

清肺汤中 8 种有效成分同时测定及其指纹图谱研究

邓秀平^{1,2}, 王 佳^{1,3#}, 张 兵^{1,2}, 王瀚然³, 于 杰³, 祁东利^{1,2}, 刘志东^{1,2*}

1. 天津中医药大学, 现代中药发现与制剂技术教育部工程中心, 天津 300193

2. 天津中医药大学, 组分中药国家重点实验室, 天津 300193

3. 天津同仁堂集团股份有限公司, 天津 300193

摘要: 目的 采用 HPLC-VWD 同时测定清肺汤市售制剂中绿原酸、苦杏仁苷、栀子苷、橙皮苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸铵、五味子醇甲指标成分的含量并建立清肺汤的指纹图谱, 表征与区分不同来源的清肺汤市售制剂。方法 采用 Agilent Technologies Zorbax SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 3.5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 柱温 35 ℃, 体积流量 0.6 mL/min, 进样量 10 μL, 同时对指标成分的含量和指纹图谱进行检测。采用指纹图谱相似度评价、热图聚类分析方法, 表征与区分不同来源清肺汤市售制剂。结果 8 种成分专属性、线性关系 ($r^2 > 0.999$)、精密度 (RSD≤1.85%, $n=6$)、重复性 (RSD≤1.82%, $n=6$)、稳定性 (RSD≤1.49%, 48 h) 均良好; 加样回收率为 (93.19±1.93)%~(102.36±4.17)% ($n=6$)。含量测定结果显示清肺汤市售制剂中指标成分的每日服用量在不同厂家中波动较大, 如黄芩苷的波动范围 59.85~224.05 mg; 但在相同厂家的不同剂型中波动不明显, 如港香兰药厂 2 种制剂中黄芩苷质量为 140.00~142.47 mg; 同时指纹图谱相似度计算结果均大于 0.945, 表明不同来源的清肺汤市售制剂指纹图谱相似度较高。结论 该方法准确可靠、具有良好的重复性, 可用于测定清肺汤市售制剂中 8 种成分的含量及建立清肺汤的指纹图谱, 通过成分每日服用量热图聚类分析与相似度评价, 能表征与区分不同来源的清肺汤市售制剂。

关键词: 清肺汤; HPLC; 指纹图谱; 市售制剂; 中药复方; 绿原酸; 苦杏仁苷; 栀子苷; 橙皮苷; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 甘草酸铵; 五味子醇甲; 相似度评价; 热图聚类分析

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)05-1242-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.05.021

Simultaneous determination of eight active components in Qingfei Decoction by HPLC and its fingerprint analysis

DENG Xiu-ping^{1,2}, WANG Jia^{1,3}, ZHANG Bing^{1,2}, WANG Han-ran³, YU Jie³, QI Dong-li^{1,2}, LIU Zhi-dong^{1,2}

1. Engineering Research Center of Modern Chinese Medicine Discovery and Preparation, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. State Key Laboratory of multi-fractions Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

3. Tianjin Tongrentang Group Co., Ltd., Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To simultaneously determinate the content of chlorogenic acid, amygdalin, gardenoside, hesperidin, baicalin, wogonoside, ammonium glycyrrhizate and schisandrin in Qingfei Decoction by HPLC-VWD, and establish the fingerprint of Qingfei Decoction. The results can be applied to characterize and distinguish commercially available Qingfei Decoction preparations from different manufacturers. **Methods** Agilent Technologies Zorbax SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) column was used, with acetonitrile (A)-0.1% phosphoric acid aqueous solution (B) as the mobile phase for gradient elution, column temperature of 35 ℃, flow rate of 0.6 mL/min, injection volume of 10 μL. The content of the indicator components and the fingerprints were simultaneously assayed by the above method. Fingerprint similarity evaluation, heat map cluster analysis and other methods were used to characterize

收稿日期: 2019-10-08

基金项目: 天津市科技计划项目 (18ZXXYSY00140)

作者简介: 邓秀平 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药学。Tel: 17720177870

*通信作者 刘志东, 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向中药新型给药系统的研究。E-mail: liuzhidong@tjutc.edu.cn

#并列第一作者 王 佳 (1984—), 女, 工程硕士, 高级工程师, 研究方向为中成药研发及中药现代化。Tel: 13163052269

and distinguish the commercially available Qingfei Decoction preparations from different sources. **Results** The specificity, linear relationship ($r^2 > 0.999$), precision ($RSD \leq 1.85\%$, $n = 6$), repeatability ($RSD \leq 1.82\%$, $n = 6$), stability ($RSD \leq 1.49\%$, 48 h) of eight components were good; The recovery rate of the sample was in the range of $(93.19 \pm 1.93)\%$ to $(102.36 \pm 4.17)\%$ ($n = 6$). The results of content determination showed that the daily dosage of the indicator ingredients in the marketed Qingfei Decoction preparations fluctuated greatly in different manufacturers, such as baicalin, which fluctuated from 59.85 to 224.05 mg, but the fluctuation was not obvious in different dosage forms of the same manufacturer, for example, the content of baicalin in the two preparations of KPC Herbs was 140.00 to 142.47 mg. At the same time, the similarity calculation results of fingerprints were all greater than 0.945, which indicated that the fingerprints of Qingfei Decoction from different sources were highly similar. **Conclusion** The method is accurate and reliable with good repeatability. It can be used to determine the content of eight components in the commercial Qingfei Decoction preparations and establish the fingerprint of Qingfei Decoction. The commercial Qingfei Decoction preparations can be characterized by heat map clustering analysis of the daily dosage of the eight components and the fingerprint similarity evaluation to distinguish the commercially available preparations of Qingfei Decoction from different sources.

