

二至丸 HPLC 指纹图谱建立

温巧巧^{1,2}, 李焕茹^{1,2}, 胡雁萍^{1,2}, 冯志毅¹, 冯素香^{1,2,3*}

(1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046; 2. 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450046; 3. 郑州市中药质量控制与评价重点实验室, 河南 郑州 450046)

摘要: **目的** 建立二至丸 HPLC 指纹图谱。**方法** 该药物 60% 甲醇提取液的分析采用 Synchronis C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 0.1% 磷酸-乙腈, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 272 nm。再进行聚类分析、主成分分析、偏最小二乘法分析。**结果** 10 批样品 HPLC 指纹图谱中有 34 个共有峰, 指出其中 13 个, 相似度均在 0.950 以上。各批样品聚为 2 类, 3 个主成分可代表变量数据 91.8% 的信息, 5、12、17、32、20、23、26 号峰是质量差异标志物。**结论** 该方法专属性强, 稳定性、重复性好, 可以用于二至丸的质量评价。

关键词: 二至丸; HPLC 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 偏最小二乘法分析

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)01-0199-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.01.036

二至丸出自《医方集解》, 由酒女贞子、墨旱莲等量配伍而成, 归肝、肾经, 具有滋肝肾、补阴血、壮筋骨、乌须发功效^[1], 是平肝补肾的经典方剂, 素有“清上补下第一方”之称^[2], 广泛用于治疗帕金森综合征^[3]、肝肾阴虚^[4-7]、结肠癌^[8]、骨质疏松^[9]、妇科^[10]、脱发^[11-12]等疾病。目前, 关于二至丸的研究大多集中在女贞子特征性成分特女贞苷及非特征性成分齐墩果酸、熊果酸含量测定方面^[13-14], 但对其整体信息把握不全面。因此, 本实验建立二至丸 HPLC 指纹图谱, 并进行聚类分析、主成分分析、偏最小二乘法分析, 以期为该制剂质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器 U3000 高效液相色谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Venusil XBP C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 天津博纳艾杰尔科技有限公司); ME204E (万分之一)、XP205 (十万分之一) 电子天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); KQ-700DE 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q POD 超纯水仪 (德国 Merck 公司); HH-S4 水浴锅 (巩义市予华仪器有限责任公司)。

1.2 试剂与药物 二至丸购自江西仁丰药业有限公司 (编号 S1~S8)、江西药都樟树制药有限公司 (编号 S9、S10)。酪醇 (批号 MUST-16041802, 纯度 98.96%)、羟基酪醇 (批号 MUST-14060402, 纯度 ≥98%)、红景天苷 (批号 MUST-16041802, 纯度 98.96%)、特女贞苷 (批号 MUST-16021904, 纯度 98.01%)、木犀草苷 (批号 MUST-14060918, 纯度 ≥98%)、松果菊苷 (批号 MUST-17030701, 纯度 98.88%)、橄榄苦苷 (批号 MUST-16052512, 纯度 99.72%)、蟛蜞菊内酯 (批号

PJ0629RA13, 纯度 ≥98%)、木犀草素 (批号 MUST-14050411, 纯度 ≥98%)、芹菜素-7-O-葡萄糖苷 (批号 CHB-D-009, 纯度 ≥98%)、芸香苷 (批号 MUST-16031712, 纯度 98.87%) 对照品均购于成都曼斯特生物科技有限公司; 女贞苷 G13 (批号 YL2014062501, 纯度 ≥98%) 对照品购于上海一林生物科技有限公司; 蒙花苷 (111528-201505, 纯度 ≥98%) 对照品购于中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈为色谱纯; 磷酸为分析纯; 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Synchronis C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 0.1% 磷酸 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 90%~82% A; 10~15 min, 82%~78% A; 15~20 min, 78%~74% A; 20~25 min, 74%~70% A; 25~40 min, 70%~58% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25℃; 检测波长 272 nm; 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量, 加入甲醇制成每 1 mL 分别含酪醇 0.520 mg、羟基酪醇 0.516 mg、红景天苷 0.715 mg、特女贞苷 1.001 mg、木犀草苷 0.490 mg、松果菊苷 0.688 mg、橄榄苦苷 0.486 mg、蟛蜞菊内酯 0.508 mg、木犀草素 0.512 mg、芹菜素-7-O-葡萄糖苷 0.813 mg、女贞苷 G13 0.727 mg、芸香苷 0.521 mg、蒙花苷 0.573 mg 的溶液, 即得。

