

高效液相色谱指纹图谱结合化学计量学评价 桔梗汤物质基准的质量

钱慧琴, 李春燕, 王迦南, 徐海波, 庞昊埏, 李彦灵*

(豫北医学院, 新乡 453000)

摘要: 为研究桔梗汤物质基准的质量控制方法,进行了题示研究。以 12 批桔梗汤物质基准为研究对象,建立高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,与对照指纹图谱对比,指认其中的共有峰,利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版本)进行相似度评价,采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法(UHPLC-Q-TOF-MS/MS)定性鉴别桔梗汤物质基准,并结合聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)等化学计量学方法筛选影响质量的主要差异性成分。通过测定 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基的清除率来评价桔梗汤物质基准的抗氧化活性,并采用偏最小二乘回归分析方法建立桔梗汤物质基准中共有峰与抗氧化活性的谱效关系模型。结果显示,12 批桔梗汤物质基准 HPLC 指纹图谱中得到 7 个共有峰,指认出 3 个成分(甘草苷、异甘草苷、甘草酸)均归属于甘草药材,相似度均大于 0.900。采用 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定出 75 个化学成分,其中 13 个化学成分归属于桔梗药材,57 个化学成分归属于甘草药材。CA、OPLS-DA 均将 12 批桔梗汤物质基准分为 3 类;PCA 得到 2 个主成分,累计方差贡献率为 92.001%;OPLS-DA 得到 4 个影响桔梗汤物质基准整体质量的差异性成分,包含甘草酸和 3 种未知物。根据谱效关系模型可知,甘草酸和 3 种未知物是清除 DPPH 自由基的关键成分,直接影响桔梗汤物质基准的抗氧化活性。

关键词: 高效液相色谱指纹图谱;化学计量学;桔梗汤物质基准;抗氧化活性

中图分类号: O657.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-4020(2025)10-1133-11

经典名方桔梗汤出自张仲景的《伤寒论》,由一两桔梗和二两甘草组成,是治疗肺病、血痹、喉痹等病症的经典方剂^[1],现收录于《古代经典名方目录(第二批)》汉族医药部分^[2]。该方在现代临床中广泛应用于内科、外科、儿科等科室,其中儿科使用频率最高,主要治疗咽痛、咳嗽^[3]。研究发现,桔梗汤可通过多途径发挥治疗作用:如桔梗汤中总皂苷和总黄酮可通过抑制白细胞介素 17A(IL-17A)/肿瘤坏死因子- α (TNF- α)信号通路及高度活化的 I κ B 激酶(IKK)/核因子 κ B(NF- κ B)/黏蛋白 5AC(MUC5AC)通路,明显改善慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠的

肺功能^[4-5];桔梗汤对脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤具有改善作用,并能抑制炎症介质表达及 NF- κ B 活化;桔梗汤可通过磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)信号通路抑制细胞凋亡,从而对博来霉素诱导的肺纤维化发挥保护作用^[6]。基于桔梗汤的抗炎活性,文献^[7]采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法鉴定出桔梗汤提取物的主要活性成分为甘草酸、甘草皂苷、甘草素、桔梗皂苷元等 11 种;文献^[8]发现当桔梗汤中桔梗与甘草的质量比为 1:2 时,其提取物对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基的清除能力最强,抗氧化能力最强。

经典名方研究通常分为物质基准研制和制剂研制两个阶段^[9]。其中,物质基准是指按照古代医籍中经典名方记载的制备方法制成的中药基准物质^[10],能够评估后续研制的复方制剂与中医临床所用药用物质的一致性,规范经典名方制剂研发,并保障制剂的有效性与安全性^[11]。目前,经典名方的质量研究多采用指纹图谱结合多元统计学分析方

收稿日期:2024-02-21

基金项目:河南省科技攻关项目(222102310374);河南省高等学校重点科研项目(23B360007)

作者简介:钱慧琴,副教授,硕士,主要从事天然药物活性成分研究, qianhuiqina@163.com

*通信作者:李彦灵,副教授,硕士,主要从事天然药物活性成分研究, 17522009@sqmc.edu.cn

• 1133 •

法,以实现更全面、更科学的质量控制^[12]。

尽管桔梗汤的研究多集中于肺部疾病(如肺炎、COPD等)的临床应用和药理研究,但其物质基准的质量研究尚存在空白。因此,本工作采用高效液相色谱法(HPLC)建立了桔梗汤物质基准指纹图谱,采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法(UHPLC-Q-TOF-MS/MS)对桔梗汤物质基准进行定性鉴别,结合聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)等化学计量学方法获得影响不同批次桔梗汤物质基准质量的主要差异性成分。构建指纹图谱与体外抗氧化活性的谱效关系模型,可为完善桔梗汤物质基准的质量标准及临床应用提供科学依据。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1260 Infinity II 型高效液相色谱仪; Agilent 1290 型超高效液相色谱仪与 6545 LC/Q-TOF 型四极杆飞行时间质谱联用系统; KS-50E 型超声波清洗

器; Heal Force 型超纯水系统。

单对照品溶液: 分别精密称取适量的甘草苷对照品、异甘草苷对照品、甘草酸对照品,用甲醇溶解并定容,配制成质量浓度为 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的单对照品溶液。

混合对照品溶液: 分别取适量的各单对照品溶液,用甲醇稀释并定容,配制成甘草苷、异甘草苷、甘草酸质量浓度为 $0.018, 0.020, 0.028 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

甘草酸对照品、甘草苷对照品、异甘草苷对照品、桔梗皂苷 D 对照品的纯度均为 98%; 乙腈、甲醇、磷酸、甲酸均为色谱纯; 试验用水为超纯水。

桔梗和甘草购自国内某 3 家有限公司,经新乡医学院三全学院副教授李彦灵鉴定桔梗为桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A.DC. 的干燥根,甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎。各饮片均符合《中华人民共和国药典(2020 年版)》一部中各药材项下饮片炮制要求,按处方量准备 12 批桔梗汤物质基准,编号 S1~S12,所用药材的产地和批号信息见表 1。