Key words: Qingfei Decoction; HPLC; fingerprint; market preparation; traditional Chinese medicine compound; chlorogenic acid; amygdalin; gardenoside; hesperidin; baicalin; wogonoside; ammonium glycyrrhizate; schisandrin; fingerprint similarity evaluation; heat map cluster analysis

清肺汤出自明朝著名医家龚廷贤所著的《万病回春·(咳嗽门)》,“主治一切咳嗽,上焦痰甚”,由黄芩、桔梗、茯苓、陈皮、贝母、桑白皮、当归、天门冬、山梔、苦杏仁、麦门冬、五味子、甘草、生姜、大枣共 15 味中药组成,具有清肺化痰止咳的功效^[1-2]。临床常用于治疗咳嗽多痰、慢性支气管炎、支气管扩张症、肺炎、支气管炎、肺结核、慢性咽喉炎、支气管喘息、心脏性喘息等症。现代药理研究表明清肺汤具有治疗肺部损伤,抑制肺部炎症的作用^[3-4]。清肺汤汤剂具有制备简单、疗效确切、起效迅速、生物利用度高等优点,临床应用较多。国内外除医院医师开出的处方汤剂以外,已经有清肺汤相关制剂上市。上市的药品主要有台湾仙丰清肺汤浓缩散、顺天堂清肺汤浓缩颗粒、港香兰清肺汤浓缩颗粒、港香兰清肺汤浓缩锭、日本小林制药清肺汤颗粒以及津村汉方制剂清肺汤颗粒等。《万病回春》及清肺汤相关资料均无对清肺汤处方汤剂制法的记录^[1-2],各上市清肺汤制剂的制备方法各不相同。如对于原文:“上铢”一词的解析,清肺汤饮片的粒度(煮散)没有明确的记载^[5],生产过程中投饮片或粉末进行生产的厂家均有;再加之清肺汤处方药味多,成分复杂,单一的化学成分测定很难反映整个复方的质量优劣。目前,对清肺汤市售制剂质量控制的研究仍处于相对匮乏的状态。

HPLC 法的发展,为同时测定复杂中药复方中的多种成分提供了技术基础^[6-12]。中药质量标志物(quality marker, Q-markers)的提出,为中药的有效和质量控制提供了理论基础^[13-16]。在清肺汤中,黄芩中黄芩苷具有抗过敏、解热(肺热咳嗽)、抗炎

等药理活性。黄芩中汉黄芩苷具有抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗氧化、心血管保护、神经保护等多种药理活性^[17-19]。甘草中的甘草酸、甘草次酸及甘草的黄酮类化合物具有镇咳、祛痰、平喘的作用^[20-21]。五味子中五味子醇甲具有抑制中枢神经系统、镇静、催眠、宁神安定及抗氧化作用^[22-23]。此外,桑白皮黄酮类成分具有止咳、平喘、祛痰、利尿、解痉、镇痛、耐缺氧等作用,如绿原酸^[24]。桔梗中桔梗皂苷 D 具有祛痰作用^[25-27]。梔子中梔子苷具有解热镇痛、抗炎、镇静催眠、降血糖等药理作用^[28]。陈皮中橙皮苷具有抗炎、抗过敏、清除自由基及抗氧化作用^[29]。苦杏仁中苦杏仁苷有镇咳平喘、抗肿瘤、抗炎、抗氧化作用^[30]。本研究将《中国药典》2015 年版中药材质量检测项下规定的梔子中的梔子苷、苦杏仁中的苦杏仁苷、陈皮中的橙皮苷、黄芩中的黄芩苷、甘草中的甘草酸(甘草酸铵)以及五味子中的五味子醇甲纳入含量测定中^[31]。结合清肺汤原治疗病症,将具有相似药理活性的绿原酸、汉黄芩苷同时纳入含量测定中。

上述 8 种指标成分可较为全面地概括清肺汤的临床作用。以此为基础,建立了以多种指标成分含量测定结合指纹图谱分析市售清肺汤制剂的方法。通过 8 种指标成分每日服用量的热图聚类分析评价表征与区分不同来源清肺汤市售制剂,并结合全方指纹图谱相似度较为全面地反映清肺汤制剂的整体的特点,以期推进对清肺汤市售制剂的质量监控,确保清肺汤市售制剂的安全、稳定和有效。

1 仪器与试剂

DZL 型煎药壶,潮州市潮安区康尔顺贸易有限

公司; N-10000 型旋转蒸发仪、FDU-2100 型冷冻干燥机, EYELA 公司; Milli-Q 型去离子水机, 美国 Millipore 公司; JA2103N 型千分之一天平, 上海新桥衡器科学仪器有限公司; FA124 型万分之一天平, 天津亿诺科学仪器有限公司; SHZ-D (III) 型循环式水式真空泵, 河南省予华仪器有限公司; KQ-400B 型高功率数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; FW100 型万能粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司; TDGC2-3KVA 型接触式调压器, 飘峰电气有限公司; Agilent 1260-VWD 型高效液相色谱仪, 可变波长扫描检测器, 美国 Agilent 公司。

