

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)17-0081-07
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.17.019



温胆汤颗粒剂质量评价方法的建立

许淑美, 王婉怡, 李航飞, 郭国富, 朱志军[△]

(河南中医药大学, 河南 郑州 450046)

摘要:目的 建立评价温胆汤颗粒质量的方法。方法 建立15批温胆汤颗粒的高效液相色谱指纹图谱, 对其进行相似度分析和共有峰指认与归属; 结合聚类分析(HCA)法、主成分分析(PCA)法、正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)法进行质量评价; 建立测定其中鸟苷、尿苷、橙皮苷、6-姜辣素含量的高效液相色谱法。结果 15批温胆汤颗粒的指纹图谱相似度均大于0.950; 共标记33个共有峰, 指认出其中8个色谱峰, 分别为16号峰(甘草苷)、19号峰(柚皮苷)、20号峰(橙皮苷)、21号峰(新橙皮苷)、28号峰(甘草酸)、29号峰(川陈皮素)、30号峰(6-姜辣素)、32号峰(橘皮素)。通过HCA将样品聚为5类; 通过PCA筛选出7个主成分, 累计方差贡献率为93.131%; OPLS-DA与HCA的结果一致, 筛选出14个差异组分。高效液相色谱含量测定结果显示, 鸟苷、尿苷、橙皮苷、6-姜辣素分别在各自质量浓度范围内与峰面积积分值线性关系良好($R^2 \geq 0.9991$); 精密度、稳定性、重复性试验结果的RSD均小于2.5% ($n=6$); 平均加样回收率分别为99.27%, 99.35%, 98.51%, 99.58%, RSD分别为0.85%, 1.52%, 1.39%, 1.04% ($n=6$); 15批温胆汤颗粒中鸟苷、尿苷、橙皮苷、6-姜辣素的平均含量分别为0.0176%, 0.0169%, 1.0467%, 0.0222%。结论 所建立的方法简便快捷、专属性强、重复性好, 可反映各化学成分信息, 可为温胆汤颗粒的质量控制提供参考。

关键词:温胆汤颗粒; 指纹图谱; 化学模式识别; 高效液相色谱法; 质量评价

Establishment of Quality Evaluation Method for Wendan Decoction Granules

XU Shumei, WANG Wanyi, LI Hangfei, GUO Guofu, ZHU Zhijun

(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan, China 450046)

Abstract: Objective To establish a method for evaluating the quality of Wendan Decoction Granules. **Methods** The high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints for fifteen batches of Wendan Decoction Granules were established, and similarity analysis and identification and attribution of common peaks were performed. Hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares - discriminant analysis (OPLS - DA) were used to evaluate the quality of 15 batches of Wendan Decoction Granules. HPLC method used for the content determination of guanosine, uridine, hesperidin, and 6 - gingerol was established. **Results** The fingerprint similarity of fifteen batches of Wendan Decoction Granules was higher than 0.950, with thirty - three common peaks attributed and eight chromatographic peaks identified, namely peak 16 (liquiritin), peak 19 (naringin), peak 20 (hesperidin), peak 21 (neohesperidin), peak 28 (glycyrrhizic acid), peak 29 (tangerine), peak 30 (6 - gingerol), and peak 32 (hesperidin). The samples were divided into five categories by HCA analysis. Seven principal components were screened through PCA, with a cumulative variance contribution rate of 93.131%. The results of OPLS - DA and HCA were consistent, and fourteen differential components were screened. The content determination results by HPLC showed that guanosine, uridine, hesperidin, and 6 - gingerol had good linear relationships with peak area integration values within their respective mass concentration ranges ($R^2 \geq 0.9991$). The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 2.5% ($n=6$). The average recoveries of guanosine, uridine, hesperidin, and 6 - gingerol were 99.27%, 99.35%, 98.51%, and 99.58%, with RSDs of 0.85%, 1.52%, 1.39%, and 1.04% ($n=6$), respectively. The average contents of guanosine, uridine, hesperidin, and 6 - gingerol in fifteen batches of Wendan Decoction Granules were 0.0176%, 0.0169%, 1.0467%, and 0.0222%, respectively. **Conclusion** The established method is simple, rapid, highly specific and has good reproducibility, which can reflect information on various chemical components, which can provide a reference for the quality control of Wendan Decoction Granules.

