

引用:罗曼,张武岗,喻文韬,等.一测多评法同时测定化肝煎中 5 种成分及其质量评价[J].现代中医药,2024,44(1):102-109.

一测多评法同时测定化肝煎中 5 种成分及其质量评价^{*}

罗曼¹ 张武岗^{1,2,3} 喻文韬¹ 吴欢^{2,3} 姚闽^{1,4} 冯育林^{1,2,3} 杨世林^{1**}

(1. 江西中医药大学,江西 南昌 330006;2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,
江西 南昌 330006;3. 江西本草天工科技有限责任公司,江西 南昌 330006;
4. 江西省药品检验检测研究院,江西 南昌 330006)

摘要:目的 建立化肝煎中没食子酸(Gallic acid, Gal)、栀子苷(Geniposide, Geni)、芸香柚皮苷(Narirutin, Nari)、橙皮苷(Hesperidin, Hesp)和丹皮酚(Paeonol, Paeo)5 种成分含量的一测多评法(Quantitative Analysis of Multi-Components by Single-Marker, QAMS),以及不同批次化肝煎的化学模式识别分析方法。方法 按照传统水煎法制备化肝煎样品,以 Nari 为参照,使用岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪, Welch C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱,以甲醇-0.1% 磷酸水溶液为流动相梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 40 ℃,检测波长 270 nm,进行方法学考察和含量测定;通过聚类分析、主成分分析和偏最小二乘法-判别分析筛选其质量控制的标志性成分。结果 建立的含量测定方法专属性、精密度、重复性、稳定性和加样回收实验结果均良好, Gal、Geni、Nari、Hesp 和 Paeo 分别在 0.0020~0.0800 mg·mL⁻¹、0.0219~0.4195 mg·mL⁻¹、0.0006~0.1803 mg·mL⁻¹、0.0060~0.1801 mg·mL⁻¹和 0.0020~0.0808 mg·mL⁻¹范围内线性关系良好($R^2 \geq 0.999$),外标法和一测多评法测定 15 批样品中 5 种成分的含量差异无统计学意义。通过对 15 批样品进行聚类分析、主成分分析和偏最小二乘法-判别分析,表明 Geni、Nari、Hesp 和 Gal 是影响化肝煎质量的标志性成分。结论 此次研究建立的高效液相色谱一测多评法和化学模式识别分析操作简便、结果可靠,可用于化肝煎的质量标准评价。

关键词:化肝煎;经典名方;一测多评法;外标法;化学模式识别分析

中图分类号:R285.5 文献标识码:A

文章编号:1672-0571(2024)01-0102-08

DOI:10.13424/j.cnki.mtcm.2024.01.021

化肝煎由青皮、陈皮、白芍、牡丹皮、栀子(炒)、泽泻、贝母组成,最早记载于明代张景岳的《景岳全书》^[1],2018 年 4 月被收录入《古代经典名方目录(第一批)》^[2]。目前多用于治疗因肝气上逆致肝胃不和引起的消化系统疾病和妇科类疾病^[3-7]。目前,关于化肝煎的多成分质量控制方法研究报道较少,聂欣等^[8]建立了化肝煎中芍药苷、橙皮苷和丹皮酚 3 种成分含量分别测定的 HPLC 方法;杨雪颖等^[3]通过建立 2 种 HPLC 方法来分别控制化肝煎中栀子苷、丹皮酚和芍药苷 3 种成分的

含量;郭中华等^[9]建立了化肝煎中没食子酸、栀子苷、芍药苷、芸香柚皮苷、橙皮苷 5 种成分含量的 HPLC 测定方法。为了更加简便、快捷的对化肝煎的质量进行评价,本研究拟建立化肝煎多成分质量控制的 QAMS 法,以期为化肝煎的后续开发及质量评价提供参考。

QAMS 法是以内标法、外标法(External Standard Method, ESM)、校正因子法等分析方法为基础的延伸,该方法以药物本身所具有的成分为参照,同步进行多个成分含量的测定,不仅解决了

^{*} 基金项目:中央引导地方科技发展专项项目(20192ZDD02002,20221ZDD02007,20212ZDD02009);江西省中医药中青年骨干人才培养计划(S21-09);江西中医药大学校级科技创新团队发展计划(GXTD22001)

^{**} 通讯作者:杨世林,教授。E-mail:slyang3636@126.com

在质量控制时,对照品价高和难得的问题,还能更加准确地反映整个处方的质量状态^[10-13]。因此,本研究拟以 Nari 作为参照,建立化肝煎中 Gal、Geni、Nari、Hesp 和 Paeo 5 种成分含量的 QAMS 法,同时利用化学模式识别分析方法对化肝煎不同批次样品的检测结果进行评价^[14],以为该处方的后续开发及质量评价提供一种更为简便的方法。

1 材料

1.1 仪器 LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津);JM-B50002 电子天平(余姚市纪铭称重校验设备有限公司);MS205DU 电子分析天平(METTLER TOLEDO 科技有限公司);康雅顺电陶炉(康雅顺电器有限公司);KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HWS-24 型电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司)。