表 1 桔梗汤物质基准药材信息

Tab. 1 Information of medicinal materials on Jiegeng decoction material benchmarks

编号	桔梗		甘草	
	产地	批号	产地	批号
S1	安徽省太和县	2110092	内蒙古鄂尔多斯市	2107021119
S2	安徽省霍邱县	2110122	甘肃省民勤县	2108061
S3	安徽省阜阳市	2001272	甘肃省榆中县	2011281
S4	安徽省六安市	2105182	甘肃省灵台县	2105171
S5	内蒙古扎鲁特旗	2105041184	内蒙古阿拉善左旗	21120601
S6	安徽省太和县	2111262	内蒙古杭锦旗	2104031119
S7	安徽省亳州市	2108222	甘肃省灵台县	2111081
S8	辽宁省本溪市	20120102	内蒙古杭锦旗	2111011119
S9	辽宁省本溪市	20020104	甘肃省榆中县	2110281
S10	内蒙古鄂伦春旗	2012011184	内蒙古巴彦淖尔市	21050102
S11	内蒙古牙克石市	2105011184	内蒙古杭锦旗	2105021119
S12	内蒙古扎兰屯市	2105021184	内蒙古杭锦旗	2109011119

1.2 仪器工作条件

1.2.1 HPLC 条件

WondaSil C₁₈ 色谱柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温 30 °C; 检测波长 254 nm; 进样量 5 μL; 流量 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 流动相 A 为乙腈, B 为 0.1% (体积分数)磷酸溶液。梯度洗脱程序: 0~10 min, A 由 5% 升至 10%; 10~30 min, A 由 10% 升至 25%; 30~45 min,

A 由 25% 升至 35%; 45~52 min, A 由 35% 升至 45%; 52~65 min, A 由 45% 升至 60%; 65~70 min, A 由 60% 升至 70%; 70~80 min, A 由 70% 升至 95%; 80~90 min, A 由 95% 降至 5%。

1.2.2 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 条件

1) 色谱条件 Thermol Hepersil BDS C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温 24 °C; 进样量 1 μL;

流量 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 流动相 A 为乙腈, B 为 0.1% (体积分数) 甲酸溶液。梯度洗脱程序: 0~12 min, A 由 5% 升至 10%; 12~36 min, A 由 10% 升至 25%; 36~54 min, A 由 25% 升至 35%; 54~62 min, A 由 35% 升至 45%; 62~78 min, A 由 45% 升至 60%; 78~84 min, A 由 60% 升至 70%; 84~96 min, A 由 70% 升至 95%; 96~100 min, A 由 95% 降至 5%。

2) 质谱条件 电喷雾离子 (ESI) 源, 正、负离子扫描模式; 雾化器温度 300°C ; 雾化气为氮气, 流量 $5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 鞘气温度 350°C , 鞘气流量 $11 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 毛细管电压 4 000 V; 碎裂电压 135 V; 喷雾压力 206.8 kPa; 质荷比 (m/z) 范围 50~1 700。

1.3 试验方法

1.3.1 桔梗汤物质基准的制备

《伤寒论》中记载“桔梗一两、甘草二两, 上二味, 以水三升, 煮取一升, 去滓, 温分再服”。经考证, 一两约 13.8 g, 一升为 200 mL^[13]。根据以上单位换算, 按照《古代经典名方中药复方制剂物质基准的申报资料要求 (征求意见稿)》中的相关要求, 制备 12 批冻干粉作为桔梗汤物质基准的基本形态。称取桔梗 13.8 g、甘草 27.6 g, 加入 600 mL 水浸泡 30 min, 先武火煮沸, 再转文火煎煮 45 min, 趁热过滤, 滤液用水定容至 200 mL。精密移取 5 mL 上述溶液于 -20°C 预冻 12 h, 再于 -80°C 、30 kPa 真空条件下冷冻干燥 72 h, 即得桔梗汤物质基准样品冻干粉。

1.3.2 供试品溶液的制备

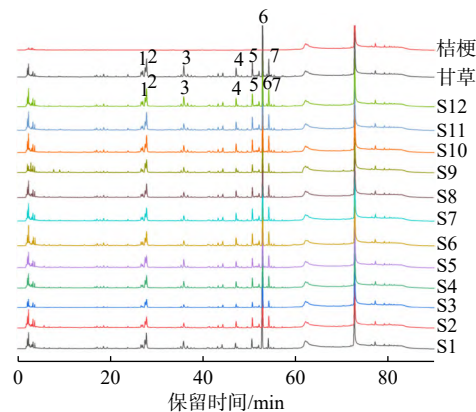
取 1 支桔梗汤物质基准样品冻干粉, 加入 8 mL 水, 于 300 W 功率下超声 30 min, 以转速 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 上清液置于 10 mL 容量瓶中, 用水定容, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜, 即得桔梗汤物质基准供试品溶液。同法分别配制单味药材 (桔梗、甘草) 溶液和空白溶液。

2 结果与讨论

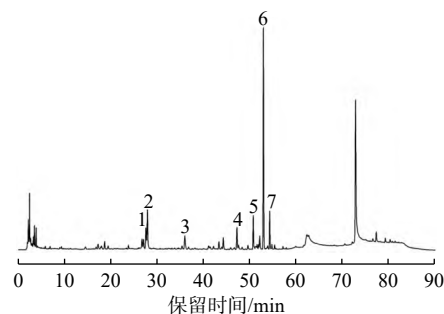
2.1 指纹图谱的建立及相似度评价

取 12 批桔梗汤处方药材, 按照 1.3 节试验方法进行分析, 记录色谱图, 将色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723 版本), 以 S6 样品图谱为参照指纹图谱, 采用中位数法进行多点校正和全谱峰匹配, 生成对照指纹图谱。12 批桔梗汤物质基准和单味药材的叠加指纹图谱、对照指纹图谱、混合对照品溶液的色谱图见图 1。