Key words: Wendan Decoction Granules; fingerprints; chemical pattern recognition; HPLC; quality evaluation

温胆汤见《备急千金要方》,同时收录于《古代经典名方目录(第一批)》^[1]。现代药理学研究表明,温胆汤具有调脂、降糖、抗炎、抗抑郁^[2]、抗失眠^[3]等作用,用于治疗气机郁滞、痰郁所致心脑血管疾病、情志病、脾胃系统疾病、妇科疾病、内分泌系统疾病、呼吸系统疾病

等^[4-7],尤其是与精神情志变化相关的疾病^[8-9]。作为历代医家治疗痰郁内扰等所致疾病的常用方,迄今临床应用广泛^[10-15]。目前,关于温胆汤颗粒的研究极少,多集中于汤剂的研究。与汤剂比较,颗粒剂更符合“三小、三效、五方便”的理论原则。化学模式识别技术结合

第一作者:许淑美,女,硕士研究生在读,研究方向为中药药剂学新剂型、新技术与新药研发,(电子信箱)1780947608@qq.com。

[△]通信作者:朱志军,男,硕士研究生,副主任医师,研究方向为中药药剂学新剂型、新技术与新药研发,(电子信箱)zzjun63@126.com。

指纹图谱已广泛应用于中药的质量控制和评价^[16]。故本研究中用不同产地的温胆汤药材饮片制备了15批温胆汤颗粒,建立了15批温胆汤颗粒的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,结合化学模式识别技术评价其质量,为温胆汤颗粒质量标准的制订提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters e2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司);DHG-9123A型电热鼓风恒温干燥箱(郑州生元仪器有限公司);ME204E型电子天平(精度为万分之一),MS105DU型电子天平(精度为十万分之一),均购于梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;HH-2型数显恒温水浴锅(金坛市杰瑞尔电器有限公司);KQ-500DV型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为250 W,频率为40 kHz)。

1.2 试剂

鸟苷对照品(批号为wkq20040308),尿苷对照品(批号为wkq20021706),6-姜辣素对照品(批号为wkq19011103),橙皮苷对照品(批号为wkq19013105),辛弗林对照品(批号为wkq19011111),甘草苷对照品(批号为wkq20022701),柚皮苷对照品(批号为wkq20020603),新橙皮苷对照品(批号为wkq20020402),甘草酸铵对照品(批号为wkq20022401)对照品,川陈皮素对照品(批号为wkq20031701),橘皮素对照品(批号为wkq20041611),纯度均不低于98%,均购于四川维克奇生物科技有限公司;乳糖(天津市致远化学试剂有限公司,批号为20220801704);半夏、竹茹、枳实、陈皮、生

姜、甘草饮片信息见表1;甲醇、乙腈(色谱醇,美国Tedia公司);水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 温胆汤颗粒制备

按随机数字表法将不同批次的中药饮片进行分组,根据经典名方关键信息,取清半夏27.6 g,竹茹27.6 g,麸炒枳实27.6 g,陈皮41.4 g,生姜鲜品55.2 g,炒甘草13.8 g,加水至药材量的17倍,浸泡30 min,加热回流提取3次,每次60 min,合并3次过滤后的提取液,70℃减压(-0.1~0.03 MPa)浓缩至约50 mL,置-50℃冷冻干燥24 h,即得颗粒中间体,粉碎,与乳糖按1:1.5(m/m)比例过40目筛数次,直至混匀,喷70%乙醇,挤压制粒,干燥,整粒,即得。制得的15批温胆汤颗粒样品信息见表1。

2.2 指纹图谱建立

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Waters Symmetry[®] C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.05%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(程序见表2);流速:1 mL/min;检测波长:202 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。

表2 流动相梯度洗脱程序(%)

Tab. 2 Gradient elution program of mobile phase (%)

时间	流动相A	流动相B	时间	流动相A	流动相B
0~5 min	10~15	90~85	22~25 min	18~20	82~80
5~14 min	15	85	25~50 min	20~40	80~60
14~16 min	15~17	85~83	50~65 min	40~65	60~35
16~22 min	17~18	83~82			

表1 15批温胆汤颗粒样品与饮片批号和产地信息

Tab. 1 Batch numbers and origin areas of 15 batches of Wendan Decoction Granules and decoction pieces