2.3 供试品溶液制备 精密称取本品粉末 1 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 60% 甲醇 25 mL, 加热回流提取 1 h, 放冷, 60% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

收稿日期: 2021-04-16

作者简介: 温巧巧 (1996—), 女, 硕士, 从事中药质量分析与评价研究。E-mail: 2994152052@qq.com

* 通信作者: 冯素香 (1971—), 女, 博士, 教授, 从事中药质量分析与新药研究。E-mail: fengsx221@163.com

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取供试品溶液（S1）适量，在“2.1”项色谱条件下进样测定6次，以特女贞苷（17号峰）为参照，测得各共有峰相对保留时间RSD均小于2.0%，相对峰面积RSD均小于3.0%，表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取供试品溶液（S1）6份，在“2.1”项色谱条件下进样测定，以特女贞苷（17号峰）为参照，测得各共有峰相对保留时间RSD均小于1.0%，相对峰面积RSD均小于3.0%，表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取供试品溶液（S1）适量，于0、2、4、8、12、24 h在“2.1”项色谱条件下进样测定，以特女贞苷（17号峰）为参照，测得各共有峰相对保留时间RSD均小于1.2%，相对峰面积的RSD均小于3.0%，表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.5 图谱生成及相似度评价 取10批样品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，以样品S1色谱图为参照，采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”（2004A版）进行色谱峰匹配，结果见图1~3，共标定34个共有峰，与对照品比对后指出其中13个，分别为羟基酪醇（4号峰）、红景天苷（5号峰）、酪醇（9号峰）、松果菊苷（12号峰）、木犀草苷（16号峰）、特女贞苷（17号峰）、女贞苷G13（20号峰）、芹菜素-7-O-葡萄糖苷（22号峰）、芸香苷（23号峰）、橄榄苦苷（24号峰）、蒙花苷（26号峰）、木犀草素（31号峰）、蟛蜞菊内酯（32号峰）。选择17号峰（特女贞苷）作为参照，得到10批样品相对峰面积，见表1，相似度分别为0.974、0.982、0.971、0.986、0.979、0.978、0.976、0.983、0.993、0.991，表明其成分组成比较相似。

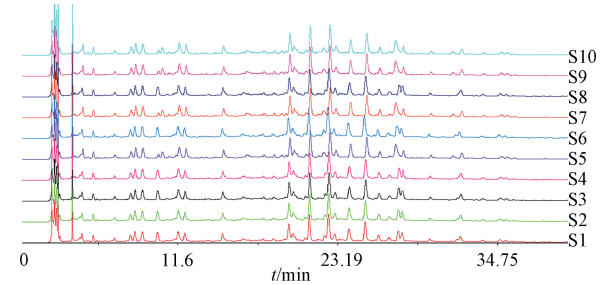


图1 10批样品HPLC指纹图谱

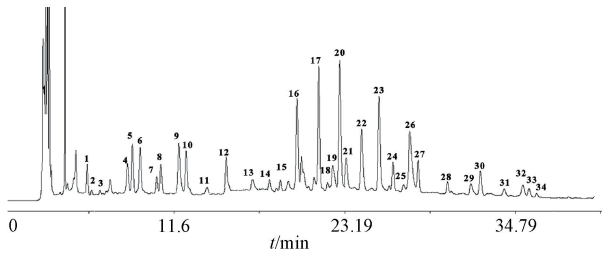
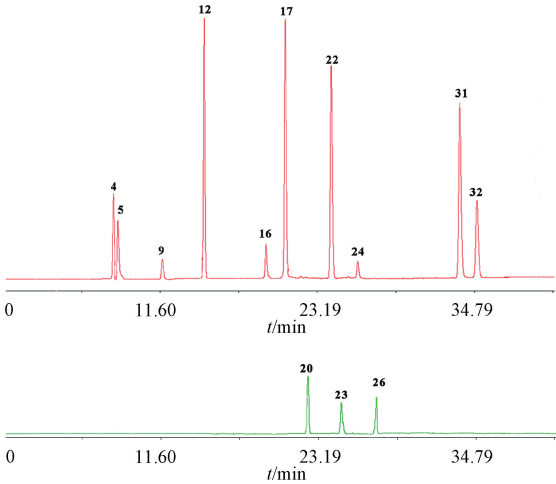


