

理中丸 HPLC 指纹图谱的建立及 9 种成分含量测定

刘晓玲^{1a}, 马海棠^{1a}, 王苗^{1a}, 李运^{2*}, 余磊^{1b}, 邱国玉³, 程显隆⁴, 冯金梁⁵, 杨扶德^{1a*} (1. 甘肃中医药大学, a. 药学院, b. 图书馆, 兰州 730000; 2. 兰州市食品药品检验检测研究院, 兰州 730050; 3. 甘肃药业集团科技创新研究院有限公司, 兰州 730000; 4. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 5. 甘肃康乐药业有限责任公司, 兰州 730300)

摘要:目的 建立理中丸高效液相色谱(HPLC)指纹图谱并测定绿原酸(chlorogenic acid)、甘草苷(liquiritin)、党参炔苷(lobetyolin)、甘草素(liquiritigenin)、甘草酸(glycyrrhetic acid)、白术内酯Ⅲ(atractylenolide Ⅲ)、白术内酯Ⅱ(atractylenolide Ⅱ)、白术内酯Ⅰ(atractylenolide Ⅰ)和10-姜酚(10-gingerol)的含量,为其质量控制提供依据。方法 采用Eclipse Plus C₁₈色谱柱,以乙腈体积分数0.1%磷酸水溶液为流动相,梯度洗脱,流速0.8 mL·min⁻¹,检测波长215和254 nm,柱温30℃;通过相似度评价,结合化学模式识别,对21批理中丸指纹图谱进行评价及分析,并对9种指标成分进行定量测定。结果 21批理中丸指纹图谱中共标定29个共有峰,各批次的相似度均大于0.9,3个厂家21批样品可聚为3类,组间差异化合物有16个。9种成分在各自线性范围内线性关系良好($r \geq 0.9987$);平均加样回收率95.34%~104.41%,相对标准偏差(RSD)0.95%~2.95%。

结论 建立的理中丸指纹图谱及多成分定量测定方法简单、准确、重现性较好,可用于理中丸整体质量评价。

关键词:理中丸;高效液相色谱法;指纹图谱;含量测定;化学模式识别

doi:10.11669/cpj.2024.17.012 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)17-1643-08

Establishment of HPLC Fingerprints and Content Determination of Nine Components of Lizhong Pills

LIU Xiaoling^{1a}, MA Haitang^{1a}, WANG Miao^{1a}, LI Yun^{2*}, YU Lei^{1b}, QIU Guoyu³, CHENG Xianlong⁴, FENG Jinliang⁵, YANG Fude^{1a*} (1a. College of Pharmacy, 1b. Library, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Lanzhou Institute of Food and Drug Inspection and Testing, Lanzhou 730050, China; 3. Gansu Pharmaceutical Group Science and Technology Innovation Research Institute Limited, Lanzhou 730000, China; 4. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 5. Gansu Kangle Pharmaceutical Co., Ltd., Lanzhou 730300, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the HPLC fingerprints, determine the contents of chlorogenic acid, liquiritin, lobetyolin, liquiritigenin, glycyrrhetic acid, atractylenolide Ⅲ, atractylenolide Ⅱ, atractylenolide Ⅰ, 10-gingerol in Lizhong Pills, and lay the foundation for its quality control. **METHODS** A Eclipse Plus C₁₈ column was used with acetonitrile-0.1% aqueous phosphoric acid as the mobile phase in gradient elution at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The detection wavelengths were set at 215 nm and 254 nm, and the column temperature was maintained at 30℃. Through similarity evaluation, combined with chemical pattern recognition, the fingerprints of 21 batches of Li Zhong Pills were evaluated and analyzed, and 9 index components were quantitatively determined. **RESULTS** The fingerprints of 21 batches of Lizhong Pills were established, with 29 peaks identified, the similarity of each batch was greater than 0.9, and 21 batches of samples from 3 manufacturers could be clustered into 3 categories, with 16 compounds differing between groups. Nine components showed good linear relationships within their respective linear ranges ($r \geq 0.9987$), the average recoveries ranged from 95.34% to 104.41%, and the RSDs ranged from 0.95% to 2.95%. **CONCLUSION** The fingerprint and quantitative determination method of Lizhong Pills is simple, accurate and reproducible, and can be used for the evaluation of the overall quality of Lizhong Pills.

KEY WORDS: Lizhong Pills; HPLC; fingerprint; content determination; chemical pattern recognition

理中丸出自张仲景《伤寒杂病论》,理中者,理中焦则为阴阳相交之处。理中汤一方,乃温中以交中焦之气,以交于阴阳也。上焦属阳,下焦属阴,而通上下焦之阴阳^[1]。为《中国药典》2020年版一部

基金项目:甘肃省药品科研项目资助(2022GSMPA0037);陇原青年创新创业人才项目资助(甘组通字[2023]20号);兰州市科技计划项目资助(2022-2-2);科技部国家重点研发计划项目资助(2018YFC1706305);国家自然地区基金项目资助(82160714);甘肃省重点研发计划项目资助(23YFFA0069)