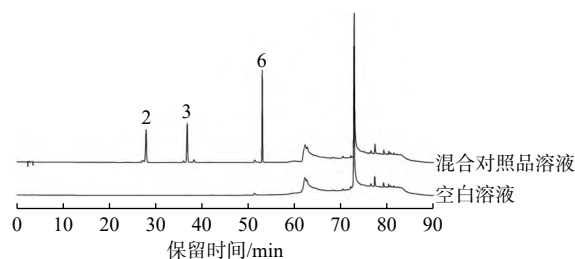
结果显示, 12 批桔梗汤物质基准指纹图谱共得



(a) 叠加指纹图谱



(b) 对照指纹图谱



(c) 混合对照品溶液

2—甘草苷; 3—异甘草苷; 6—甘草酸

图 1 12 批桔梗汤物质基准与 2 种单味药材的叠加指纹图谱、对照指纹图谱和混合对照品溶液色谱图

Fig. 1 Superimposed fingerprints of 12 batches of Jiegeng decoction material benchmarks and 2 single herbs, reference fingerprint and chromatogram of mixed reference solution

到 7 个共有峰, 全部归属于甘草药材, 桔梗药材中有效成分桔梗皂苷的紫外吸收较弱, 无法通过紫外检测器检测, 因此桔梗药材对桔梗汤物质基准指纹图谱的贡献难以体现。与对照品比对, 指认 2、3、6 号峰分别为甘草苷、异甘草苷、甘草酸。

由于甘草酸色谱峰的保留时间适中、峰面积最大, 因此选择 6 号峰为参照峰。分别计算 12 批桔梗汤物质基准指纹图谱中其余 6 个共有峰与参照峰的相对保留时间和相对峰面积的相对标准偏差 (RSD)。结果显示, 6 个共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.43%~0.46%, 说明不同批次桔梗汤物质基准组成成分稳定, 6 个共有峰相对峰面积的 RSD 为 4.7%~25%, 说明不同批次桔梗汤物质基准中各共有成分

含量差异较大。

将对照指纹图谱与各批桔梗汤物质基准图谱进行相似度评价,结果见表2。

表2 相似度评价结果

Tab. 2 Results of similarity evaluation

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.979	S5	0.996	S9	0.970
S2	0.983	S6	0.984	S10	0.987
S3	0.945	S7	0.991	S11	0.979
S4	0.996	S8	0.999	S12	0.993

结果显示,12批桔梗汤物质基准的相似度为0.945~0.999,均大于0.900,说明不同批次桔梗汤物质基准的化学成分组成基本一致,质量稳定性较好。

2.2 方法学考察

取S2供试品溶液按照1.2.1节色谱条件连续进样6次,以甘草酸色谱峰为参照峰,分别计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD。结果显示,各共有峰相对保留时间的RSD为0.010%~0.040%,各共有峰相对峰面积的RSD为0.74%~3.0%,表明仪器的精密度良好。

取同一S3桔梗汤物质基准按照1.3节试验方法平行制备6份供试品溶液,按照1.2.1节色谱条件测定,以甘草酸色谱峰为参照峰,分别计算各共有

峰相对保留时间和相对峰面积的RSD。结果显示,各共有峰相对保留时间的RSD为0.010%~0.060%,各共有峰相对峰面积的RSD为0.54%~3.2%,表明该方法的重复性良好。

取S3供试品溶液分别放置0,2,4,8,12,24h后测定,以甘草酸色谱峰为参照峰,计算24h内各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD。结果显示,各共有峰相对保留时间的RSD为0.010%~0.070%,各共有峰相对峰面积的RSD为0.19%~3.8%,表明供试品溶液在24h内稳定性良好。

2.3 定性分析

由2.1节结果可知,紫外检测器无法表征桔梗药材对桔梗汤物质基准指纹图谱的成分贡献。因此,试验采用UHPLC-Q-TOF-MS/MS分析桔梗汤物质基准中化学成分,以考察其中是否含有桔梗药材的有效成分。根据处方中各饮片化学成分的相关研究^[14-16],共鉴定出75个化学成分,结果见表3。其中,药材归属中GC代表甘草药材,JG代表桔梗药材,N代表煎煮生成成分。

结果显示,鉴定出的75个化学成分包括黄酮类化合物、三萜皂苷类化合物、氨基酸类化合物等。13个化学成分归属于桔梗药材,57个化学成分归属于甘草药材,5个化学成分在处方饮片中均未见报道,推测可能为煎煮过程中生成的化合物。

桔梗汤物质基准S1的供试品溶液在正、负离子模式下的色谱图见图2。

表3 UHPLC-Q-TOF-MS/MS鉴定的桔梗汤物质基准中的化学成分

Tab. 3 Chemical components identified in Jiegeng decoction material benchmarks by UHPLC-Q-TOF-MS/MS

