

基于多组分含量测定和化学计量学的风寒感冒颗粒整体质量评价研究

许莉¹, 黄晓婧¹, 高鹏¹, 赵小勤¹, 文永盛¹, 谭鹏^{2*}

1. 成都市食品药品检验研究院, 国家药品监督管理局中药材质量监测评价重点实验室, 四川 成都 610045

2. 四川省中医药科学院, 国家中医药管理局中药质量生物评价重点研究室, 四川 成都 610041

摘要: **目的** 建立一种超高效液相色谱(UHPLC-UV)波长切换法同时测定风寒感冒颗粒中 *D*-苦杏仁苷、葛根素、橙皮苷等 14 种化学成分的含量, 结合化学计量学分析不同来源样品的质量差异。**方法** 色谱柱为 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 2.7 μm), 以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相梯度洗脱, 切换波长(210、254、310 nm)对 5 家生产企业 68 批样品中 14 种化学成分含量进行测定; 并使用雷达图分析、相似度评价、热图聚类分析和主成分分析法对数据进行统计分析。**结果** 68 批样品中各成分质量分数分别为 *D*-苦杏仁苷 0.063~3.885 mg/g、3'-羟基葛根素 0.012~1.540 mg/g、葛根素 0.036~4.017 mg/g、3'-甲氧基葛根素 0.016~1.837 mg/g、葛根素-6''-*O*-木糖苷 0.004~0.449 mg/g、芹糖葛根素苷 0.021~2.076 mg/g、大豆苷 0.010~1.527 mg/g、升麻素苷 0.007~0.471 mg/g、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 0.062~1.029 mg/g、橙皮苷 0.210~8.453 mg/g、迷迭香酸 0.001~0.237 mg/g、水合氧化前胡素 0.007~0.204 mg/g、甘草酸 0.056~1.311 mg/g、氧化前胡素 0.002~0.042 mg/g。化学计量学分析表明, 同一厂家不同批次样品的整体质量一致性较好, 但不同厂家之间样品的整体质量一致性存在较大差异。**结论** 建立的基于 UHPLC 波长切换法的多组分含量测定方法简便、重复性好、专属性强, 可为风寒感冒颗粒的整体质量评控提供方法参考。

关键词: 风寒感冒颗粒; 整体质量评价; 超高效液相色谱; 波长切换法; 雷达图分析; 相似度评价; 热图聚类分析; 主成分分析; *D*-苦杏仁苷; 3'-羟基葛根素; 葛根素; 3'-甲氧基葛根素; 葛根素-6''-*O*-木糖苷; 芹糖葛根素苷; 大豆苷; 升麻素苷; 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷; 橙皮苷; 迷迭香酸; 水合氧化前胡素; 甘草酸; 氧化前胡素

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)14-3670-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.14.009

Overall quality evaluation of Fenghan Ganmao Granules based on multi-components quantitative determination and chemometric analysis

XU Li¹, HUANG Xiao-jing¹, GAO Peng¹, ZHAO Xiao-qin¹, WEN Yong-sheng¹, TAN Peng²

1. Chengdu Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Monitoring and Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610045, China

2. Sichuan Academy of Traditional Chinese Medicine, State Key Laboratory of Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To establish a method for the simultaneous content determination of 14 chemical components such as *D*-amygdalin, puerarin, hesperidin in Fenghan Ganmao Granules (FGG) by UHPLC-UV wavelength switching method, and chemometric analysis was used to analyze the quality differences. **Methods** Separation was performed on an Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 2.7 μm) with a gradient elution of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid. The content of 14 chemical components in 68 batches of samples from five manufacturers was determined by switching wavelength (210, 254, 310 nm). The radar chart, similarity evaluation, heat map and hierarchical clustering analysis, and principal component analysis (PCA) were used for data analysis. **Results** The content of each component was as follows, *D*-amygdalin 0.063—3.885 mg/g, 3'-hydroxy puerarin 0.012—1.540 mg/g, puerarin 0.036—4.017 mg/g, 3'-methoxy puerarin 0.016—1.837 mg/g, puerarin-6''-*O*-xyloside 0.004—0.449 mg/g, mirificin 0.021—2.076 mg/g, daidzin 0.010—1.527 mg/g, prim-*O*-glucosylcimifugin 0.007—0.471 mg/g, 5-*O*-methylvisammioside 0.062—1.029 mg/g,

收稿日期: 2020-02-18

基金项目: 四川省科技厅应用基础研究项目(2019YJ0640)、四川省重大科技专项(2018TZDZX0007)

作者简介: 许莉(1987—), 中药学博士, 主要从事中药质量标准研究。Tel: (028)85362592 E-mail: xulicd1987@sina.com

*通信作者 谭鹏, 中药学博士, 主要从事中药质量分析新技术的应用研究。E-mail: 2013tanpeng@sina.com

hesperidin 0.210—8.453 mg/g, rosmarinic acid 0.001—0.237 mg/g, oxypeucedanin hydrate 0.007—0.204 mg/g, glycyrrhizic acid 0.056—1.311 mg/g, oxypeucedanin 0.002—0.042 mg/g, respectively. Chemometric analysis showed that there were some differences among the samples from different manufacturers, and the samples from the same manufacturer were more consistent. **Conclusion** The method is simple, reproducible, and specific, which provides a reference method for the overall quality evaluation of FGG.