图2 二至丸HPLC对照指纹图谱

2.6 聚类分析 选择特女贞苷（17号峰）作为参照，共有峰相对峰面积作为变量，采用SPSS 25.0软件进行聚类分析，设定判别距离为10，结果见图4。由此可知，10批



4. 羟基酪醇 5. 红景天苷 9. 酪醇 12. 松果菊苷 16. 木犀草苷 17. 特女贞苷 20. 女贞苷G13 22. 芹菜素-7-O-葡萄糖苷 23. 芸香苷 24. 橄榄苦苷 26. 蒙花苷 31. 木犀草素 32. 蟛蜞菊内酯

图3 对照品溶液HPLC色谱图

样品聚为2类，S9、S10为第1类，S1~S8为第2类，表明2个厂家样品具有差异性，但同一厂家相似性较好，与相似度分析结果一致。

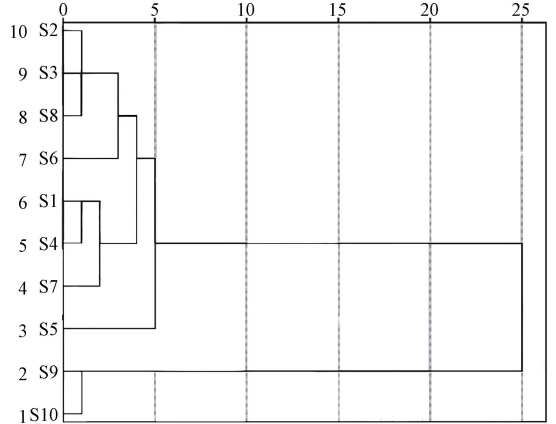


图4 10批样品聚类分析图

2.7 主成分分析 选择特女贞苷（17号峰）作为参照，共有峰相对峰面积作为变量，采用SIMCA13.0软件进行主成分分析，共提取3个主成分，测得 R^2X 为0.918， Q^2 为0.710，即可代表变量数据91.8%的信息，预测能力达71.0%，并且两者均高于0.5，表明该模型具有较高的稳定性和预测性，得分图见图5。由此可知，2个厂家样品分布在不同区域，表明厂家之间存在一定差异，但均比较集中，即样品组内差异较小。

2.8 偏最小二乘法判别分析 为了找出对分类影响比较大的变量，本实验建立正交偏最小二乘法判别分析模型，测得3个主成分 R^2X 为0.762， R^2Y 为0.997， Q^2 为0.962，均大于0.5，并且 R^2 、 Q^2 差距小于0.2，表明该模型具有较高的稳定性和预测率^[15-16]，得分图见图6，可知分为左右2组，与图5一致。再对模型进行20次置换检验，结果见图7，可知 R^2 、 Q^2 右侧最高点相交于1，并且后者拟合