乙腈、磷酸 (质量分数 85%), 色谱纯, 美国 Fisher 公司。对照品绿原酸 (批号 110753-201817, 质量分数 96.8%)、苦杏仁苷 (批号 110820-201808, 质量分数 93.4%)、栀子苷 (批号 110749-201718, 质量分数 97.6%)、橙皮苷 (批号 110721-201818, 质量分数 96.2%)、黄芩苷 (批号 110715-201821, 质量分数 95.4%)、甘草酸铵 (批号 110731-201720, 质量分数 97.7%)、汉黄芩苷 (批号 112002-201702, 质量分数 98.5%) 均购自中国食品药品检定研究院。对照品五味子醇甲 (批号 Y13D8H50595, HPLC 检测得质量分数 $\geq 98.0\%$) 购自上海源叶生物科技有限公司。黄芩 (产地山西, 批号 T100601-1)、桔梗 (产地河北, 批号 T180601-1)、茯苓 (产地安徽, 批号 T180601-1)、陈皮 (产地四川, 批号 181001-1)、贝母 (产地杭州, 批号 181001-1)、桑白皮 (产地河北, 批号 180814-1)、当归 (产地甘肃定西, 批号 T180601-1)、天门冬 (产地云南, 批号 180812-1)、山栀 (产地江西, 批号 180810-1)、苦杏仁 (产地河北, 批号 180106-1)、麦冬 (产地四川, 批号 T181001-1)、五味子 (产地大连, 批号 180816-1)、甘草 (产地内蒙古, 批号 T180601-1)、大枣 (产地山东, 批号 181110-1)、生姜 (产地河北, 批号 180101-1) 均由天津同仁堂集团股份有限公司提供, 并进行质量检查。由中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所郭宝林研究员鉴定, 黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根; 桔梗为桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根; 茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核; 陈皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮; 贝母为百合科植物浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq. 的干燥鳞茎; 桑白皮为桑科植物桑

Morus alba L. 的干燥根皮; 当归为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根; 天门冬为百合科植物天冬 *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr. 的干燥块根; 栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实; 苦杏仁为蔷薇科植物山杏 *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. 的干燥成熟种子; 麦冬为百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f) Ker-Gawl. 的干燥块根; 五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实; 甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎; 大枣为鼠李科植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实; 生姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的根茎。

清肺汤浓缩锭, 批号 G26419, 港香兰药厂股份有限公司, 简称制剂 A; 清肺汤浓缩颗粒, 批号 K09916, 港香兰药厂股份有限公司, 简称制剂 B; 清肺汤萃取物颗粒, 批号 N34151, 日本津村药业有限公司, 简称制剂 C; 清肺汤浓缩颗粒, 批号 18102431, 台湾顺天堂药厂股份有限公司, 简称制剂 D; 清肺汤浓缩散, 批号 E073RR1, 台湾仙丰股份有限公司, 简称制剂 E。

2 方法与结果

2.1 清肺汤市售制剂中成分含量与指纹图谱测定

2.1.1 混合对照品溶液制备 取绿原酸、苦杏仁苷、栀子苷、橙皮苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸铵、五味子醇甲对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶液配制成含绿原酸 122.55 $\mu\text{g/mL}$ 、苦杏仁苷 561.15 $\mu\text{g/mL}$ 、栀子苷 134.30 $\mu\text{g/mL}$ 、橙皮苷 120.73 $\mu\text{g/mL}$ 、黄芩苷 585.37 $\mu\text{g/mL}$ 、汉黄芩苷 297.08 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草酸铵 832.40 $\mu\text{g/mL}$ 、五味子醇甲 48.96 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 清肺汤的干浸膏粉制备 将处方药材黄芩、桔梗、茯苓、陈皮、贝母、桑白皮、当归、天门冬、山栀、苦杏仁、麦门冬、五味子、甘草共 13 味药材用中药粉碎机粉碎后, 过一号筛。取黄芩粉 4.5 g, 桔梗粉、茯苓粉、陈皮粉、贝母粉、桑白皮粉各 3.0 g, 当归粉、天门冬粉、山栀粉、杏仁粉、麦门冬粉各 2.1 g, 五味子粉、甘草粉各 0.9 g, 生姜 2.5 g, 大枣 3.0 g, 于煎药壶中以蒸馏水或去离子水 350 mL 浸泡 50 min, 以 210 V 电压加热至水沸腾, 调整电压至 150 V 保持沸腾约 25 min, 倾倒入汤剂; 再加入水 350 mL, 以 210 V 电压加热至水沸腾, 调整电

压至 150 V 保持沸腾约 18 min, 倾倒入汤剂与第 1 次倒出的汤剂混合, 汤剂体积为 350 mL^[32-34]。将汤剂用旋转蒸发仪 55 °C 浓缩至稠浸膏状, -85 °C 冷冻干燥 30 h。即得清肺汤干浸膏粉, 干燥器内密封保存。通过在全方中减去黄芩并按清肺汤煎煮与干燥方法制得清肺汤黄芩阴性对照处方干浸膏粉, 同法制备其余 14 种药材的清肺汤阴性对照处方干浸膏粉。

2.1.3 供试品溶液制备 取自制清肺汤干浸膏粉 0.50 g 于 50 mL 三角瓶中, 先加 50% 甲醇 25 mL, 称定质量, 超声 (240 W, 40 kHz) 提取 20 min, 50% 甲醇补足减失质量, 摇匀, 静置 30 min 后, 取上清液过 0.22 μm 孔径微孔滤膜, 即得待测样品 a, 用以测定甘草酸铵、五味子醇甲、苦杏仁苷的含量和样品的指纹图谱。精密移取待测样品 a 2 mL 于 25 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇定容, 摇匀, 静置 30 min, 取上清液过 0.22 μm 孔径微孔滤膜, 即得待测样品稀释品 b, 用以测定绿原酸、栀子苷、橙皮苷、黄芩苷、汉黄芩苷的含量。

取足量清肺汤市售制剂研磨成粉, 精密称取粉末适量, 各包含干浸膏 0.50 g (制剂 A 1.00 g 粉末、制剂 B 1.00 g 粉末、制剂 C 0.75 g 粉末、制剂 D 1.04 g 粉末、制剂 E 0.75 g 粉末), 同法制备清肺汤市售制剂待测样品。取各单味药材阴性对照处方干浸膏粉各 0.50 g, 同法制备各单味药材阴性对照处方待测样品。