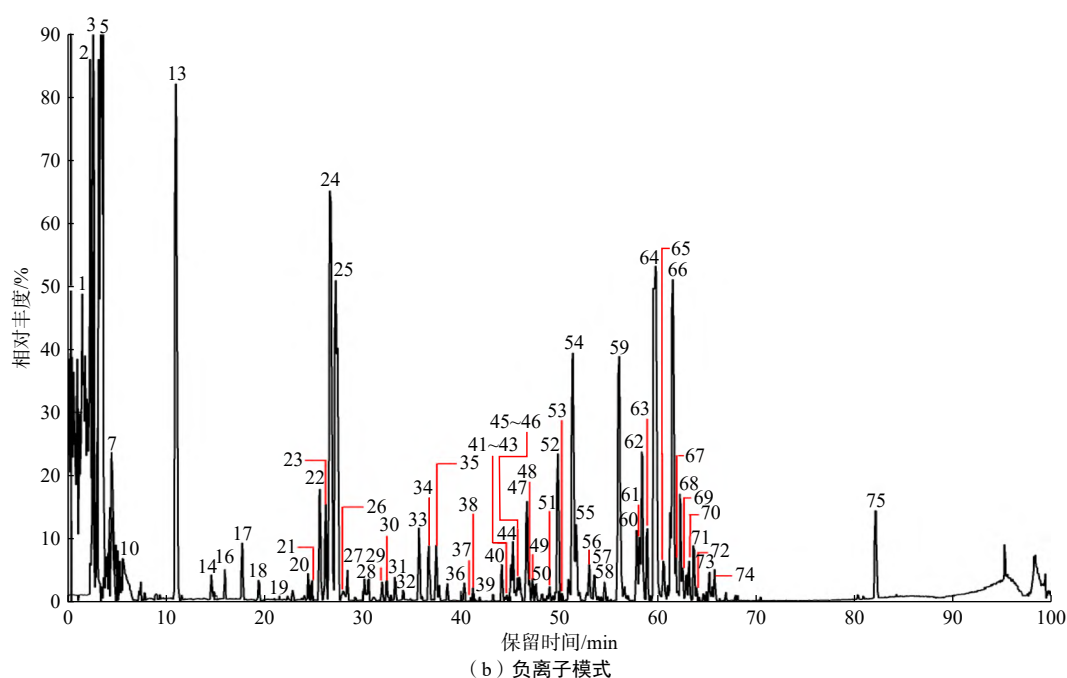
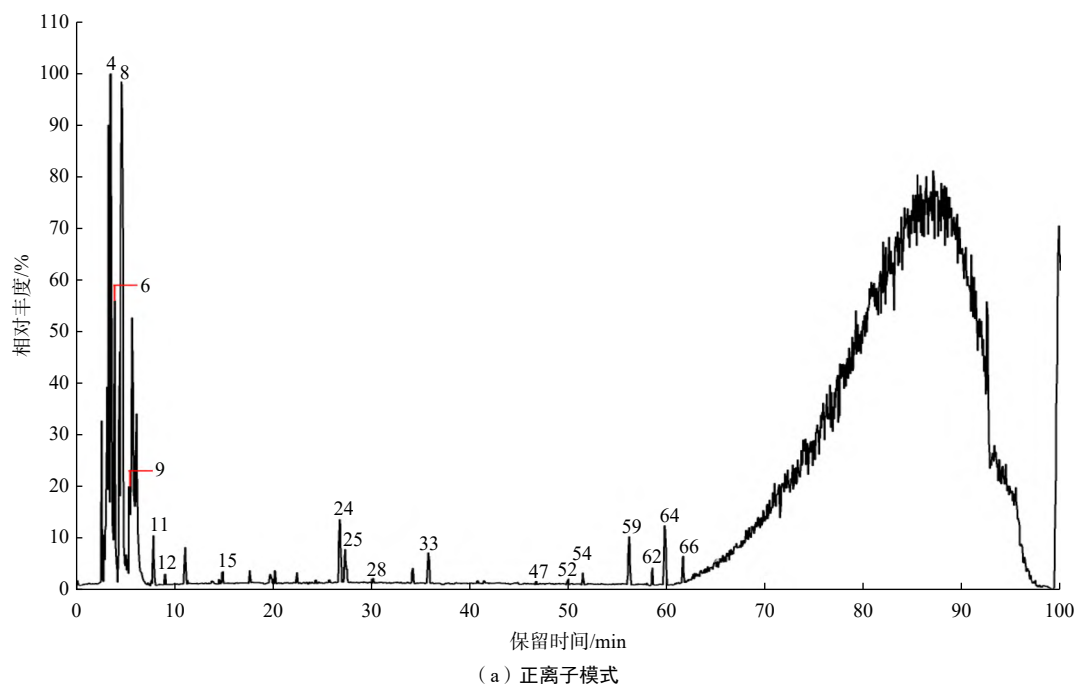
序号	化合物	保留时间/min	母离子 m/z	药材归属	离子模式
1	α -羟基马尿酸	2.56	194.95	N	负
2	D-(+)-苹果酸	3.18	133.02	GC	负
3	柠檬酸	3.43	191.02	GC	负
4	脯氨酸	3.49	116.07	GC	正
5	哌可酸	3.62	128.04	GC	负
6	N-丙烯酰基-L-谷氨酸	3.87	202.07	N	正
7	光果甘草酮	4.30	335.16	GC	负
8	精氨酸	4.62	175.12	GC	正
9	腺嘌呤	5.37	136.06	GC	正
10	柚皮素	5.68	271.96	GC	负
11	苯丙氨酸	7.80	166.09	GC	正
12	2',5-二甲氧基黄酮	8.99	283.14	N	正
13	5-羟基阿魏酸	11.24	209.05	GC	负

表 3(续)

序号	化合物	保留时间/min	母离子 m/z	药材归属	离子模式
14	甘草查尔酮D	14.65	353.09	GC	负
15	色氨酸	14.86	205.10	GC	正
16	牡荆素	16.01	431.12	GC	负
17	槲皮素-3,4'-O-二- β -D-吡喃葡萄糖苷	17.78	625.18	N	负
18	芹糖甘草苷-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷	19.46	711.21	GC	负
19	维采宁-2	21.54	593.15	GC	负
20	夏佛塔苷	24.50	563.14	GC	负
21	异夏佛塔苷	24.85	563.14	GC	负
22	甘草苷	25.66	417.12	GC	负
23	芹糖甘草苷	26.25	549.16	GC	负
24	异甘草苷	26.72	441.06	GC	正
		26.71	417.12		负
25	异芹糖甘草苷	27.37	551.25	GC	正
		27.25	549.16		负
26	紫罗兰素	27.64	577.16	GC	负
27	异佛莱心苷	28.48	577.16	GC	负
28	芹菜素-6-C- β -吡喃木糖基-8-C-[6"-O-(3-羟基-3-甲基戊二酰基)- β -吡喃葡萄糖苷	30.15	709.20	GC	正
		30.19	707.18		负
29	柚皮素-7-O-葡萄糖苷	32.03	433.11	GC	负
30	2 β ,3 β ,23,24-四羟基-28-去甲-齐墩果烷-12-烯-16-酮-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷	32.46	635.16	JG	负
31	光甘草素T	33.32	441.18	GC	负
32	3-O- β -D-吡喃葡萄糖基铂酸二甲酯A	34.09	723.50	JG	负
33	芒柄花苷	35.77	431.13	GC	正
		35.76	475.13		负
34	桔梗皂苷E	36.68	1 547.67	JG	负
35	新甘草苷	37.48	417.12	GC	负
36	桔梗皂苷D ₂ /D ₃	40.33	1 385.62	JG	负
37	桔梗皂苷I	40.96	1 399.60	JG	负
38	远志皂苷D ₂	41.67	1 369.63	JG	负
39	桔梗皂苷S ₃	43.20	969.47	GC	负
40	桔梗苷酸A	44.16	1 237.55	JG	负
41	去芹糖桔梗皂苷D	44.45	1 091.53	JG	负
42	桔梗皂苷K	44.64	1 279.56	JG	负
43	甘草皂苷P ₂	45.02	837.39	GC	负
44	桔梗皂苷D	45.20	1 223.57	GC	负
45	桔梗皂苷A	45.70	1 265.58	JG	负
46	24-羟基甘草皂苷A ₃	45.95	999.45	GC	负