编号	样品批号	清半夏	竹茹	麸炒枳实	陈皮	生姜	炒甘草
S1	WDT-01	BX190903(贵州大方)	ZR191210(浙江)	ZS190902(湖南沅江)	CP191005(重庆江津)	SJ190701(贵州贵阳)	GC190805(新疆)
S2	WDT-02	BX191020(甘肃西和)	ZR191206(浙江)	ZS191003(江西新干)	CP191004(浙江衢州)	SJ190805(山东潍坊)	GC190902(新疆)
S3	WDT-03	BX191102(甘肃西和)	ZR191218(浙江)	ZS191010(江西清江)	CP191003(广东新会)	SJ191002(四川犍为)	GC190802(甘肃)
S4	WDT-04	BX191017(贵州赫章)	ZR191222(浙江)	ZS191012(江西清江)	CP191010(江西清江)	SJ190804(山东潍坊)	GC190801(甘肃)
S5	WDT-05	BX191101(甘肃西和)	ZR191203(浙江)	ZS190915(江西新干)	CP191014(江西清江)	SJ190910(河南焦作)	GC190904(新疆)
S6	WDT-06	BX191015(甘肃西和)	ZR191217(浙江)	ZS191002(江西新干)	CP191020(广东化州)	SJ190912(河南焦作)	GC190901(新疆)
S7	WDT-07	BX191002(河北保定)	ZR191201(浙江)	ZS191007(江西清江)	CP191001(浙江衢州)	SJ190911(河南焦作)	GC190908(新疆)
S8	WDT-08	BX191003(河北保定)	ZR191209(浙江)	ZS191001(江西清江)	CP191002(浙江衢州)	SJ190802(贵州黔南)	GC190906(内蒙古)
S9	WDT-09	BX191001(河北保定)	ZR191211(浙江)	ZS191004(江西新干)	CP191013(浙江衢州)	SJ190808(山东济宁)	GC190907(甘肃)
S10	WDT-10	BX191103(甘肃西和)	ZR191207(浙江)	ZS191005(江西清江)	CP191018(江西清江)	SJ190807(山东济宁)	GC190806(甘肃)
S11	WDT-11	BX190902(贵州赫章)	ZR191202(浙江)	ZS190912(江西新干)	CP191011(浙江衢州)	SJ191003(四川犍为)	GC190905(甘肃)
S12	WDT-12	BX191104(甘肃西和)	ZR191208(浙江)	ZS190901(湖南沅江)	CP191006(浙江衢州)	SJ190702(贵州贵阳)	GC190811(新疆)
S13	WDT-13	BX191018(甘肃西和)	ZR191215(浙江)	ZS190911(浙江衢州)	CP191009(湖南沅江)	SJ190801(贵州黔南)	GC190804(甘肃)
S14	WDT-14	BX191022(贵州大方)	ZR191220(浙江)	ZS190907(浙江衢州)	CP191007(江西新干)	SJ190913(河南焦作)	GC190909(新疆)
S15	WDT-15	BX190901(贵州大方)	ZR191212(浙江)	ZS190905(四川西充)	CP191015(江西新干)	SJ191004(四川犍为)	GC190803(甘肃)

2.2.2 溶液制备

取2.1项下样品1.0 g,加50%甲醇20 mL使其溶解,静置3 h,离心(4 226 g)5 min,取上清液,0.22 μm微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

分别取2倍处方量饮片,制备对照药材冻干粉,按供试品溶液制备方法制备单味中药饮片供试品溶液。

精密称取橙皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、橘皮素、6-姜辣素、甘草苷、甘草酸铵对照品各适量,加甲醇溶解,得对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

精密度试验:取2.2.2项下供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件连续进样测定6次,以21号峰为参照峰。结果峰面积的RSD均小于4.88%($n=6$),保留时间的RSD均小于1.31%($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取2.1项下样品适量,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,共6份,按2.2.1项下色谱条件进样测定,以21号峰为参照峰。结果峰面积的RSD均小于4.68%($n=6$),保留时间的RSD均小于2.13%($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取2.2.2项下供试品溶液,分别于0,2,4,8,12,24 h时按2.2.1项下色谱条件进样测定,以21号峰为参照峰。结果峰面积的RSD均小于4.93%($n=6$),保留时间的RSD均小于2.63%($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.2.4 共有峰指认与归属