1.2 试剂与试药 陈皮(批号:20201101-5,江西南丰)、青皮(批号:20190601-5,江西吉安)、白芍(批号:201907011-5,浙江磐安)、牡丹皮(批号:1909011-5,四川苍溪)、栀子(批号:20201111-5,江西)、泽泻(批号:20200311-5,福建南平)、浙贝母(批号:20200311-5,浙江磐安县)各 5 批;以上七味药经江西省药品检验检测研究院高级工程师姚闽鉴定。

橙皮苷(批号:110721-202019,质量分数:95.3%),没食子酸(批号:110831-201906,质量分数:91.5%),栀子苷(批号:110749-201919,质量分数:97.1%),丹皮酚(批号:110708-201908,质量分数:99.8%),以上对照品均购自于中国食品药品检定研究院;芸香柚皮苷(批号:YY-071-190329,质量分数:98%),购自成都瑞芬思生物科技有限公司;甲醇(色谱级,Fisher);磷酸(色谱级,Fisher);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取 Gal、Geni、Nari、Hesp 和 Paeo,以甲醇为溶剂配制质量浓度分别为 0.1601、2.1900、1.8030、0.7205 和 0.1616 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液。同时配制一份 Gal、Geni、Nari、

Hesp 和 Paeo 质量浓度分别为 0.0021、0.0219、0.0060、0.0068 和 0.0030 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 称取青皮(20190605)7.50 g,陈皮(20201101)7.50 g,白芍(201907015)7.50 g,牡丹皮(1909013)5.63 g,栀子(20201112)5.63 g,泽泻(20200311)5.63 g,浙贝母(20200714)10.00 g,置煎药壶中,加水 300 mL,浸泡 30 min,以武火煮沸,转文火煎煮 40 min,趁热过滤,即得标准煎液。精密吸取标准煎液 10 mL 于 50 mL 容量瓶内,加甲醇定容至刻度线,即得供试品溶液。

2.1.3 阴性样品溶液 参照“2.1.2”项分别制备缺青皮;缺陈皮;缺栀子;缺牡丹皮;缺青皮和陈皮;缺青皮、陈皮、牡丹皮和栀子;缺青皮、陈皮、牡丹皮、栀子和白芍的阴性样品溶液。

2.2 色谱条件 色谱柱:Welch C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.1%的磷酸水,洗脱时间程序如表 1 所示;柱温 40 ℃;流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长 270 nm;进样量 10 μL。

表 1 HPLC 梯度洗脱表

时间(min)	甲醇(%)	0.1%磷酸水(%)
0.01	5	95
13.00	12	88
15.00	28	72
26.00	28	72
28.00	30	70
30.00	33	67
60.00	38	62
65.00	42	58
75.00	83	17
80.00	95	5
90.00	95	5