表 1 10 批样品共有峰相对峰面积

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.268 6	0.268 2	0.261 8	0.261 0	0.264 4	0.262 0	0.267 4	0.265 9	0.260 9	0.261 7
2	0.089 7	0.090 7	0.093 9	0.094 2	0.091 9	0.092 7	0.089 5	0.093 1	0.089 0	0.092 7
3	0.052 3	0.053 2	0.054 4	0.051 9	0.051 9	0.052 9	0.051 7	0.053 9	0.051 3	0.052 7
4	0.061 2	0.060 9	0.062 5	0.063 3	0.061 5	0.061 9	0.068 0	0.068 8	0.078 9	0.079 0
5	0.383 5	0.383 0	0.382 3	0.383 8	0.383 4	0.382 3	0.381 7	0.382 6	0.482 6	0.484 2
6	0.452 1	0.450 3	0.440 1	0.440 8	0.441 3	0.438 7	0.445 1	0.444 2	0.434 3	0.434 8
7	0.473 0	0.473 0	0.488 1	0.484 4	0.480 9	0.485 3	0.482 8	0.487 2	0.502 4	0.529 5
8	0.118 0	0.108 0	0.111 0	0.112 7	0.113 7	0.110 0	0.115 7	0.113 2	0.113 5	0.112 1
9	0.569 1	0.568 3	0.569 5	0.567 9	0.564 1	0.564 1	0.562 5	0.563 8	0.605 1	0.624 7
10	0.353 3	0.352 3	0.363 9	0.366 0	0.357 5	0.361 4	0.360 3	0.361 5	0.368 7	0.364 6
11	0.127 4	0.125 5	0.127 8	0.128 5	0.122 7	0.126 9	0.142 6	0.131 5	0.138 7	0.132 4
12	0.396 2	0.394 8	0.397 6	0.398 7	0.394 1	0.396 9	0.391 6	0.397 2	0.413 4	0.410 7
13	0.212 7	0.222 6	0.228 6	0.228 3	0.217 5	0.227 6	0.221 4	0.225 5	0.242 6	0.238 2
14	0.177 7	0.176 9	0.180 2	0.180 1	0.175 5	0.179 6	0.178 7	0.180 3	0.190 9	0.187 4
15	0.159 7	0.155 7	0.158 3	0.157 0	0.153 4	0.158 0	0.161 7	0.547 0	0.209 8	0.205 1
16	0.778 5	0.778 2	0.780 5	0.780 2	0.774 9	0.775 6	0.772 8	0.775 8	0.608 3	0.595 6
17	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
18	0.134 2	0.134 0	0.141 5	0.140 9	0.142 3	0.142 5	0.144 1	0.143 7	0.148 9	0.149 5
19	0.285 2	0.282 4	0.282 9	0.282 9	0.286 4	0.278 5	0.282 1	0.283 7	0.269 8	0.273 3
20	1.216 9	1.216 2	1.207 9	1.205 7	1.204 0	1.205 3	1.207 8	1.205 6	1.316 7	1.308 8
21	0.183 4	0.191 5	0.194 4	0.194 8	0.192 0	0.192 9	0.181 0	0.195 2	0.215 6	0.206 2
22	0.539 8	0.541 5	0.536 5	0.535 4	0.537 1	0.532 9	0.532 1	0.535 2	0.551 9	0.546 7
23	0.838 5	0.838 2	0.830 5	0.830 2	0.834 9	0.835 6	0.832 8	0.835 8	0.848 3	0.845 6
24	0.342 6	0.356 7	0.351 7	0.348 8	0.350 2	0.348 5	0.346 0	0.353 5	0.370 9	0.364 6
25	0.089 1	0.098 9	0.084 5	0.086 5	0.084 5	0.089 2	0.091 0	0.092 7	0.091 1	0.094 4
26	0.095 1	0.094 9	0.094 1	0.094 9	0.090 1	0.094 9	0.101 1	0.100 2	0.117 6	0.109 9
27	0.520 8	0.525 9	0.520 5	0.529 0	0.481 5	0.524 4	0.515 3	0.522 0	0.569 4	0.560 9
28	0.140 1	0.134 6	0.143 1	0.141 0	0.138 0	0.141 2	0.144 0	0.146 6	0.152 8	0.159 6
29	0.073 6	0.070 7	0.072 3	0.074 8	0.074 1	0.074 9	0.075 6	0.076 0	0.045 2	0.046 4
30	0.258 6	0.266 8	0.297 4	0.300 5	0.261 1	0.259 8	0.301 8	0.285 0	0.324 4	0.327 9
31	0.076 3	0.077 8	0.082 7	0.084 2	0.079 8	0.081 0	0.094 0	0.109 7	0.135 0	0.138 8
32	0.199 3	0.198 0	0.204 4	0.203 3	0.205 0	0.202 2	0.201 2	0.206 5	0.249 8	0.245 8
33	0.084 4	0.085 2	0.082 4	0.082 1	0.081 2	0.083 5	0.094 2	0.086 0	0.116 9	0.116 2
34	0.026 8	0.026 8	0.025 7	0.025 4	0.026 7	0.025 5	0.031 8	0.025 4	0.071 0	0.070 2