表 3(续)

序号	化合物	保留时间/min	母离子 m/z	药材归属	离子模式
47	22-羟基甘草皂苷 G_2	46.70	855.40	GC	正
		46.67	853.39		负
48	桔梗皂苷L	47.01	1 279.56	JG	负
49	乌拉尔皂苷F	47.33	895.40	GC	负
50	桔梗皂苷C	47.64	1 265.58	JG	负
51	桔梗苷酸B	49.01	1 279.56	JG	负
52	甘草皂苷 A_3	49.82	985.46	GC	正
		50.04	983.45		负
53	乌拉尔皂苷X	50.32	1 025.46	GC	负
54	马其顿甘草皂苷A	51.38	839.41	GC	正
		51.49	837.39		负
55	22 β -乙酰氧基甘草酸	51.76	879.40	GC	负
56	甘草皂苷 Q_2	53.07	837.40	GC	负
57	甘草皂苷 G_2	53.57	837.39	GC	负
58	甘草皂苷 E_2	54.63	819.38	GC	负
59	羟基甘草酸	56.19	839.41	GC	正
		56.13	837.39		负
60	马其顿甘草皂苷B	57.88	837.39	GC	负
61	(3 β ,20 β)-20-羧基-11-氧代-30-去甲-齐墩果烷-12-烯-3-醇-2- O - α -L-鼠李糖-2- O - β -D-吡喃葡萄糖- β -D-吡喃葡萄糖苷酸	58.19	967.46	GC	负
62	乌拉尔甘草皂苷N	58.50	839.41	GC	正
		58.51	837.39		负
63	云甘苷 G_1	59.00	985.47	GC	负
64	甘草酸	59.81	823.41	GC	正
		59.82	821.40		负
65	22-去羟基乌拉尔甘草皂苷C	61.32	807.42	GC	负
66	乌拉尔甘草皂苷B	61.62	823.41	GC	正
		61.57	821.40		负
67	乌拉尔甘草皂苷S	61.88	969.47	GC	负
68	甘草皂苷 H_2	62.31	821.40	GC	负
69	乌拉尔甘草皂苷C	62.53	823.41	GC	负
70	甘草皂苷 K_2	63.34	821.40	GC	负
71	甘草皂苷 J_2	63.74	823.41	GC	负
72	3- O -(β -D-呋喃芹糖基(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄糖醛酸吡喃糖基)甘草酸	64.06	777.41	GC	负
73	甘草皂苷 C_2	65.31	805.40	GC	负
74	甘草皂苷 B_2	65.71	807.42	GC	负
75	2',3',6-三甲氧基黄酮	82.07	311.20	N	负



峰号 1~75 对应的化合物名称同表 3

图 2 桔梗汤物质基准的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of Jiegeng decoction material benchmark

2.4 化学模式识别分析

2.4.1 聚类分析

将 12 批桔梗汤物质基准指纹图谱的共有峰峰面积数据导入 SPSS 27.0 软件进行系统聚类分析, 结果见图 3。

结果显示, 当欧氏距离为 5 时, 12 批桔梗汤物质基准样品可聚为 3 类, 第 1 类包含 S1、S2、S4、S5、S8 和 S9, 第 2 类仅含 S3, 第 3 类包含 S6、S7、S10、S11

和 S12, 说明不同厂家和批次的桔梗汤物质基准整体质量较为稳定。

2.4.2 主成分分析

将 12 批桔梗汤物质基准指纹图谱中的 7 个共有峰的峰面积导入 SPSS 27.0 软件, 经标准化处理得到标准化变量 $X_1 \sim X_7$ 。标准化处理后进行主成分分析, 以特征值大于 1 为提取标准, 共提取 2 个主成分, 其特征值分别为 5.121 和 1.319, 累计方差贡

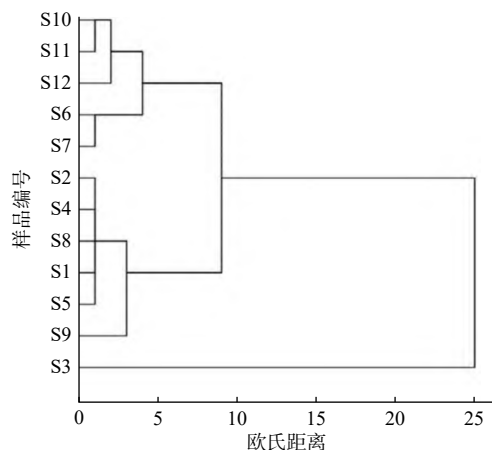


图3 12批桔梗汤物质基准的聚类分析图

Fig. 3 Cluster analysis chart of 12 batches of Jiegeng decoction material benchmarks

