

## 经典名方枇杷清肺饮的UPLC指纹图谱及多指标成分含量分析

吴安<sup>1</sup>, 张誉晴<sup>1</sup>, 赵志峰<sup>1</sup>, 邹婷<sup>1</sup>, 冼少华<sup>2</sup>, 卢国扬<sup>2</sup>, 胡旭光<sup>1\*</sup>

(1. 广东药科大学 中药学院, 广州 510006;

2. 国药集团德众(佛山)药业有限公司, 广东 佛山 528000)

**[摘要]** **目的:**建立枇杷清肺饮物质基准的超高效液相色谱法(UPLC)指纹图谱,并建立同时测定其5种指标成分含量的定量分析方法,为该经典名方的质量控制及评价提供参考。**方法:**采用ACQUITY UPLC<sup>®</sup> CSH<sup>™</sup> C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),以乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)为流动相梯度洗脱(0~7 min, 5%~7%A; 7~11 min, 7%~8%A; 11~22 min, 8%~14%A; 22~30 min, 14%~15%A; 30~35 min, 15%~25%A; 35~42 min, 25%~40%A; 42~45 min, 40%~50%A; 45~50 min, 50%~60%A),流速0.35 mL·min<sup>-1</sup>,柱温25℃,检测波长278 nm和248 nm。建立15批枇杷清肺饮物质基准的UPLC指纹图谱,应用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(2012版)进行相似度分析,并对共有峰进行归属。采用聚类分析(CA),主成分分析(PCA)及正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)对指纹图谱数据进行评价。利用UPLC指纹图谱方法测定5种成分的含量。**结果:**指纹图谱及含量测定方法的各项方法学验证均良好,15批枇杷清肺饮物质基准与对照指纹图谱的相似度均≥0.997,共标定了23个共有峰,指认出了11个色谱峰。CA,PCA及OPLS-DA可将15批物质基准分为两类。盐酸黄柏碱、绿原酸、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、甘草酸铵5种成分在一定质量浓度范围内与峰面积呈良好线性关系( $R^2$ 均>0.999),平均加样回收率96.47%~101.16%,在各物质基准中的质量分数范围分别为0.87~2.00,1.53~5.95,18.45~33.97,3.87~6.29,1.02~4.12 mg·g<sup>-1</sup>。**结论:**建立的枇杷清肺饮UPLC指纹图谱及多指标成分含量测定方法专属性强、分离度好、灵敏度高,除人参药味以外均有表征,可为该方剂复方制剂的质量控制与评价提供参考。

**[关键词]** 经典名方; 枇杷清肺饮; 物质基准; 指纹图谱; 含量测定; 聚类分析(CA); 主成分分析(PCA); 正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)

[中图分类号] R22;R37;R28;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)14-0012-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210749

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210121.1032.002.html>

[网络出版日期] 2021-01-21 10:37

### Analysis on UPLC Fingerprint and Determination of Multi-index Components in Pipa Qingfei Yin

WU An<sup>1</sup>, ZHANG Yu-qing<sup>1</sup>, ZHAO Zhi-feng<sup>1</sup>, ZOU Ting<sup>1</sup>, XIAN Shao-hua<sup>2</sup>,  
LU Guo-yang<sup>2</sup>, HU Xu-guang<sup>1\*</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Sinopharm Group Dezhong (Foshan) Pharmaceutical Co. Ltd., Foshan 528000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the ultraperformance liquid chromatography (UPLC) fingerprint of Pipa Qingfei Yin substance benchmark, and to establish a quantitative analysis method for simultaneous determination of the contents of five index components, so as to provide reference for the quality control and evaluation of this famous classical formula. **Method:** ACQUITY UPLC<sup>®</sup> CSH<sup>™</sup> C<sub>18</sub> column (2.1 mm×100 mm,

[收稿日期] 20201119(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673620);广东省重点领域研发计划项目(2019B110209005)

[第一作者] 吴安,在读硕士,从事中药药效评价与临床应用研究,E-mail:543163571@qq.com

[通信作者] \*胡旭光,博士,教授,从事中药药理与中药新药开发研究,Tel:020-34071234,E-mail:1741969133@qq.com

1.7  $\mu\text{m}$ ) was used with mobile phase of acetonitrile (A)-0.1% formic acid aqueous solution (B) for gradient elution (0-7 min, 5%-7%A; 7-11 min, 7%-8%A; 11-22 min, 8%-14%A; 22-30 min, 14%-15%A; 30-35 min, 15%-25%A; 35-42 min, 25%-40%A; 42-45 min, 40%-50%A; 45-50 min, 50%-60%A), the flow rate was  $0.35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , the column temperature was  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , the detection wavelengths were 278 nm and 248 nm. UPLC fingerprints of 15 batches of Pipa Qingfeiyin substance benchmark were established, and the "Similarity Evaluation System of Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine" software (2012 edition) was used for similarity analysis, and the common peaks were assigned. Cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to evaluate the fingerprint data. UPLC fingerprint method was used to simultaneously determine the contents of five components in the substance benchmark. **Result:** The method validation of fingerprint and determination method was good, the similarities between 15 batches of Pipa Qingfeiyin substance benchmark and their control fingerprint were  $\geq 0.997$ , 23 common peaks were identified and 11 chromatographic peaks were identified. CA, PCA and OPLS-DA divided 15 batches of the substance benchmark into two groups. The linear relationship of phellodendrine hydrochloride, chlorogenic acid, berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride and ammonium glycyrrhizinate was good in a certain range of concentration ( $R^2 > 0.999$ ), their average recovery was 96.47%-101.16%, and the contents of these five components in the substance benchmark were 0.87-2.00, 1.53-5.95, 18.45-33.97, 3.87-6.29, 1.02-4.12  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , respectively. **Conclusion:** The established UPLC fingerprint and multi-index component content determination methods have strong specificity, good resolution and high sensitivity, it can be characterized except for the Ginseng Radix et Rhizoma flavor, which can provide reference for the quality control and evaluation of Pipa Qingfeiyin compound preparation.