作者简介:刘晓玲,女,硕士研究生 研究方向:中药鉴定及品质评价研究 * **通讯作者:**李运,男,博士,高级工程师 研究方向:中药质量控制 Tel:(0931)5180326;杨扶德,男,博士,教授,博士生导师 研究方向:中药品质研究 Tel:(0931)5162435

收载的中药复方制剂,由党参、土白术、炙甘草、炮姜4味药组成^[2],方中以白术为君,大补中宫之土。干姜辛热,能暖中宫之气,为臣药。但辛燥太过,恐伤脾中之阴血,复以甘温濡润之党参为佐药,刚柔相济。炙甘草为使药,与白术干姜辛药同用,便可化周身之阳气;与党参同用,可化周身之阴血。如此则中焦之气旺,阴邪即灭,中焦大振,自然体健身安。临床上可用于治疗脾胃虚寒、呕吐泄泻、胸满腹痛、消化不良等^[3]。

高效液相色谱(HPLC)指纹图谱作为一种高效、准确的药物质量控制方法,其高分辨率和高灵敏度能够有效地分离和测定中药中的复杂成分,已经在药物研发和生产过程中得到了广泛应用^[4-5]。通过比较不同批次药物的指纹图谱,可以确保药物质量的稳定性,为患者提供安全、可靠的药品。该方现行质量标准中仅收载了对甘草的含量测定,而对理中丸中多个化学成分的同时测定鲜有报道。本实验建立理中丸 HPLC 指纹图谱同时测定绿原酸(chlorogenic acid)、甘草苷(liquiritin)、党参炔苷(lobetyolin)、甘草素(liquiritigenin)、甘草酸(glycyrrhetic acid)、白术内酯Ⅲ(atractylenolide Ⅲ)、白术内酯Ⅱ(atractylenolide Ⅱ)、白术内酯Ⅰ(atractylenolide Ⅰ)和10-姜酚(10-gingerol)的含量,并进行方法学考察,通过相似度评价,结合聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)及正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)等化学模式识别进行分析^[6],更全面地挖掘指纹图谱数据中的信息,快速筛选质量差异成分,以期有效控制该制剂的质量控制、药效评估提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters e2695 型液相色谱仪(美国 Waters 公司);XS105 DualRange 型十万分之一天平(瑞士梅特勒-托利多公司);SBL-10DT 型超声波恒温清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 药品与试剂

对照品绿原酸(批号:RDD-L00701908029,98.00%,成都瑞芬思德丹生物科技有限公司);对照品甘草苷(批号:14310,91.50%)、党参炔苷(批号:16550,≥98.00%)、甘草素(批号:14207,≥98.00%)、甘草酸(批号:16277,95.40%)、白术内酯Ⅲ(批号:16202,≥98.00%)、白术内酯Ⅱ(批号:14498,≥98.00%)、白术内酯Ⅰ(批号:14232,≥98.00%)和10-姜酚(批号:15456,≥98.00%)(上海诗丹德生物

技术有限公司)。理中丸(规格:每丸重9g)21批,编号S1~S21,具体见表1。乙腈为色谱纯;磷酸和甲醇为分析纯;水为纯化水;其他试剂为分析纯。

表1 21批理中丸信息来源

Tab.1 Sources of information for 21 batches of Lizhong Pills

Vender	No.	Batch number	Vender	No.	Batch number
Y1	S1	210003	Y2	S11	230606
	S2	220001		S12	230607
	S3	220008		S13	230608
	S4	220008		S14	230801
	S5	220010		S15	230802
	S6	220010		S16	230803
	S7	230001		S17	230901
	S8	230002	Y3	S18	230201
	S9	230002		S19	230201
	S10	230003		S20	230301
		S21		230501	

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);乙腈(A)-体积分数0.1%磷酸溶液(B)为流动相;按表2进行梯度洗脱;检测波长为215 nm(绿原酸、甘草苷、党参炔苷、甘草素、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ和10-姜酚)、254 nm(甘草酸、白术内酯Ⅰ);柱温为30℃;流速为0.8 mL · min⁻¹;进样量为10 μL。

表2 理中丸样品高效液相色谱(HPLC)测定洗脱程序

Tab.2 HPLC elution procedure for the determination of Lizhong Pills sample

t/min	Acetonitrile(A)/%	0.1% Phosphoric acid solution(B)/%
0	3	97
10	14	86
14	20	80
18	25	75
23	35	65
33	50	50
43	58	42
52	65	35
55	75	25
58	78	22
59	3	97
60	3	97

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取绿原

酸、甘草苷、党参炔苷、甘草素、甘草酸、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅰ和10-姜酚对照品9.65、9.02、9.22、11.11、9.90、10.38、9.84、9.02和9.85 mg,置于10 mL量瓶中,用无水甲醇溶解并定容至刻度,4℃下保存备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 将适量剪碎的理中丸与等比例硅藻土混匀,研成粉末。精密称定其粉末2 g于150 mL具塞锥形瓶中,加入体积分数70%甲醇溶液25 mL,称重并记录。超声提取45 min后,冷却并再次称重。用原溶解液补充损失的质量,摇匀,过0.45 μm有机微孔滤膜,即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按照本品处方工艺及比例,以“2.2.2”项下方法,分别制得缺炮姜、缺党参、缺土白术、缺甘草、缺党参和土白术的5种阴性样品,即得。