献率为 92.001%, 表明这 2 个主成分能够充分代表 7 个共有峰的主要信息。

基于主成分分析得到成分矩阵 A , 根据公式 $U_i = A_i / \lambda_i$ 计算得到主成分载荷矩阵 U_i (其中 i 为主成分的编号, A_i 为因子矩阵, λ_i 为主成分特征值)。根据 $X_1 \sim X_7$, 按照以下公式计算各主成分得分: $F_1 = 0.163X_1 + 0.395X_2 + 0.319X_3 + 0.405X_4 + 0.423X_5 + 0.437X_6 + 0.426X_7$; $F_2 = 0.753X_1 + 0.132X_2 + 0.487X_3 - 0.309X_4 - 0.200X_5 - 0.096X_6 - 0.185X_7$ 。最后, 按照公式 $F = 0.732F_1 + 0.188F_2$ 计算各批桔梗汤物质基准的综合得分, 结果见表 4。

表 4 12 批桔梗汤物质基准的主成分得分及综合得分

Tab. 4 Principal component scores and comprehensive scores of 12 batches of Jiegeng decoction material benchmarks

编号	F_1	F_2	F
S1	0.02	1.74	0.34
S2	-1.33	-1.19	-1.20
S3	-5.05	-0.57	-3.81
S4	-0.63	-0.09	-0.48
S5	0.01	2.00	0.39
S6	0.94	-0.80	0.54
S7	0.51	-1.28	0.13
S8	-0.39	-0.84	-0.44
S9	-2.17	1.44	-1.32
S10	2.31	-0.57	1.59
S11	2.33	-0.34	1.64
S12	3.45	0.50	2.62

由表 4 可知, 12 批桔梗汤物质基准的综合得分由高到低排序为 S12、S11、S10、S6、S5、S1、S7、

S8、S4、S2、S9、S3, 说明不同批次桔梗汤物质基准之间存在质量差异。其中, 以内蒙古地区(扎兰屯市、牙克石市、鄂伦春旗)桔梗药材和内蒙古地区(杭锦旗、巴彦淖尔市)甘草药材为原料的批次质量较好, 说明药材产地可能是影响物质基准质量的重要因素, 这种差异可能与不同地域的药材生长环境条件等因素有关。

2.4.3 正交偏最小二乘法-判别分析

为进一步筛选出不同批次桔梗汤物质基准的差异性成分, 将 7 个共有峰的峰面积数据导入 SIMCA 14.1 软件进行 OPLS-DA, 结果见图 4。

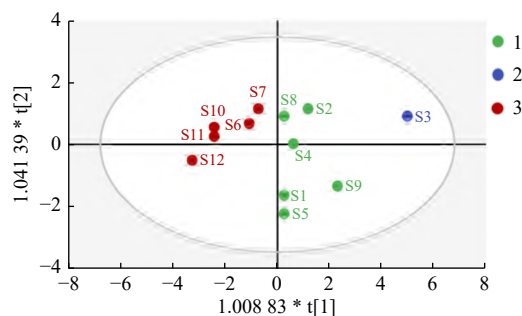


图4 12批桔梗汤物质基准的 OPLS-DA 得分图

Fig. 4 OPLS-DA score plot of 12 batches of Jiegeng decoction material benchmarks

由图 4 可知, S1、S2、S4、S5、S8、S9 聚为第 1 类, S3 聚为第 2 类, S6、S7、S10、S11 和 S12 聚为第 3 类, 与聚类分析结果一致。

变量重要性投影(VIP)值是筛选不同批次物质基准差异性成分的关键指标^[17], VIP 值越高表明该差异性成分对组间差异的贡献越大。桔梗汤物质基准共有峰的 VIP 值见图 5。

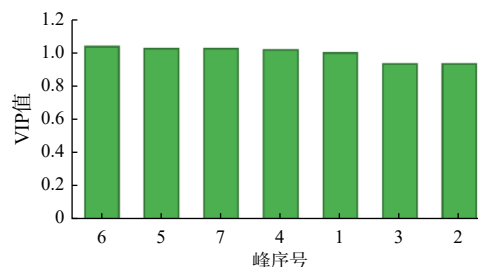


图5 桔梗汤物质基准共有峰的 VIP 图

Fig. 5 VIP plot of common peaks in Jiegeng decoction material benchmarks

由图 5 可知, 4、5、6(甘草酸)、7 号峰的 VIP 值均大于 1, 说明这些峰对应的化合物是影响桔梗汤物质基准质量的差异性成分。在后续经典名方桔梗汤复方制剂的研发中, 应重点监控这些成分的含量变化以确保产品质量。需要特别说明的是, 4、

5、7号峰对应的成分尚未明确,建议采用液相色谱-质谱联用技术对这些未知成分进行鉴定,以实现桔梗汤质量的全面控制。

2.5 抗氧化活性分析

参考文献[18]方法,测定不同批次桔梗汤物质基准对 DPPH 自由基的清除能力,每个批次桔梗汤物质基准平行测定 3 次,结果见表 5。DPPH 自由基清除率越大,说明桔梗汤物质基准的抗氧化活性越大。

表 5 12 批桔梗汤物质基准对 DPPH 自由基的清除能力结果

Tab. 5 Results of scavenging ability of 12 batches of Jiegeng decoction material benchmarks on DPPH free radicals

编号	DPPH 自由基清除率/%	编号	DPPH 自由基清除率/%
S1	74.90±0.23	S7	95.97±0.38
S2	89.13±0.35	S8	89.10±0.20
S3	61.54±0.17	S9	80.59±0.32
S4	84.93±0.30	S10	92.29±0.21
S5	93.06±0.25	S11	84.44±0.17
S6	83.92±0.20	S12	94.15±0.28

由表 5 可知,不同批次桔梗汤物质基准对 DPPH 自由基的清除率存在明显差异,其中 S7 桔梗汤物质基准的清除率最高,为 95.97%,S3 桔梗汤物质基准的清除率最低,为 61.54%。这种抗氧化活性的差异可能与各批桔梗汤物质基准中抗氧化活性成分的含量差异有关。