[**Keywords**] famous classical formulas; Pipa Qingfeiyin; substance benchmark; fingerprint; determination; cluster analysis (CA); principal component analysis (PCA); orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA)

经典名方物质基准是指以古代医籍中记载的古代经典名方制备方法为依据制备而得的中药药用物质的标准,其研制过程涵盖处方考证及历史沿革研究、药味收集和质量评价、饮片炮制方法和质量评价、物质基准的制备和质量研究等5个阶段<sup>[1-2]</sup>。2020年11月10日,为贯彻落实《中共中央国务院关于促进中医药传承创新发展的意见》,加快推动经典名方复方制剂简化注册审批,国家中医药管理局与国家药品监督管理局联合制定了《古代经典名方关键信息考证原则》《古代经典名方关键信息表(7首方剂)》<sup>[3]</sup>2个文件,包含经典名方枇杷清肺饮在内的7首方剂的药味基原及药用部位、炮制规格、剂量折算、用法用量、临床定位等核心问题都得到了较为妥善的解决,为其他首经典名方的关键信息考证提供了参考依据。

枇杷清肺饮出自《医宗金鉴》,原文记载“此证由肺经血热而成。每发于面鼻,起碎疙瘩,形如黍屑,色赤肿痛,破出白粉汁,日久皆成白屑,形如黍米白屑。宜内服枇杷清肺饮。”全方由蜜枇杷叶、桑白皮、黄连、黄柏、人参、甘草6味药材组成,方中蜜

枇杷叶清肺止咳、降逆止呕,桑白皮泻肺平喘、利水消肿,黄连和黄柏清热燥湿、泻火解毒,人参补脾益肺、生津养血,甘草补脾益气、祛痰止咳。六药合用,具有宣肺和胃、清热解毒、化湿的功效。枇杷清肺饮临床应用广泛、疗效明确,主治肺经风热证疾病,以治疗痤疮(粉刺)为主<sup>[4]</sup>,也有学者将其用于治疗脂溢性皮炎<sup>[5]</sup>及激素过敏性皮炎<sup>[6]</sup>等。目前,对经典名方枇杷清肺饮的研究多集中在药理机制<sup>[7-8]</sup>及临床应用<sup>[9-11]</sup>方面,尚未见其有关药理学研究的报道,因此,有必要对该经典名方进行质量控制方面研究<sup>[12]</sup>。本研究基于古代医籍中的记载制备枇杷清肺饮物质基准,通过超高效液相色谱法(UPLC)建立该物质基准的指纹图谱并对其进行相似度评价和化学模式识别方法分析,同时,建立盐酸黄柏碱、绿原酸、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、甘草酸铵5种成分的含量测定方法,从定性与定量2个方面进行研究,以期对枇杷清肺饮的质量控制及制剂开发提供参考。

## 1 材料

1290型超高效液相色谱仪[美国Agilent公司,

包括 G7104A 型四元梯度泵, G7117A 型二极管阵列检测器(DAD), G7116B 型柱温箱, G7129B 型自动进样器], SQP 型 1/1 万电子天平和 BP211D 型 1/10 万电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司], LK-B30 型电陶瓷煎药壶(深圳一枚王电子商务有限公司, 规格 2 L), TRL-0.5 型真空冷冻干燥机(大连双瑞科技有限公司)。

盐酸黄柏碱(批号 111895-201805, 纯度 94.9%), 绿原酸(批号 110753-201817, 纯度 96.8%), 盐酸小檗碱(批号 110713-201814, 纯度 86.7%), 盐酸巴马汀(批号 110732-201913, 纯度 85.7%), 甘草苷(批号 111610-201607, 纯度 93.1%), 甘草酸铵(批号 110731-201720, 纯度 97.7%), 盐酸黄连碱(批号 112026-201802, 纯度 94.0%), 盐酸药根碱(批号 110733-201609, 纯度 89.5%)对照品均购于中国食品药品检定研究院; 表小檗碱(批号 C10743482, 纯度 ≥98%), 木兰花碱(批号 C10740916, 纯度 ≥98%), 非洲防己碱(批号 C10740682, 纯度 ≥98%)对照品均购于上海麦克林生化科技有限公司; 水为屈臣氏纯化水, 乙腈、甲酸为色谱级, 其他试剂均为分析纯。

制备 15 批枇杷清肺饮物质基准所用的各饮片均源自道地产地或主产区, 其产地信息见表 1。经广东药科大学李书渊教授鉴定, 蜜枇杷叶为蔷薇科植物枇杷 *Eriobotrya japonica* 的干燥叶的蜜炙品, 桑白皮为桑科植物桑 *Morus alba* 的干燥根皮, 黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* 的干燥根茎, 黄柏为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* 的干燥树皮, 人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* 的干燥根和根茎, 甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根和根茎, 均符合 2020 年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)(一部)相关项下规定。

## 2 方法与结果

**2.1 物质基准的制备** 枇杷清肺饮原文制法记载<sup>[13]</sup>为“人参三分, 枇杷叶二钱(刷去毛, 蜜炙), 甘草三分(生), 黄连一钱, 桑白皮二钱(鲜者佳), 黄柏一钱。水一盅半, 煎七分, 食远服。”查阅文献资料<sup>[14]</sup>, 结合《古代经典名方关键信息表(7 首方剂)》<sup>[3]</sup>, 确定明清时期一钱等于现今 3.73 g, 一分等于现今 0.373 g, 1 盅等于现今 200 mL。即称取人参 1.12 g, 蜜枇杷叶 7.46 g, 甘草 1.12 g, 黄连 3.73 g, 桑白皮 7.46 g, 黄柏 3.73 g, 置于 2 L 电陶瓷煎药壶中, 加水 300 mL, 称定煎煮前总质量, 先用武火 400 W 煎煮约 11 min 至沸腾, 再改用文火 200 W 保持微沸

表 1 15 批枇杷清肺饮物质基准所用饮片的产地信息

Table 1 Production area information of decoction pieces in 15 batches of Pipa Qingfei Yin substance benchmark

样品	产地				
	蜜枇杷叶	桑白皮	黄连	人参	甘草
S1	四川	广东	四川	吉林	甘肃
S2	广东	安徽	重庆	吉林	甘肃
S3	广东	湖北	重庆	吉林	甘肃
S4	广西	湖北	四川	吉林	甘肃
S5	四川	河南	重庆	吉林	内蒙古
S6	福建	四川	四川	吉林	甘肃
S7	广东	浙江	四川	辽宁	甘肃
S8	四川	安徽	四川	辽宁	内蒙古
S9	广西	河南	四川	辽宁	甘肃
S10	广东	湖北	四川	辽宁	内蒙古
S11	四川	广东	四川	黑龙江	内蒙古
S12	四川	湖北	四川	黑龙江	甘肃
S13	广东	四川	四川	黑龙江	甘肃
S14	广西	河南	四川	黑龙江	甘肃
S15	福建	浙江	四川	黑龙江	甘肃