2.3 HPLC 指纹图谱建立

2.3.1 精密度试验 精密称定理中丸粉末(S5)2 g,按相应溶液制备方法和最佳色谱条件,连续进样6次,记录色谱图,以5号峰(甘草苷)为参照峰,计算各共有峰峰面积和相对保留时间的相对标准偏差(RSD)分别小于2.98%和0.076%,表明该方法精密度良好。

2.3.2 重复性试验 精密称定理中丸粉末(S5)2 g,按相应溶液制备方法和最佳色谱条件,平行制备6份样品溶液进样,记录色谱图,以5号峰(甘草苷)为参照峰,计算各共有峰峰面积和相对保留时间的RSD分别小于2.96%和0.086%,表明该方法

重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 精密称定理中丸粉末(S5)2 g,按相应溶液制备方法,室温下于0、2、4、8、12、24 h在最佳色谱条件进样测定,记录色谱图,以5号峰(甘草苷)为参照峰,计算各共有峰峰面积和相对保留时间的RSD分别小于2.82%和0.079%,表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.4 指纹图谱生成及相似度评价 取21批理中丸样品(编号:S1~S21)按“2.1”项下方法,记录色谱图,将所得21批样品色谱图数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012年版),以S5样品的色谱图为参照图谱,对21批样品选择吸收信号较强、峰形明显、峰宽适中、稳定且分辨率高的峰为共有峰进行多点校正和标记(Mark)峰匹配,生成理中丸的对照特征图谱(R)和21批理中丸样品的HPLC叠加指纹图谱(图1),共确认29个共有峰(215 nm),通过与对照品相比,指认出了9个色谱峰,其中1号峰为绿原酸、5号峰为甘草苷、6号峰为党参炔苷、8号峰为甘草素、9号峰为甘草酸、17号峰为白术内酯Ⅲ、23号峰为白术内酯Ⅱ、27号峰为白术内酯Ⅰ、28号峰为10-姜酚。计算S1~S21样品与对照特征图谱的相似度,分别为0.994、0.973、0.967、0.969、0.979、0.972、0.978、0.975、0.974、0.973、0.950、0.935、0.951、0.923、0.923、0.909、0.915、0.962、0.961、0.958、0.959,均>0.90,相似度良好,可知各批理中丸样品的质量比较稳定。

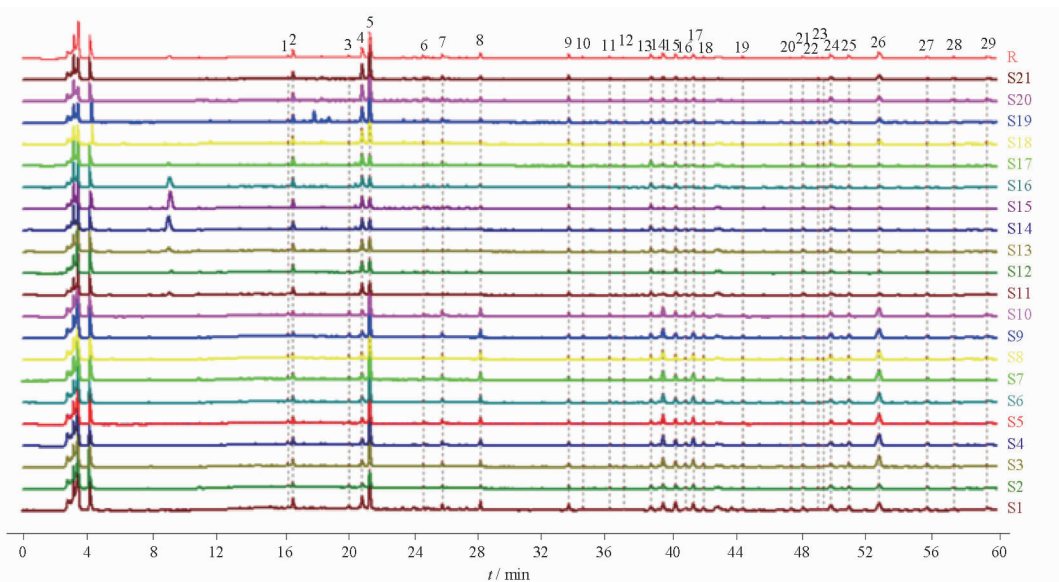


图1 21批理中丸样品HPLC叠加图谱(S1~S21)及对照图谱(R)

Fig. 1 HPLC overlay profiles of 21 batches of Lizhong Pills (S1-S21) and control profiles (R)

2.4 化学识别模式分析

2.4.1 聚类分析(CA) 将21批理中丸样品的29个共有峰面积导入SIMCA 14.1软件中,以峰面积结果为变量,采用Ward法计算的距离用于将理中丸样品进行聚类(图2),结果显示,当度量距离为 1.0×10^7 时,21批理中丸样品可分为3大类:S2~S10为第一类、S18~S21为第二类、余下批次为第三类。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。