2.6 谱效关系分析

试验采用化学计量学方法建立了桔梗汤物质基准指纹图谱与抗氧化活性的谱效关系模型,以共有峰的峰面积为自变量 x ,DPPH 自由基清除率为因变量 y ,通过 SIMCA-P 14.1 软件进行偏最小二乘回归分析,得到回归方程为 $y=0.168\ 9x_1-0.427\ 9x_2-0.157\ 1x_3+0.546\ 5x_4+0.042\ 16x_5+0.702\ 8x_6+0.022\ 07x_7$ 。在回归方程中,回归系数的绝对值越大,说明该共有峰对应的化合物对 DPPH 自由基的清除能力越强。结果显示,除了 2 号峰(甘草苷)和 3 号峰(异甘草苷)与 DPPH 自由基清除能力呈负相关之外,其他共有峰均与 DPPH 自由基清除能力呈正相关,贡献度由大到小依次为 6 号峰(甘草酸)、4 号峰、1 号峰、5 号峰、7 号峰,说明桔梗汤物质基准的抗氧化作用可能是由多种成分共同作用而实现的。

同时,在偏最小二乘回归分析中,自变量的 VIP 值越大,对因变量的影响越大,结果见图 6。

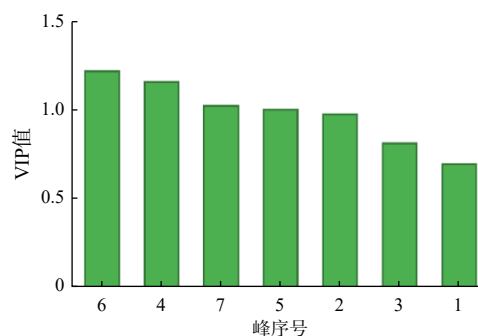


图 6 桔梗汤物质基准中共有峰峰面积与抗氧化活性生物效价的 VIP 图

Fig. 6 VIP plot of peak areas of common peaks and antioxidant activity bioequivalence in Jiegeng decoction material benchmarks

由图 6 可知,6、4、7、5 号峰的 VIP 值均大于 1,各共有峰对 DPPH 自由基的清除能力由大到小依次为 6 号峰(甘草酸)、4 号峰、7 号峰、5 号峰。甘草酸具有多重药理活性,包括抗氧化、抗炎、抗病毒、抗肿瘤及免疫调节等作用^[19-20],如在鲢鱼饲料中添加 $100\sim 300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 甘草酸可提高鲢鱼体内抗氧化酶活性^[21]。此外,有报道指出甘草酸是甘草药材中发挥抗氧化活性的有效成分^[22]。因此,甘草酸可能是桔梗汤物质基准发挥抗氧化活性的主要物质。

本工作基于 HPLC 成功建立了桔梗汤物质基准的指纹图谱,并结合化学模式识别分析筛选出影响不同批次桔梗汤物质基准质量的差异性成分。通过构建指纹图谱与抗氧化活性的谱效关系模型,初步明确了桔梗汤物质基准抗氧化活性的物质基础,为建立更科学、全面的桔梗汤物质基准质量控制方法提供理论支撑。为进一步完善质量标准,后续研究需采用液相色谱-质谱联用技术对未知成分进行鉴定。

参考文献:

- [1] 封婷,徐爽,郑智礼,等.《金匱要略》桔梗汤“亦治血痹”考辨[J]. 中医学报,2023,38(1): 217-221. FENG T, XU S, ZHENG Z L, et al. Discussion on Jiegeng decoction “also being used to treat blood impediment” in Jin Gui Yao Lue[J]. Acta Chinese Medicine, 2023, 38(1): 217-221.
- [2] 国家中医药管理局. 国家药品监督管理局关于印发《古代经典名方目录(第二批)》的通知[EB/OL]. (2023-09-01)[2023-10-08]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20230901165919115.html>. National Administration of Traditional Chinese Medicine. Notice on issuing the “catalogue of ancient classic prescriptions (second batch)” by the national medical products administration[EB/OL]. (2023-09-01)[2023-10-08].