注: 饮片黄柏的产地均为四川。

约 60 min, 至总质量减少 110 g, 停止加热, 趁热过 400 目筛, 即得枇杷清肺饮物质基准。将其置于真空冷冻干燥机中, 经预冷、抽真空、一次升华、解析干燥的步骤冻干 72 h, 即得枇杷清肺饮物质基准冻干粉。

## 2.2 溶液的制备

**2.2.1 供试品溶液** 精密称量枇杷清肺饮物质基准(样品 S10) 0.15 g 于 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 30 min(功率 400 W, 频率 40 kHz), 放冷, 称定质量, 用 50% 甲醇补足减少的质量, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

**2.2.2 阴性样品溶液** 按照 2.1 项下物质基准制备方法, 分别制备缺蜜枇杷叶、缺桑白皮、缺黄连、缺黄柏、缺人参、缺甘草的阴性冻干粉, 以及缺黄连和黄柏、缺蜜枇杷叶和桑白皮的双阴性冻干粉。按 2.2.1 项下方法分别制备缺蜜枇杷叶、缺桑白皮、缺黄连、缺黄柏、缺人参、缺甘草的阴性样品溶液, 以及缺黄连和黄柏、缺蜜枇杷叶和桑白皮的双阴性样品溶液。

**2.2.3 对照品溶液** 取盐酸黄柏碱、绿原酸、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、甘草苷、甘草酸铵、盐酸黄连碱、盐酸药根碱、表小檗碱、木兰花碱、非洲防己碱

对照品适量,精密称定,置于不同量瓶中,加入50%甲醇稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为94.99, 80.54, 244.32, 77.47, 49.34, 180.74, 502.56, 246.32, 446.52, 528.50, 310.45 mg·L<sup>-1</sup>的单一对照品贮备液。

分别精密量取盐酸黄柏碱、绿原酸、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、甘草苷、甘草酸铵、盐酸黄连碱、盐酸药根碱、表小檗碱、木兰花碱、非洲防己碱对照品贮备液适量,置于同一25 mL量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,得质量浓度分别为8.07, 9.31, 35.23, 28.01, 11.60, 9.38, 24.72, 25.97, 13.00, 19.74, 31.08 mg·L<sup>-1</sup>的混合对照品溶液1。精密吸取盐酸黄柏碱、绿原酸、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、甘草酸铵5种对照品贮备液适量,置于同一10 mL量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,得质量浓度分别为6.20, 9.55, 64.79, 18.78, 8.70 mg·L<sup>-1</sup>的混合对照品溶液2。

**2.2.4 色谱条件** ACQUITY UPLC<sup>®</sup> CSH<sup>™</sup> C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),流动相选择乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~7 min, 5%~7%A; 7~11 min, 7%~8%A; 11~22 min, 8%~14%A; 22~30 min, 14%~15%A; 30~35 min, 15%~25%A; 35~42 min, 25%~40%A; 42~45 min, 40%~50%A; 45~50 min, 50%~60%A)。进样量2 μL,柱温25 °C,流速0.35 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长的程序为0~32 min, 278 nm; 32~50 min, 248 nm。

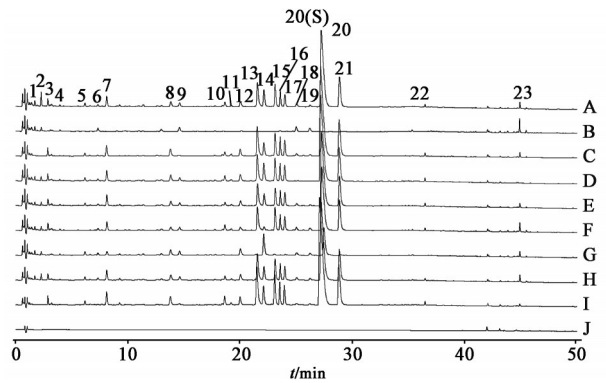
### 2.3 方法学验证<sup>[15-17]</sup>

**2.3.1 专属性试验** 取枇杷清肺饮物质基准(样品S10)的供试品溶液、空白溶剂50%甲醇、阴性样品溶液进行UPLC分析,按2.2.4项下色谱条件测定,记录色谱图,结果表明各色谱峰分离度良好,不同化学成分之间无明显干扰,说明该方法专属性良好,见图1。

**2.3.2 精密度** 取枇杷清肺饮物质基准(样品S10)的供试品溶液,按2.2.4项下条件连续测定6次,以20号峰(盐酸小檗碱)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均≤2.0%,表明仪器精密度良好。

**2.3.3 重复性** 取枇杷清肺饮物质基准(样品S10)适量,按2.2.1项下方法平行制备供试品溶液6份,按2.2.4项下色谱条件测定,以20号峰(盐酸小檗碱)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均≤0.8%,表明该方法重复性良好。

**2.3.4 稳定性** 取枇杷清肺饮物质基准(样品S10)的供试品溶液适量,分别于制备后0, 2, 4, 8, 12, 24 h



A. 全方; B. 缺黄连和黄柏; C. 缺蜜枇杷叶和桑白皮; D. 缺甘草; E. 缺人参; F. 缺黄柏; G. 缺黄连; H. 缺桑白皮; I. 缺蜜枇杷叶; J. 50% 甲醇

图1 枇杷清肺饮及其阴性样品、空白溶剂的UPLC

Fig. 1 UPLC chromatograms of blank solvent, Pipa Qingfei Yin and its negative samples

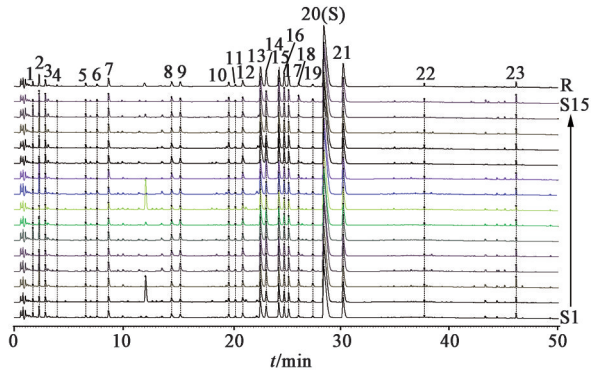
按2.2.4项下色谱条件测定,以20号峰(盐酸小檗碱)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均≤2.3%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

