

本文引用: 吴淑辉, 刘娟, 肖婷, 郑慧娥, 朱明芳. 丹润方 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(10): 1822-1829.

丹润方 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定研究

吴淑辉¹, 刘娟¹, 肖婷¹, 郑慧娥¹, 朱明芳^{1,2*}

1. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南长沙 410005;

2. 血管生物学与转化医学湖南省重点实验室, 湖南长沙 410208

[摘要] **目的** 建立丹润方指纹图谱并测定没食子酸、绿原酸、鞣花酸含量, 为其质量控制提供依据。**方法** 采用 Agilent 5 TC-C₁₈ 色谱柱, 以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 315 nm, 柱温 30 °C; 通过相似度评价, 结合主成分分析及偏最小二乘法-判别分析对 15 批丹润方指纹图谱进行分析评价, 并对 3 种指标成分进行定量测定。**结果** 建立了 15 批丹润方指纹图谱, 共标定 19 个共有峰, 各批次的相似度均大于 0.9; 没食子酸、绿原酸、鞣花酸在各自线性范围内线性关系良好; 15 批丹润方中没食子酸、绿原酸、鞣花酸的质量分数为 0.219~1.100、0.168~0.445、0.418~3.077 mg/g。**结论** 建立的丹润方指纹图谱及多成分定量测定方法简单、准确、重现性较好, 可用于丹润方整体质量评价。

[关键词] 丹润方; 指纹图谱; 质量评价; 没食子酸; 绿原酸; 鞣花酸

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.10.011

HPLC fingerprint and multi-component content determination of Danrun Formula

WU Shuhui¹, LIU Juan¹, XIAO Ting¹, ZHENG Hui'e¹, ZHU Mingfang^{1,2*}

1. The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China; 2. Key Laboratory of Vascular Biology and Translational Medicine, Education Department of Hunan Province, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To establish the HPLC fingerprint of Danrun Formula and determine the content of gallic acid, chlorogenic acid, and ellagic acid so as to provide basis for its quality control. **Methods** Agilent 5 TC-C₁₈ chromatographic column was used, with the mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution for gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 315 nm, and the column temperature was 30 °C. Through similarity evaluation, combined with principal component analysis and partial least squares-discriminant analysis, the fingerprints of 15 batches of Danrun Formula were analyzed and evaluated, and the 3 index components were quantitatively determined. **Results** The fingerprints of 15 batches of Danrun Formula were established with 19 common peaks, and the similarity of each batch was greater than 0.9. Gallic acid, chlorogenic acid, and ellagic acid had good linear relationships within their respective linear ranges. The mass fractions of gallic acid, chlorogenic acid, and ellagic acid in 15 batches of Danrun Formula were 0.219-1.100, 0.168-0.445, and 0.418-3.077 mg/g, respectively. **Conclusion** The established fingerprint and multi-component quantitative determination method of Danrun Formula are simple, accurate, and reproducible, which can be used for the overall quality evaluation of Danrun Formula.

[Keywords] Danrun Formula; fingerprint; quality evaluation; gallic acid; chlorogenic acid; ellagic acid

[收稿日期] 2023-03-17

[基金项目] 湖南省自然科学基金科药联合基金项目(2020JJ9051); 湖南省卫生健康委员会科研项目(202202124772)。

[第一作者] 吴淑辉, 女, 硕士, 研究方向: 中医药防治皮肤病。

[通信作者] * 朱明芳, 女, 二级教授, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail: cszmf@163.com。

丹润方(专利号:201510648346.6)是湖南省中医院朱明芳教授在国家级名中医欧阳恒教授“以皮治皮”理论指导下,结合其近30年临床工作经验,对多种药物进行反复筛选化裁,最终形成的一种天然中草药面膜^[1],主要由石榴皮、忍冬藤、白芷、乌梅组成,广泛用于痤疮、玫瑰痤疮、黄褐斑及色素沉着性疾病的治疗^[2-3]。现代药理学研究表明,丹润方组成具有抗菌消炎、调节皮脂代谢紊乱、抗氧化、抑制黑色素形成等作用^[2,4-5]。课题组前期研究发现,丹润方可明显降低痤疮患者皮损积分,降低痤疮患者复发率,同时因其具备美白润肤、提亮肤色功效,故名曰丹润^[6]。丹润方为湖南省科技进步奖科技成果转化产品,在湖南省中医院、衡阳市中医院等多家三甲医院广泛应用。然而,目前对于丹润方的质量控制主要集中于各单味药,尚缺乏全方整体性质量控制的方法。中药指纹图谱指中药经适当处理后,采用一定的分析方法得到的能够体现中药整体特性的图谱,能够反映中药多成分特点,整体评价中药质量,确保其内在质量的均一、稳定,可用于中药材、饮片、提取物或中间体、成方制剂的质量控制^[7]。此外,研究表明丹润方酸类成分含量丰富,是其主要的功效成分之一,绿原酸、没食子酸具有抗氧化、抗炎、抗衰老等功效^[8-9];鞣花酸可显著抑制酪氨酸酶活性,具有抗炎、抗衰老、美白等功效^[10-11]。基于此,本研究以丹润方为研究对象,建立其HPLC指纹图谱,结合化学模式识别技术分析图谱信息,并在同样的色谱条件下