采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A版)软件分析15批样品的指纹图谱,采用中位数法和多点校正生成对照图谱和叠加图谱。以S1的图谱作为参照图谱,共标记33个共有峰,详见图1。与对照品溶液中各色谱峰的保留时间对比,指认出供试品溶液中的8个共有峰,分别为16号峰(甘草苷)、19号峰(柚皮苷)、20号峰(橙皮苷)、21号峰(新橙皮苷)、28号峰(甘草酸)、29号峰(川陈皮素)、30号峰(6-姜辣素)、32号峰(橘皮素)。详见图2和图3。来源于竹茹的有5号峰、7-8号峰、10号峰、13号峰、24号峰、33号峰,来源于陈皮的有7号峰、9-11号峰、14号峰、18号峰、20-21号峰、23-24号峰、29号峰、31号峰、33号峰,来源于枳实的有4-10号峰、12号峰、14号峰、17-22号峰、25-27号峰、29号峰、32-33号峰,来源于生姜的有5号峰、23号峰、30号峰、33号峰,来源于甘草的有8号峰、15号峰、16号峰、22号峰、28号峰、33号峰。6种药材的色谱峰中均出现1-3号峰,且均出现于前5 min,故推测为包含尿苷、鸟苷在内的大极性类成分。

2.2.5 相似度评价

15批样品指纹图谱的相似度均大于0.950,表明温

胆汤颗粒制剂工艺稳定,批次间差异较小。详见表3。

2.3 化学模式识别分析

聚类分析(HCA):以15批样品的指纹图谱中33个共有峰的峰面积为变量,经标准化处理后导入SPSS 26.0统计学软件,采用Ward法以平方欧氏距离为测度进行系统HCA,结果见图4。可见,当平方欧氏距离为10时,15批样品可聚为5类,编号分别为S6、S8-S10、S1-S5、S11、S13、S12、S14-S15、S7,提示不同批次的样品由于饮片来源不同可能会导致化学成分存在差异。

主成分分析(PCA):采用SPSS 26.0统计学软件分析,ZScore标准化处理15批样品的33个共有峰,行PCA。筛选出的7个主成分提取特征值大于1,方差贡献率分别为30.168%,19.691%,15.240%,14.707%,5.870%,3.916%,3.539%,累计方差贡献率为93.131%,详见表4。表明采用降维模式处理后得到的7个主成分可代表15批样品的原始色谱的大部分质量信息。样品的PCA碎石图见图5。

正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA):以33个共有峰的峰面积为自变量,不同批次样品为因变量,采用SIMCA 14.1软件,并结合PCA、偏最小二乘判别分析(PLS-DA)法进行OPLS-DA,以区分样品间的差异。结果显示,本次分析中模型的预测能力参数(Q^2)为 $0.334 < 0.5$,表明模型拟合效果一般,样品间的差异不显著;15批样品可分为5类,与HCA结果一致。详见图6。OPLS-DA模型中,投影重要变量(VIP)值表征变量对样品差异的贡献值。根据VIP > 1的标准,共筛选出14个对样品质量影响较大的共有峰,分别为6号峰、1号峰、14号峰、8号峰、20号峰(橙皮苷)、18号峰、26号峰、24号峰、12号峰、23号峰、7号峰、10号峰、25号峰和11号峰。详见图7。

2.4 高效液相色谱法测定样品中4种指标性成分含量

2.4.1 色谱条件

色谱柱:橙皮苷和6-姜辣素为Waters Symmetry® C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),鸟苷、尿苷为Agilent Zorbax SB-Aq柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:见表5;流速:1.0 mL/min;检测波长:283 nm(橙皮苷),265 nm(鸟苷、尿苷),280 nm(6-姜辣素);柱温:30℃;进样量:5 μL(橙皮苷),10 μL(鸟苷、尿苷和6-橙皮苷)。

2.4.2 溶液制备

取样品1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入10 mL超纯水,超声处理(功率为250 W,频率为40 kHz)30 min,0.22 μm微孔滤膜滤过,即得鸟苷、尿苷供试品溶液。