**2.4 指纹图谱的建立** 按2.2.1项下方法制备15批枇杷清肺饮物质基准(样品S1~S15)的供试品溶液,根据2.2.4项下色谱条件进行UPLC检测,记录各样品色谱图。

**2.4.1 参照峰的选定** 在15批枇杷清肺饮物质基准指纹图谱中,盐酸小檗碱色谱峰保留时间适中、峰面积大且稳定、分离度好,故选用盐酸小檗碱(峰20)为参照峰。

**2.4.2 相似度评价及色谱峰归属** 将15批枇杷清肺饮物质基准(样品S1~S15)的指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(2012版)中,以样品S10色谱图为参照图谱,利用中位数法,设置时间窗宽度0.1 min,进行多点校正并生成对照指纹图谱(R),计算相似度。结果15批枇杷清肺饮物质基准共标记了23个共有峰,15批样品的UPLC指纹图谱与R的相似度分别为0.999, 0.999, 0.998, 0.999, 0.998, 0.999, 0.999, 0.999, 0.998, 0.999, 0.999, 1.000, 0.999, 0.997,表明各批样品之间差异较小,制备工艺稳定。将样品S10的色谱图与各阴性样品色谱图进行比较,确定峰1, 2, 4, 6归属于蜜枇杷叶;峰9为蜜枇杷叶与桑白皮共有峰;峰5归属于黄柏;峰7, 8, 12, 14, 20为黄连与黄柏共有峰;峰18, 19, 23归属于甘草;峰3, 10, 11, 13, 15~17, 21, 22归属于黄连。根据对照品信息指认了11个色谱峰,分别为5号峰(盐酸黄柏碱), 7号峰(木兰花碱), 9号峰(绿原酸), 13号峰(盐酸黄连碱), 15号峰

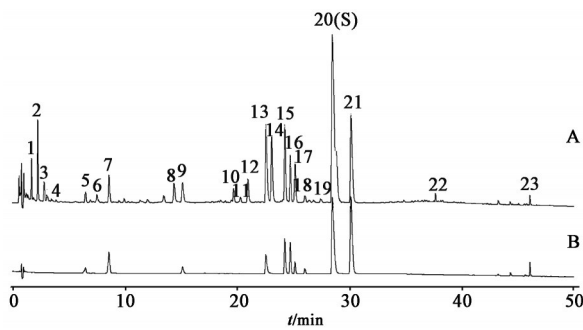
(表小檗碱), 16号峰(非洲防己碱), 17号峰(盐酸药根碱), 18号峰(甘草苷), 20号峰(盐酸小檗碱), 21号峰(盐酸巴马汀), 23号峰(甘草酸铵), 见图1~3。



20. 盐酸小檗碱(S); R. 对照指纹图谱

图2 15批枇杷清肺饮物质基准的UPLC指纹谱

Fig. 2 UPLC fingerprint of 15 batches of Pipa Qingfei Yin substance benchmark



A. 供试品; B. 混合对照品; 5. 盐酸黄柏碱; 7. 木兰花碱; 9. 绿原酸; 13. 盐酸黄连碱; 15. 表小檗碱; 16. 非洲防己碱; 17. 盐酸药根碱; 18. 甘草苷; 20. 盐酸小檗碱; 21. 盐酸巴马汀; 23. 甘草酸铵(图9同)

图3 枇杷清肺饮物质基准UPLC指纹谱的色谱峰指认

Fig. 3 Identification of chromatographic peaks in UPLC fingerprint of Pipa Qingfei Yin substance benchmark

对比15批枇杷清肺饮物质基准UPLC指纹图谱,发现样品S2, S8色谱图中在保留时间约12 min处有一峰面积较大的色谱峰,而S3, S4, S11~13色谱图中对应位置没有色谱峰,其余批次样品色谱图中对应位置有峰面积较小的色谱峰,故未将该峰作为共有峰。经研究发现此色谱峰为桑皮苷A, 归属于桑白皮。样品S2, S8组方中所用的桑白皮产地为安徽亳州, 魏敏等<sup>[18]</sup>比较了不同产地桑白皮中的7种成分含量, 结果表明不同产地桑白皮各成分含量差异较大, 故在选用枇杷清肺饮中桑白皮饮片时建议尽量选用源于道地产区的。

**2.4.3 聚类分析(CA)<sup>[19]</sup>** 15批枇杷清肺饮物质基准(样品S1~S15)是由不同产地、不同批号饮片随机配伍煎煮所得, 本研究中所用的饮片(尤其是蜜枇

杷叶和桑白皮)产地较为广泛, 为了进一步研究不同批次物质基准间的差异, 采用SPSS 25.0软件对15批物质基准进行CA。以15批物质基准的23个共有峰的峰面积为变量, 选用组间连接聚类方法, 测量区间为平方欧氏距离, 见图4。当平方欧氏距离为20时, 可将15批物质基准分为两类, 其中样品S1, S2, S4, S6, S7, S9, S10聚为一类, 其余样品聚为另一类, 结合指纹图谱相似度评价结果, 可以看出这两类样品之间差异很小, 表明不同批次样品之间的相同成分仍存在一定的微小差异, 与不同产地的饮片配伍具有一定相关性。说明来源于不同产地的饮片质量差异会对枇杷清肺饮物质基准的质量控制产生一定的影响。

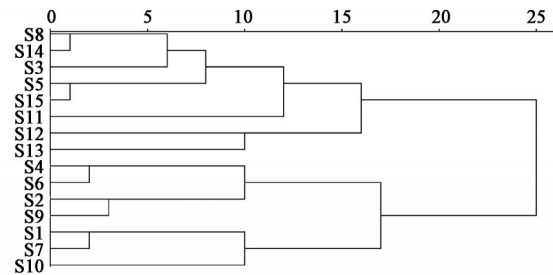


图4 15批枇杷清肺饮物质基准的CA树状分析

Fig. 4 CA dendrogram of 15 batches of Pipa Qingfei Yin substance benchmark

**2.4.4 主成分分析(PCA)** 选择15批枇杷清肺饮物质基准(样品S1~S15)的23个共有峰的峰面积为变量, 导入SIMCA 13.0软件进行PCA处理, 见图5。结果发现15批枇杷清肺饮物质基准可分为两类, 其中样品S1, S2, S4, S6, S7, S9, S10为一类, 其余样品为另一类, 与CA结果一致。