测定其3种有效成分含量,将指纹图谱与多成分定量分析相结合,以期完善丹润方整体质量评价方法,为丹润方的开发与利用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);Agilent 5 TC-C₁₈型色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm,美国安捷伦科技有限公司);JY5002型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);AL204型万分之一天平、XSR205DU型十万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];SB-3200D型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);DHG-9145A型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);HH-S8型数显恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司)。

1.2 主要试剂及药物

乙腈(色谱纯,批号:32Y1612PT,美国ASC Grace化工科技有限公司);甲醇(分析纯,批号:20190328)、磷酸(分析纯,批号:20210220)均购自国药集团化学试剂有限公司;鞣花酸(纯度88.8%,批号:111959-201903)、没食子酸(纯度91.5%,批号:110831-201906)、绿原酸(纯度96.1%,批号:110753-202018)均购自中国食品药品检定研究院。15批丹润方组成药物均由湖南中医药大学聂孝平教授鉴定,其药物来源见表1。

表1 丹润方药材来源

药材	产地	批号
白芷	安徽	20210801,20201202,20201202
	河南	201101
	四川	Z2107001,20121908,21071411,21071411,21090809,21071411,20210601,20111844
	浙江	210701,2021071301,200908
乌梅	浙江	200601,200401,201202,201701,200401,210601,200401
	四川	A210730,A210807,200214,Z2108001,202004176,21030308,21060305,21030308
石榴皮	安徽	21022312,20210623,210101
	河北	2003002,201026,200918
	湖南	2019032107,190801,201032107
	陕西	20052910,20052910,17122007
	江苏	18101106,200814002,19060901
忍冬藤	湖北	2018092812
	湖南	20210501,2021060901,2020070205,20051313,2021080307,210101,200701
	河南	21070905,210801,21070905
	山东	191203,191229,201226,210616002

2 方法与结果

2.1 15 批丹润方浸膏样品制备

对制备的 15 批白芷、乌梅、石榴皮、忍冬藤中药饮片进行编号并排序,通过随机数字表法组合出 15 批全方,制备 15 批丹润方样品,见表 2。每批按照原处方称取白芷 10 g、乌梅 10 g、石榴皮 10 g、忍冬藤 10 g,加入 8 倍水浸泡 30 min,加热至沸腾,60 ℃保持微沸回流提取 30 min,过滤;滤渣加 6 倍水加热至沸腾,60 ℃保持微沸回流提取 30 min,过滤合并 2 次滤液,浓缩至约 100 mL,于恒温水浴锅中水浴蒸干后,置真空干燥箱干燥,得丹润方浸膏备用。

2.2 对照品及供试品溶液制备

混合对照品溶液制备:精密称定各对照品适量,加入甲醇,制成含没食子酸、鞣花酸、绿原酸 0.400、0.540、0.044 mg/mL 的混合对照品储备液。

供试品溶液制备:精密称定丹润方浸膏 0.500 0 g,置具塞锥形瓶中,加入 25 mL 60%甲醇,超声 30 min,放冷,60%甲醇补足质量,摇匀,过 0.45 μm 滤膜,即得。

2.3 色谱条件

采用 Agilent 5 TC-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),以乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~10 min,90% A,10% B;10~25 min,10% A,90% B;25~45 min,12% A,88% B;45~60 min,20% A,80% B;60~65 min,40% A,60% B;65~70 min,

表 2 15 批丹润方样品对应饮片批次

批次	批号			
	白芷	乌梅	石榴皮	忍冬藤
S1	210701	21030308	17122007	191229
S2	200908	21030308	200814002	210616002
S3	21071411	200214	20052910	210801
S4	21071411	200401	2019032107	210101
S5	20210801	200601	21022312	2018092812
S6	20210601	Z2108001	19060901	21070905
S7	20121908	210601	200918	2021080307
S8	201101	201701	2003002	2020070205
S9	Z2107001	200401	201026	20051313
S10	2021071301	21060305	18101106	201226
S11	20201202	201202	210101	2021060901
S12	20201202	200401	20210623	20210501
S13	21071411	A210730	190801	200701
S14	21090809	A210807	201032107	21070905
S15	20111844	202004176	17122007	191203

50% A,50% B);流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长 315 nm;柱温 30 ℃;进样量 10 μL。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度考察 随机选取 1 批丹润方浸膏,按“2.2”方法制备供试品溶液,连续进样 6 次,以峰面积较大、分离度较好的 9 号峰作为参照,计算相对保留时间的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)范围为 0.039%~0.153%,相对峰面积 RSD 范围为 0.293%~4.109%,表明仪器精密度良好。详见表 3—4。