2.1.4 色谱条件 采用 Agilent Technologies Zorbax SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 3.5 μm) 色谱柱, 以 0.1% 磷酸水溶液-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 洗脱程序: 0~10 min, 5% 乙腈; 10~25 min, 5%~10% 乙腈; 25~50 min, 10%~12% 乙腈; 50~60 min, 12%~16% 乙腈; 60~135 min, 16%~26% 乙腈; 135~170 min, 26%~56% 乙腈; 170~182 min, 56%~90% 乙腈; 182~187 min, 90% 乙腈; 柱温 35 °C, 体积流量 0.6 mL/min, 进样量 10 μL, 检测波长: 0~35 min, 330 nm; 35~40 min, 210 nm; 40~60 min, 238 nm; 60~67 min, 316 nm; 67~91.1 min, 280 nm; 91.1~107.5 min, 250 nm; 107.5~152.5 min, 280 nm; 152.5~161 min, 238 nm; 161.0~175 min, 210 nm; 175~187 min, 326 nm。同时对指标成分的含量和清肺汤样品指纹图谱进行测定。

2.1.5 专属性考察 分别精密吸取清肺汤处方供试品溶液、混合对照品溶液、各单味药材阴性对照处

方供试品溶液各 10 μL, 在“2.1.4”项下色谱条件分析, 见图 1-A~I。

优选出 21 个共有峰用以评价清肺汤指纹图谱相似度, 如图 1-A 所示, 9 号峰 (橙皮苷) 为参照峰, 用以评价相对保留时间与相对峰面积。

如图 1-B~I 所示, 清肺汤与各阴性对照处方对照图表明, 清肺汤中绿原酸为桑白皮专属成分; 苦杏仁苷为苦杏仁专属成分; 栀子苷为栀子专属成分; 橙皮苷为陈皮专属成分; 黄芩苷、汉黄芩苷为黄芩专属成分; 甘草酸铵为甘草专属成分; 五味子醇甲为五味子专属成分。8 种化合物在相应测定波长与其相邻色谱峰的分度均大于 1.5, 各阴性对照处方在相应位置上基本无干扰, 表明方法专属性良好。

2.1.6 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 0.1、0.2、0.4、1.0、2.0、4.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。按“2.1.4”项测定条件测定各对照品色谱峰面积, 以对照品质量浓度为横坐标 (X), 色谱峰峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得 8 种指标成分的回归方程与线性范围分别为绿原酸 $Y=54.64 X-46.23$, $r^2=0.999 9$, 线性范围 1.23~122.55 μg/mL; 苦杏仁苷 $Y=16.54 X-10.05$, $r^2=1.000 0$, 线性范围 5.61~561.15 μg/mL; 栀子苷 $Y=25.96 X-4.22$, $r^2=1.000 0$, 线性范围 1.34~134.30 μg/mL; 橙皮苷 $Y=12.26 X-2.38$, $r^2=0.999 9$, 线性范围 2.41~120.73 μg/mL; 黄芩苷 $Y=22.36 X-155.13$, $r^2=0.999 8$, 线性范围 5.85~585.37 μg/mL; 汉黄芩苷 $Y=65.74 X-40.57$, $r^2=1.000 0$, 线性范围 2.97~297.08 μg/mL; 甘草酸铵 $Y=10.83 X-112.95$, $r^2=1.000 0$, 线性范围 8.32~832.40 μg/mL; 五味子醇甲 $Y=102.74 X-9.15$, $r^2=0.999 9$, 线性范围 0.49~48.96 μg/mL。

2.1.7 精密度考察 含量测定精密度: 精密吸取同一份混合对照品溶液 10 μL 测定 8 种成分含量的精密度, 按“2.1.4”项下测定条件连续进样 6 次, 分别记录各成分的峰面积, 并计算 RSD。结果绿原酸、苦杏仁苷、栀子苷、橙皮苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸铵、五味子醇甲 8 种成分的峰面积 RSD 分别为 0.12%、0.15%、0.25%、0.44%、1.85%、0.37%、1.32%、0.20%, 结果表明建立的方法用于含量测定精密度良好。