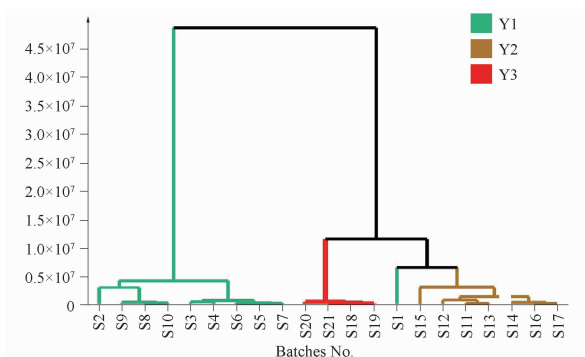


图2 21批理中丸样品聚类分析(CA)图

Fig. 2 CA diagram of 21 batches of Lizhong Pills samples

2.4.2 主成分分析(PCA) 将21批理中丸样品的29个共有峰面积导入到SIMCA 14.1软件中,以峰面积结果为变量进行PCA分析,得到21批理中丸样品的PCA得分图(图3),图3可以看出,21批样品可以分为3类,其中S2~S10聚为第一类,S18~S21聚第二类、余下批次为第三类。与聚类分析结果一致。

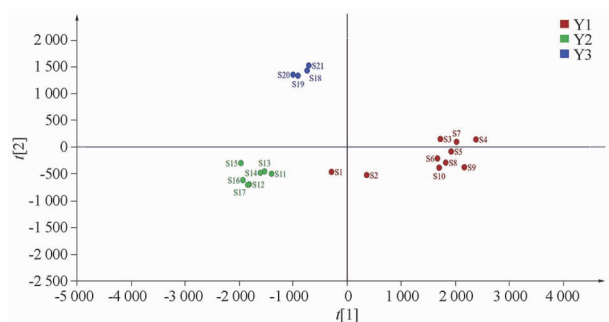


图3 21批理中丸样品主成分分析(PCA)得分图

Fig. 3 Plot of PCA scores for 21 batches of Lizhong Pills samples

2.4.3 正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)

将21批样品中29个共有峰面积导入SIMCA 14.1软件,自动拟合建立OPLS-DA模型,结果该模型累积解释能力参数 $R^2 X$ (自变量矩阵)与 $R^2 Y$ (因

变量矩阵)分别为0.746、0.952,预测能力参数 $Q^2 = 0.848$,表明所构建OPLS-DA模型拟合程度高,具有较高的解释能力,且稳定性和预测能力良好。OPLS-DA得分图见图4,该分类结果说明同一厂家生产的不同批次的样品质量一致性较好,但不同厂家之间样品的质量一致性存在明显差异。采用置换检验($n = 200$)对该模型进行验证,结果见图5,随着置换保留度的下降, R^2 和 Q^2 下降,回归线呈向上的趋势,表明所构建的OPLS-DA模型未出现过拟合现象,具有较好的预测能力,可用于进一步的数据分析。不同批次理中丸样品的变量重要性投影值(variable importance in projection, VIP)分析结果见图6,筛选出导致样品分类影响较大的差异性成分,VIP > 1.0的峰有16个:峰5、峰21、峰9、峰27、峰25、峰15、峰11、峰14、峰18、峰13、峰19、峰8、峰26、峰17、峰7、峰16,其中峰5为甘草苷、峰8为甘草素、峰9为甘草酸、峰17为白术内脂Ⅲ、峰27为白术内脂Ⅰ,说明这16个成分为影响样品分类差异的主要成分。