表 3 丹润方相对峰面积精密度考察

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	1.111	0.605	0.219	0.406	0.470	1.344	0.122	0.487	1.000	0.996	0.484	0.174	0.231	1.935	0.319	0.272	0.210	0.677	0.264
2	1.112	0.604	0.219	0.406	0.468	1.349	0.123	0.487	1.000	0.993	0.484	0.175	0.230	1.936	0.320	0.264	0.209	0.677	0.263
3	1.099	0.604	0.217	0.403	0.468	1.341	0.120	0.484	1.000	0.991	0.482	0.176	0.231	1.926	0.318	0.262	0.210	0.674	0.263
4	1.100	0.606	0.219	0.403	0.472	1.344	0.122	0.486	1.000	0.992	0.532	0.175	0.231	1.932	0.317	0.264	0.209	0.676	0.264
5	1.091	0.604	0.218	0.403	0.465	1.339	0.122	0.484	1.000	0.990	0.479	0.175	0.230	1.930	0.317	0.267	0.208	0.674	0.263
6	1.088	0.603	0.219	0.405	0.467	1.347	0.123	0.487	1.000	0.988	0.483	0.178	0.231	1.928	0.316	0.264	0.208	0.672	0.263
平均值	1.100	0.604	0.218	0.404	0.468	1.344	0.122	0.486	1.000	0.992	0.491	0.176	0.231	1.931	0.318	0.266	0.209	0.675	0.263
RSD/%	0.903	0.176	0.339	0.364	0.499	0.277	1.085	0.293	0.000	0.265	4.109	0.747	0.308	0.195	0.518	1.431	0.348	0.278	0.255

表 4 丹润方相对保留时间精密度考察

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	0.154	0.345	0.372	0.452	0.547	0.632	0.675	0.690	1.000	1.034	1.126	1.707	1.774	2.212	2.482	2.529	2.739	2.770	2.808
2	0.154	0.345	0.371	0.452	0.546	0.631	0.674	0.689	1.000	1.033	1.126	1.706	1.774	2.211	2.481	2.527	2.738	2.769	2.806
3	0.154	0.344	0.372	0.451	0.546	0.631	0.674	0.689	1.000	1.033	1.126	1.705	1.773	2.210	2.475	2.526	2.736	2.767	2.804
4	0.153	0.344	0.371	0.451	0.546	0.630	0.673	0.688	1.000	1.032	1.125	1.703	1.771	2.206	2.475	2.521	2.731	2.761	2.799
5	0.154	0.344	0.371	0.451	0.546	0.631	0.674	0.689	1.000	1.033	1.125	1.705	1.773	2.210	2.479	2.526	2.735	2.766	2.803
6	0.153	0.344	0.371	0.450	0.546	0.630	0.673	0.688	1.000	1.032	1.124	1.703	1.771	2.207	2.475	2.521	2.730	2.761	2.798
平均值	0.154	0.344	0.371	0.451	0.546	0.631	0.674	0.689	1.000	1.033	1.125	1.705	1.773	2.209	2.478	2.525	2.735	2.766	2.803
RSD/%	0.153	0.136	0.087	0.132	0.039	0.109	0.068	0.093	0.000	0.065	0.066	0.093	0.075	0.108	0.137	0.123	0.133	0.140	0.144

2.4.2 重复性考察 随机选取1批丹润方浸膏,按“2.2”项下方法平行制备供试品溶液6份,按“2.3”项下色谱条件进样,记录色谱图,以峰面积较大、分离度较好的9号峰作为参照,计算各共有峰的相对保留时间RSD范围为0.088%~0.378%,相对峰面积RSD范围为0.125%~6.602%。详见表5—6。

2.4.3 稳定性考察 取同一供试品溶液按“2.3”项下色谱方法于0、2、4、8、12、24 h进样,记录色谱图,以峰面积较大、分离度较好的9号峰作为参照,计算各共有峰的相对保留时间RSD范围为0.059%~0.551%,相对峰面积RSD范围为1.534%~5.872%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。详见表7—8。

2.5 指纹图谱建立及相似度评价

取S1~S15批丹润方浸膏样品,按“2.2”项制备相应供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件进样检测,记录色谱图,精密吸取没食子酸、绿原酸、鞣花酸的对照品溶液,按“2.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,标定峰3为没食子酸,峰10为绿原酸,峰14为鞣花酸。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)进行分析,选定参照图谱后,采用中位数法,时间窗宽度设置为0.3 min,经多点校正后,进行Mark谱匹配,生成丹润方共有模式的对照指纹图谱(图1),共

标定丹润方19个共有峰,15批样品指纹图谱与对照图谱的相似度为0.938~0.990,各批次间样品相似度均>0.8(表9),表明各批次相似度较高,所建立的指纹图谱可以较全面地反映丹润方整体成分。

2.6 化学计量学分析

2.6.1 聚类分析 将15批丹润方共有峰面积导入SPSS 22.0,以组间均连法及平方距离作为度量标准对其进行聚类分析,结果显示,当度量距离为15时,15批丹润方可以分为两类:其中S2、S3为一类,余下批次聚为一类(图2)。这表明即使在指纹图谱相似度较好的情况下,不同批次药材质量仍存在一定差异。

2.6.2 主成分分析 将15批丹润方共有峰面积导入SIMCA 14.1软件进行主成分分析,得到15批丹润方得分图及载荷图(图3—4),从得分图可以看出15批样品可以分为两类,其中S2、S3聚为一类,余下聚为一类,与聚类分析结果一致,从载荷图可以看出成分3、12、7、14对丹润方质量影响较大。