指纹图谱精密度: 精密吸取同 1 份清肺汤处方供试品 a 溶液 10 μL, 按“2.1.4”项下测定条件连

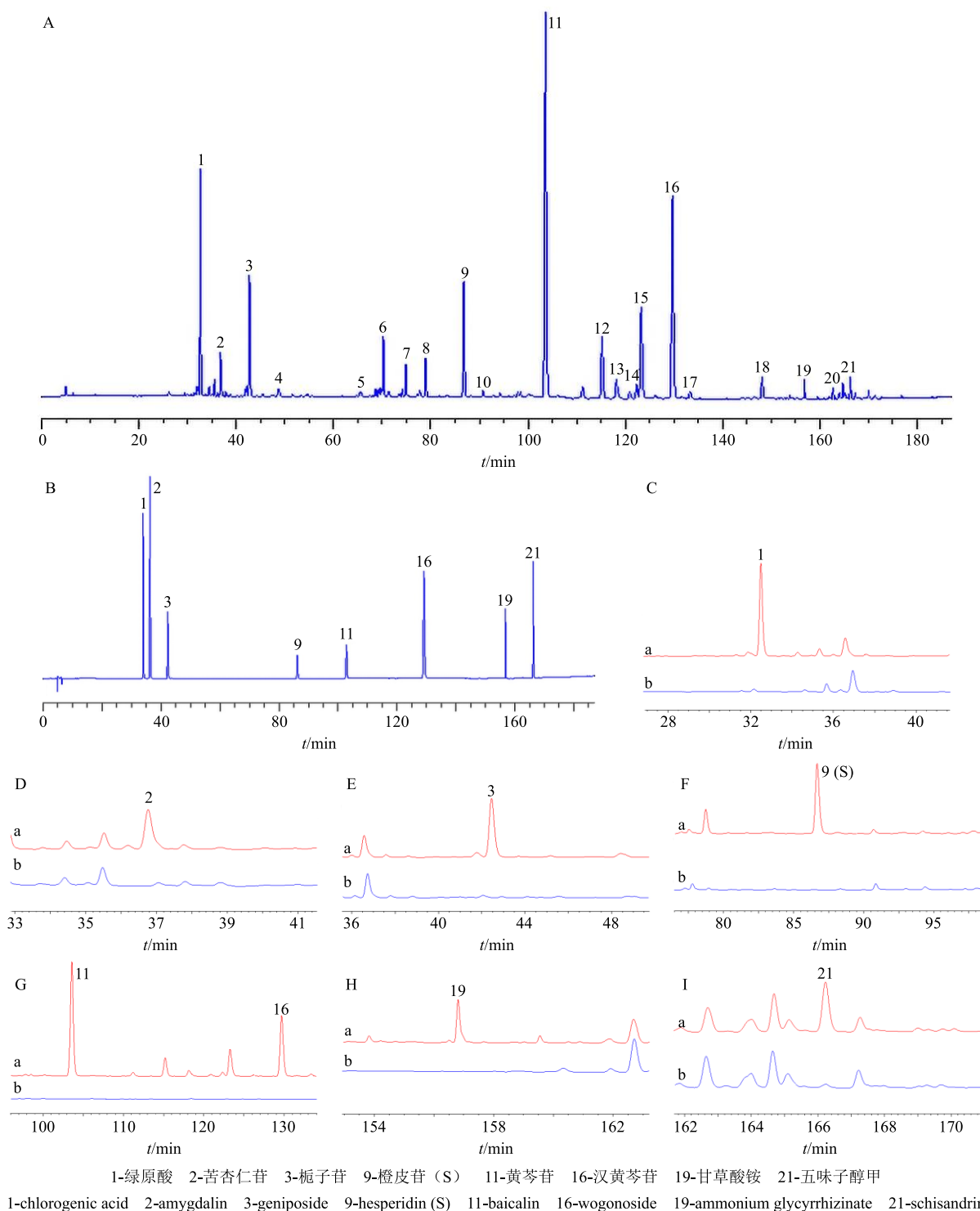


图 1 清肺汤指纹图谱 (A)、8 种指标成分混合对照品溶液 (B)、清肺汤与各单味药材阴性对照处方对照图 (C~I, a-清肺汤处方, b-各单味药材阴性对照处方)

Fig. 1 Fingerprint of Qingfei Decoction (A), mixed references solution of eight components (B), Qingfei Decoction and negative control prescription of each single herb comparison chart (C~I, a-Qingfei Decoction prescription, b-negative control prescription of each single herb)

续进样 6 次, 分别记录 21 个共有峰的保留时间和峰面积, 计算保留时间和峰面积的 RSD, 以橙皮苷为参照峰 (S) 计算相对保留时间和相对峰面积的 RSD

值, 结果表明建立的方法用于指纹图谱测定精密度良好。结果见表 1。

2.1.8 重复性考察 精密称取清肺汤干浸膏粉 6

份,按“2.1.3”项下制备供试品溶液,按“2.1.4”项下测定条件测定 8 种成分在干浸膏中的含量,同时建立清肺汤的指纹图谱。含量测定结果绿原酸、苦杏仁苷、栀子苷、橙皮苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸铵、五味子醇甲 8 种成分在干浸膏中质量分数 RSD 分别为 0.32%、1.82%、0.37%、0.51%、1.54%、0.73%、1.03%、1.02%。指纹图谱重复性结果见表 1。表明方法同时用于含量测定和指纹图谱测定重复性良好。

2.1.9 稳定性考察 含量测定稳定性:精密称取清肺汤干浸膏粉 1 份,按“2.1.3”项下制备供试品溶液,分别于 0、4、8、12、24、48 h 按“2.1.4”项下测定条件测定 8 种成分在干浸膏中的含量,并计算 RSD。结果绿原酸、苦杏仁苷、栀子苷、橙皮苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸铵、五味子醇甲 8 种成分在干浸膏中质量分数 RSD 分别为 0.32%、1.49%、

0.53%、0.32%、0.17%、0.13%、0.33%、0.15%。

指纹图谱稳定性:精密称取清肺汤干浸膏粉 1 份,按“2.1.3”项下制备供试品 a 溶液,分别于 0、4、8、12、24、48、72、168、192 h 按“2.1.4”项下测定样品指纹图谱。结果 192 h 内指纹图谱中 21 个共有峰相对峰面积 RSD 均小于 5.03%,结果见表 1。表明样品在 192 h 内稳定。

2.1.10 加样回收率考察 精密称取已知 8 种指标成分含量的自制清肺汤干浸膏粉 6 份,每份 0.25 g,精密称定,放入 50 mL 三角瓶中,精密加入近似等量的 8 种对照品溶液,按“2.1.3”项方法制备供试品溶液,按“2.1.4”项下测定条件测定样品中 8 种成分的含量,并计算加样回收率。结果绿原酸、苦杏仁苷、栀子苷、橙皮苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸铵、五味子醇甲等 8 种成分的加样回收率分别为 (101.28±0.59)%、(99.95±1.51)%、(96.31±

表 1 清肺汤指纹图谱重复性、精密度和稳定性

Table 1 Repeatability, precision and stability results of Qingfei Decoction fingerprints