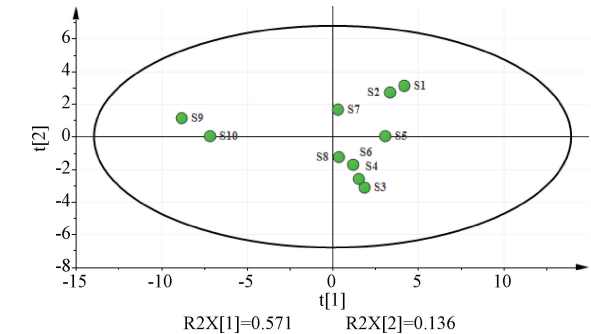


图 5 10 批样品主成分分析得分图

直线与 Y 轴纵坐标的截距为-0.569，表明该模型可用于分析 10 批样品组间差异。

为了确定引起差异的主要物质，本实验进一步筛选变量重要性 (VIP) >1 的成分^[17]，并采用 t-test 进行统计学分析，以 VIP>1、P<0.05 者为差异成分，结果见表 2、图 8~9。由此可知，共存在 7 种差异成分，分别为特女贞苷、红景天苷、蟛蜞菊内酯、松果菊苷、女贞苷 G13、芸香苷、

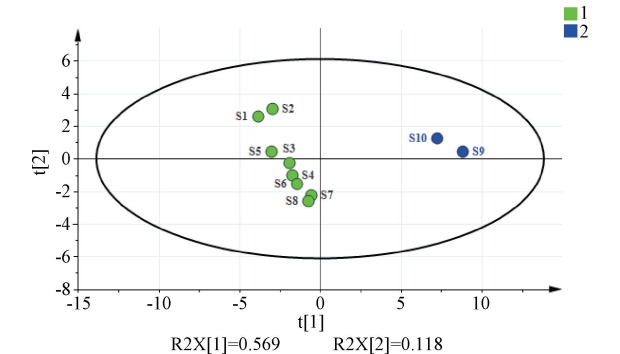


图 6 10 批样品偏最小二乘法判别分析得分图

蒙花苷，可认为是二至丸差异标志物。

3 讨论

3.1 HPLC 指纹图谱相似度分析 本实验以 17 号峰（特女贞苷）为参照，标定了 34 个共有峰，并指出其中 13 个。10 批样品相似度为 0.971~0.993，表明不同厂家生产的二至丸相关性良好。

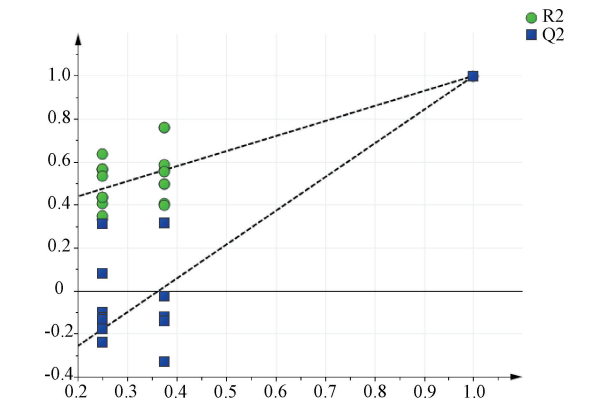


图 7 10 批样品偏最小二乘法判别分析置换检验图

表 2 差异成分筛选结果

差异成分	不同厂家		差异成分	不同厂家	
	VIP	P		VIP	P
红景天苷	1.644 85	0.003 6	松果菊苷	1.082 48	0.028 9
特女贞苷	1.336 60	0.000 8	女贞苷 G13	1.233 19	0.003 9
芸香苷	2.025 69	0.037 8	蒙花苷	1.014 84	0.008 4
蟛蜞菊内酯	1.085 05	0.017 5			