取样品0.2 g,精密称定,加10 mL甲醇,超声处理(功

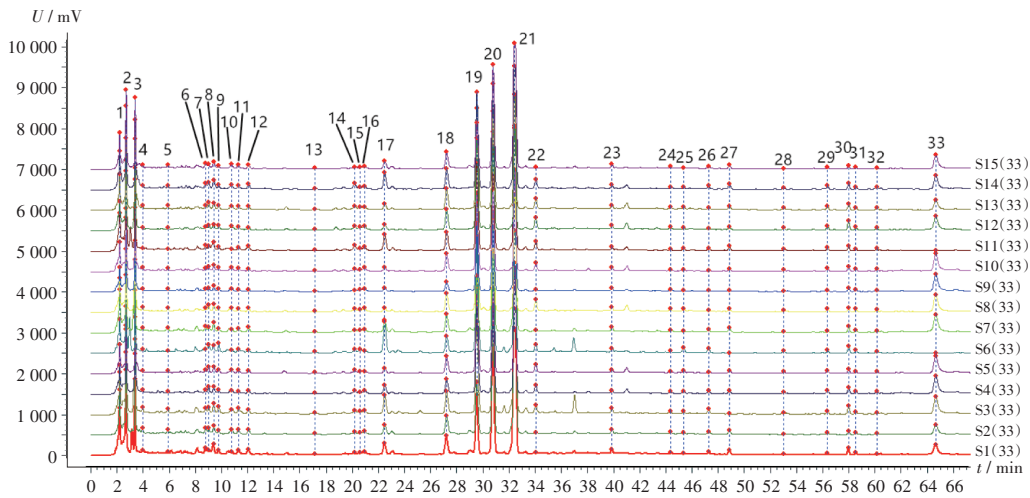
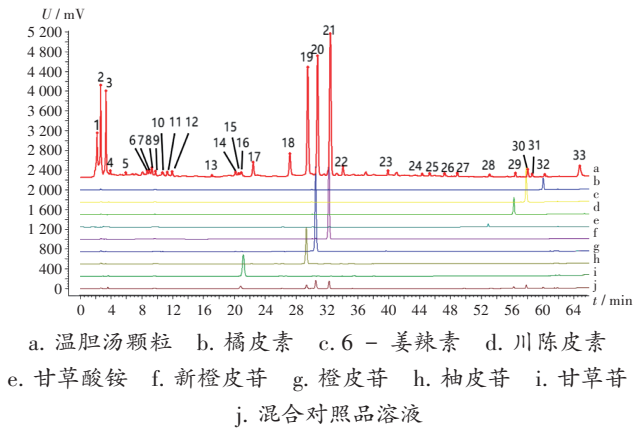


图1 15批温胆汤颗粒高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 1 Overlay HPLC fingerprints of 15 batches of Wendan Decoction Granules



a. 温胆汤颗粒 b. 橘皮素 c. 6-姜辣素 d. 川陈皮素
e. 甘草酸铵 f. 新橙皮苷 g. 橙皮苷 h. 柚皮苷 i. 甘草苷
j. 混合对照品溶液

图2 温胆汤颗粒单一对照品溶液和混合对照品溶液高效液相色谱对照图谱

a. Wendan Decoction Granules b. Hesperidin c. 6-Gingerol
d. Tangerine e. Glycyrrhizic acid f. Neohesperidin g. Hesperidin
h. Naringin i. Licquiritin j. Mixed reference solution

Fig. 2 HPLC chromatograms of Wendan Decoction Granules single reference solution and mixed reference solution

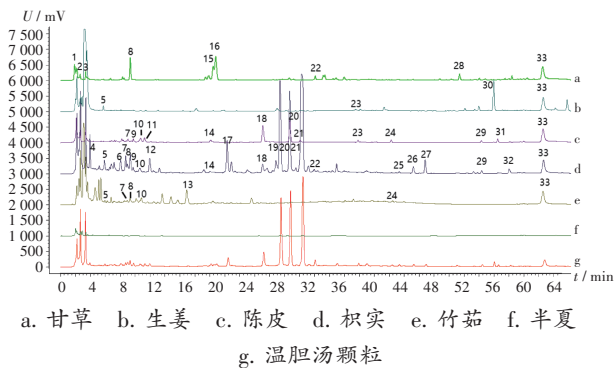


图3 温胆汤颗粒与单味中药饮片供试品溶液高效液相色谱对照图谱

a. Glycyrrhizae Radix et Rhizoma b. Zingiberis Rhizoma Recens c. Pericarpium Citri Reticulatae d. Aurantii Fructus Immaturus e. Bambusae Caulis in Taenias f. Pinellia Rhizoma g. Wendan Decoction Granules

表3 15批温胆汤颗粒剂高效液相色谱指纹图谱相似度评价结果

Tab. 3 Evaluation results of the HPLC fingerprint similarity of 15 batches of Wendan Decoction Granules