指纹特征 峰序号	检测成分	t_R/min ($\bar{x} \pm s, n=6$)	精密度 RSD/% ($n=6$)		重复性 RSD/% ($n=6$)		稳定性 RSD/% (192 h)	
			相对保留时间	相对峰面积	相对保留时间	相对峰面积	相对保留时间	相对峰面积
1	绿原酸	32.55±0.05	0.08	0.45	0.10	0.24	0.23	0.26
2	苦杏仁苷	36.63±0.04	0.07	0.79	0.10	1.02	0.21	1.65
3	栀子苷	42.53±0.03	0.14	0.60	0.12	0.17	0.31	0.12
4	—	48.47±0.06	0.09	9.21	0.19	4.38	0.28	1.95
5	阿魏酸	65.34±0.05	0.04	4.29	0.10	2.43	0.11	2.92
6	—	70.10±0.04	0.07	1.16	0.05	2.52	0.06	4.45
7	—	74.69±0.05	0.07	0.31	0.04	0.14	0.03	4.93
8	芸香柚皮苷	78.71±0.06	0.02	0.27	0.04	0.11	0.03	0.87
9 (S)	橙皮苷	86.53±0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	—	90.50±0.09	0.01	12.36	0.03	1.36	0.01	1.71
11	黄芩苷	103.25±0.09	0.02	37.88	0.06	0.64	0.09	0.15
12	—	114.86±0.10	0.03	3.77	0.06	1.02	0.08	0.37
13	—	117.81±0.10	0.04	1.24	0.07	0.30	0.08	0.19
14	—	121.96±0.10	0.03	1.85	0.07	0.60	0.08	0.34
15	—	122.90±0.09	0.03	1.11	0.08	0.61	0.09	0.09
16	汉黄芩苷	129.30±0.10	0.03	1.21	0.07	0.33	0.09	0.07
17	—	132.97±0.10	0.04	1.44	0.08	0.20	0.10	3.25
18	黄芩素	147.93±0.06	0.07	56.97	0.08	8.78	0.09	5.03
19	甘草酸铵	156.77±0.01	0.12	2.55	0.11	0.76	0.13	0.25
20	汉黄芩素	162.61±0.02	0.11	15.79	0.09	7.36	0.12	0.21
21	五味子醇甲	166.18±0.01	0.12	0.58	0.11	1.01	0.13	0.17

S-代表基准峰;“—”为未知成分

S-represents reference peak; “—” represents unknown components

1.11) %、(96.07±0.58) %、(93.19±1.93) %、(94.69±1.09) %、(102.36±4.17) %、(100.57±0.90) %，RSD 分别为 0.58%、1.51%、1.15%、0.61%、2.07%、1.15%、4.07%、0.89%，结果表明方法加样回收率结果良好。

2.1.11 样品测定结果 分别取 5 种清肺汤市售制剂样品粉末，按“2.1.3”项下制备供试品溶液，按“2.1.4”项下测定条件测定 8 种成分在干浸膏粉中的含量，并结合各制剂的服用说明（A~E 所代表的各制剂中干浸膏粉的每日服用量分别 5.4、6、6、6.5、4 g），计算出 8 种指标成分在不同清肺汤市售制剂中的每日服用量，结果见表 2。指纹图谱见图 2，指纹图谱相似度结果见表 3。

2.2 结果分析

指纹图谱相似度结果表明，不同来源的清肺汤市售制剂相似度较高，相似度均大于等于 0.945。8 种指标成分在不同来源清肺汤市售制剂中的每日服用量进行归一化处理，处理后数据进行热图聚类分析，见图 3。结果不同来源的清肺汤市售制剂得到准确地区分。从热图聚类分析结果可以看出来自港香兰药厂股份有限公司的不同剂型（颗粒剂与錠剂）被聚类为一组，表明建立的含量测定方法结合热图聚类分析能够有效地区分清肺汤市售制剂。同时热图聚类分析结果表明来源于黄芩的黄芩苷和汉黄芩苷聚类为一组，表明建立的含量测定方法结合热图聚类分析可以帮助对清肺汤中成分的药材

表 2 清肺汤市售制剂中 8 种指标成分的每日服用量 ($n=2$)

Table 2 Daily dosage of eight indicator components in marketed Qingfei Decoction preparation ($n=2$)

制剂	每日服用量/mg							
	绿原酸	苦杏仁苷	栀子苷	橙皮苷	黄芩苷	汉黄芩苷	甘草酸铵	五味子醇甲
A1	0.30	7.68	22.77	42.08	141.61	17.60	3.13	0.39
A2	0.31	7.66	22.77	42.06	140.96	17.51	3.12	0.39
B1	3.37	9.61	23.03	42.36	142.47	19.57	4.01	0.40
B2	3.36	9.71	23.01	42.33	140.00	19.47	3.98	0.40
C1	3.82	15.18	28.10	33.07	112.59	14.48	11.47	1.07
C2	3.82	15.79	28.11	33.07	112.98	14.48	11.45	1.07
D1	0.91	17.90	27.57	39.10	224.05	29.67	10.81	0.62
D2	0.91	18.12	27.54	39.08	223.80	29.67	10.79	0.63
E1	0.01	5.35	13.59	13.30	59.85	9.69	2.51	0.01
E2	0.01	5.40	13.58	13.32	59.85	9.68	2.50	0.01