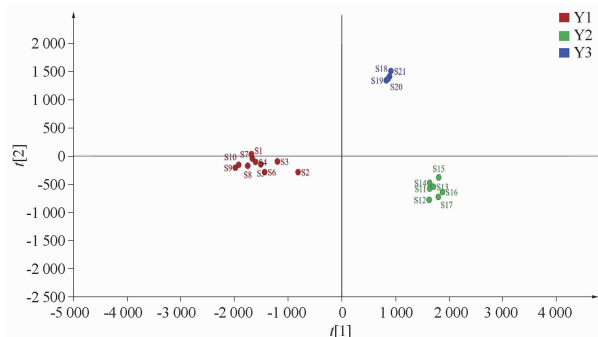


图4 21批理中丸样品正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)得分图

Fig. 4 Plot of OPLS-DA scores for 21 batches of Lizhong Pills samples

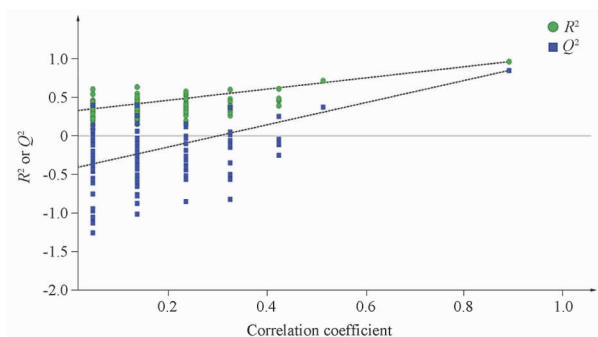


图5 21批理中丸样品的OPLS-DA置换检验图

Fig. 5 OPLS-DA permutation test of 21 batches of Lizhong Pills samples

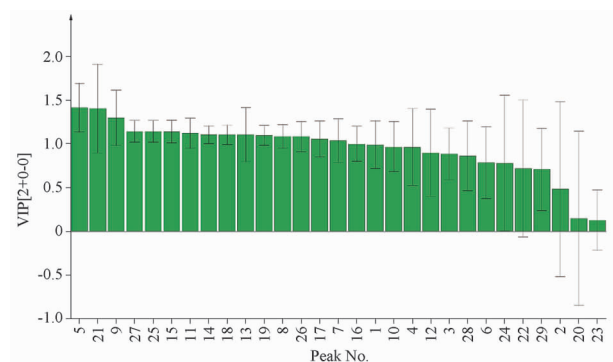


图6 21批理中丸OPLS-DA VIP图

Fig. 6 OPLS-DA VIP plot of 21 batches of Lizhong Pills samples

2.5 含量测定

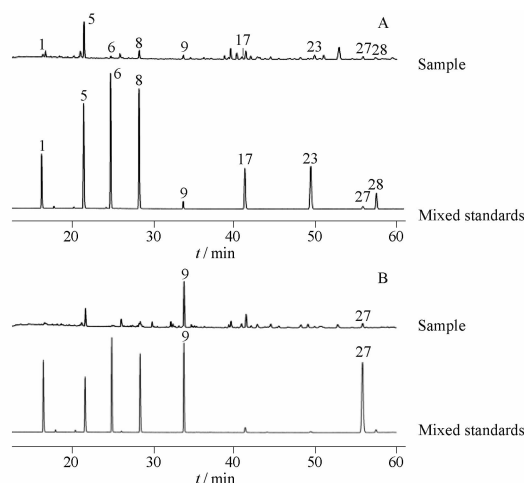
2.5.1 专属性试验 取理中丸粉末(S5)适量,按相应溶液制备方法制备对照品溶液、样品溶液以及阴性样品溶液,结果见图7~8,在最佳色谱条件下进样测定,发现各成分色谱峰均具有良好的分离度、峰形对称性,并且与相应对照品一一匹配,表明该方法专属性良好,能够准确、有效地进行成分分析和鉴定。

2.5.2 线性关系考察 精密吸取各对照品溶液适量,置于10 mL量瓶内,用无水甲醇定容至刻度,摇匀,配制成质量分别为绿原酸 $25.6275 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甘草苷 $107.2890 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、党参炔苷 $6.3252 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甘草素 $38.0800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甘草酸 $217.2350 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、白术内脂 III $71.2040 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、白术内脂 II $4.8215 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、白术内脂 I $22.1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、10-姜酚 $48.2650 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液,逐级稀释成系列质量浓度,在最佳色谱条件下进样测定,记录峰面积(Y),并与相应的溶液浓度(X)建立标准曲线。结果见表3, $r \geq 0.9987$,由表3可知9种成分在各自浓度范围内线性关系良好。

表3 理中丸中9种成分的线性回归方程及线性范围

Tab. 3 Linear regression equations and linear ranges for the 9 components in Lizhong Pills

Component	Equation of linear regression	r	Linearity range/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
Chlorogenic acid	$Y = 2.50 \times 10^4 X + 5.31 \times 10^2$	0.9997	1.28 - 25.63
Lobetyolin	$Y = 9.40 \times 10^4 X - 5.70 \times 10^2$	0.9998	0.32 - 5.06
Liquiritin	$Y = 3.57 \times 10^4 X + 2.79 \times 10^4$	0.9995	5.36 - 107.29
Liquiritigenin	$Y = 6.60 \times 10^4 X - 1.47 \times 10^3$	0.9999	1.90 - 38.08
Glycyrrhetic acid	$Y = 1.05 \times 10^4 X + 8.18 \times 10^3$	0.9996	10.86 - 217.24
Atractylenolide I	$Y = 3.23 \times 10^4 X + 6.85 \times 10^3$	0.9997	1.11 - 22.10
Atractylenolide II	$Y = 4.75 \times 10^4 X + 1.44 \times 10^4$	0.9987	0.24 - 4.82
Atractylenolide III	$Y = 3.05 \times 10^4 X + 2.95 \times 10^4$	0.9994	3.56 - 71.20
10-Gingerol	$Y = 1.37 \times 10^4 X + 1.56 \times 10^4$	0.9997	2.41 - 48.26

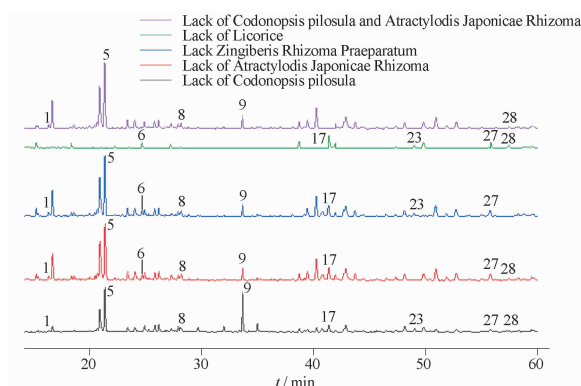


1 - 绿原酸; 5 - 甘草苷; 6 - 党参炔苷; 8 - 甘草素; 9 - 甘草酸; 17 - 白术内酯 III; 23 - 白术内酯 II; 27 - 白术内酯 I; 28 - 10-姜酚。

1 - chlorogenic acid; 5 - liquiritin; 6 - lobetyolin; 8 - liquiritigenin; 9 - glycyrrhetic acid; 17 - atractylenolide III; 23 - atractylenolide II; 27 - atractylenolide I; 28 - 10-gingerol.