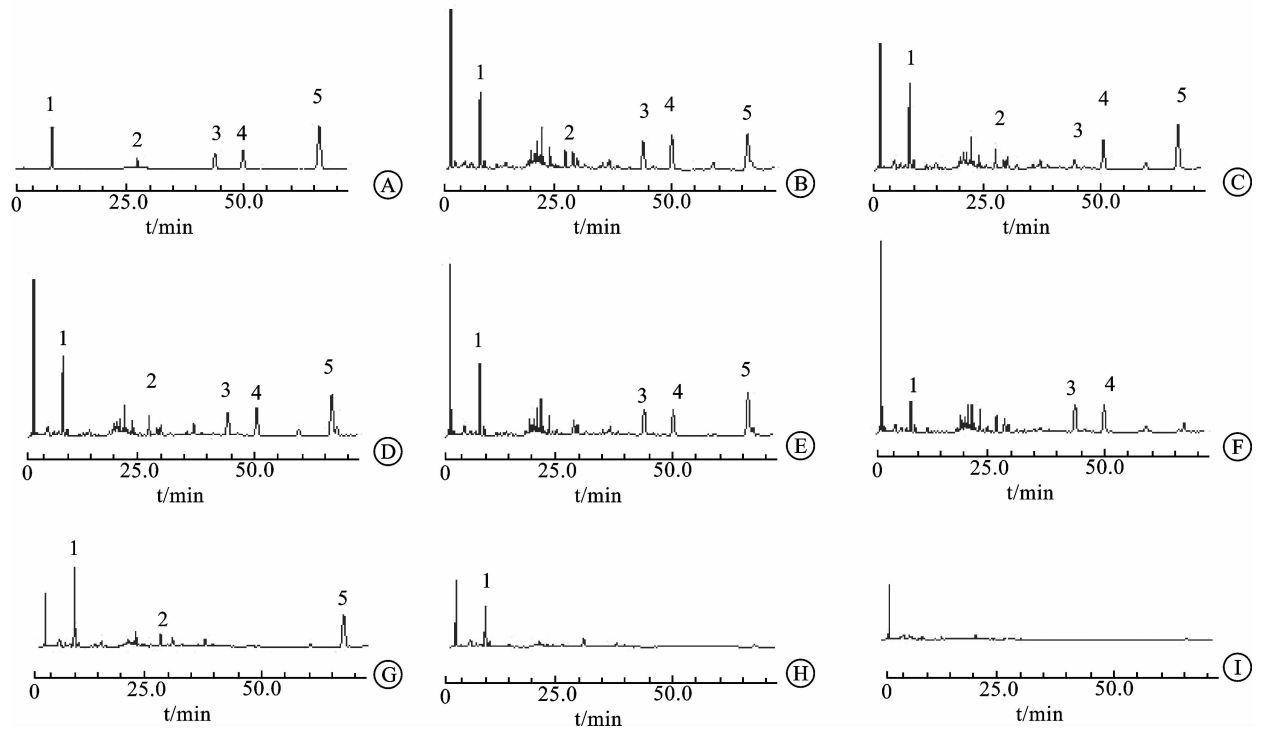
2.3 方法学考察

2.3.1 专属性实验 取“2.1.1”项下混合对照品、“2.1.2”项下供试品溶液和“2.1.3”项下七种阴性样品溶液各适量,按“2.2”项的色谱条件进样测定,结果如图 1 所示,5 种成分色谱峰的分离度均大于 1.5,且阴性样品对 Gal、Geni、Nari、Hesp 和 Paeo 5 种成分的含量测定没有干扰,表明该方法专属性良好。

2.3.2 线性关系考察 将“2.1.1”项下对照品溶

液分别稀释成 5 个浓度梯度,按“2.2”项的色谱条件分别进样测定。横坐标(X)为各成分质量浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),纵坐标(Y)为各成分峰面积,得到各

成分的回归方程和线性范围如表 2 所示, Gal、Geni、Nari、Hesp 和 Paeo 分别在各自的范围内线性关系良好, R^2 均在 0.9992 ~ 0.9999 之间。



注:A. 对照品溶液;B. 供试品溶液;C. 缺青皮阴性样品;D. 缺陈皮阴性样品;E. 缺栀子阴性样品;F. 缺牡丹皮阴性样品;G. 缺青皮、陈皮阴性样品;H. 缺青皮、陈皮、栀子和牡丹皮阴性样品;I. 缺青皮、陈皮、栀子和牡丹皮和白芍阴性样品;1. Gal;2. Geni;3. Nari;4. Hesp;5. Paeo

图 1 9 种样品的 HPLC 图

表 2 各成分线性关系与范围

成分	回归方程	R^2	线性范围($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Gal	$y=3\times10^8x+2603.9$	0.9999	0.0020 ~ 0.0800
Geni	$y=6\times10^7x-663.56$	0.9996	0.0219 ~ 0.4380
Nari	$y=870325x+422.88$	0.9993	0.0006 ~ 0.1803
Hesp	$y=1\times10^7x-8391.2$	0.9992	0.0060 ~ 0.1801
Paeo	$y=1\times10^7x-4098.8$	0.9999	0.0020 ~ 0.0808

2.3.3 精密度实验 将“2.1.1”项下混合对照品溶液按“2.2”项的色谱条件连续进样六次,测得 Gal、Geni、Nari、Hesp 和 Paeo 含量的相对标准偏差(RSD)值分别为 0.25%、0.23%、0.22%、0.30%和 0.30%,均小于 1.00%,表明该仪器精密度良好。

2.3.4 重复性实验 按“2.1.2”项下的方法平行制备同批次 6 份供试品溶液,分别按“2.2”项的色谱条件进样测定,测得 Gal、Geni、Nari、Hesp 和 Paeo 含量的 RSD 值分别为 2.27%、1.77%、

0.29%、0.57%和 0.34%,均小于 3.00%,表明该方法重复性良好。

2.3.5 稳定性实验 吸取同一份供试品溶液,按“2.2”项的色谱条件,分别于 0、4、8、12、16、24 h 进样测定。测得 Gal、Geni、Nari、Hesp 和 Paeo 含量的 RSD 值分别为 0.25%、2.19%、0.33%、0.50%和 0.33%,均小于 3.00%,表明该供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.6 加样回收实验 参照“2.1.2”项下方法制备两份供试品溶液,精密量取 6 份标准汤剂,每份 2 mL,分别以 1:0.8、1:1、1:1.2 的比例加入对照品粉末,加入适量甲醇,超声使其完全溶解,冷却至室温,甲醇定容至 10 mL,取上清液,过 0.22 μm 有机滤头,按“2.2”项的色谱条件进样测定,测各成分加样回收率和 RSD 值。结果测得在加样 80% 时, Gal、Geni、Nari、Hesp 和 Paeo 的平均加样回收率分别为 96.86%、94.29%、104.0%、93.69% 和