Key words: Fenghan Ganmao Granules; overall quality evaluate; UHPLC-UV; wavelength switching method; radar chart; similarity evaluation; heat map and hierarchical clustering analysis; principal component analysis; *D*-amygdalin; 3'-hydroxy puerarin; puerarin; 3'-methoxy puerarin; puerarin-6''-*O*-xyloside; mirificin; daidzin; prim-*O*-glucosylcimifugin; 5-*O*-methylvisammioside; hesperidin; rosmarinic acid; oxypeucedanin hydrate; glycyrrhizic acid; oxypeucedanin

风寒感冒颗粒源于经典名方麻黄汤，由麻黄、葛根、紫苏叶、防风、桂枝、白芷、陈皮、苦杏仁、桔梗、甘草、干姜 11 味中药组方而成，具有解表发汗、疏风散寒的功效，用于治疗风寒感冒身热、头痛、咳嗽等症。该药现行质控标准主要是《卫生部药品标准》中药成方制剂第一册（标准中原名“风寒感冒冲剂”），标准的整体质控力较弱，仅有性状、制剂通则检查项^[1]，缺少薄层鉴别和含量测定等质控方法。风寒感冒颗粒的生产企业较多，不同厂家、不同批次之间的整体质量和一致性评价至今尚无文献报道。目前其质控研究主要集中在盐酸麻黄碱、葛根素、橙皮苷、升麻素苷等 1 个或 2 个成分含量测定^[2-4]，检测指标少，难以有效控制风寒感冒颗粒的整体质量。通过文献调研，本研究选择 *D*-苦杏仁苷^[5]、葛根素^[6-8]、升麻素苷^[9]、橙皮苷^[10-11]、迷迭香酸^[12]、甘草酸铵^[13]等 14 个主要药味的特征化学成分作为指标，对风寒感冒颗粒的整体质量进行多组分化学评价。所选 14 个化学成分涵盖方中苦杏仁、葛根、防风、陈皮、紫苏叶、白芷、甘草 7 味药材，且药理活性与风寒感冒颗粒的临床应用有直接关联，这些化学成分的含量高低能在一定程度上反映风寒感冒颗粒的整体质量情况。由于选择的 14 个待测化学成分的最大吸收波长差异较大，不能在同一波长下同时测定，为兼顾各化学成分的最大吸收波长，提高灵敏度，减少干扰，本实验采用 UHPLC 波长切换法对市场占有率较高的 5 家生产企业的 68 批次样品进行含量测定，并进行化学计量学分析，以期能为风寒感冒颗粒的整体质量评控和标准修订提供一些参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Thermo 3000 超高效液相色谱仪，配备二极管阵列检测器，美国赛默飞世尔科技公司；Thomovanquish UHPLC 串联 Q Exactive plus 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱，美国赛默飞世尔科技公司；

XPE26 百万分之一电子天平，瑞士 Mettler Toledo 公司；AE-240 十万分之一电子天平，德国赛多利斯公司；SK250H 超声仪，50 kHz，上海科导超声仪器有限公司；10~100 μL 移液枪，德国 Eppendorf 公司；Milli-Q 超纯水制备系统，美国 Millipore 公司。

1.2 试剂

对照品葛根素（批号 110752-201816，质量分数 95.4%）、大豆苷（批号 111738-201603，质量分数 93.3%）、升麻素苷（批号 111522-201712，质量分数 96.2%）、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷（批号 111523-201811，质量分数 97.4%）、迷迭香酸（批号 111871-201706，质量分数 90.5%）、甘草酸铵（批号 110731-201720，质量分数 97.7%）、橙皮苷（批号 110721-201818，质量分数 96.2%）、大豆苷元（批号 111502-200402）由中国食品药品检定研究院提供；对照品 *D*-苦杏仁苷（批号 18032611，质量分数 98.0%）由成都普菲德生物技术有限公司提供；对照品 3'-羟基葛根素（批号 MUST-19041601，质量分数 99.59%）、3'-甲氧基葛根素（批号 MUST-19041602，质量分数 98.47%）、葛根素-6''-*O*-木糖苷（批号 MUST-19052801，质量分数 99.45%）、芹糖葛根素苷（批号 MUST-19022203，质量分数 99.41%）、水合氧化前胡素（批号 MUST-19022202，质量分数 99.95%）、氧化前胡素（批号 MUST-19022201，质量分数 98.04%）、川陈皮素（批号 MUST-18042205，质量分数 98.86%）由成都曼斯特生物科技有限公司提供。

色谱级甲醇、色谱级乙腈、质谱级甲酸，美国 Fisher 公司；色谱级磷酸，天津市科密欧化学试剂有限公司；分析纯甲醇、乙醇等试剂购自广东光华科技股份有限公司；水为超纯水。

1.3 样品

68 批次风寒感冒颗粒样品来自 5 个生产企业，信息见表 1。

表 1 68 批次风寒感冒颗粒样品信息

Table 1 Information of 68 batches of samples

编号	企业代号	样品数量 (批次)
S1~S13	A	13
S14~S22	B	9
S23~S39	C	17
S40~S46	D	7
S47~S68	E	22

2 方法与结果

2.1 色谱、质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 2.7 μm); 以乙腈 (A) - 0.1%磷酸水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱程序为 0~32 min, 2%~14% A; 32~57 min, 14%~18% A; 57~80 min, 18%~50% A; 体积流量为 0.3 mL/min; 柱温为 25 °C; 检测波长: 0~20 min 为 254 nm; 20~22 min 为 210 nm; 22~45 min 为 254 nm; 45~58 min 为 210 nm; 58~61 min 为 330 nm; 61~80 min 为 254 nm; 进样量为 5 μL。UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 分析过程以 0.1%甲酸水溶液为流动相 B, 其余条件同上。

2.1.2 质谱条件 离子源为 HESI-II 源; 离子传输管温度 320 °C, 辅助气温度 350 °C, 辅助气压力 10 arb, 鞘气压力 35 arb, 喷雾电压 3.50 kV。扫描方式: 正离子 Full MS/dd-MS² 模式, Full MS 分辨率为 70 000 FWHM, dd-MS² 分辨率为 17 500 FWHM, 质荷比窗口宽度为 m/z 1, 碰撞能梯度为 20、40、60 eV, 扫描范围为 m/z 100~1 500。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 取 *D*-苦杏仁苷、3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素-6''-*O*-木糖苷、芹糖葛根素苷、大豆苷、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、橙皮苷、迷迭香酸、水合氧化前胡素、甘草酸铵、氧化前胡素对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇制成含 *D*-苦杏仁苷 429.1 μg/mL、3'-羟基葛根素 235.8 μg/mL、葛根素 341.4 μg/mL、3'-甲氧基葛根素 154.6 μg/mL、葛根素-6''-*O*-木糖苷 51.5 μg/mL、芹糖葛根素苷 218.3 μg/mL、大豆苷 233.3 μg/mL、升麻素苷 46.9 μg/mL、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 97.2 μg/mL、橙皮苷 313.2 μg/mL、迷迭香酸 28.5 μg/mL、水合氧化前胡素 44.9 μg/mL、甘草酸铵 293.1 μg/mL、氧化前胡素 11.7 μg/mL 的混合