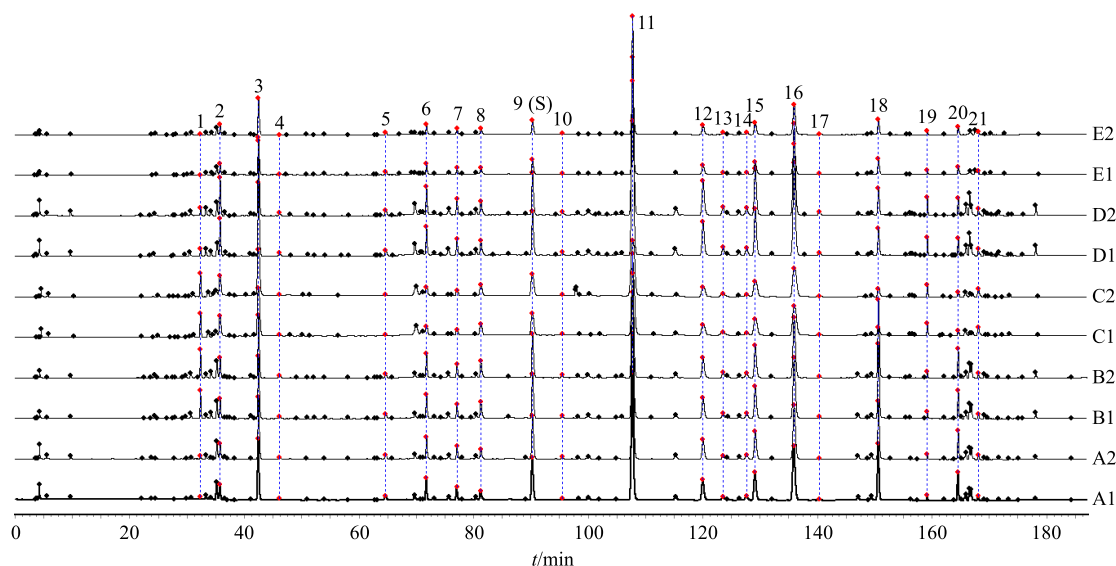


图 2 清肺汤市售制剂指纹图谱

Fig. 2 Fingerprint of commercially available Qingfei Decoction preparations

表 3 清肺汤市售制剂指纹图谱相似度

Table 3 Fingerprint similarity of commercially available Qingfei Decoction preparations

制剂	相似度									
	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2	E1	E2
A1	1.000									
A2	1.000	1.000								
B1	0.994	0.995	1.000							
B2	0.993	0.993	1.000	1.000						
C1	0.959	0.958	0.949	0.945	1.000					
C2	0.959	0.958	0.949	0.945	1.000	1.000				
D1	0.975	0.974	0.961	0.957	1.000	0.969	1.000			
D2	0.975	0.974	0.961	0.956	1.000	0.969	1.000	1.000		
E1	0.983	0.982	0.975	0.973	1.000	0.979	0.982	0.982	1.000	
E2	0.982	0.982	0.975	0.972	1.000	0.980	0.982	0.982	1.000	1.000

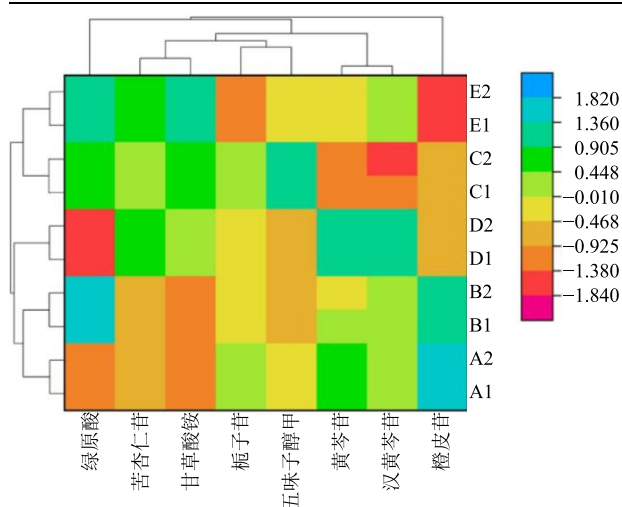


图 3 清肺汤市售制剂中 8 种指标成分的每日服用量热图聚类分析

Fig. 3 Heat map cluster analysis of eight indicator components daily dosages in commercially available Qingfei Decoction preparations

来源进行归属。

3 讨论

3.1 色谱条件优化

实验中对流动相的种类（甲醇-纯水、甲醇-加酸水、乙腈-纯水、乙腈-加酸水）和酸度的比例（乙腈-0.05%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.2%磷酸水溶液、乙腈-0.2%甲酸水溶液），以及色谱柱柱温（30、35、40 ℃），洗脱体积流量（0.5、0.6、0.8、1.0 mL/min）等进行了优化，以整体峰形和分离度为指标进行评价，优选以 0.1%磷酸水溶液-乙腈为流动相，梯度洗脱，柱温 35 ℃，体积流量 0.6 mL/min 为清肺汤色谱检测条件。同时，以药典

中检测波长为基础，结合实际扫描结果中各指标成分的响应情况，确定各指标成分的检测波长。例如，黄芩苷紫外检测最大吸收波长 274 nm，药典检测波长 280 nm^[23]，考虑到黄芩苷单个指标成分在清肺汤处方中的含量最高，与其他成分的出峰响应差别较大，不利于处方整体的含量测定和指纹图谱分析，选择波谷吸收 250 nm 作为黄芩苷检测波长可较大地减小这种冲突。此外，汉黄芩苷紫外检测最大吸收在 274 nm，橙皮苷紫外检测最大吸收在 286 nm，两者在 280 nm 处均有较大的响应，故以 280 nm 作为检测波长。苦杏仁苷药典检测波长为 207 nm，清肺汤处方样品在近紫外吸收波段下，溶剂峰以及多个指标成分峰都存在较为明显的吸收干扰，选择 210 nm 作为苦杏仁苷的检测波长可保证苦杏仁苷的分离度。综上，清肺汤复方成分复杂，各化学成分色谱行为差异较大，为确保处方中各指标成分在紫外检测中都有合适的响应被检测到，利用紫外扫描检测器可变波长的优势，以程序波长对各指标成分进行综合检测。

3.2 指纹图谱方法的建立

指纹图谱测定方法与含量测定方法一致，大大节省了检测的时间成本，不仅可以定量分析 8 种指标成分含量，同时也能对全方进行特征分析。本方法选取的 21 个指纹图谱共有峰，占全方总峰面积 90%以上，其中陈皮的主要活性成分橙皮苷（峰 9）分离度、稳定性良好，纯度高，具有抗肿瘤、抗过敏性哮喘等作用，将其作为清肺汤指纹图谱的参照峰（S）。本方法建立的清肺汤指纹图谱具有较强的代表性和特征性。