92.77% ; 加样 100% 时, Gal、Geni、Nari、Hesp 和 Paeo 的平均加样回收率分别为 94.71%、97.53%、105.90%、97.20% 和 95.04% ; 加样 120% 时, Gal、Geni、Nari、Hesp 和 Paeo 的平均加样回收率分别为 95.46%、92.87%、101.23%、105.8% 和 97.28% ; 加样回收实验的 RSD 值均小于 3.00% , 表明该方法准确可靠。

2.4 QAMS 法分析

2.4.1 相对校正因子测定 相对校正因子($f_{k/s}$) 计算公式为 $f_{k/s} = f_k/f_s = (C_k A_s)/(C_s A_k)$, 其中 C 表示质量浓度, A 表示峰面积, S 表示参照物, K 表示其他成分^[11-12,15-18]。精密吸取 6 份“2.1.1”项下混合对照品溶液, 按“2.2”项的色谱条件进样测定, 以 Nari 为参照, 计算其他 4 种成分的相对校正因子, 结果见表 3。

表 3 各成分的相对校正因子(Nari 为参照)

序号	Gal	Geni	Hesp	Paeo
1	0.2329	13.1992	1.0225	0.1598
2	0.2345	13.2873	1.0293	0.1609
3	0.2352	13.3303	1.0327	0.1619
4	0.2359	13.3703	1.0358	0.1614
5	0.2353	13.3343	1.0330	0.1614
6	0.2367	13.4122	1.0390	0.1624
\bar{x}	0.2351	13.3223	1.0321	0.1613
RSD(%)	0.51	0.50	0.50	0.49

2.4.2 不同色谱柱对校正因子的影响 取“2.1.1”项下的对照品溶液, 以 Nari 为参照, 在岛津色谱仪下考察 Welch C₁₈、Diamonsil C₁₈ 和 Cosmosl C₁₈ 色谱柱对相对校正因子的影响, 结果如表 4 所示, 这三种色谱柱对相对校正因子的影响不显著 (RSD<2.00%)。

表 4 不同色谱柱对相对校正因子的影响

色谱柱	Gal	Geni	Hesp	Paeo
Welch C ₁₈	0.2289	12.9728	1.0050	0.1571
	0.2382	13.4992	1.0458	0.1634
Diamonsil C ₁₈	0.2165	12.2668	0.9503	0.1485
	0.2317	13.1295	1.0171	0.1590
Cosmosl C ₁₈	0.228 3	12.9394	1.0024	0.1567
	0.2331	13.2099	1.0234	0.1599
\bar{x}	0.2294	13.0029	1.0073	0.1574
RSD(%)	1.74	0.18	1.73	1.72

2.4.3 流动相 pH 对校正因子的影响 取“2.1.1”项下的对照品溶液, 以 Nari 为参照, 在岛津色谱仪、Welch C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱下, 考察不同 pH(2.1、2.4、2.7) 的流动相相对校正因子的影响^[17-18], 结果见表 5, 从表可知不同 pH 对相对校正因子的影响不显著 (RSD<1.00%)。

表 5 不同 pH 对相对校正因子的影响

pH	Gal	Geni	Hesp	Paeo
2.1	0.2309	13.0835	1.0136	0.1584
2.4	0.2291	12.9819	1.0057	0.1572
2.7	0.2295	13.0084	1.0077	0.1575
\bar{x}	0.2298	13.0246	1.0090	0.1577
RSD(%)	0.33	0.33	0.33	0.33

2.4.4 不同柱温对校正因子的影响 取“2.1.1”项下的对照品溶液, 以 Nari 为参照, 在岛津色谱仪、Welch C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱下, 考察不同柱温 (35℃、37℃、40℃、42℃、45℃) 对 Gal、Geni、Hesp 和 Paeo 4 种成分相对校正因子的影响。结果如表 6 所示, 以 Nari 为内标物时, 不同柱温对这 4 种成分的相对校正因子的影响不显著 (RSD<1.00%)。

表 6 不同柱温对相对校正因子的影响

柱温(℃)	Gal	Geni	Hesp	Paeo
35	0.2287	12.9618	1.0041	0.1569
37	0.2302	13.0443	1.0105	0.1579
40	0.2310	13.0835	1.0136	0.1584
42	0.2329	13.1972	1.0223	0.1598
45	0.2305	13.0636	1.0120	0.1582
\bar{x}	0.2307	13.0701	1.0125	0.1582
RSD(%)	0.61	0.58	0.58	0.57

2.4.5 色谱峰定位 相对保留时间计算公式 $t_{ri/s} = t_{Ri}/t_{Rs}$ ^[19], $t_{ri/s}$ 表示相对保留时间, t_{Ri} 表示其他成分保留时间, t_{Rs} 表示内标物保留时间, 考察其在 Welch C₁₈、Diamonsil C₁₈ 和 COSMOSL C₁₈ 三种不同色谱柱下的重复性。取“2.1.1”项的混合对照品溶液, 用岛津高效液相色谱仪进样测定, 以 Nari 为参照, 计算其他四种物质的 $t_{ri/s}$ 和 RSD。结果如表 7 所示, 采用该方法所计算的各成分相对保留时间的 RSD 均小于 1.50% , 即说明该方法适用。