对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取风寒感冒颗粒粉末 4.0 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 准确加入甲醇 50 mL, 称定质量, 超声提取 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密吸取续滤液 5 mL, 挥干, 残渣用 50% 甲醇溶解, 并转移至 5 mL 量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性范围考察 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液, 稀释制得系列不同质量浓度的混合对照品溶液。按照“2.1.1”项色谱条件依次进样, 记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标, 化合物质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 进行线性回归, 结果见表 2。结果表明, 各成分在各自质量浓度范围内与其峰面积呈良好的线性关系。

2.3.2 精密度试验 取“2.2.1”项下混合对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算 RSD。结果显示, 14 种待测化学成分峰面积的 RSD 为 1.09%~2.28%, 表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品溶液 (S1), 分别在 0、4、8、12、16、24 h 进样测定, 记录峰面积并计算 RSD, 结果显示, 14 种待测化学成分峰面积的 RSD 为 0.30%~2.81%, 表明供试品溶液在制备后 24 h 内基本稳定。

2.3.4 重复性试验 取同一批样品 (S1), 按“2.2.2”项下方法, 平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行检测, 计算各成分含量。结果显示, 14 种待测化学成分质量分数的 RSD 为 0.24%~2.93%, 表明该测定方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品粉末 (S1) 9 份, 每份取样量为供试品溶液制备时取样量的 50%, 以当前取样含量的 0.5、1.0、1.5 倍, 分别精密加入混合对照品溶液, 按“2.2.2”项方法制备供试品溶液, 按含量测定方法测定, 计算加样回收率。结果显示, 14 种待测化学成分的加样回收率为 95.24%~100.00%; RSD 为 1.18%~2.92%。表明该方法具有良好的准确度, 方法可行。

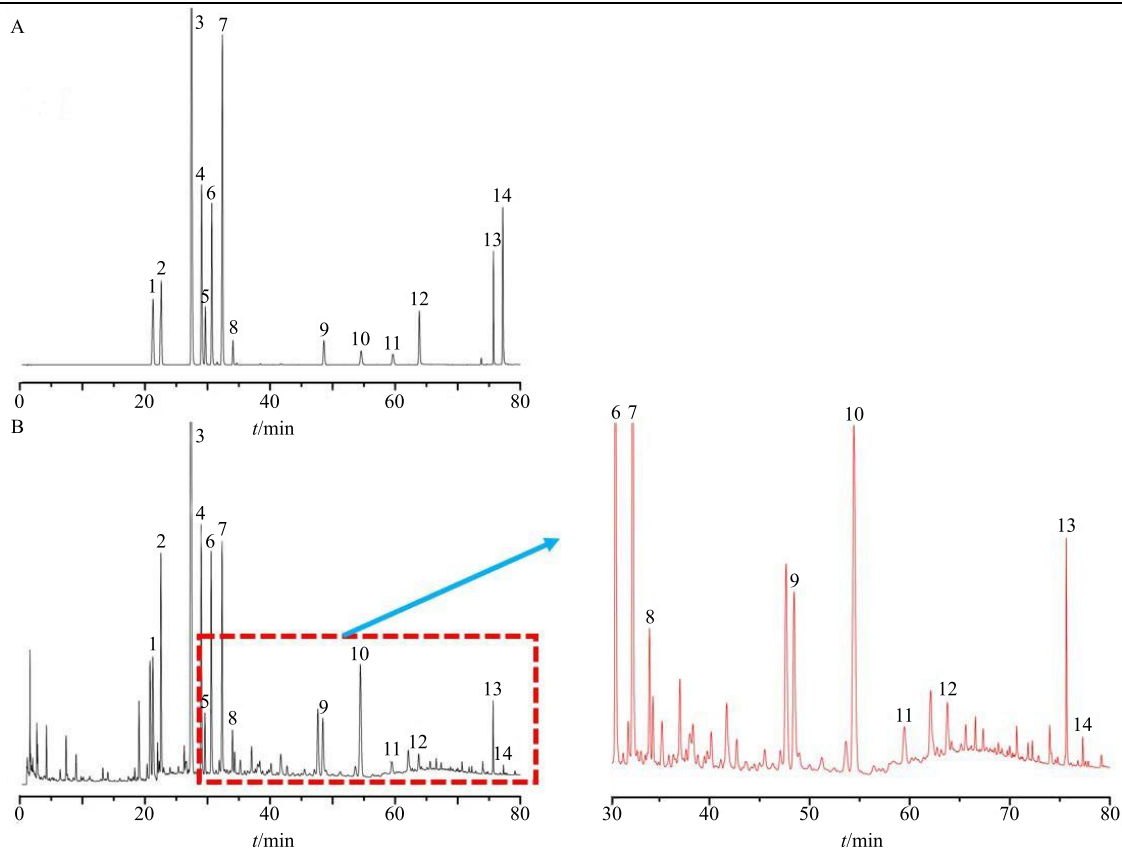
2.4 样品含量测定

按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样 5 μL 分析, 计算各成分含量。典型的色谱图见图 1, 含量测定结果见表 3。