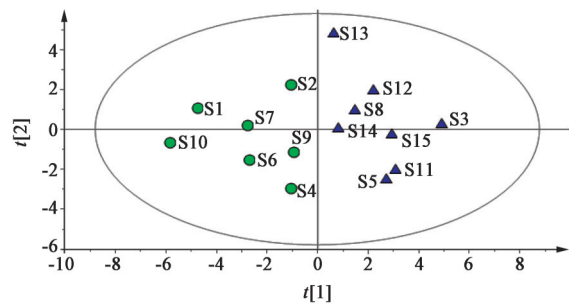


图5 15批枇杷清肺饮物质基准的PCA得分

Fig. 5 PCA score of 15 batches of Pipa Qingfei Yin substance benchmark

**2.4.5 正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)<sup>[20]</sup>**

将不同批次枇杷清肺饮物质基准(样品S1~S15)的23个共有峰的峰面积导入SIMCA 13.0软件进行OPLS-DA处理, 见图6~8。由图6可知, 15批次样品

数据点全落在置信区间(95%)内且可分成两类,分类结果与CA,PCA结果一致。图7中的点离原点越远,表明对应变量(色谱峰)权重值越大,结合变量投影重要性(VIP)值可更加直接地看出各变量(色谱峰)影响程度由大到小排序依次为峰17(盐酸药根碱)>峰15(表小檗碱)>峰16(非洲防己碱)>峰21(盐酸巴马汀)>峰3>峰20(盐酸小檗碱)>峰13(盐酸黄连碱)>峰22>峰6>峰10>峰1>峰9(绿原酸)>峰8>峰7(木兰花碱)>峰2>峰4>峰23(甘草酸铵)>峰12>峰5(盐酸黄柏碱)>峰18(甘草苷)>峰19>峰14>峰11。以VIP值>1为评判标准,共有10个色谱峰的VIP值>1,其中有9个峰来源于黄连药味,说明全方中黄连饮片质量优劣对枇杷清肺饮物质基准指纹图谱影响较大。

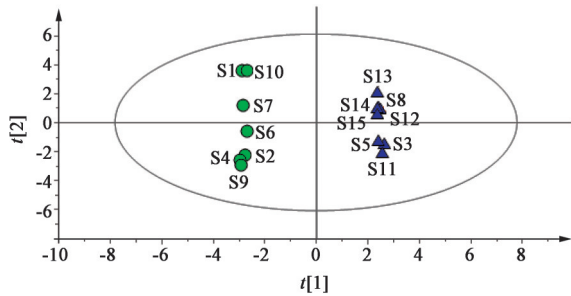
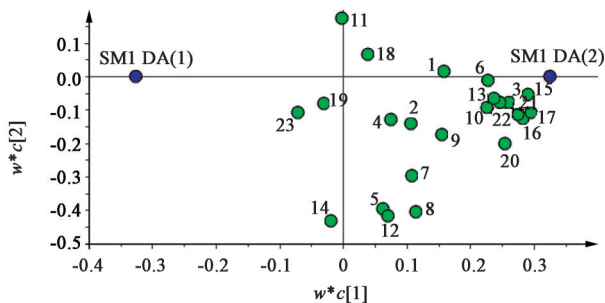


图6 15批枇杷清肺饮物质基准的OPLS-DA得分矩阵  
Fig. 6 OPLS-DA scoring plots of 15 batches of Pipa Qingfei Yin substance benchmark



图中数字1~23代表色谱峰序号  
图7 枇杷清肺饮物质基准的OPLS-DA载荷散点  
Fig. 7 OPLS-DA loading plots of Pipa Qingfei Yin substance benchmark

## 2.5 多指标成分的含量测定

### 2.5.1 色谱条件 同2.2.4项。

2.5.2 系统适用性试验 取混合对照品溶液2,枇杷清肺饮物质基准(样品S10)的供试品溶液和空白溶剂(50%甲醇)适量,按2.2.4项下色谱条件测定,结果发现各色谱峰分离度、拖尾因子和理论板数均较好,见图9。

2.5.3 线性关系考察 精密吸取2.2.3项下配制的

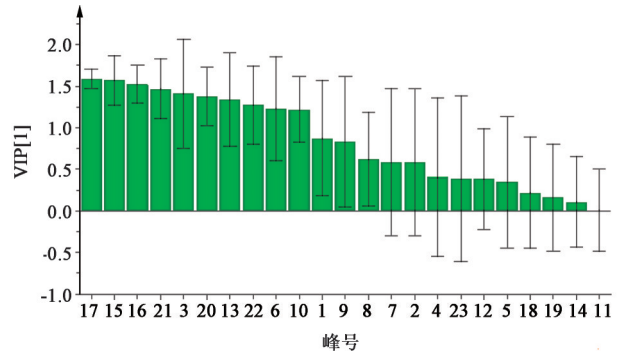
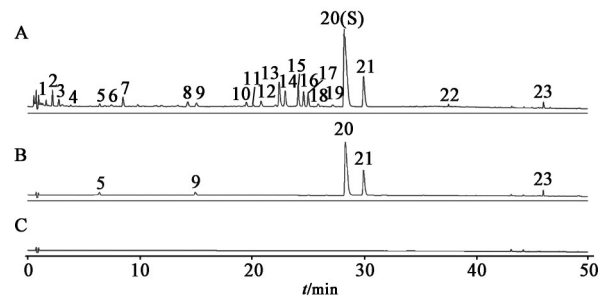


图8 枇杷清肺饮物质基准OPLS-DA的VIP值  
Fig. 8 VIP values of OPLS-DA of Pipa Qingfei Yin substance benchmark



A. 供试品; B. 混合对照品2; C. 50%甲醇

图9 枇杷清肺饮物质基准的UPLC  
Fig. 9 UPLC chromatograms of Pipa Qingfei Yin substance benchmark

各单一对照品储备液适量,分别稀释成一系列不同质量浓度的溶液,按2.2.4项下色谱条件测定,记录色谱峰峰面积,以峰面积为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,见表2,结果表明5种成分在相应质量浓度范围内与峰面积呈良好线性关系。

表2 枇杷清肺饮物质基准中5种指标成分的线性关系考察

Table 2 Linear relationship of 5 index components of Pipa Qingfei Yin substance benchmark