2.6.3 差异成分分析 为进一步明确对样品分类贡献较大的成分,采用正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)拟合模型,结合变量重要性投影(variable importance projected value, VIP)筛选出导致

表5 丹润方相对峰面积精密度考察

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	0.737	0.705	0.241	0.460	0.470	0.961	0.138	0.272	1.000	0.497	0.268	0.218	0.180	2.106	0.109	0.150	0.125	0.472	0.183
2	0.875	0.722	0.239	0.486	0.547	0.975	0.138	0.288	1.000	0.504	0.288	0.220	0.179	2.162	0.115	0.139	0.136	0.460	0.188
3	0.758	0.708	0.242	0.462	0.465	0.968	0.135	0.275	1.000	0.496	0.259	0.220	0.175	2.122	0.108	0.145	0.125	0.476	0.185
4	0.788	0.705	0.241	0.460	0.470	0.961	0.138	0.272	1.000	0.497	0.268	0.218	0.180	2.106	0.109	0.150	0.125	0.472	0.183
5	0.848	0.753	0.259	0.497	0.508	1.035	0.146	0.294	1.000	0.537	0.279	0.229	0.178	2.185	0.129	0.156	0.148	0.520	0.203
6	0.816	0.728	0.244	0.487	0.489	0.993	0.136	0.290	1.000	0.509	0.265	0.226	0.202	2.165	0.122	0.141	0.136	0.493	0.197
平均值	0.804	0.720	0.244	0.475	0.492	0.982	0.139	0.282	1.000	0.507	0.271	0.222	0.182	2.141	0.115	0.147	0.132	0.482	0.190
RSD/%	6.602	2.575	2.949	3.529	6.418	2.905	2.754	3.628	0.000	3.087	0.268	0.218	0.180	2.106	0.109	0.150	0.125	0.472	0.183

表6 丹润方相对保留时间精密度考察

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	0.155	0.347	0.373	0.454	0.547	0.634	0.677	0.693	1.000	1.038	1.132	1.711	1.781	2.219	2.495	2.541	2.754	2.785	2.824
2	0.155	0.347	0.372	0.455	0.546	0.636	0.676	0.694	1.000	1.040	1.134	1.717	1.785	2.227	2.506	2.553	2.767	2.800	2.839
3	0.154	0.345	0.372	0.452	0.547	0.632	0.675	0.690	1.000	1.036	1.128	1.705	1.774	2.208	2.482	2.527	2.738	2.769	2.807
4	0.155	0.347	0.373	0.455	0.547	0.635	0.677	0.694	1.000	1.039	1.133	1.714	1.783	2.224	2.498	2.545	2.758	2.790	2.828
5	0.155	0.347	0.373	0.455	0.547	0.635	0.677	0.694	1.000	1.039	1.132	1.713	1.783	2.223	2.500	2.546	2.759	2.791	2.829
6	0.155	0.347	0.373	0.455	0.547	0.635	0.677	0.694	1.000	1.039	1.133	1.714	1.783	2.224	2.498	2.545	2.758	2.790	2.828
平均值	0.155	0.347	0.373	0.454	0.547	0.635	0.676	0.693	1.000	1.039	1.132	1.712	1.782	2.221	2.497	2.543	2.755	2.788	2.826
RSD/%	0.363	0.302	0.184	0.266	0.088	0.211	0.136	0.203	0.000	0.151	0.165	0.236	0.223	0.303	0.328	0.335	0.351	0.371	0.378

表 7 丹润方相对峰面积稳定性考察

时间/h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
0	2.040	1.383	0.375	1.116	0.377	2.052	0.209	1.034	1.000	2.812	0.613	0.314	0.493	2.404	0.335	0.581	0.477	1.296	0.528
2	2.164	1.434	0.386	1.163	0.373	2.078	0.220	1.033	1.000	2.931	0.634	0.326	0.517	2.504	0.347	0.605	0.490	1.350	0.548
4	2.135	1.428	0.386	1.163	0.373	2.078	0.218	1.034	1.000	2.928	0.633	0.325	0.514	2.502	0.344	0.603	0.484	1.348	0.549
8	1.914	1.363	0.349	1.109	0.351	2.016	0.214	0.892	1.000	2.792	0.552	0.311	0.491	2.397	0.360	0.559	0.467	1.282	0.523
12	1.917	1.374	0.370	1.106	0.369	2.007	0.209	0.987	1.000	2.794	0.593	0.313	0.493	2.405	0.332	0.582	0.467	1.283	0.525
24	1.903	1.387	0.374	1.119	0.374	2.024	0.212	1.009	1.000	2.821	0.602	0.316	0.495	2.414	0.333	0.588	0.471	1.296	0.528
平均值	2.012	1.395	0.373	1.130	0.369	2.043	0.214	0.998	1.000	2.846	0.605	0.318	0.500	2.437	0.342	0.586	0.476	1.309	0.534
RSD/%	5.872	2.099	3.630	2.348	2.546	1.534	2.167	5.524	0.000	2.299	5.058	2.017	2.345	2.086	3.122	2.908	2.026	2.397	2.238