表 2 14 种化学成分线性关系考察结果

Table 2 Linearity of 14 chemical components

峰号	化学成分	回归方程	r^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
1	D-苦杏仁苷	$Y=0.1278X+0.4738$	0.9994	2.86~429.12
2	3'-羟基葛根素	$Y=0.4703X-0.2382$	0.9999	0.47~235.83
3	葛根素	$Y=0.9808X+2.3230$	0.9996	1.71~341.38
4	3'-甲氧基葛根素	$Y=0.4568X+0.5288$	0.9995	0.77~154.64
5	葛根素-6"-O-木糖苷	$Y=0.4193X-0.0575$	0.9996	0.26~51.48
6	葛根素芹菜糖苷	$Y=0.3757X+0.4582$	0.9995	1.46~218.30
7	大豆苷	$Y=0.5594X+0.4082$	0.9996	0.58~233.32
8	升麻素苷	$Y=0.2471X+0.0675$	0.9997	0.31~46.87
9	5-O-甲基维斯阿米醇苷	$Y=0.3378X+0.1660$	0.9996	3.89~97.21
10	橙皮苷	$Y=0.3110X+1.0541$	0.9996	6.26~313.23
11	迷迭香酸	$Y=0.5539X-0.0750$	0.9996	0.07~28.53
12	水合氧化前胡素	$Y=0.5560X+0.1835$	0.9996	0.45~44.86
13	甘草酸铵	$Y=0.1172X-0.0014$	0.9996	3.91~293.10
14	氧化前胡素	$Y=0.4144X+0.0315$	0.9994	0.15~11.75



1-D-苦杏仁苷 2-3'-羟基葛根素 3-葛根素 4-3'-甲氧基葛根素 5-葛根素-6"-O-木糖苷 6-芹菜糖葛根素苷 7-大豆苷 8-升麻素苷 9-5-O-甲基维斯阿米醇苷 10-橙皮苷 11-迷迭香酸 12-水合氧化前胡素 13-甘草酸铵 14-氧化前胡素
 1-D-amygdalin 2-3'-hydroxy puerarin 3-puerarin 4-3'-methoxy puerarin 5-puerarin-6"-O-xyloside 6-mirificin 7-daidzin 8-prim-O-glucosylcimifugin 9-5-O-methylvisammioside 10-hesperidin 11-rosmarinic acid 12-oxypeucedanin hydrate 13-ammonium glycyrrhizinate 14-oxypeucedanin

图 1 混合对照品溶液(A) 和 S1 供试品溶液 (B) 的典型的 UHPLC-UV 图

Fig. 1 Typical UHPLC-UV chromatograms of mixed substances solution (A) and sample solution S1 (B)

表 3 不同厂家样品含量测定结果 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Determination analysis results ($\bar{x} \pm s$)

厂家	质量分数/(mg·g ⁻¹)						
	<i>D</i> -苦杏仁苷	3'-羟基葛根素	葛根素	3'-甲氧基葛根素	葛根素-6''- <i>O</i> -木糖苷	芹糖葛根素苷	大豆苷
A (<i>n</i> =13)	3.591±0.272	1.404±0.088	3.683±0.240	1.671±0.110	0.397±0.038	1.889±0.113	1.318±0.098
B (<i>n</i> =9)	0.691±0.301	0.876±0.210	3.096±0.249	1.202±0.145	0.287±0.033	1.386±0.167	1.018±0.167
C (<i>n</i> =17)	1.794±0.228	0.564±0.046	2.216±0.134	0.923±0.072	0.184±0.013	0.996±0.070	0.502±0.037
D (<i>n</i> =7)	0.956±0.214	0.361±0.072	1.014±0.200	0.451±0.077	0.095±0.020	0.466±0.082	0.349±0.071
E (<i>n</i> =22)	0.126±0.054	0.056±0.018	0.184±0.066	0.086±0.032	0.018±0.007	0.099±0.037	0.048±0.018

厂家	质量分数/(mg·g ⁻¹)						
	升麻素苷	5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷	橙皮苷	迷迭香酸	水合氧化前胡素	甘草酸	氧化前胡素
A (<i>n</i> =13)	0.445±0.018	0.812±0.181	3.805±0.679	0.157±0.032	0.133±0.014	1.137±0.098	0.038±0.004
B (<i>n</i> =9)	0.234±0.109	0.551±0.177	6.818±1.080	0.091±0.049	0.141±0.032	0.711±0.165	0.024±0.008
C (<i>n</i> =17)	0.121±0.011	0.458±0.038	2.175±0.213	0.088±0.013	0.036±0.004	0.568±0.060	0.026±0.003
D (<i>n</i> =7)	0.144±0.031	0.252±0.059	2.176±0.463	0.047±0.024	0.043±0.011	0.335±0.082	0.012±0.006
E (<i>n</i> =22)	0.025±0.010	0.092±0.022	0.609±0.201	0.003±0.001	0.011±0.003	0.106±0.042	0.004±0.002

为了更直观地反映各生产企业样品中化学成分的含量分布情况,绘制了 14 种化学成分的平均含量分布情况雷达图。由于不同化学成分的含量差异较大,将 5 个生产企业样品中 14 种化学成分含量平均值分别进行加和,再以各生产企业每种化学成分的含量平均值与相应总和比较,得到比值,用比值绘制雷达图,结果见图 2。结果显示,各化学成分含量比值的落点几乎没有重合,而且落点分布广,表明同一化学成分在不同企业样品中的差异较大。企业 A 的整体轮廓较大,说明该企业样品中 14 种化

学成分含量均较高,提示质量可能较好;而企业 E 的整体轮廓明显小于其他企业,说明该企业样品中 14 种化学成分含量均偏低,提示从多组分化学含量高低的角度来评价该企业样品质量可能不佳。以 *D*-苦杏仁苷为例,*D*-苦杏仁苷为苦杏仁中平喘止咳的主要活性成分^[5],企业 A 样品中的平均含量是企业 E 样品中平均含量的 28.5 倍 (3.591 mg/g vs 0.126 mg/g),且 5 个不同生产企业样品中 *D*-苦杏仁苷的含量差异较大,这是值得关注的。

2.5 化学计量学统计分析

2.5.1 指纹图谱相似度评价及特征图谱的构建

指纹图谱能更全面地反映中成药中各种化学成分的整体分布情况,尤其是在现阶段有效成分绝大多数尚不明确的情况下^[14-15]。将 68 批不同生产企业风寒感冒颗粒 UHPLC-UV 图谱,导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》,与参照谱图 (整体色谱丰度较高的 A、B、C、D 4 家生产企业样品 UHPLC-UV 图谱生成) 比较相似度,相似度分析结果见表 4。结果显示, A、B、C、D 4 家生产企业的风寒感冒颗粒样品相似度大于 0.940,表明这些批次样品间的整体差异性较小;而企业 E 样品相似度在 0.856~0.983,表明与其他企业相比,企业 E 的样品整体质量差异较大。但含量测定结果表明,不同生产企业的样品之间 14 个化学成分的含量存在一定差异,经查阅文献报道^[16-17],可能是不同样品指纹图谱没有色谱峰缺失和增加,仅存在峰