图7 理中丸样品和混合对照品溶液215 nm(A)和254 nm(B)处的HPLC色谱图

Fig. 7 HPLC chromatograms of Lizhong Pills samples and mixed standards solution at 215 nm(A) and 254 nm(B)



峰1, 5, 6, 8, 9, 17, 23, 27, 28 同图7。

Peak 1, 5, 6, 8, 9, 17, 23, 27, 28 are the same as Fig. 7.

图8 理中丸阴性样品溶液的HPLC色谱图

Fig. 8 HPLC chromatogram of Lizhong Pills negative sample solution

2.5.3 精密度试验 取“2.2.1”项下混合对照品溶液连续进样6次,测得绿原酸、甘草苷、党参炔苷、甘草素、甘草酸、白术内脂 III、白术内脂 II、白术内脂 I、10-姜酚峰面积 RSD 分别为 2.98%、2.16%、2.62%、2.46%、2.70%、2.84%、1.62%、2.97%、2.63%,表明仪器精密度良好。

2.5.4 重复性试验 精密称定理中丸样品粉末(S5)2 g,按相应溶液制备方法和最佳色谱条件,平行制备6份样品溶液进样,测得绿原酸、甘草苷、党参炔苷、甘草素、甘草酸、白术内脂 III、白术内脂 II、白术内脂 I、10-姜酚峰面积 RSD 分别为 2.79%、1.54%、1.58%、2.58%、1.85%、2.11%、2.62%、2.62%、2.96%,表明本方法具有良好的重复性。

2.5.5 稳定性试验 精密称定理中丸样品粉末(S5)2 g,按相应溶液制备方法,室温下于0、2、4、8、12、24 h 在最佳色谱条件进样测定,测得绿原酸、甘草苷、党参炔苷、甘草素、甘草酸、白术内脂 III、白术内脂 II、白术内脂 I、10-姜酚峰面积 RSD 分别为 2.50%、1.57%、2.39%、2.77%、0.98%、1.89%、2.65%、1.95%、2.62%,表明溶液在24 h 内稳定性良好。

2.5.6 加样回收率试验 取同一批已知含量的理中丸粉末(S5)6份,每份约1.00 g,按照对照品量与样品中含量1:1的比例加入各对照品,按相应溶液制备方法和最佳色谱条件,测定并计算加样回收率,结果见表4。

表4 理中丸中9种成分的加样回收率试验结果

Tab.4 The results of recovery test of 9 components in Lizhong Pills

Component	<i>m</i> (Original)/mg	<i>m</i> (Added)/mg	<i>m</i> (Measured)/mg	Recovery/%	Average recovery/%	RSD/%
Chlorogenic acid	0.283 6	0.284 0	0.582 3	105.17	103.35	2.12
			0.565 0	99.08		
			0.591 7	108.48		
			0.564 1	98.77		
			0.589 3	107.64		
			0.570 4	100.98		
Liquiritin	0.811 1	0.811 1	1.636 2	101.73	102.36	1.42
			1.676 3	106.67		
			1.634 4	101.50		
			1.605 5	97.94		
			1.640 2	102.21		
			1.655 5	104.10		
Lobetyolin	0.035 3	0.039 1	0.073 8	98.36	97.43	2.70
			0.070 8	90.69		
			0.073 1	96.63		
			0.076 7	105.85		
			0.072 2	94.26		
			0.073 9	98.79		
Liquiritigenin	0.126 7	0.126 7	0.257 7	103.44	99.03	2.09
			0.246 0	94.19		
			0.246 8	94.81		
			0.250 2	97.48		
			0.257 7	103.45		
			0.254 4	100.83		
Glycyrrhetic acid	1.217 7	1.217 7	2.496 9	105.04	104.41	1.85
			2.421 2	98.83		
			2.536 7	108.31		
			2.508 3	105.98		
			2.527 5	107.56		
			2.444 4	100.74		
Atractylenolide III	0.282 9	0.282 9	0.576 7	103.83	103.40	0.95
			0.566 8	100.35		
			0.583 8	106.34		
			0.578 2	104.35		
			0.571 9	102.14		
			0.575 4	103.36		

续表 4 (continued)