3.3 结果分析

通过建立的含量测定方法对不同厂家清肺汤中 8 种指标成分每日服用量进行测定, 结果表明不同厂家清肺汤中 8 种指标成分每日服用量波动范围较大。例如 5 种市售清肺汤制剂中黄芩苷的每日服用量在 59.85~223.95 mg 内波动, 该结果可为清肺汤的临床使用提供一定的依据。如在治疗咳嗽伴随着并发过敏症状时, 可建议服用黄芩苷每日服用量较高的台湾顺天堂药厂的清肺汤浓缩颗粒。这种采用含量测定分析结合指导临床应用的方法, 可为其他的中药复方制剂的临床应用提供一定的依据。

参考文献

- [1] 龚廷贤. 万病回春 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984.
- [2] 李世华, 王育学. 龚廷贤·医学全书 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2015.
- [3] Iwasaki K, Wang Q, Satoh N, *et al.* Effects of Qing Fei Tang (TJ-90) on aspiration pneumonia in mice [J]. *Phytomedicine*, 1999, 6(2): 95-101.
- [4] 宫本康嗣, 黒岩中, 岡田秀親, 等. 清肺湯に関する研究 [J]. 日本東洋医学雑誌, 1987, 38(1): 25-30.
- [5] 穆兰澄, 曹京梅, 李冀湘, 等. 中药煮散的历史沿革与现代研究概述 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(7): 74-75.
- [6] 杨春红, 张 瑜, 张赛楠, 等. RP-HPLC-ELSD 法分离制备抗肿瘤成分达玛烷-3 β ,12 β ,20,25-四醇差向异构体 [J]. 中草药, 2016, 47(7): 1126-1131.
- [7] Gao S M, Liu J S, Wang M, *et al.* Quantitative and HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics for quality evaluation of *Codonopsis Radix* processed with different methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(2): 160-168.
- [8] 黄春兰, 朱新华, 叶慧文, 等. HPLC 法测定舒筋跌打膏中哈巴苷、哈巴俄苷、梓醇、毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷 B1、马替诺皂苷和藁本内酯 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(7): 1960-1963.
- [9] 王祥红, 谢培山, 田润涛, 等. 复方中成药保济丸的 HPLC-DAD 指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(12): 1748-1751.
- [10] 姚志红, 潘宇明, 戴 毅, 等. 3 种市售中药复方制剂消炎利胆片的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国药学杂志, 2010, 45(20): 1530-1534.
- [11] 杜小伟, 常增荣, 王京辉, 等. 藿香正气水含量测定方法的改进 [J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(7): 45-46.
- [12] 牟佳佳, 陈 芳, 陈党辉, 等. 黄芪中 5 种黄酮类成分的含量测定及其指纹图谱研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(5): 900-906.
- [13] 刘昌孝. 中药质量标志物 (Q-marker): 提高中药质量标准及质量控制理论和促进中药产业科学发展 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4517-4518.
- [14] 曹建华, 刘艳之, 刘海霞, 等. 基于“五原则”的脑震宁颗粒质量标志物 (Q-marker) 的辨识分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4654-4662.
- [15] 苏联麟, 李 昱, 徐 祯, 等. 基于多元统计分析和网络药理学的五味子醋制前后质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4643-4653.
- [16] 郝 敏, 童黄锦, 张 季, 等. 中药饮片质量标志物 (Q-marker) 研究: 莪术饮片质量评价研究及质量标准探讨 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4673-4682.
- [17] 郑勇凤, 王佳婧, 傅超美, 等. 黄芩的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中成药, 2016, 38(1): 141-147.
- [18] 付国辉, 马香芹. 黄芩的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国当代医药, 2015, 22(22): 18-20.
- [19] 申云富, 范小青. 汉黄芩苷的药理活性研究进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2016, 30(4): 98-101.
- [20] 吴宗耀, 牛李义, 梁喜爱. 甘草化学成分及药理作用分 [J]. 河南中医, 2010, 30(12): 1235-1236.
- [21] 杨 豆, 张卫波. 甘草化学成分及药理作用研究 [J]. 饲料研究, 2017(3): 21-23.
- [22] 史 琳, 王志成, 冯叙桥. 五味子化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 208-212.
- [23] 周燕燕. 五味子的现代药理作用研究进展 [J]. 海峡药, 2016, 28(3): 183-184.
- [24] 王 瑾, 张会敏, 石俊英. 桑白皮黄酮类化学成分研究进展 [J]. 齐鲁药事, 2012, 31(7): 420-422.
- [25] 李 婷, 徐文珊, 李西文, 等. 中药桔梗的现代药理研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(2): 205-208.
- [26] 金 欣, 陈 勤. 桔梗的药理作用研究新进展 [J]. 现代中药研究与实践, 2015, 29(2): 79-82.
- [27] 于维颖, 祝红杰. 桔梗治疗支气管哮喘的药理机制研究 [J]. 中医药学报, 2012, 40(3): 38-40.
- [28] 郭曙军, 赵志英. 栀子苷的药理作用及其作用机制研究进展 [J]. 包头医学院学报, 2013, 29(2): 111-113.
- [29] 张 恒, 林饶坤, 韩 向. 橙皮苷药理活性研究进展 [J]. 中南药学, 2016, 14(10): 1097-1100.
- [30] 常 军, 肖依文, 吴文婷, 等. 苦杏仁苷抗肿瘤机理研究进展 [J]. 药物生物技术, 2014, 21(6): 597-599.
- [31] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [32] 卫生部国家中医药管理局关于印发医疗机构中药煎药室管理规范的通知 [S]. 2009.
- [33] 陈士林, 黄志海, 丘小惠, 等. 中药精准煮散饮片 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(9): 1430-1440.
- [34] 陈士林, 刘 安, 李 琦, 等. 中药标准汤剂研究策略 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(8): 1367-1371.