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.994	S5	0.991	S9	0.993	S13	0.992
S2	0.986	S6	0.979	S10	0.989	S14	0.998
S3	0.994	S7	0.970	S11	0.994	S15	0.973
S4	0.964	S8	0.988	S12	0.985		

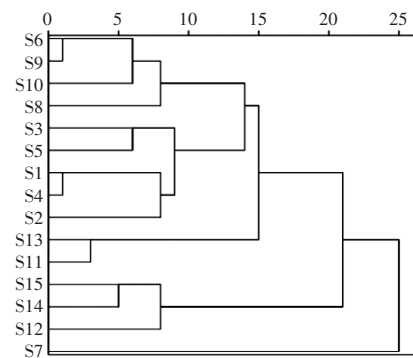


图4 15批温胆汤颗粒HCA树状图

Fig. 4 HCA dendrogram of 15 batches of Wendan Decoction Granules

表4 温胆汤颗粒PCA特征值与方差贡献率

Tab. 4 PCA eigenvalues and variance contribution rates of Wendan Decoction Granules

主成分	初始特征值		
	总计	方差贡献率(%)	累计方差贡献率(%)
1	9.956	30.168	30.168
2	6.498	19.691	49.859
3	5.029	15.240	65.099
4	4.853	14.707	79.806
5	1.937	5.870	85.676
6	1.292	3.916	89.592
7	1.168	3.539	93.131

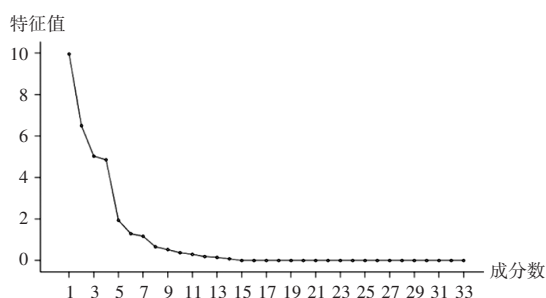


图5 温胆汤颗粒PCA碎石图

Fig. 5 PCA lithotripsy of Wendan Decoction Granules

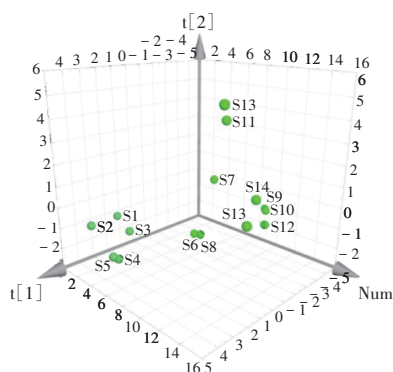


图6 15批温胆汤颗粒OPLS-DA得分图

Fig. 6 OPLS-DA scores of 15 batches of Wendan Decoction Granules

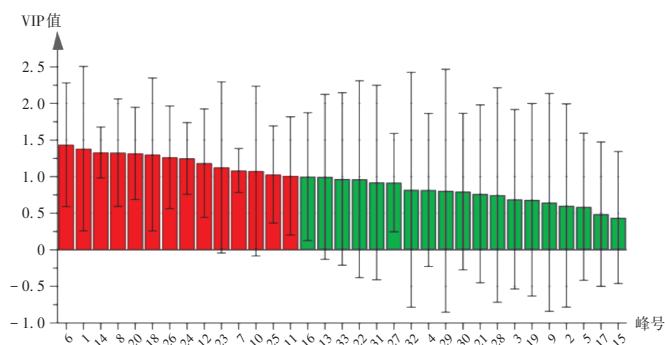


图7 温胆汤颗粒共有峰VIP值

Fig. 7 VIP values of common peaks of Wendan Decoction Granules

率为250 W, 频率为40 kHz)45 min, 离心(1 057 g)5 min, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得橙皮苷供试品溶液。

取样品0.5 g, 精密称定, 加20 mL 甲醇, 溶解, 称定质量, 超声处理(功率为500 W, 频率为40 kHz)30 min,

表5 流动相及其梯度洗脱程序

Tab. 5 Gradient elution program of the mobile phase

待测成分	流动相	洗脱程序
橙皮苷	乙腈(A)-水(B)	0~10 min 时 22%A, 10~20 min 时 22%A → 48%A
鸟苷、尿苷	乙腈(A)-水(B)	0~5 min 时 0.2%A → 0.5%A, 5~10 min 时 0.5%A → 1%A, 10~15 min 时 1%A → 1.5%A, 15~25 min 时 1.5%A → 5.5%A
6-姜辣素	甲醇-乙腈-水	等度洗脱 (5:40:55, V/V/V)