Component	<i>m</i> (Original)/mg	<i>m</i> (Added)/mg	<i>m</i> (Measured)/mg	Recovery/%	Average recovery/%	RSD/%
Atractylenolide II	0.029 8	0.029 8	0.057 8	94.04	95.34	2.95
			0.058 5	96.36		
			0.060 9	104.36		
			0.056 6	89.96		
			0.059 8	100.75		
Atractylenolide I	0.076 2	0.076 2	0.055 6	86.59	101.33	2.91
			0.151 0	98.19		
			0.153 8	101.75		
			0.161 3	111.61		
			0.148 1	94.36		
10-Gingerol	0.230 9	0.231 0	0.155 7	104.30	99.56	1.38
			0.150 7	97.79		
			0.464 9	101.27		
			0.455 6	97.40		
			0.467 9	102.58		
			0.463 1	100.50		
	0.464 2	100.96				
	0.449 6	94.66				

2.5.7 样品含量测定 取 21 (S1 ~ S21) 批理中丸样品,按相应溶液的制备方法和最佳色谱条件,进样测定,计算各成分含量,结果见表 5。

表 5 21 批理中丸各成分含量测定结果。 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3$ Tab. 5 Determination results of contents of each ingredient in 21 batches of Lizhong Pills. $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3$

No.	Chlorogenic acid	Liquiritin	Lobetyolin	Liquiritigenin	Glycyrrhetic acid	Atractylenolide III	Atractylenolide II	Atractylenolide I	10-gingerol
S1	0.60	1.47	0.04	0.25	2.30	0.55	0.05	0.13	0.35
S2	0.64	0.94	0.03	0.22	1.91	0.33	0.05	0.12	0.25
S3	0.48	1.51	0.06	0.20	2.35	0.57	0.05	0.14	0.40
S4	0.51	1.56	0.06	0.22	2.35	0.58	0.06	0.14	0.38
S5	0.55	1.48	0.07	0.24	2.27	0.50	0.06	0.14	0.41
S6	0.38	1.36	0.05	0.22	2.32	0.49	0.06	0.14	0.39
S7	0.58	1.59	0.08	0.25	2.48	0.53	0.06	0.15	0.38
S8	0.44	1.30	0.05	0.25	2.44	0.42	0.06	0.14	0.31
S9	0.64	1.38	0.08	0.28	2.46	0.43	0.06	0.14	0.26
S10	0.46	1.33	0.07	0.27	2.40	0.39	0.06	0.15	0.35
S11	0.30	0.71	0.04	0.08	1.93	0.16	0.03	0.12	0.17
S12	0.07	0.65	0.02	0.07	1.98	0.13	0.03	0.12	0.16
S13	0.10	0.70	0.04	0.07	1.94	0.17	0.03	0.11	0.17
S14	0.11	0.61	0.06	0.09	2.14	0.18	0.04	0.10	0.14
S15	0.09	0.56	0.06	0.08	2.09	0.17	0.04	0.09	0.16
S16	0.06	0.51	0.04	0.07	2.13	0.16	0.04	0.10	0.14
S17	0.08	0.53	0.04	0.07	2.08	0.15	0.05	0.10	0.20
S18	0.29	1.61	0.05	0.10	2.68	0.22	0.04	0.09	0.16
S19	0.21	1.54	0.04	0.11	2.68	0.22	0.04	0.09	0.14
S20	0.19	1.57	0.04	0.10	2.72	0.20	0.04	0.09	0.15
S21	0.21	1.63	0.05	0.11	2.76	0.21	0.04	0.08	0.14

3 讨论

3.1 色谱条件考察、样品提取方式

本研究分别考察了不同流动相体系(甲醇-水,乙腈-体积分数 0.1% 磷酸水溶液)、不同波长(215、

237^[7]、254、276 nm^[8])、不同流速(0.8、1.0 mL · min⁻¹),对 HPLC 方法进行优化,以获得最佳的分离效果和分析性能。通过对不同提取方法(加热回流提取、超声提取)、不同提取溶剂(无水乙醇、体积分数

30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、无水甲醇、水) 和不同提取体积 (10、25、50 mL) 的考察, 最终确定样品提取方法为 25 mL 体积分数 70% 甲醇超声处理 45 min。以乙腈-水 (含 0.1% 磷酸) 为流动相, 梯度洗脱, 检测波长为 215 和 254 nm, 柱温 30 °C, 此时各成分色谱峰分离度、峰形良好, 基线平稳。

3.2 指标成分的选择

针对理中丸处方组成饮片, 参考《中国药典》2020 年版含量测定的指标成分结合理中丸相关研究, 白术具有健脾益气、燥湿止汗等功效, 化学成分主要是由白术内酯 I、白术内酯 II 和白术内酯 III 等构成, 且白术内酯 I 具有调节胃肠道作用^[9], 白术内酯 II 的在大鼠肠道中吸收部位主要是十二指肠段, 白术内酯 III 在所有肠段中的吸收率最高^[10]; 甘草中黄酮类成分 (甘草素) 多具有抗氧化、提高机体免疫力、保护心脑血管、抗炎止痛等作用^[11], 绿原酸具有抗氧化、抗菌以及治疗代谢类疾病等药理作用^[12]; 上述药味所含的成分与理中丸的功效息息相关, 故选择以上成分作为含量测定的指标成分。