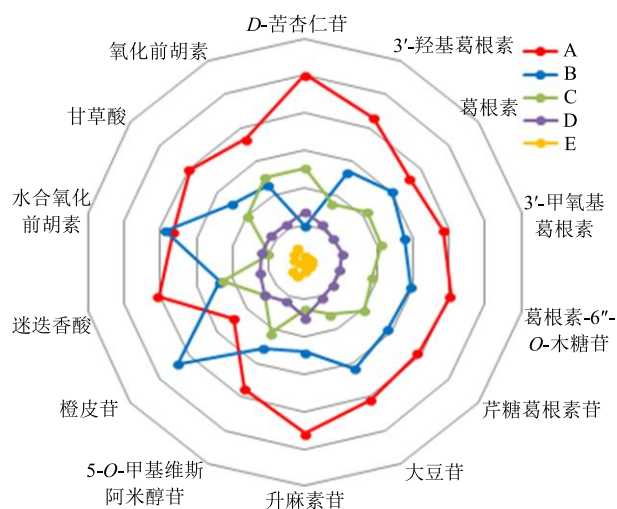


图 2 5 个生产企业样品中 14 种化学成分平均含量的分布雷达图

Fig. 2 Radar chart of average content of 14 chemical components in samples from five manufacturers

表 4 68 批样品的指纹图谱相似度评价分析结果

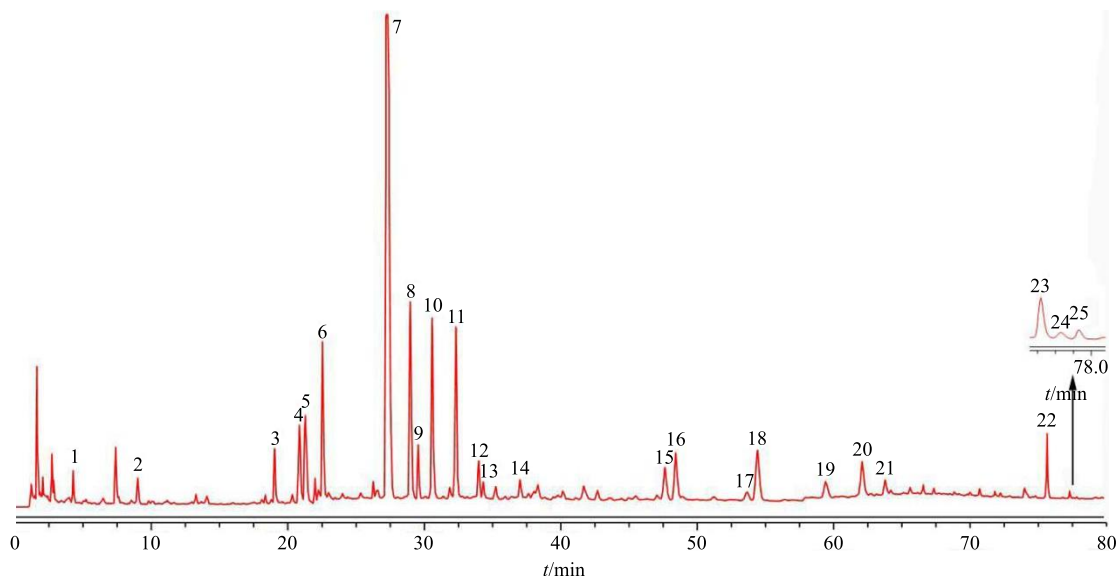
Table 4 Fingerprints similarity evaluation analysis results of 68 batches of samples

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.971	S18	0.982	S35	0.992	S52	0.941
S2	0.994	S19	0.948	S36	0.971	S53	0.961
S3	0.993	S20	0.985	S37	0.971	S54	0.891
S4	0.988	S21	0.963	S38	0.993	S55	0.884
S5	0.990	S22	0.971	S39	0.994	S56	0.932
S6	0.961	S23	0.977	S40	0.978	S57	0.968
S7	0.960	S24	0.974	S41	0.986	S58	0.889
S8	0.989	S25	0.994	S42	0.944	S59	0.913
S9	0.994	S26	0.993	S43	0.980	S60	0.944
S10	0.991	S27	0.993	S44	0.978	S61	0.856
S11	0.989	S28	0.993	S45	0.981	S62	0.874
S12	0.982	S29	0.993	S46	0.976	S63	0.873
S13	0.984	S30	0.993	S47	0.947	S64	0.974
S14	0.927	S31	0.994	S48	0.924	S65	0.893
S15	0.985	S32	0.994	S49	0.983	S66	0.918
S16	0.980	S33	0.973	S50	0.902	S67	0.937
S17	0.983	S34	0.992	S51	0.946	S68	0.966

面积大小差异, 而不同化学成分峰面积差异较大, 高达数百倍, 大峰掩盖小峰信息所致。

含量测定结果表明不同生产企业风寒感冒颗粒化学成分含量差异较大, 整体质量评控难度大。因此在多成分含量测定的基础上, 进一步建立了风寒感冒颗粒的特征指纹图谱, 以期对风寒感冒颗粒质量的整体评控提供参考。将整体色谱丰度较高的 46 批次(不含 E 厂家 22 批次)风寒感冒颗粒的 UHPLC-UV 谱图数据, 导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》, 以 S1 为参照谱图(在 46 批次样品的色谱图中峰度相对较高), 经多点校正后, 进行色谱峰的匹配, 生成特征指纹图谱。采用对照品比对和 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap HRMS 技术对 25 个共有峰进行指认, 其中 16 个色谱峰经对照品比对确证, 6 个色谱峰经过高分辨质谱指认, 构建的典型风寒感冒颗粒特征指纹图谱见图 3。经高分辨质谱分析但未经对照品比对色谱峰离子碎片信息见表 5。