表 7 不同色谱柱各成分的相对保留时间值

色谱柱	Gal	Geni	Hesp	Paeo
Welch C ₁₈	0. 2111	0. 6269	1. 1355	1. 5141
	0. 2107	0. 6279	1. 1351	1. 5142
Diamonsil C ₁₈	0. 2018	0. 6100	1. 1417	1. 4916
	0. 2158	0. 6118	1. 1418	1. 4926
Cosmosil C ₁₈	0. 2050	0. 6201	1. 1142	1. 3672
	0. 2049	0. 6200	1. 1137	1. 3664
\bar{x}	0. 4181	0. 6194	1. 1304	1. 4577
RSD(%)	0. 58	1. 09	1. 05	0. 00

2.5 样品含量检测 将 5 批次化肝煎 7 味药材随机组合成 15 批处方,按照“2. 1. 2”项制备方法制得 15 批供试品溶液(编号 S1 ~ S15),按“2. 2”项的色谱条件分别采用外标法和一测多评法计算各成分含量,结果如表 8 所示,两种方法所测 Gal、Geni、Hesp 和 Paeo 4 种成分含量的 RSD 值均小于 3. 00%,说明两种方法测得的各成分含量差异不显著,QAMS 法可靠。同时,测得 15 批次化肝煎中 5 种成分的含量均未出现离散值,说明供试品的制

备工艺稳定可靠。

2.6 化肝煎化学模式识别分析方法的建立

2.6.1 聚类分析 以 Nari 为参照,将 2. 5 项下 15 批化肝煎中 5 种待测成分的 QAMS 法含量数据导入 SPSS 21 软件进行聚类分析,结果显示,当欧氏距离为 15 时,15 批样品可分为 2 大类,S2 ~ S4、S6、S10 ~ S12 为一类,S1、S5、S7 ~ S9、S13 ~ S15 为一类,其可以评估 15 批样品之间的差异。

2.6.2 主成分分析(PCA) 以 Nari 为参照,将 2. 5 项下 15 批化肝煎中 5 种待测成分的 QAMS 法含量数据导入 SIMCA 14. 1 软件进行 PCA 分析,在一定程度上可以进一步分析不同批次化肝煎之间的质量差异,并初步分析出造成该差异的成分。PCA 模型自动拟合选择两个主成分,其累计方差贡献率为 95%(大于 85%),表明模型预测良好^[14],结果见图 2,15 批样品的分组结果与聚类分析一致,S2 ~ S4、S6、S10 ~ S12 为一组,S1、S5、S7 ~ S9、S13 ~ S15 为第二组。

表 8 15 批次样品中各成分含量检测结果(mg · mL⁻¹)

批号	Nari		Gal		Geni			Hesp			Paeo		
	ESM	ESM	QAMS	RSD(%)	ESM	QAMS	RSD(%)	ESM	QAMS	RSD(%)	ESM	QAMS	RSD(%)
S1	0. 0616	0. 0130	0. 0138	2. 99	0. 1897	0. 1953	1. 45	0. 0784	0. 0830	2. 85	0. 0185	0. 0196	2. 89
S2	0. 0517	0. 0108	0. 0114	2. 70	0. 1806	0. 1860	1. 47	0. 0648	0. 0686	2. 85	0. 0168	0. 0177	2. 61
S3	0. 0534	0. 0120	0. 0127	2. 83	0. 1671	0. 1721	1. 47	0. 0688	0. 0729	2. 89	0. 0227	0. 0240	2. 78
S4	0. 0607	0. 0124	0. 0131	2. 75	0. 1643	0. 1691	1. 44	0. 0824	0. 0872	2. 83	0. 0166	0. 0176	2. 92
S5	0. 0603	0. 0135	0. 0143	2. 88	0. 1797	0. 1850	1. 45	0. 0791	0. 0838	2. 89	0. 0195	0. 0206	2. 74
S6	0. 0446	0. 0127	0. 0134	2. 68	0. 1553	0. 1599	1. 46	0. 0677	0. 0717	2. 87	0. 0206	0. 0218	2. 83
S7	0. 0730	0. 0141	0. 0149	2. 76	0. 2042	0. 2103	1. 47	0. 0932	0. 0987	2. 87	0. 0185	0. 0196	2. 89
S8	0. 0614	0. 0164	0. 0173	2. 67	0. 1874	0. 1930	1. 47	0. 0935	0. 0990	2. 86	0. 0206	0. 0218	2. 83
S9	0. 0706	0. 0151	0. 0160	2. 89	0. 1750	0. 1802	1. 46	0. 0924	0. 0978	2. 84	0. 0159	0. 0168	2. 75
S10	0. 0526	0. 0126	0. 0133	2. 70	0. 1631	0. 1679	1. 45	0. 0568	0. 0602	2. 91	0. 0177	0. 0188	2. 75
S11	0. 0514	0. 0122	0. 0129	2. 79	0. 1579	0. 1625	1. 44	0. 0499	0. 0528	2. 82	0. 0148	0. 0157	2. 95
S12	0. 0559	0. 0132	0. 0139	2. 58	0. 1507	0. 1552	1. 47	0. 0543	0. 0575	2. 86	0. 0145	0. 0153	2. 68
S13	0. 0696	0. 0161	0. 0171	2. 72	0. 2065	0. 2126	1. 46	0. 0943	0. 0998	2. 83	0. 0219	0. 0232	2. 88
S14	0. 0545	0. 0137	0. 0146	2. 84	0. 1892	0. 1948	1. 46	0. 0795	0. 0842	2. 87	0. 0185	0. 0196	2. 89
S15	0. 0631	0. 0146	0. 0154	2. 67	0. 1874	0. 1930	1. 47	0. 0793	0. 0839	2. 82	0. 0190	0. 0201	2. 81
\bar{x}	0. 0590	0. 0135	0. 0143		0. 1772	0. 1825		0. 0756	0. 0801		0. 0184	0. 0195	