3.3 化学模式识别及含量测定的分析

本研究建立的理中丸 HPLC 指纹图谱, 共确定了 29 个共有峰, 与对照品比较确定了其 1 号峰、5 号峰、6 号峰、8 号峰、9 号峰、17 号峰、23 号峰、27 号峰和 28 号峰, 分别为绿原酸、甘草苷、党参炔苷、甘草素、甘草酸、白术内酯 III、白术内酯 II、白术内酯 I、10-姜酚。21 批理中丸指纹图谱相似度均在 0.900 以上, 表明理中丸批次间一致性良好, 化学成分基本一致, 整体质量稳定。结合化学识别模式分析可知, 21 批理中丸样品可聚为 3 类, 表明理中丸中 9 种成分的含量与生产厂家有关, 造成明显聚类的原因可能与不同厂家生产时所用的投料药材质量差异以及生产工艺差异有关, 进一步通过 OPLS-DA 中的 VIP 值可以判断出, 影响各批次间差异的主要峰有 16 个, 这可能与不同产地药材的含量差异、运输及贮存过程中发生变化有关^[13]。含量测定结果中甘草酸的含量最高, 其次是甘草素, 同一厂家不同批次含量差异较小, 不同厂家成分含量差异较大, 这可能与生产过程中原材料的来源、品质、加工炮制方法以及工艺控制等因素有关^[14-15]。

4 结论

本实验建立理中丸 HPLC 指纹图谱, 并同时测定绿原酸、甘草苷、党参炔苷、甘草素、甘草酸、白术内酯 III、白术内酯 II、白术内酯 I、10-姜酚的含

量, 能较好地反映药品整体质量状况, 再采用化学模式分析筛选出不同批次样品之间的差异, 该方法准确可靠, 重复性好, 为理中丸的质量控制提供参考。

REFERENCES

- [1] ZHANG L X, SHI G W, ZHANG L L, *et al.* Exploration of the postfactual notes of sheng jiang diarrhoea xin tang and zhang zhongjing's rizhong method in the treatise on typhoid fever [J]. *Henan Tradit Chin Med* (河南中医), 2023, 43(5):656-659.
- [2] *Ch. P* (2020) Vol I (中国药典 2020 年版. 一部) [S]. 2020: 1587-1588.
- [3] BAI Y, CHEN Y C. Overview of clinical application of Lizhong Pill [J]. *Jiangsu Tradit Chin Med* (江苏中医药), 2013, 45(7):75-77.
- [4] YE T, LIANG W Y, LIANG L J, *et al.* Application of HPLC fingerprinting in the quality study of Chinese medicinal preparations [J]. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med* (世界科学技术-中医药现代化), 2017, 19(11):1794-1800.
- [5] WEI W Y, LUO Y D, LI F C, *et al.* Application of high performance liquid chromatography in the analysis of components of traditional Chinese medicine compound formulae [J]: *Res Zhuang Yao Eth Med* (壮瑶药研究), 2023(1):304-307.
- [6] SUN L L, WANG M, REN X L. Application progress on chemical pattern recognition in quality control of Chinese materia medica [J]. *Chin Tradit Herb Durgs* (中草药), 2017, 48(20):4339-4345.
- [7] CHEN X F, XU P H, OU X Y. Simultaneous determination of glycyrrhizin, glycyrrhizic acid ammonium atractylenolide II and atractylenolide III in Radix Rehmanniae Pills by HPLC [J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol* (中国中医药科技), 2022, 29(1):41-44.
- [8] FENG L H, LIANG S J. Determination of glycyrrhizin in Guifu Lizhong Pill by HPLC [J]. *Guangdong Chem* (广东化工), 2020, 47(17):178-179, 175.
- [9] LI Y. Effects of different *Atractylodes macrocephalus* decoction pieces on gastrointestinal function and intestinal microbiota in rats with spleen deficiency and dampness syndrome [D]. Shandong: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2019.
- [10] GAO X X, FENG J Y, Yang L, *et al.* Investigation on pharmacokinetics and pharmacokinetics of atractylenolides from *Atractylodes* in vivo based on UPLC-MS combined with everted gut sac model *in vitro* [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2018, 41(16):892-902.
- [11] SONG X, LIU S J, FAN J, *et al.* Discussion on clinical application based on the differences in chemical composition and pharmacological effects between boiled licorice and raw licorice [J]. *Chin Med Sci* (中国医药科学), 2022, 12(19):114-117, 159.
- [12] WANG Q H, DU T T, ZHANG Z Z, *et al.* Research progress on pharmacological effects and mechanisms of chlorogenic acid [J]. *Act Pharm Sin* (药学学报), 2020, 55(10):2273-2280.
- [13] ZHANG L H, ZHOU X L, WANG Y. Simultaneous determination of the contents of nine components in prostasolone capsules by HPLC gradient elution method [J]. *Chin Pharm* (中国药师), 2021, 24(7):383-387.
- [14] SUN M, LIU X C, ZHAO Y Y, *et al.* Prediction of extraction process design space of sanpian decoction based on quality by design [J]. *Mod Chin Med* (中国现代中药), 2024, 26(2):348-356.
- [15] LIU J, ZHANG H W, ZHANG Y J. Analysis of dehydrated andrographolide content in different batches of anti-inflammatory choleric tablets from different manufacturers [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2011, 29(2):402-403.

(收稿日期:2024-02-07)