冷却, 补足减失的质量, 滤过, 蒸干, 残渣加水20 mL, 溶解至分液漏斗, 加冷氯仿, 每次20 mL, 萃取4次, 氯仿层置水浴锅上蒸干, 残渣加甲醇定容至5 mL, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得6-姜辣素供试品溶液。

分别取鸟苷对照品0.93 mg、尿苷对照品1.01 mg, 精密称定, 加水定容, 配制成质量浓度分别为0.093 0, 0.101 mg/mL的鸟苷对照品溶液、尿苷对照品溶液。取橙皮苷对照品2.27 mg、6-姜辣素对照品0.45 mg, 精密称定, 加甲醇配制成质量浓度为0.454 mg/mL的橙皮苷对照品溶液和0.090 mg/mL的6-姜辣素对照品溶液。

2.4.3 方法学考察

线性关系考察: 取鸟苷、尿苷、橙皮苷和6-姜辣素对照品各适量, 配制成系列质量浓度对照品贮备液, 按2.4.1项下色谱条件进样测定, 以质量浓度($X, \mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积积分值(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表6。

精密度试验: 分别取同一质量浓度的橙皮苷、6-姜辣素、鸟苷、尿苷对照品溶液, 按2.4.1项下色谱条件连续进样测定6次, 记录峰面积。结果见表6, 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取样品(批号为WDT-06)适量, 依法制备供试品溶液, 分别于0, 2, 4, 8, 12, 24 h时按2.4.1项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果见表6, 表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

重复性试验: 取样品(批号为WDT-02)适量, 依法

表6 指标性成分含量测定方法学考察结果

Tab. 6 Results of methodology for the content determination of index components

待测成分	回归方程	R^2	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	RSD(% , $n = 6$)			加样回收试验(% , $n = 6$)	
				精密度试验	稳定性试验	重复性试验	平均回收率	RSD
鸟苷	$Y = 19\,370 X - 19\,694$	0.999 4	4.07 ~ 120.57	0.11	1.11	1.47	99.27	0.85
尿苷	$Y = 25\,550 X - 229\,935$	0.999 1	8.34 ~ 204.17	0.85	1.56	1.25	99.35	1.52
橙皮苷	$Y = 10\,266 X - 75\,186$	0.999 7	57.24 ~ 833.94	0.92	2.21	1.36	98.51	1.39
6-姜辣素	$Y = 5\,913.1 X - 42\,708$	0.999 3	16.44 ~ 217.51	0.77	1.42	1.61	99.58	1.04

制备供试品溶液6份,按2.4.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果见表6,表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知各成分含量的样品(批号为WDT-09)4份,其中鸟苷、尿苷0.5g,橙皮苷0.5g,6-姜辣素0.5g,精密称定,按1:1(m/m)分别加入1.744mL质量浓度为0.102mg/mL的尿苷对照品、1.03mL质量浓度为0.245mg/mL的6-姜辣素对照品、3.79mL质量浓度为0.846mg/mL的橙皮苷对照品、0.987mL质量浓度为0.198mg/mL的鸟苷对照品,依法制备供试品溶液,按2.4.1项下色谱条件进样测定。结果见表6。

2.4.4 样品含量测定

取15批样品,依法制备供试品溶液,按2.4.1项下色谱条件进样测定。结果样品中鸟苷、尿苷、橙皮苷、6-姜辣素的平均含量分别为0.0176%,0.0169%,1.0467%,0.0222%,上下浮动30%后分别为0.0123%~0.0228%,0.0118%~0.0220%,0.7554%~1.4029%,0.0155%~0.0288%,但部分批次样品中上述4种指标性成分含量超出范围。详见表7。

表7 15批温胆汤颗粒含量测定结果(%)

Tab. 7 Results of the content determination of index components in Wendan Decoction Granules (%)