- <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20230901165919115.html>.
- [3] 单进军, 邹葭霜, 徐建亚, 等. 桔梗汤的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 304-306.
SHAN J J, ZOU J S, XU J Y, et al. Research advances of Jiegeng Tang[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2012, 18(19): 304-306.
 - [4] 张超云, 李宏艺, 郝鹏飞, 等. 基于IL-17A/TNF- α 信号通路的桔梗汤有效部位群干预COPD模型大鼠的实验研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(6): 1951-1957.
ZHANG C Y, LI H Y, HAO P F, et al. Experimental study of the effective components of Jiegeng decoction based on IL-17A/TNF- α signaling pathway in intervention of COPD model rats[J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology, 2021, 23(6): 1951-1957.
 - [5] 郝鹏飞, 丁生晨, 卞华, 等. 桔梗汤总皂苷对慢性阻塞性肺病大鼠IKK/NF- κ B/MUC5AC通路的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(12): 1197-1201.
HAO P F, DING S C, BIAN H, et al. Effect of total-saponins of *Radix Platycodonis* decoction on IKK/NF- κ B/MUC5AC pathway in rats with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2021, 41(12): 1197-1201.
 - [6] XU Y, WANG X, HAN D, et al. Revealing the mechanism of Jiegeng decoction attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via PI3K/Akt signaling pathway based on lipidomics and transcriptomics[J]. Phytomedicine, 2022, 102: 154207.
 - [7] TAO J, NIE Y, HOU Y Y, et al. Chemomics-integrated proteomics analysis of Jie-Geng-Tang to ameliorate lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016, 2016(1): 7379146.
 - [8] 董宇, 王莹, 谢丽雅, 等. 基于抗氧化活性响应曲面法优化桔梗汤中桔梗-甘草配伍[J]. 吉林农业大学学报, 2024, 46(4): 673-679.
DONG Y, WANG Y, XIE L Y, et al. Optimization of radix platycodi-radix et rhizoma glycyrrhizae in Jiegeng decoction based on antioxidant activity response surface methodology[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2024, 46(4): 673-679.
 - [9] 高喜梅, 贾萌, 赵晓莉, 等. 经典名方传统制法向现代生产工艺转化关键问题探索[J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(5): 601-605.
GAO X M, JIA M, ZHAO X L, et al. Exploration on the key problems in the transformation from traditional preparation to modern manufacture of classical famous prescriptions[J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2019, 35(5): 601-605.
 - [10] 孙新茹, 邓秀平, 彭辉, 等. 经典名方物质基准的质量相关性研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2022, 41(5): 653-660.
SUN X R, DENG X P, PENG H, et al. Research progress on the quality correlation of the material standard of classical famous formulations[J]. Journal of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2022, 41(5): 653-660.
 - [11] 代云桃, 靳如娜, 吴治丽, 等. 基于标准汤剂(物质基准)的经典名方制备工艺和质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 164-174.
DAI Y T, JIN R N, WU Z L, et al. Research strategies for quality standards of famous classical formula based on standard decoction (material reference)[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2020, 26(2): 164-174.
 - [12] 孟岩, 李熠仪, 单家明, 等. 经典名方小承气汤物质基准的HPLC指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4): 130-136.
MENG Y, LI W Y, SHAN J M, et al. HPLC fingerprint analysis of substance benchmark of Xiao Chengqi-tang[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2021, 27(4): 130-136.
 - [13] 张林, 唐若水, 宋佳, 等. 古代经典名方中方药剂量折算原则考证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(10): 196-202.
ZHANG L, TANG R S, SONG J, et al. Textual research on principle of dose conversion in ancient famous classical formulas[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2024, 30(10): 196-202.
 - [14] LIU Y N, HU M T, QIAN J, et al. Characterization of the chemical constituents of Jie-Geng-Tang and the metabolites in the serums and lungs of mice after oral administration by LC-Q-TOF-MS[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2021, 19(4): 284-294.
 - [15] 谢雄雄, 张迟, 曾金祥, 等. 桔梗提取物部位群镇咳祛痰活性与桔梗皂苷成分研究[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(13): 1647-1653.
XIE X X, ZHANG C, ZENG J X, et al. Antitussive and expectorant activities and saponin components of various extract fractions from *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2019, 28(13): 1647-1653.
 - [16] 陈佩东, 周习, 丁安伟. 炙甘草水煎液的HPLC-MS分析[J]. 中成药, 2014, 36(10): 2115-2120.
CHEN P D, ZHOU X, DING A W. Constituents in aqueous extract of honey fried licorice by HPLC-MS[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2014, 36(10): 2115-2120.
 - [17] 文敏, 周欣, 赵超, 等. 苗药滚山珠HPLC指纹图谱及化学模式识别研究[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(10): 1668-1674.
WEN M, ZHOU X, ZHAO C, et al. Study on HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of Miao medicine *Prionobelium qianensis* Chen[J]. Natural Product Research and Development, 2021, 33(10): 1668-1674.
 - [18] 王莹, 于迪, 黄剑, 等. 人參熟化工艺优化及抗氧化活

- 性研究[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(8): 1907-1911.
- WANG Y, YU D, HUANG J, et al. Study on optimization of aging process and antioxidant activity of ginseng[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2022, 33(8): 1907-1911.
- [19] SHAMSA F, OHTSUKI K, HASANZADEH E, et al. The anti-inflammatory and anti-viral effects of an ethnic medicine: Glycyrrhizin[J]. Journal of Medicinal Plants, 2010, 9: 1-28.
- [20] WANG Y M, DU G Q. Glycyrrhizic acid prevents enteritis through reduction of NF- κ B p65 and p38MAPK expression in rat[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2016, 13(4): 3639-3646.
- [21] HARIKRISHNAN R, DEVI G, VAN DOAN H, et al. Study on antioxidant potential, immunological response, and inflammatory cytokines induction of glycyrrhizic acid (GA) in silver carp against vibriosis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021, 119: 193-208.
- [22] ZHANG X M, GUO X H, ZHAO P, et al. Chemometric analysis of active compounds and antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities for the quality evaluation of licorice from different origins[J]. *Biomedical Chromatography*, 2021, 35(12): e5215.

Quality Evaluation of Jiegeng Decoction Material Benchmarks by High Performance Liquid Chromatography Fingerprint with Chemometrics

QIAN Huiqin, LI Chunyan, WANG Jianan, XU Haibo, PANG Haoyu, LI Yanling*

(North Henan Medical University, Xinxiang 453000, China)

Abstract: To investigate the quality control method for Jiegeng decoction material benchmarks, the title research was conducted. With 12 batches of Jiegeng decoction material benchmarks as research object, high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints were established, and common peaks were identified by comparing with reference fingerprint. Similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (2012.130723 edition) was used for similarity evaluation. Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF-MS/MS) was employed for the qualitative identification of Jiegeng decoction material benchmarks. Chemometric methods including cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were used to find the main difference components affecting the quality. The antioxidant activity of the Jiegeng decoction material benchmarks was evaluated by determining the scavenging rate of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radicals, and the spectrum-effect relationship model between the common peaks in the Jiegeng decoction material benchmarks and antioxidant activity was established using partial least squares regression analysis method. As shown by the results, 7 common peaks were obtained from the HPLC fingerprints of 12 batches of Jiegeng decoction material benchmarks. 3 components (liquiritin, isoliquiritin, glycyrrhizic acid) were identified, all of which were attributed to *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. herbs, and the similarity was greater than 0.900. 75 chemical components were identified by UHPLC-Q-TOF-MS/MS, of which 13 chemical components were attributed to *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A.DC. herbs and 57 chemical components were attributed to *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. herbs. 12 batches of Jiegeng decoction material benchmarks were classified into 3 categories by CA and OPLS-DA. 2 principal components were obtained by PCA, with cumulative variance contribution rate of 92.001%. 4 differential components that effect the overall quality of the Jiegeng decoction material benchmarks were obtained by OPLS-DA, including glycyrrhizic acid and 3 unknown substances. The spectrum-effect relationship model indicated that glycyrrhizic acid and 3 unknown substances were the key components for scavenging DPPH free radicals, and the antioxidant activity of the Jiegeng decoction material benchmarks was directly affected by the above 4 chemical compounds.

Keywords: high performance liquid chromatography fingerprint; chemometric; Jiegeng decoction material benchmark; antioxidant activity