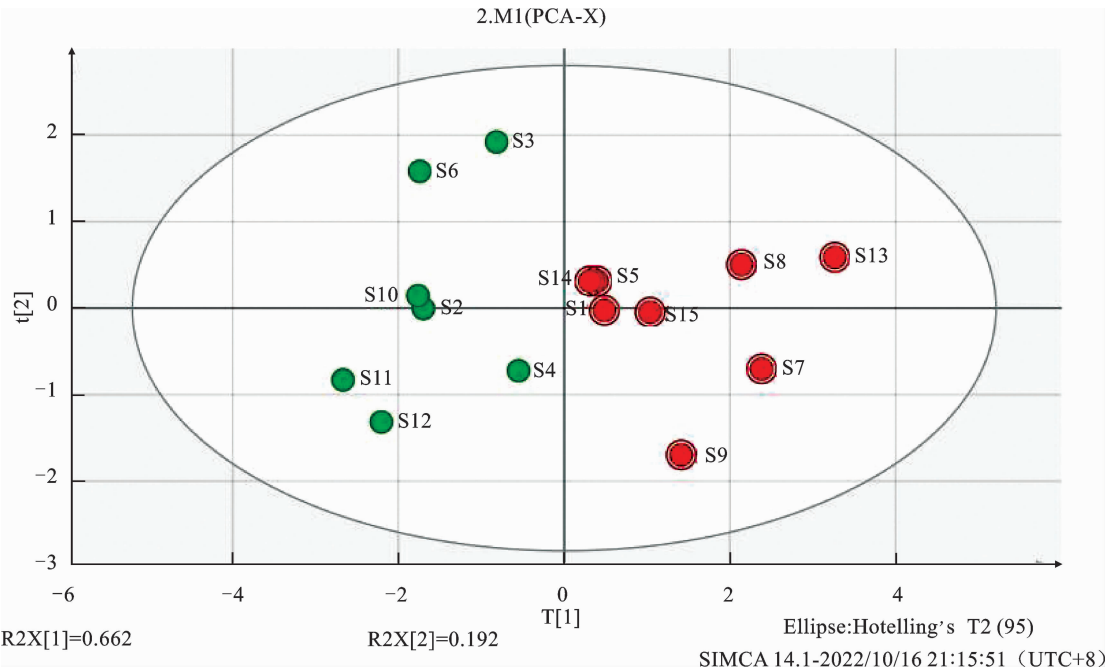


图 2 15 批化肝煎样品 PCA 分布图

2.6.3 偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 以“2.5”项下 15 批化肝煎中 5 个待测成分的 QAMS 法含量为变量,通过 SIMCA 14.1 软件进行 PLS-DA 分析,然后对 PLS-DA 模型进行 200 次置换检验,结果如图 3 所示。

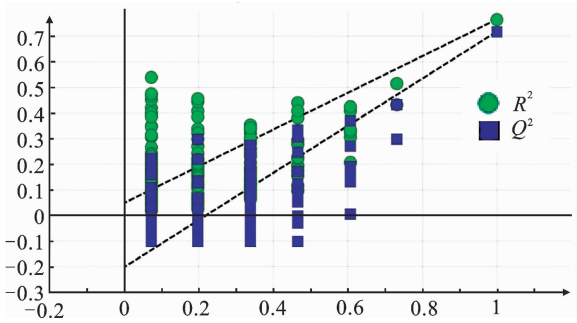


图 3 15 批化肝煎样品的 PLS-DA 模型置换检验图

由图 3 可知:拟合直线 Y 轴的截距为 $0.0489 < 0.3$,表明所建立的模型结果可靠; Q^2 拟合直线 Y 轴截距为 $-0.2020 < 0.0500$,说明所建立的模型没有过度拟合,此分析可有效判别分析 15 批化肝煎的质量差异。再根据变量重要性投影 (variable importance in projection, VIP) 分析不同批次样本中相同成分的影响强度,筛选影响化肝煎质量的标志性成分^[13],结果显示 (图 4): Gal、Geni、Nari 和 Hesp 的 VIP 值均大于 1.00,则这 4 种成分可能是影响该药质量的标志性成分。