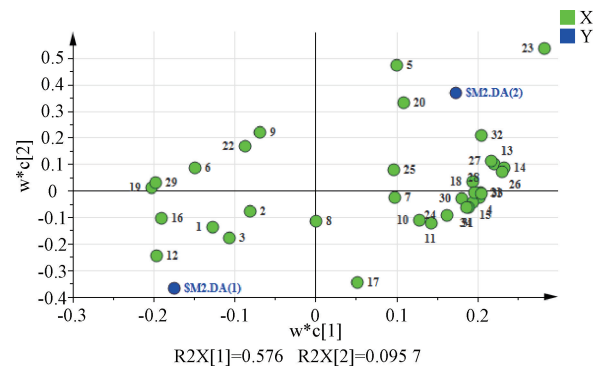


图 8 10 批样品偏最小二乘法判别分析载荷图

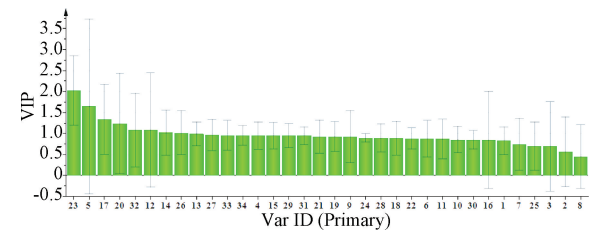


图 9 偏最小二乘法判别分析变量权重图

3.2 化学模式识别 聚类分析、主成分分析结果表明，不同厂家生产的二至丸质量存在差异。偏最小二乘法分析结果表明，5 号峰（红景天苷）、12 号峰（松果菊苷）、17 号峰（特女贞苷）、32 号峰（蟛蜞菊内酯）、20 号峰（女贞苷 G13）、23 号峰（芸香苷）、26 号峰（蒙花苷）是引起样品组间差异的主要变量，提示厂家在生产过程中要注意上述成分含量，进而提升二至丸整体稳定性，这也说明仅通过测定特女贞苷含量无法全面控制该制剂质量，需结合 HPLC 指纹图谱作进一步完善。

参考文献：

[1] 蔡秀江,黄美艳,丁安伟,等.二至丸考源及药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(23):272-275.

[2] 刘春柳,王炳权,李玲,等.基于网络药理学的二至丸作用机制研究[J].中国医院用药评价与分析,2018,18(8):1027-1030.

[3] 吴欣芳,段冷昕,高晓乐,等.二至丸对 MPTP 所致帕金森病小鼠的防治作用研究[J].中国中药杂志,2019,44(19):4219-4224.

[4] 庄莉,翟园园,姚卫峰,等.基于网络药理学的二至丸对肾脏保护作用的机制研究[J].药科学报,2019,54(5):877-885.

[5] 徐佳,刘其南,翟园园,等.二至丸抗大鼠肾细胞衰老的 GC-MS 代谢组学研究[J].南京中医药大学学报,2019,35(4):458-464.

[6] 翟园园,刘其南,徐佳,等.基于网络药理学的二至丸保肝作用机制研究[J].药科学报,2018,53(4):567-573.

[7] 李跃文,王博龙.二至丸抗肝纤维化活性成分-靶点-通路的网络预测[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(11):201-205.

[8] 余文燕,王国娟,王桦影,等.二至丸对结肠癌细胞增殖及凋亡作用的实验研究[J].中药药理与临床,2018,34(4):11-15.

[9] 徐森楠,庄莉,翟园园,等.基于网络药理学研究二至丸防治骨质疏松症的物质基础与作用机制[J].中国药理学杂志,2018,53(22):1913-1920.

[10] 申芳超.二至丸合左归丸治疗青春期崩漏 53 例疗效观察[J].吉林中医药,2008,28(1):39.

[11] 贾华魁,李琳婕.二至丸加味联合非那雄胺治疗脂溢性脱发的临床研究[J].现代中西医结合杂志,2019,28(24):2684-2686;2724.

[12] 樊倩雯.桂枝加龙骨牡蛎汤合二至丸治疗斑秃的临床疗效观察及皮肤镜下观察结果[D].武汉:湖北中医药大学,2019.

[13] 刘菊,白明学,张红伟,等.反相高效液相色谱法测定二至丸中特女贞苷的含量[J].中南药学,2016,14(2):194-196.

[14] 范妙璇,谭成,王萌萌,等.基于 5 种特征性成分综合评价二至丸的质量[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(17):88-92.

[15] 陈宇,梁爽,卢森华,等.HPLC 指纹图谱结合化学计量学评价不同产地山苦荬的药材质量[J].中药材,2020,43(10):2477-2481.

[16] 罗佳,黄圆圆,周欣,等.乙肝宁颗粒高效液相色谱指纹图谱研究[J].中药新药与临床药理,2020,31(9):1104-1109.

[17] 韩忠耀,张涛,李燕,等.不同采收期大接骨丹 HPLC 指纹图谱建立及化学模式识别[J].中成药,2021,43(2):547-551.