成分	线性回归方程	R <sup>2</sup>	线性范围 /mg·L <sup>-1</sup>
盐酸黄柏碱	$Y=5\ 525.291\ 3X-605.834\ 2$	1.000 0	2.97~94.99
绿原酸	$Y=6\ 046.983\ 1X-1\ 125.342\ 8$	1.000 0	3.22~80.54
盐酸小檗碱	$Y=19\ 383.673\ 4X-11\ 093.634\ 8$	1.000 0	6.11~244.32
盐酸巴马汀	$Y=25\ 329.608\ 6X+714.362\ 4$	1.000 0	1.24~77.47
甘草酸铵	$Y=4\ 677.401\ 2X-41.973\ 9$	0.999 9	7.23~90.37

2.5.4 精密度试验 取同一枇杷清肺饮物质基准(样品S10)供试品溶液,按2.2.4项下色谱条件连续进样6次,计算盐酸黄柏碱、绿原酸、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、甘草酸铵峰面积的RSD分别为1.0%, 0.9%, 0.3%, 0.3%, 0.4%,表明仪器精密度良好。

**2.5.5 稳定性试验** 取同一批枇杷清肺饮物质基准(样品S10)供试品溶液,分别于制备后0,2,4,8,12,24 h按2.2.4项下色谱条件测定,计算盐酸黄柏碱、绿原酸、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、甘草酸铵峰面积的RSD分别为1.0%,2.2%,0.5%,0.4%,1.1%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

**2.5.6 重复性试验** 取同一批枇杷清肺饮物质基准(样品S10)的供试品溶液6份,按2.2.4项色谱条件测定,记录色谱图,计算盐酸黄柏碱、绿原酸、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、甘草酸铵平均质量分数分别为1.07,1.75,17.87,3.75,1.51 mg·g<sup>-1</sup>,RSD分别为0.5%,0.1%,1.3%,0.8%,0.1%,表明该方法重复性良好。

**2.5.7 加样回收率试验** 称取已知各指标成分含量的枇杷清肺饮物质基准(样品S10)约0.075 g,精密称定,平行6份,分别按照样品中相对应成分含量1:1加入2.2.3项下配制的盐酸黄柏碱、绿原酸、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、甘草酸铵对照品溶液。按2.2.1项下方法制备供试品溶液,按2.2.4项下色谱条件测定,计算盐酸黄柏碱、绿原酸、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、甘草酸铵的平均加样回收率分别为101.16%,96.47%,97.41%,98.41%,98.13%,RSD分别为1.8%,2.6%,2.9%,2.3%,4.8%,表明该方法准确可靠。

**2.5.8 样品测定** 取15批枇杷清肺饮物质基准(样品S1~S15),按2.2.1项下方法制备供试品溶液,按2.2.4项下色谱条件测定,计算5个指标成分的含量。结果表明15批物质基准中盐酸黄柏碱、绿原酸、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、甘草酸铵质量分数范围分别为0.87~2.00,1.53~5.95,18.45~33.97,3.87~6.29,1.02~4.12 mg·g<sup>-1</sup>,见表3。

### 3 讨论与总结

**3.1 物质基准制备工艺探讨** 经典名方汤剂的制备工艺稳定是研究物质基准的前提。本研究以《医宗金鉴》记载为依据,参照《古代经典名方关键信息表(7首方剂)》用法用量制备枇杷清肺饮物质基准。枇杷清肺饮全方饮片总量24.62 g,因考虑处方中各药味用量均较小,为保证煎煮工艺与古代医籍记载基本一致,本研究采用1倍处方剂量按2.1项下煎煮方法进行煎煮,平行4次,将平行煎煮所得煎液合并混匀,得枇杷清肺饮物质基准(4倍处方量),此法所得的物质基准符合古籍记载且具有代表性。

**3.2 供试品溶液制备方法考察** 预试验考察了不同提取溶剂(水,50%甲醇,乙醇,50%乙醇),

表3 15批枇杷清肺饮物质基准中5个指标成分的质量分数

Table 3 Contents of 5 index components in 15 batches of Pipa Qingfei Yin substance benchmark mg·g<sup>-1</sup>

样品	盐酸黄柏碱	绿原酸	盐酸小檗碱	盐酸巴马汀	甘草酸铵
S1	1.04	1.78	22.72	3.96	1.82
S2	1.40	1.53	24.07	4.05	4.12
S3	1.51	5.95	30.17	6.29	2.66
S4	1.66	3.76	24.14	4.19	2.62
S5	1.74	4.67	28.33	5.22	1.02
S6	1.41	3.91	22.45	4.30	2.12
S7	1.28	2.61	23.78	4.52	1.80
S8	1.38	3.78	27.81	5.64	2.52
S9	1.64	2.13	24.26	4.41	2.44
S10	0.95	1.84	18.45	3.87	1.69
S11	2.00	3.95	33.97	6.20	1.65
S12	1.60	1.81	32.10	5.47	2.47
S13	0.87	2.50	25.26	5.34	2.99
S14	1.74	5.67	32.49	5.69	2.25
S15	1.52	3.41	29.18	5.31	1.45

不同提取方式(超声、回流)及不同提取时间(15,30,45 min)制备的供试品溶液,进行UPLC分析,按峰个数、峰形、分离度等对比研究。结果表明选择用50%甲醇超声30 min能提取较为完全,且该方法快速简便。

**3.3 色谱条件的优化** 预试验考察了乙腈-磷酸水溶液、甲醇-甲酸水溶液、乙腈-甲酸水溶液等常用的流动相系统,分析后发现乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱时,分离效果较好、峰数多、峰形佳、基线平稳。采用DAD进行全波长扫描(190~400 nm),以期获得最大化指纹图谱信息。以基线、峰形、峰数、分离度等因素为波长选定标准,为实现指纹图谱信息丰富且可用于多成分含量测定,最终选用双波长切换法,即检测波长程序为0~32 min,278 nm;32~50 min,248 nm。

**3.4 指标成分的选定** 中药复方制剂药味多、化学成分复杂,选择具有代表性的化学成分进行含量测定能在一定程度上对制剂质量进行控制及评价<sup>[12]</sup>。枇杷清肺饮方中蜜枇杷叶入肺、胃经,桑白皮入肺经,主清肺、降气和胃,是治疗肺风粉刺(痤疮)的重要药味,共为君药。黄连和黄柏均能清热泻火解毒,助蜜枇杷叶清肺胃湿热,共为臣药。人参补脾益肺,生甘草清热解毒、调和诸药,两者用量较小,共为佐使药。现代研究表明,痤疮炎症的产生与痤疮丙酸杆菌密切相关<sup>[21-22]</sup>,蜜枇杷叶和桑白皮中的