表 8 丹润方相对保留时间稳定性考察

时间/h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
0	0.162	0.359	0.379	0.467	0.549	0.649	0.728	0.769	1.000	1.055	1.148	1.754	1.814	2.280	2.571	2.618	2.842	2.883	2.925
2	0.162	0.360	0.379	0.467	0.549	0.649	0.728	0.769	1.000	1.055	1.148	1.753	1.813	2.279	2.570	2.617	2.841	2.882	2.923
4	0.162	0.360	0.379	0.467	0.550	0.649	0.728	0.769	1.000	1.055	1.148	1.754	1.814	2.280	2.571	2.618	2.842	2.883	2.925
8	0.164	0.363	0.381	0.469	0.548	0.647	0.729	0.769	1.000	1.057	1.151	1.771	1.830	2.308	2.605	2.652	2.881	2.923	2.966
12	0.162	0.360	0.380	0.468	0.550	0.650	0.729	0.770	1.000	1.056	1.149	1.759	1.819	2.290	2.584	2.630	2.857	2.898	2.940
24	0.162	0.361	0.380	0.468	0.550	0.650	0.729	0.770	1.000	1.056	1.149	1.759	1.818	2.288	2.581	2.628	2.854	2.895	2.937
平均值	0.162	0.360	0.380	0.468	0.549	0.649	0.729	0.769	1.000	1.056	1.149	1.758	1.818	2.288	2.580	2.627	2.853	2.894	2.936
RSD/%	0.461	0.362	0.183	0.164	0.138	0.156	0.087	0.059	0.000	0.085	0.117	0.380	0.351	0.474	0.527	0.512	0.538	0.546	0.551

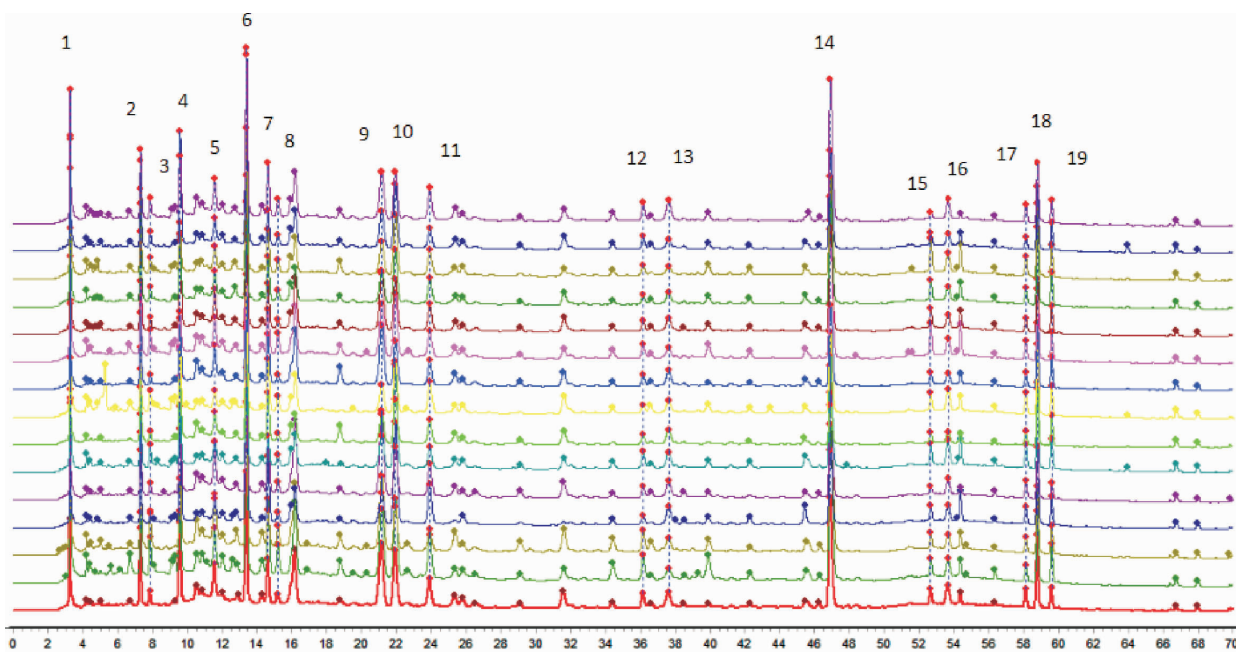


图 1 15 批样品指纹图谱

注:1~19 为共有峰,峰 3 为没食子酸,峰 10 为绿原酸,峰 14 为鞣花酸。

样品分类影响较大的差异性成分(图 5)。其中具有统计学意义且 VIP>1.0 的峰有 6 个,按 VIP 大小排列为:峰 3、峰 7、峰 12、峰 14、峰 5、峰 1、峰 9,其中峰 14 为鞣花酸。

2.7 3 种成分含量测定

2.7.1 精密度考察 精密吸取“2.2”项混合对照品

溶液,按“2.3”项色谱条件连续进样 6 次,记录色谱图,测得没食子酸、绿原酸、鞣花酸峰面积 RSD 分别为 0.26%、0.34%、0.20%,表明仪器精密度良好。