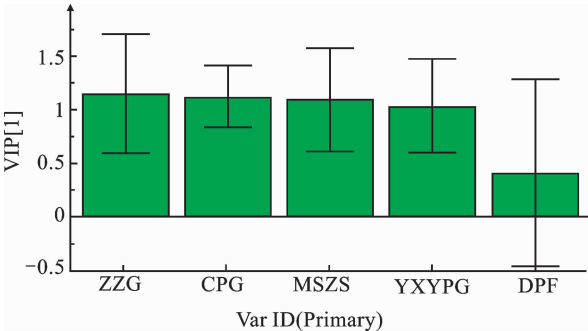


图 4 化肝煎中 5 种成分的 VIP

3 讨论

3.1 色谱条件的选择 本实验分别考察了不同流动相、流速、柱温、检测波长下化肝煎中 5 种成分在色谱图中的分离度、保留时间、峰数量,实验发现这 5 种成分在 230 nm 和 270 nm 波长下吸收较好,但在 230 nm 波长下的分离效果不理想;甲醇选择性虽然弱于乙腈,但甲醇溶剂下峰形更优,杂质沉淀更为完全,0.1% 的磷酸水的加入使化肝煎中这 5 种成分的出峰时间更合适^[20],峰形较好;流速在 $0.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 以上时各成分出峰时间和峰形都比较好, $1.00 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的峰形最好,所以最终选择甲醇和 0.1% 的磷酸水为流动相、柱温 40°C 、流速 $1.00 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、进样量 $10 \mu\text{L}$ 、检测波长 270 nm 作为检测条件,同时采用梯度洗脱对各成分进行分离和检测。

3.2 检测指标的选择 化肝煎具有疏肝理气、泻

热和胃之功^[21-22]。在指标成分选择时,根据处方君臣佐使的顺序依次进行考虑^[23]。青皮和陈皮为君药^[24],其中主要含有 Nari 和 Hesp 等成分^[25-26]。梔子、牡丹皮和白芍为臣药^[24],梔子中主要含有 Geni^[27];牡丹皮中主要含有 Paeo 和 Gal^[28];白芍中主要含有芍药苷和 Gal 等成分^[29];但芍药苷色谱峰的分离度较差,难以和其他物质分离开来,故而本实验没有选择芍药苷作为检测指标。泽泻和浙贝母为佐药^[24],所含的主要成分色谱峰吸收较差,故本实验未对其进行检测。同时 Gal、Geni、Nari、Hesp 和 Paeo 与化肝煎的药理活性均存在直接相关性^[19],进而最终将这 5 种成分定为检测指标。

3.3 内标物的选择 在实验中发现,Nari 性质稳定,线性拟合度较好,色谱峰分离度合适,峰形易辨认,含量也比较高,对照品价格相对比较便宜。所以根据内标物的选择原则^[30-31],本实验选择 Nari 作为参照。

4 结论

本实验采用 QAMS 法同时测定化肝煎中 Gal、Geni、Nari、Hesp 和 Paeo 的含量,测得这 5 种成分在各自线性范围内线性关系良好($R^2 \geq 0.999$),平均加样回收率在 92% ~ 106% 之间,RSD<3.00%;方法的专属性、精密度、重复性和稳定性良好。Gal、Geni、Hesp 和 Paeo 相对于 Nari 的校正因子分别是 0.2351、13.3223、1.0321、0.1613。QAMS 法含量检测结果与外标法无统计学差异,表明本研究建立的 QAMS 法较为合理。从聚类分析、主成分分析和偏最小二乘法-判别分析结果可以看出,Gal、Geni、Nari 和 Hesp 是影响化肝煎质量的标志性成分。

综上所述,本研究所建立的一测多评法和化学模式识别分析可用于化肝煎的质量评价,且该方法简单便捷,稳定性和重复性好,可为该方的质量控制和评价提供更为全面科学的参考。

参考文献

[1] 张景岳. 景岳全书[M]. 北京:人民卫生出版社,1994:1267.
[2] 国家中医药管理局. 古代经典名方目录(第一批)[EB/OL]. (2018-04-13)[2022-07-13]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2018-12/31/content_5429153.htm.