绿原酸具有较强的抗菌<sup>[23]</sup>、抗氧化、抗炎<sup>[24]</sup>作用。黄连、黄柏中主要含生物碱成分,盐酸小檗碱具有抗炎,抗菌等作用<sup>[25]</sup>,为两者共有成分,也是两者含量最高的成分,盐酸黄柏碱、盐酸巴马汀也为抗菌有效成分。甘草中的甘草酸铵有抗炎、抗过敏、抗氧化作用<sup>[26]</sup>。结合枇杷清肺饮组方配伍特点及2020年版《中国药典》对各药味含量测定成分分析,综合考虑不同批次物质基准指纹图谱共有峰的OPLS-DA分析结果,选定盐酸黄柏碱、绿原酸、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、甘草酸铵5个成分进行枇杷清肺饮含量测定可对其质量控制提供评价依据。

**3.5 指纹图谱分析** 本研究建立了15批枇杷清肺饮物质基准指纹图谱,并进行了共有峰标定、相似度评价及化学模式识别分析。结果共标定了23个共有峰,这23个成分来自蜜枇杷叶、桑白皮、黄连、黄柏、甘草5个药味。15批物质基准指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均 $\geq 0.997$ ,说明指纹图谱重复性好,制备工艺较为稳定。CA和PCA等将15批物质基准分为两类,结合相似度分析可知不同批次样品间存在微小差异,与配伍饮片产地具有一定相关性。另外,本研究选用的桑白皮饮片产地较为广泛,而不同产地的桑白皮质量差异较大<sup>[18]</sup>,部分批次物质基准桑皮苷A含量很低或者为零,故本研究中未将桑皮苷A定为共有峰,也没有对其进行定量分析,为缩小指标性成分含量范围,减少批次间的质量差异,在今后进行枇杷清肺饮物质基准的制备时,建议尽量选用道地产地饮片。人参含有丰富的皂苷类成分,由于其在枇杷清肺饮全方中用量占比较小,在本研究的指纹图谱中未能明显检测到人参的特征峰,后续会对枇杷清肺饮中皂苷类成分进行研究,以期为该复方中所有药味建立完整的指纹图谱及质量标准提供科学依据。

**3.6 总结** 经典名方是中医临床应用几千年实践经验的结晶,其开发的关键所在是如何结合古今应用实际,将其制备方式、方法标准化。物质基准在经典名方开发中具有举足轻重的地位,是制剂工艺筛选及制剂标准制订的依据和准绳,可确保复方制剂关键质量属性与其一致。本研究建立的15批枇杷清肺饮物质基准UPLC指纹图谱相似度高、分离度好,对应全方中除人参以外的5个药味均有表征,并可同时对盐酸小檗碱、盐酸巴马汀等5种指标性成分进行定量分析,进而控制该物质基准的质量,可为枇杷清肺饮复方制剂的研发提供参考和依据。

**[利益冲突]** 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 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[EB/OL]. (2018-04-13)[2020-09-10]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [2] 刘艳,章军,杨林勇,等. 经典名方物质基准研制策略及关键问题分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(1):1-9.
- [3] 国家中医药管理局,国家药品监督管理局. 关于发布《古代经典名方关键信息考证原则》《古代经典名方关键信息表(7首方剂)》的通知[EB/OL]. (2020-11-10)[2020-11-16]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2020-11-10/18132.html>.
- [4] 周梦圆,蒋佳风,周激,等. 基于“中医时间、空间医学”理论的古方枇杷清肺饮的探讨[J]. 时珍国医国药,2018,29(12):2990-2991.
- [5] 陈桂升,管志强,张翠侠. 枇杷清肺饮加减联合红蓝光治疗头部脂溢性皮炎41例临床观察[J]. 江苏中医药,2018,50(4):37-39.
- [6] 李宗超,叶伟. 枇杷清肺饮治疗脾胃蕴热型皮肤病的临床研究[J]. 世界中医药,2015,10(12):1894-1896.
- [7] 胡志帮,陈茜,陶春蓉,等. 枇杷清肺饮加减方对痤疮丙酸杆菌诱导的小鼠耳部炎症的疗效观察[J]. 临床皮肤科杂志,2019,48(4):202-206.
- [8] 陈茜,刁庆春,韩晓凤,等. 加减枇杷清肺饮对ICR小鼠痤疮模型NLRP3炎性小体及其下游因子的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2019,25(1):52-55.
- [9] 钟玲,杨世强,覃媛春. 枇杷清肺饮联合刺络放血拔罐治疗脾胃蕴热型痤疮72例[J]. 中医药临床杂志,2017,29(4):572-574.
- [10] 席丽红,姜云平,王坤. 枇杷清肺饮加减联合电针火针治疗肺经风热型痤疮42例[J]. 江西中医药大学学报,2019,31(6):60-62.
- [11] 王奎,徐曼菲,胡卫红. 枇杷清肺饮治疗痤疮的临床效果观察[J]. 中国医疗美容,2019,9(11):98-101.
- [12] 谢凡,施崇精,袁强华,等. 基于HPLC特征图谱和多元定量分析建立加味四妙颗粒的质量评价方法[J]. 沈阳药科大学学报,2020,37(4):308-314.
- [13] 吴谦. 医宗金鉴[M]. 石学文,高春媛,王新佩,等,点校. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1997:614-615.
- [14] 宋佳,谭曦然,傅延龄. 宋代至清代经方本原剂量研究概述[J]. 中医杂志,2013,54(21):1804-1807.
- [15] 肇鑫宇,金希儒,陈雁飞,等. 京大戟醋制前后UPLC指纹图谱及含量测定的比较[J]. 沈阳药科大学学报,2016,33(11):861-869.
- [16] 李莉娜,杨淑婷,杨健,等. 生芪消渴胶囊UPLC指纹图谱建立及6种成分含量测定[J]. 中国新药杂志,2018,27(18):2196-2202.