2.7.2 重复性考察 随机选取 1 批丹润方浸膏,按“2.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按“2.3”项下色谱条件进样,记录色谱图,测得没食子酸、绿原

表9 15批样品指纹图谱相似度

批次	相似度
S1	1.000
S2	0.965
S3	0.956
S4	0.920
S5	0.984
S6	0.948
S7	0.915
S8	0.955
S9	0.985
S10	0.974
S11	0.989
S12	0.970
S13	0.963
S14	0.954
S15	0.977

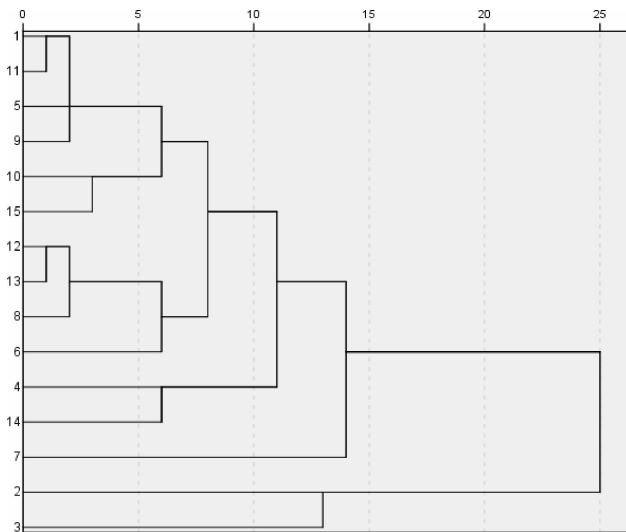


图2 15批样品聚类分析

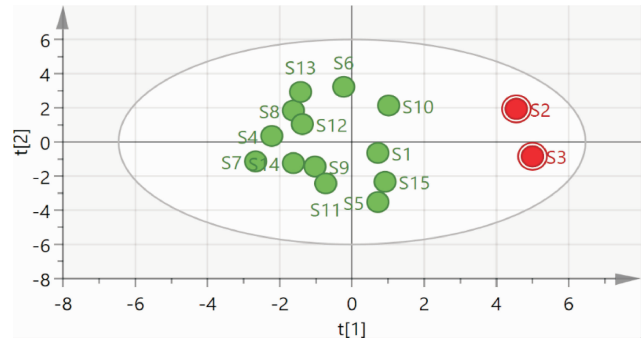


图3 15批样品得分图

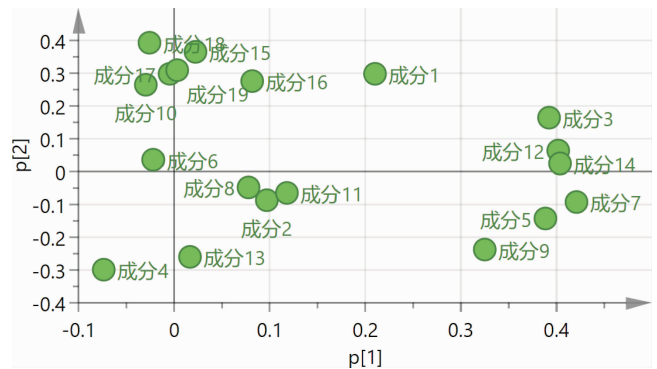


图4 15批样品载荷图

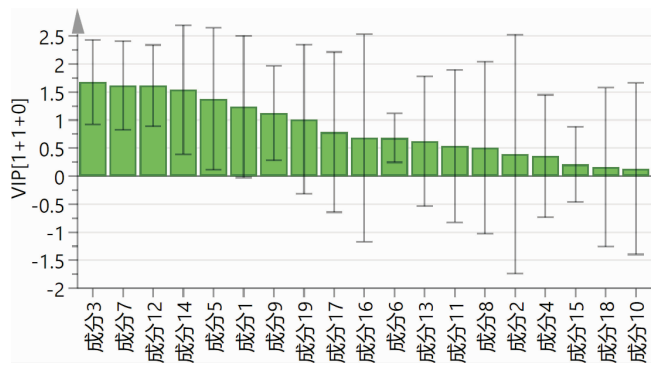


图5 VIP图

酸、鞣花酸峰面积 RSD 分别为 0.16%、0.37%、0.28%。

2.7.3 稳定性考察 取同一供试品溶液按“2.3”色谱方法于 0、2、4、8、12、24 h 进样,记录色谱图,测得没食子酸、绿原酸、鞣花酸峰面积 RSD 分别为 0.18%、0.09%、0.35%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7.4 线性关系考察 取适量“2.2”制备的混合对照品储备液,过 0.45 μm 滤膜,精密吸取混合对照品 1、2、4、6、8、10 μL ,按“2.3”项色谱条件进样分析。以对照品溶液质量为横坐标,对照品峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。详见表 10。

2.7.5 加样回收实验 精密称定 6 份已测定指标成分含量的样品各 0.500 0 g,加入各对照品适量,按“2.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按“2.3”项下色谱条件进样,记录各色谱峰峰面积,计算得到的平均加样回收率分别 109.73%、102.02%、101.88%。RSD 分别为 1.01%、0.52%、0.27%。