2.5.2 热图聚类分析 为了更直观地展示不同企业生产的风寒感冒颗粒的多组分化学差异性, 以测得的 68 批次样品中 14 种化学成分的含量作为评价指



3-葛根素-4'-O-葡萄糖苷 4-L-苦杏仁苷 5-D-苦杏仁苷* 6-3'-羟基葛根素* 7-葛根素*(S) 8-3'-甲氧基葛根素* 9-葛根素-6''-O-木糖苷* 10-芹糖葛根素苷* 11-大豆苷* 12-升麻素苷* 13-黄豆苷* 14-染料木素-8-C-芹糖基(1→6)-葡萄糖苷 15-芸香柚皮苷 16-5-O-甲基维斯阿米醇苷* 18-橙皮苷* 19-迷迭香酸* 20-大豆苷元* 21-水合氧化前胡素* 22-甘草酸铵* 23-氧化前胡素* 24-川陈皮素* 25-6-姜烯酚* 表示经对照品比对确证

3-puerarin-4'-O-glucoside 4-L-amygdalin 5-D-amygdalin* 6-3'-hydroxy puerarin* 7-puerarin*(S) 8-3'-methoxy puerarin* 9-puerarin-6''-O-xyloside* 10-mirificin* 11-daidzin* 12-prim-O-glucosylcimifugin* 13-glycitin 14-genistein-8-C-apioside(1→6)-glucoside 15-narirutin 16-5-O-methylvisammioside* 18-hesperidin* 19-rosmarinic acid* 20-isoflavoues aglycone* 21-oxypeucedanin hydrate* 22-ammonium glycyrrhizinate* 23-oxypeucedanin* 24-nobiletin* 25-6-shogaol *identify with standard substances

图 3 典型的风寒感冒颗粒特征指纹图谱

Fig. 3 Typical characteristic fingerprint chromatogram of Fenghan Ganmao Granules

表 5 未经对照品比对共有峰的高分辨质谱离子碎片信息

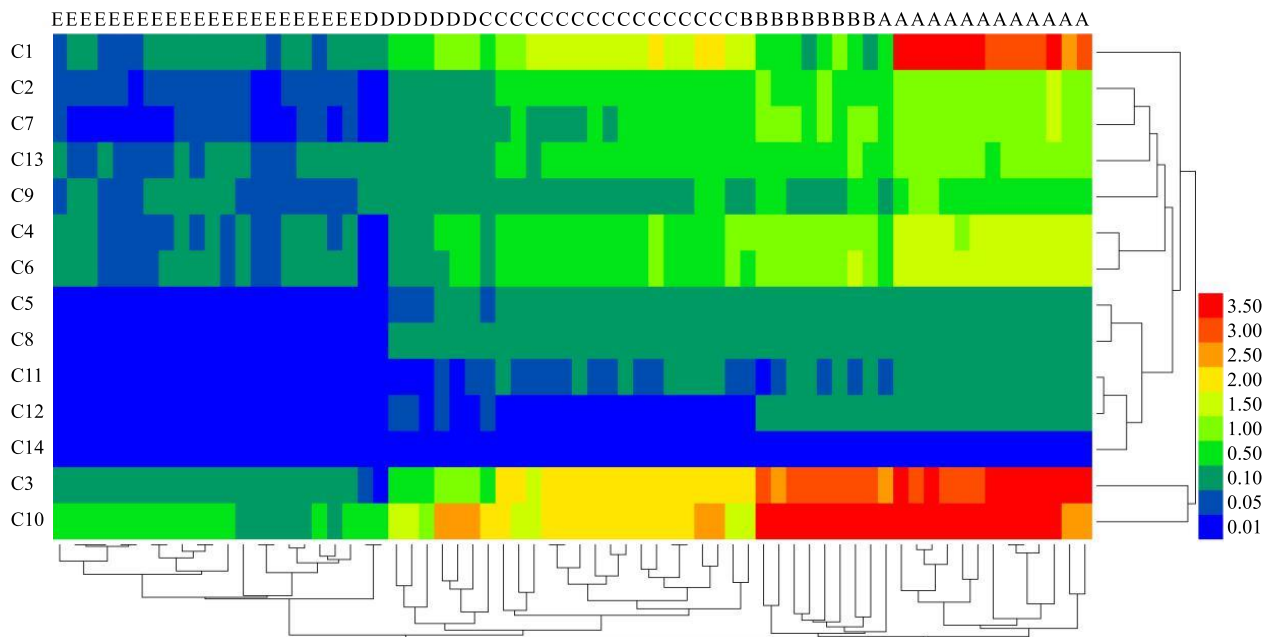
Table 5 Ion fragment information of common peaks without identify with standard substances

峰号	化合物	分子式	理论值 [M+H] ⁺	实测值 [M+H] ⁺	误差/ (×10 ⁻⁶)	二级碎片 (dd-ms ²)	λ _{max} / nm
3	葛根素-4'-O-葡萄糖苷 ^[18]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	579.170 84	579.170 59	-0.43	459.02, 431.34, 297.15	250.89
4	L-苦杏仁苷 ^[19]	C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁	458.165 69	458.165 31	-0.83	265.08, 151.05, 115.02	263.11
13	黄豆黄苷 ^[20]	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	447.128 57	447.128 78	0.47	285.08, 270.05, 220.10	256.02
14	染料木素-8-C-芹糖基 (1→6)-葡萄糖苷 ^[18]	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	565.155 19	565.155 94	1.33	433.47, 313.42, 285.17	251.18
15	芸香柚皮苷 ^[21]	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	581.186 48	581.186 40	-0.14	273.08, 153.02, 147.12	283.07
25	6-姜烯酚 ^[22]	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	277.179 82	277.179 81	-0.04	137.06, 122.04	280.12