[3] 杨雪颖,杨海菊,赵玥瑛,等. 经典名方化肝煎的基准样品质质量标准及量值传递研究[J]. 中国中药杂志,2022,47(15):3994-4006.
[4] 朱剑峰. 化肝煎加减联合叶酸对 HP 阳性慢性萎缩性胃炎患者胃蛋白酶原、白介素族及 MDA 水平影响研究[J]. 中华中医药学刊,2017,35(6):1580-1582.
[5] 许话. 化肝煎加减治疗反流性食管炎肝胃郁热型临床观察[J]. 实用中医药杂志,2019,35(7):772-773.
[6] 李文斌. 化肝煎加味治疗肝胃郁热型胃食管返流病临床观察[J]. 实用中医内科杂志,2020,34(1):11-14.
[7] 徐蕾,李达. 化肝煎加减治疗 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病的临床研究[J]. 中西医结合心血管病电子杂志,2017,5(31):81,84.
[8] 聂欣,庞兰,江华娟,等. 经典名方化肝煎物质基准特征图谱及多指标成分含量测定研究[J]. 中草药,2020,51(20):5177-5186.
[9] 郭中华,李更生,其木格,等. 经典名方化肝煎总黄酮、多糖、无机盐三大类成分及 5 种有效成分的含量测定[J]. 中国医药导报,2021,18(18):26-31.
[10] Zhu CS, Li XP, Zhang B, et al. Quantitative analysis of multi-components by single marker — a rational method for the internal quality of Chinese herbal medicine[J]. Integrative Medicine Research,2017,6(1):1-11.
[11] 颜瑞琪,渠建明,顾利红,等. 一测多评法在舒肝健脾颗粒中的应用[J]. 分析测试学报,2021,40(1):126-131.
[12] 阮家钊,赵芳,李高天,等. 一测多评法同时测定芍药汤中 6 种成分[J]. 中成药,2021,43(11):2970-2975.
[13] 龙凯花,刘峰,张红,等. 一测多评法同时测定冠心舒通胶囊中 10 个成分的含量[J]. 药科学报,2022,57(6):1880-1886.
[14] 张颖,李志平,高雨秋,等. 固肾定喘丸多指标成分一测多评法的建立及质量评价[J]. 中国药房,2022,33(18):2230-2234.
[15] 王玉梅,胡青,孙健,等. 一测多评法同时测定麻黄配方颗粒中 5 种生物碱[J]. 中成药,2023,45(5):1438-1442.
[16] 王涛. 一测多评法同时测定广藿香中 4 种成分的含量[J]. 中国科技信息,2022(9):48-49.
[17] 王智民,钱忠直,张启伟,等. 一测多评法建立的技术指南[J]. 中国中药杂志,2011,36(6):657-658.

[18]唐红梅,翟少钦,陈春林,等.一测多评法同时测定甘草泻心汤中 8 种成分[J].中成药,2022,44(5):1410-1415.

[19]孙磊,叶六平,于新兰,等.HPLC 相对保留时间法中参照物的优选[J].药物分析杂志,2020,40(3):420-428.

[20]梁洁,梁炎丽,陈辉华,等.基于一测多评法对止得咳颗粒中 7 种成分的质量控制[J/OL].中华中医药学刊:1-16[2024-01-10].

[21]李点.基于“木郁达之”探讨化肝煎之临证运用[J].广州中医药大学学报,2021,38(4):842-845.

[22]盛丹丹,杨帆,郭宏举,等.化肝煎对慢性胃炎和非酒精性脂肪性肝病异病同治作用机制的网络药理学研究[J].中国药业,2022,31(24):23-32.

[23]汤瑜晨,王龙,郭相廷,等.经典名方质量标志物的选择方法研究进展及相关思考[J].分析测试学报,2023,42(8):1064-1071.

[24]杨海菊,黄嘉怡,杨艳玲,等.经典名方化肝煎的古今文献研究[J].中国现代中药,2022,24(5):897-904.

[25]陈芳,梁月仪,童培珍,等.不同规格青皮饮片指纹图谱[J].中国现代中药,2021,23(1):117-122.

[26]李影,尚尔雨,孙爽,等.陈皮 HPLC 指纹图谱色谱条件优化[J].黑龙江科学,2021,12(10):8-10,13.

[27]罗家敏,高雯,李萍.指纹图谱结合一测多评法的栀子质量控制方法研究[J].中草药,2022,53(11):3480-3486.

[28]侯锡鸿,葛梅,张迎春,等.牡丹皮药材的 HPLC 指纹图谱建立和聚类分析[J].中国药房,2018,29(24):3354-3358.

[29]刘珏玲,赵龙山.基于 HPLC 指纹图谱及多成分定量的白芍质量评价研究[J].山西卫生健康职业学院学报,2021,31(6):4-7.

[30]黄建猷,黄周锋,胡筱希,等.一测多评法测定瑶药消瘤藤中 4 种香豆素类成分的含量[J].中药材,2022,45(4):917-921.

[31]李艳,侯媛芳,伍永富,等.一测多评法同时测定六味地黄丸中 8 种成分[J].中成药,2022,44(5):1405-1410.

(修回日期:2023-09-27 编辑:刘惠娴)