批号	鸟苷	尿苷	橙皮苷	6-姜辣素
WDT-01	0.0152	0.0207	1.1646	0.0240
WDT-02	0.0268	0.0181	1.3521	0.0179
WDT-03	0.0248	0.0167	1.5780	0.0171
WDT-04	0.0122	0.0163	0.8816	0.0191
WDT-05	0.0195	0.0176	0.9424	0.0170
WDT-06	0.0148	0.0150	0.9241	0.0203
WDT-07	0.0185	0.0185	1.2840	0.0187
WDT-08	0.0175	0.0142	0.8700	0.0310
WDT-09	0.0168	0.0250	1.1997	0.0227
WDT-10	0.0116	0.0154	1.0073	0.0209
WDT-11	0.0157	0.0148	0.6770	0.0323
WDT-12	0.0139	0.0125	0.9075	0.0336
WDT-13	0.0168	0.0156	0.9400	0.0226
WDT-14	0.0247	0.0180	0.9894	0.0226
WDT-15	0.0148	0.0151	0.9832	0.0130
$\bar{X} \pm s$	0.0176 ± 0.0046	0.0169 ± 0.0030	1.0467 ± 0.2283	0.0222 ± 0.0059
$\bar{X}(1 \pm 30\%)$	0.0123 ~ 0.0228	0.0118 ~ 0.0220	0.7554 ~ 1.4029	0.0155 ~ 0.0288

3 讨论

指纹图谱能反映中药及其制剂的真实性、整体性和稳定性,联用化学模式识别能客观、全面地评价中药批次间的质量差异。本研究中HCA结果显示,15批样品可聚为5类(编号分别为S6、S8-S10、S1-S5、S11、S13、S12、S14-S15、S7),这可能与饮片归属地来源及采收时间不同有关。PCA降维模式因子分析表明,对15批

样品差异影响较大的特征变量共有7个。OPLS-DA结果显示,模型的预测能力参数(Q^2)为 $0.334 < 0.5$,表明模型拟合效果一般,推测可能是由于样品间差异不显著导致。VIP值大于1的共有峰成分共14个,对样品差异的贡献值较大。其中,6号峰、12号峰、25号峰、26号峰来源于枳实,7号峰来源于竹茹、枳实、陈皮,8号峰来源于枳实、甘草及竹茹,10号峰、14号峰、18号峰、20号峰来源于陈皮和枳实,23号峰来源于陈皮,24号峰来源于竹茹及陈皮,11号峰源于陈皮,1号峰在6种药材中均出现。在高效液相色谱指纹图谱中,未体现半夏的特征峰,可能是由于半夏中的有效成分极性较大,均集中在高效液相色谱指纹图谱前5min,与其他成分出峰时间接近,未能分离开,故未进行相关描述。

15批样品含量测定结果显示,小部分批次在测定过程中出现离散数据,这与中药材的质量相关。15批样品聚为5类,质量差异不大,OPLS-DA结果得15批样品间的差异组分有14个,对温胆汤颗粒剂的质量控制影响较大,应着重关注差异组分。鸟苷、尿苷、橙皮苷和6-姜辣素含量测定结果显示,4种成分含量基本都在线性范围内,且符合含量限度要求。所建立的15批样品高效液相色谱指纹图谱的相似度均高于0.950,表明15批样品中有较多相似的化学成分,指纹图谱相关性更好,且质量更稳定。

本研究中建立的方法专属性强、简便快捷、重复性好,可反映各化学成分信息,可为温胆汤颗粒的质量控制提供参考。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局. 国家中医药管理局关于发布《古代经典名方目录(第一批)》的通知[A/OL]. (2018-04-16) [2023-01-20]. <http://natcm.gov.cn/kejisi/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [2] 杨思雨,詹梁,袁满,等. 经典名方温胆汤的研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2021,23(7):2361-2371.
- [3] 万红娇,贺又舜. 温胆汤的现代实验研究进展[J]. 江西中医药大学学报,2007,19(6):93-95.
- [4] 杜松,赵凯维,刘寨华,等. 经典名方“温胆汤”研究进展及相关思考[J]. 中国中医基础医学杂志,2019,25(12):1764-1768.
- [5] 吕双宏. 温胆汤临床应用研究进展[J]. 中医药导报,2018,24(20):123-125.
- [6] 黄丽红. 温胆汤临床应用研究进展[J]. 内蒙古中医药,2016,35(3):124-125.
- [7] 常艳宾,李雁,张丽丽. 温胆汤临床应用研究进展[J]. 中国民间疗法,2021,29(24):145-147.
- [8] 金珏,陈晓. 温胆汤组方主治研究进展[J]. 中成药,2022,44(5):1535-1538.