标, 采用 HemI-1.0 软件以欧氏距离、远邻法进行热图聚类分析, 结果见图 4。其中横向聚类样品, 纵向聚类成分含量, 热图颜色条带的变化体现各成分的含量高低。热图分析结果显示不同生产企业中 14 种化学成分的含量差异较大。其中生产企业 A 各成分条带颜色偏暖, 表明其所含各成分含量均较高, 其产品质量较好; 而生产企业 E 各成分条带颜色均偏冷, 表明其所含各成分含量均较低, 其产品质量较差, 与雷达图分析结果一致。不同生产企业聚类分析结果显示 68 批次样品总体聚类区分较明显, 各企业样品各自聚为一类, 表明同一生产企业的样品

质量一致性较好而不同生产企业的样品间的质量一致性较差。成分聚类结果显示 C3、C10 聚为一类, C1 单独聚为一类, 其他成分聚为一类, 表明 C1 (D-苦杏仁苷)、C3 (葛根素)、C10 (橙皮苷) 为区分各样品的主要成分。

2.5.3 主成分分析 (principal component analysis, PCA) PCA 可对复杂信息中的多变量进行快速提取、降维分析, 通过降维可排除众多化学信息中相互重叠的信息, 生成新的综合变量即主成分, 经投影处理后, 样本最终落在主成分组成平面上的位置, 即可表征不同样本的总体信息^[23-25]。本研究以 68



C1-D-苦杏仁苷 C2-3'-羟基葛根素 C3-葛根素 C4-3'-甲氧基葛根素 C5-葛根素-6"-O-木糖苷 C6-芹糖葛根素苷 C7-大豆苷 C8-升麻素苷
 C9-5-O-甲基维斯阿米醇苷 C10-橙皮苷 C11-迷迭香酸 C12-水合氧化前胡素 C13-甘草酸 C14-氧化前胡素, 图 6 同
 C1-D-amgdalin C2-3'-hydroxy puerarin C3-puerarin C4-3'-methoxy puerarin C5-puerarin 6"-O-xyloside C6-mirificin C7-daidzin
 C8-prim-O-glucosylcimifugin C9-5-O-methylvisammioside C10-hesperidin C11-rosmarinic acid C12-oxypeucedanin hydrate C13-ammonium glycyrrhizinate C14-oxypeucedani, Fig. 6 is the same

图 4 68 批次风寒感冒颗粒中 14 种化学成分含量热图聚类分析

Fig. 4 Heat map and hierarchical clustering analysis of 14 chemical components in 68 bathes of samples

批次风寒感冒颗粒中 14 种化学成分含量为变量,采用多元变量统计软件 SIMCA 14.1 进行 PCA。分析结果显示,贡献率最大的 3 个主成分,累积方差贡献率超过 90%,表明前 3 个主成分能够充分体现出风寒感冒颗粒的基本特征和主要信息。模型 $R^2_x=0.963$, $Q^2=0.911$,表明模型拟合效果较好,结果见图 5、6。

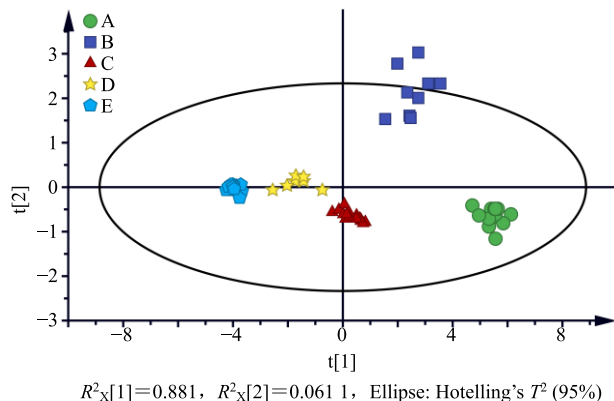


图 5 PCA 得分散点图

Fig. 5 PCA score scatter plot

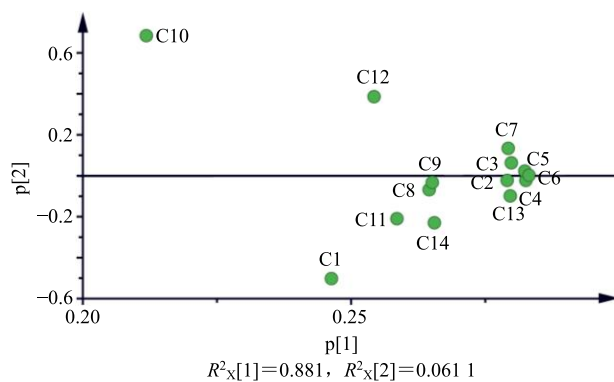


图 6 PCA 主成分载荷图

Fig. 6 PCA loading scatter plot

由图 5 可知,各生产企业样品出现明显的分类,PCA 的整体区分与热图聚类分析结果一致;企业 B 样品分布相对较分散,提示其不同批次之间的质量存在一定的差异。图 6 主成分载荷图,表示每个化学成分对主成分综合作用的贡献,每 1 个点代表 1 个化学成分,距离载荷图原点越远的变量,权重越大,代表该化合物的含量对样本区分起的作用就越大。载荷图中橙皮苷(C10)、D-苦杏仁苷(C1)在坐标系中的绝对值较大,表明这 2 个成分是区分不同生产企业风寒感冒颗粒的重要指标,与热图聚类分析结果一致。橙皮苷是陈皮的指标性成分,具有增强毛细血管韧性、缩短出血时间等药理活性^[10-11];目前,市场流通环节的陈皮来源混杂,茶枝柑、大

红袍、朱橘、温州蜜桔、福橘等数十个柑橘品种或品系的成熟果皮均作陈皮使用,且产地、加工方式、储藏时间等不同,导致药材中橙皮苷含量差异显著,提示生产企业应关注陈皮投料药材的质量一致性。D-苦杏仁苷是苦杏仁止咳平喘的主要活性成分,易异构化为 L-苦杏仁苷,且在一定的温度和湿度条件下易被水解为葡萄糖、氢氰酸和苯甲醛,导致 D-苦杏仁苷含量差异较大,提示生产企业应关注苦杏仁投料的原药材质量及提取工艺对 D-苦杏仁苷的影响。