2.7.6 样品含量测定 取 S1~S15 批丹润方浸膏样品,按“2.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按“2.3”项下色谱条件进样,记录色谱图,根据标准曲线计算样品中各成分质量分数,结果见表 11。

表 10 3 种成分线性方程

组分	线性方程	R ²	线性范围/ μg
没食子酸	$Y=290.21X+2.2026$	0.9996	0.366 0~3.660 0
绿原酸	$Y=3192.00X+3.2883$	0.9997	0.040 6~0.406 3
鞣花酸	$Y=916.55X+9.2256$	0.9997	0.479 5~4.795 2

表 11 15 批丹润方各成分质量分数

批次	没食子酸/(mg/g)	绿原酸/(mg/g)	鞣花酸/(mg/g)
S1	0.374	0.235	1.479
S2	1.091	0.380	2.455
S3	1.100	0.207	3.077
S4	0.247	0.465	1.069
S5	0.355	0.233	1.594
S6	0.428	0.404	1.443
S7	0.219	0.168	0.418
S8	0.515	0.216	1.099
S9	0.264	0.229	1.295
S10	0.585	0.255	1.699
S11	0.258	0.214	1.505
S12	0.354	0.238	1.516
S13	0.326	0.223	1.168
S14	0.335	0.286	1.399
S15	0.402	0.187	1.843

3 讨论

丹润方由石榴皮、忍冬藤、白芷、乌梅组成。石榴皮,味酸涩,《本草撮要·果部》记载其“入手太阴足少阴经”,可“涂疮拔毒”,亦有记载其“入手阳明大肠”,肺与大肠相表里。《医学启源·肺之经》云:肺之经“外养皮毛,内荣肠胃,与大肠为表里,手太阴(阳明)是其经也”,肺在体合皮,其华在毛,皮肤病多可责之于肺,选用入肺经之药能直达病所^[12]。“药之为枝者达四肢,为皮者达皮肤”,基于“同气相求”原理,选用动物或植物的皮部入药,相互感应,奏“以皮达皮”“因病在皮,以皮行皮”“以皮治皮”之效^[13]。忍冬藤,又名金银花藤,味甘,性寒,归肺、胃经,具有清热解毒、消红活血、通络散结的功效,是外用的良药。白芷,“长肌肤,润泽颜色,可作面脂”,具有润泽颜面、祛斑增白之功效^[14]。乌梅,味酸,性温,归肝、脾、肺、大肠经,可“去青黑痣”。四药相伍,共奏活血行气通络之功,起润泽颜面、祛斑美白之效。现代药理学研究表明,丹润方主要由黄酮类、有机酸类、多酚类组成^[15-17],其中,没食子酸、绿原酸、鞣花酸等酸类成分具有抗氧化、抗衰老、抗炎等药理作用,可作为

天然氧自由基清除剂应用于化妆品中^[16,18]。研究显示,鞣花酸可清除自由基,参与抗氧化防御相关酶的表达、增强抗氧化酶活性及基因表达来达到抗氧化目的^[19];此外,鞣花酸能抑制酪氨酸酶,从而减少黑色素的形成^[20]。没食子酸,可阻止自由基对脂肪酸分子中双键的进攻来发挥抗氧化作用^[21]。绿原酸则可通过抑制脂质过氧化,上调过氧化物分解酶活性,发挥抗氧化作用^[22]。

由于丹润方化学成分复杂,部分化学成分结构相似,色谱峰易重叠,增加了指纹图谱的建立难度,为使丹润方各组分成分较好分离,在指纹图谱的建立过程中,综合考虑图谱信息量、色谱峰响应和分离效果,考察了安捷伦 Agilent 5 TC-C₁₈(2) 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)、依利特 Supersil ODS2 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Waters XBridge[®] C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)对丹润方色谱图的影响,结果表明,安捷伦 Agilent 5 TC-C₁₈(2) 色谱柱峰形对称、分离度较好、稳定性较好,故本研究选用 Agilent 5 TC-C₁₈(2) 色谱柱。同时,考察了 280、315、323、327、350、360 nm 不同波长及不同流动相甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液对丹润方色谱图的影响,结果表明以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相,检测波长为 315 nm 时,各色谱峰分离效果较好,峰形较好,且基线较为平稳。

中药多指标成分整体质量控制已成为中药质量控制的必然发展趋势^[23],中药指纹图谱能够反应方剂所含成分,可揭示成分的特征性、溯源性及可测性,具有整体性与动态性的特点,是一种有效的质量评价方法^[24]。本研究构建了 15 批丹润方 HPLC 指纹图谱,发现共有峰 19 个,15 批样品指纹图谱与对照图谱的相似度为 0.938~0.990,各批次间样品相似度大于 0.9,提示不同批次丹润方整体质量较稳定。通过聚类分析、主成分分析等化学计量学分析发现,15 批丹润方可以大致分为两类,这表明不同批次共有成分存在一定差异,影响各批次间差异的主要峰有峰 3、峰 7、峰 12、峰 14、峰 5、峰 1、峰 9,其中峰 14 为鞣花酸,这可能与不同产地药材的含量差异有关。此外,本研究建立了没食子酸、绿原酸、鞣花酸 3 种有效成分的含量测定方法,将指纹图谱与多成分定