- [17] 张誉晴,吴安,邹婷,等. 经典名方圣愈汤的UPLC指纹图谱建立及多成分定量分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(8):8-16.
- [18] 魏敏,陀扬凌,杜晓月,等. 不同产地桑白皮中7种成分的含量测定及化学计量学评价[J]. 中药材,2020,43(1):125-129.
- [19] 郑承剑,秦路平. 采用高效液相色谱法建立黄荆子药材化学指纹图谱及含量测定方法并集合聚类分析进行品质评价[C]//世界中医药学会联合会. 世界中医药学会联合会中药鉴定专业委员会第二届学术年会论文集:2015年卷. 武汉:世界中医药学会联合会,2015:529-543.
- [20] 孟岩,李焯仪,单家明,等. 经典名方小承气汤物质基础的HPLC指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(4):130-136.
- [21] BAKRY O A, SAMAKA R M, SEBIKA H, et al. Toll-like receptor 2 and *P. acnes*: do they trigger initial acne vulgaris lesions? [J]. Anal Quant Cytopathol Histopathol, 2014, 36(2): 100-110.
- [22] BHATE K, WILLIAMS H C. Epidemiology of acne vulgaris [J]. Br J Dermatol, 2013, 168(3): 474-485.
- [23] BAGDAS D, GUL Z, MEADE J A, et al. Pharmacologic overview of chlorogenic acid and its metabolites in chronic pain and inflammation [J]. Curr Neuropharmacol, 2020, 18(3): 216-228.
- [24] DOS-SANTOS M D, ALMEIDA M C, LOPES N P, et al. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid [J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(11): 2236-2240.
- [25] 周瑞,项昌培,张晶晶,等. 黄连化学成分及小檗碱药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2020,45(19): 4561-4573.
- [26] 韩瑶聘,王彬,王政雨,等. 甘草酸药理作用的研究进展[J]. 中国新药杂志,2012,21(21):2499-2505.

[责任编辑 刘德文]

· 书讯 ·

## 牙周病致前牙移位采用口腔正畸治疗的临床价值 ——评《当代口腔诊疗基础与临床进展》

牙周病是一种炎症性疾病,对患者牙龈和牙周组织具有很强的破坏性。部分患者会出现前牙移动和松动的现象,如治疗不及时会导致牙齿脱落,严重限制个体的咀嚼功能。临床上,牙周病引起的前牙位移治疗以全身用药为主。

《当代口腔诊疗基础与临床进展》由丁广存编写,吉林科学技术出版社2019年出版。本书共八章,第一章介绍牙体牙髓病;第二章介绍牙周病;第三章介绍口腔黏膜病;第四章介绍口腔颌面外科;第五章介绍口腔修复;第六章介绍口腔正畸;第七章介绍口腔种植;第八章介绍儿童牙病和老年牙病。对口腔正畸治疗牙周病致前牙移位的治疗主要包括:(1)早期矫治:尽早去除病因,促进下颌向前生长。从替牙期到恒牙早期,下颌经历了生长快速期,在此阶段宜采用功能矫治器如肌激动器,促进下颌的向前生长,对许多Ⅱ类错前牙深覆盖和远中磨牙关系的矫正起到很好的作用。远中移动上颌的难度很大,真正的骨骼畸形需要采用外科手术。但是,抑制上颌向前发育却是可以做到的。在生长发育早期使用口外弓,限制上颌向前生长,与此同时,下颌能自由地向前发育,最终建立正常的上下颌矢状关系。除颌骨矢状关系不调外,Ⅱ类错经常伴有颌骨垂直关系不调。根据几何学原理,后部牙槽嵴高度减小,下颌将向前、向上旋转,下颌平面角减小,颏点位置前移,这对高角病例的治疗有利;相反,后部牙槽嵴高度增加,下颌将向后、向下旋转,下颌平面角增大,颏点位置将后移,这对低角病例的治疗有利而不利于高角病例侧貌的改善。(2)综合矫治:应用弓丝以由细到粗、由软到硬、由圆到方为原则。整平牙弓时常可戴用平面导板打开咬合。如需增强磨牙支抗,可配合使用腭杆、口外弓等辅助装置。远中移动上尖牙,使尖牙与第二前磨牙靠拢,下颌尖牙一般不需要单独向远中移动。内收上前牙是矫正前牙深覆盖的主要方法。如上前牙需要较多的后移,应当使用方丝,对上切牙进行内收的同时行根舌向(冠唇向)的转矩控制。上前牙内收时,由于“钟摆效应”前牙的覆将会加深,使原本在第一阶段得以控制或矫正的深覆重新出现。为此,在弓丝的关闭曲前后弯“人”字形曲,在内收的同时,继续压低上切牙。由于上颌的6颗前牙分两阶段向远中移动,下颌6颗前牙同时向远中移动,下颌磨牙的前移将比上颌磨牙多;另外,在内收切牙时常配合使用Ⅱ类颌间牵引,起到保护上磨牙支抗,消耗下磨牙支抗的作用,进一步改变了上、下磨牙前移的比例,治疗中若使用口外弓,上磨牙的前移会得到更有效地控制。通过这些共同作用,使前后牙段发生不同比例的近远中移动,最终前牙达到正常的覆盖关系,磨牙建立中性。治疗前应向患者普及口腔卫生知识,进行彻底的口腔清洁。检查患者口腔炎症部分,对炎症部位给予相应的抗炎治疗。采用直丝弓矫正技术进行矫正治疗,注意粘结托槽时的咬合程度,将托槽靠近切方进行粘结。按照自前向后的顺序对尖牙进行结扎,在完成以上操作后,根据患者情况不同对正畸进行微调。牙周炎与牙龈炎是导致探诊出血的主要因素,牙龈受到刺激、肿胀,在吃水果、刷牙时出现牙龈出血。治疗后患者发生探诊出血率明显减少,因患者接受口腔正畸治疗,完全清楚口腔内刺激性物质,改善出血症状。患者治疗后牙槽骨高度无明显变化,牙周袋深度明显缩小,该方法可有效改善患者牙周袋深度。炎症控制是治疗牙周炎所致前牙移位患者的关键所在,若患者炎症未得到控制就盲目进行正畸治疗,不但达不到预期治疗效果,甚至使患者病情加重。

《当代口腔诊疗基础与临床进展》中编写了常见龋病、牙髓病和根尖周病、牙周病等多个部分,着重介绍了口腔疾病的诊断及治疗技术,案例理论与实践充分结合,贴近临床,具有较强的临床指导意义,可供口腔医师、进修医师和实习医师参考。

(作者王学升,陈倩,宁夏固原市西吉县中医医院,宁夏 固原 756299)