3 讨论

课题组前期到生产企业实地调研,发现不同生产企业用于投料的原药材来源、大生产过程中的工艺参数(如加水量、挥发油提取方式及提取时间、制成总量)、生产设备等存在较大差异。本实验研究结果表明,同一企业不同批次样品的整体质量一致性(化学一致性)相对较好,但不同企业之间样品的整体质量一致性差异较大,这值得监管部门和企业的关注。

中成药化学成分复杂,仅仅测定少数几个指标性成分很难全面反映中成药的整体质量差异,多组分化学表征有利于其整体质量评控。通过文献调研,本研究建立了风寒感冒颗粒处方中 7 味药味 14 种化学成分的同时定量分析方法,以评价风寒感冒颗粒整体质量。课题组曾尝试同时测定君药麻黄的指标性成分盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱,但由于化学性质差异较大,分离度及峰型较差,不能满足测定条件,故采用水蒸气蒸馏法对其进行单独测定。测定结果显示 5 家不同生产企业的风寒感冒颗粒中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱总量均值规律为 C (0.545 mg/g) > A (0.519 mg/g) > B (0.436 mg/g) > D (0.211 mg/g) > E (0.100 mg/g),生产企业 E 二者总量仅为生产企业 C 的 18.34%。

本实验建立了基于 UHPLC 波长切换法的风寒感冒颗粒中 14 种化学成分的同时定量分析方法,并对市场流通环节收集的 5 个生产企业的 68 批样品进行测定,具有较强的代表性和较广的覆盖面。通过雷达图、指纹图谱相似度评价、热图聚类分析和 PCA 等化学计量学综合评价了不同生产企业样品的整体质量情况,为风寒感冒颗粒的质量评控提供了客观数据和参考方法。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部药品标准: 中药成方制剂第一

- 册 [S]. 1989.
- [2] 王兆龙, 许淑健, 秦 拢, 等. 反相高效液相色谱法测定风寒感冒颗粒中盐酸麻黄碱和伪麻黄碱的含量 [J]. 中南药学, 2006, 4(4): 289-291.
- [3] 蒋 健. HPLC 法同时测定风寒感冒颗粒中苦杏仁苷、葛根素和橙皮苷的含量 [J]. 中国药品标准, 2019, 20(6): 482-485.
- [4] 汤 云, 岳 宁, 刘宏明. HPLC 同时测定风寒感冒颗粒中葛根素和升麻素苷的含量 [J]. 食品与药品, 2017, 19(4): 272-274.
- [5] 刘 易, 龚 莹, 郭 磊, 等. 中成药中甾苷及其差向异构体的成分分析 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(6): 1011-1019.
- [6] 邢志华, 马誉畅, 李新萍, 等. 葛根素及其衍生物抗炎、抗痛风作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19): 3703-3708.
- [7] Hu W, Yang X, Zhe C, *et al.* Puerarin inhibits iNOS COX-2 and CRP expression via suppression of NF- κ B activation in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells [J]. *Pharmacol Rep*, 2011, 63(3): 781-789.
- [8] 曾祥伟, 冯 倩, 张莹莹, 等. 葛根素对炎症相关疾病研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(1): 8-11.
- [9] 陈 娜. 升麻素苷抗炎及抗小鼠肺损伤作用的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [10] 许姗姗, 许 浚, 张笑敏, 等. 常用中药陈皮、枳实和枳壳的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 35-44.
- [11] Loscalzo L M, Yow T T, Wasowski C, *et al.* Hesperidin induces antinociceptive effect in mice and its aglycone, hesperetin, binds to μ -opioid receptor and inhibits GIRK1/2 currents [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2011, 99(3): 333-341.
- [12] 李 丽, 梁绪国, 田京伟, 等. 迷迭香酸抗炎作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2008, 24(4): 21-22.
- [13] Yasui S, Fujiwara K, Tawada A, *et al.* Efficacy of intravenous glycyrrhizin in the early stage of acute onset autoimmune hepatitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56(12): 3638-3647.
- [14] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.
- [15] Yang D Z, An Y Q, Jiang X L, *et al.* Development of a novel method combining HPLC fingerprint and multi-ingredients quantitative analysis for quality evaluation of traditional Chinese medicine preparation [J]. *Talanta*, 2011, 85(2): 885-890.
- [16] 于新兰, 冯春蕾, 王 雪, 等. 多波长 HPLC 法测定加味逍遥丸中多种成分含量及化学计量学分析 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(7): 1262-1268.
- [17] 孙国祥, 侯志飞, 张春玲, 等. 色谱指纹图谱定性相似度和定量相似度的比较研究 [J]. 药学学报, 2007, 42(1): 75-80.
- [18] 汤 丹, 曹东敏, 黄广泉, 等. 葛根的指纹图谱构建及共有特征峰四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱分析 [J]. 广东药科大学学报, 2019, 35(2): 204-209.
- [19] Kang S H. Electrokinetic chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the direct analysis of amygdalin epimers [J]. *Bull Korean Chem Soc*, 2003, 24(1): 144-146.
- [20] 吴文杰, 刘良红, 黄 莺. LC-MS/MS 法同时测定葛根药材中 14 种异黄酮类成分的含量 [J]. 中国药房, 2018, 29(10): 1320-1324.
- [21] 马超一, 高文远, 高 颖, 等. 枳壳化学成分和代谢成分的 UPLC-PAD-Q-TOF/MS 分析 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(2): 110-115.
- [22] 张文焕, 刘平香, 邱 静, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速同时测定生姜中 10 种营养成分 [J]. 色谱, 2019, 37(10): 1105-1111.
- [23] 孔 浩, 郭庆梅, 王慧慧, 等. 主成分分析法在中药质量评价中的应用 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(5): 890-892.
- [24] 黄晓婧, 李婷婷, 肖春霞, 等. 基于 HPLC 波长切换法测定 7 种成分和化学计量学的苏合香质量评价研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(14): 3070-3077.
- [25] 谭 鹏, 张海珠, 张 青, 等. UPLC 法同时测定大黄中 10 个蒽醌衍生物的含量 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 928-934.