量分析相结合,可为丹润方质量评价的整体性及准确性提供科学依据。

参考文献

- [1] 吴淑辉, 朱明芳, 张曦, 等. 基于数据挖掘探讨朱明芳教授治疗寻常痤疮的用药规律[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(9): 1142-1146.
- [2] 吴淑辉, 朱明芳, 魏露, 等. 石榴皮多酚对金黄地鼠皮脂腺斑及 AKT/Sox9 信号通路的影响[J]. 中华皮肤科杂志, 2021, 54(8): 705-708.
- [3] 陈家祥, 刘彬. 中药面膜治疗寻常痤疮用药规律的数据挖掘研究[J]. 中医临床研究, 2022, 14(1): 43-47.
- [4] 潘东升, 谭祖顺, 郭燕华, 等. 石榴皮多酚对植物油的抗氧化作用[J]. 食品工业, 2021, 42(12): 264-267.
- [5] 金义虎, 陈涛, 刘强, 等. 白芷中抗炎镇痛香豆素类成分的虚拟筛选[J]. 中医药信息, 2021, 38(10): 9-13.
- [6] LANG L, BEIBEI C, YAMENG Z, et al. Effect of danrun mask combined with 0.1% adaparine on acne vulgaris[J]. *Guangxi Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 42(5): 20-22.
- [7] 姚令文, 刘燕, 郑笑为, 等. 指纹图谱、特征图谱技术在中药材和中成药中的应用[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(8): 934-939.
- [8] 浦智婷, 唐霄, 尹铁球. 基于转录组测序分析绿原酸对铜绿假单胞菌的作用机制[J]. 华夏医学, 2023, 36(3): 30-36.
- [9] 杜星男, 田宝忠. 绿原酸对膝关节炎大鼠软骨细胞炎症性凋亡及免疫反应的影响[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(11): 2785-2789.
- [10] 倪丹, 蒋新元, 唐玉莲, 等. 鞣花酸抑制酪氨酸酶的动力学、荧光光谱分析及分子对接[J/OL]. 食品科学:1-12[2023-09-13]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20230714.1345.050.html>.
- [11] 陈政伶, 勾玲, 卢海啸. 鞣花酸药理作用研究进展[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2023, 25(1): 196-202.
- [12] 武亦阁, 周光. “肺-皮毛”功能轴的理论基础和临床价值当议[J]. 中医药学报, 2023, 51(6): 55-58.
- [13] 陈曙光, 王加锋, 赵栋, 等. 从“以皮治皮”论法象药理[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(11): 6659-6662.
- [14] 王晓慧, 孙双姣, 曾立, 等. “三白”保湿美白凝胶的制备及其性能研究[J]. 邵阳学院学报(自然科学版), 2022, 19(3): 79-85.
- [15] 魏露, 吴淑辉, 张曦, 等. 石榴皮活性成分治疗痤疮作用机制的网络药理学预测及实验研究[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2021, 23(4): 1129-1136.
- [16] 陈建雯, 杨剑兵, 吴双凤, 等. 石榴皮中化学成分及其生物学活性研究进展[J]. 化工设计通讯, 2019, 45(7): 144-145.
- [17] 马畅, 李妍. 白芷、白芍水和乙醇提取物对酪氨酸酶的抑制效应[J]. 香料香精化妆品, 2023, 197(2): 54-58.
- [18] 王荣, 宋闯, 陈庆庆, 等. 丹皮酚、绿原酸和没食子酸复合物对 D-半乳糖致小鼠衰老模型的抗氧化作用研究[J]. 陕西中医药大学学报, 2023, 46(2): 95-99.
- [19] CATERINA F, ENKELEJDA G, ALEXANDRU N, et al. Pomegranate fruit cracking during maturation: From waste to valuable fruits[J]. *Foods*, 2023,12(9): 1908.
- [20] GUBITOSA J, RIZZI V, FINI P, et al. Multifunctional green synthesized gold nanoparticles/chitosan/ellagic acid self-assembly: Antioxidant, sun filter and tyrosinase-inhibitor properties [J]. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2020, 106: 110170.
- [21] VITHLEEM K, KONSTANTIA G, ANTIGONI C, et al. Phytochemical study on seeds of *Paeonia Clusii* Subsp. *Rhodia*—Antioxidant and anti-tyrosinase properties[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(5): 4935.
- [22] 杨城, 靳欣, 张楠, 等. 绿原酸咖啡的研制及抗氧化性评价[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(10): 140-145, 185.
- [23] 马双成, 王莹, 魏锋. 中药质量控制未来发展方向思考[J]. 中国药学杂志, 2021, 56(16): 1273-1281.
- [24] 吕恬仪, 刘亚楠, 任越, 等. 基于特征图谱及网络药理学的大柴胡汤质量标志物研究[J]. 药学报, 2022, 57(5): 1477-1485.

(本文编辑 周旦)