

健脾和胃方的指纹图谱、化学模式识别分析及多指标含量测定^Δ

何东栋^{1*}, 宗 慧¹, 王重阳¹, 宛娟娟¹, 毛学璞¹, 黄川生², 王新春², 王立萍^{1#}(1. 石河子大学药学院/新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002; 2. 石河子大学第一附属医院药学部, 新疆 石河子 832008)

中图分类号 R284;R917

文献标志码 A

文章编号 1001-0408(2025)15-1876-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.15.10



摘要 **目的** 建立健脾和胃方的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并进行化学模式识别分析和其中7种成分的含量测定,为健脾和胃方的质量控制及后续制剂开发提供参考。**方法** 以15批健脾和胃方标准汤剂为样品,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》建立HPLC指纹图谱,并进行相似度评价、色谱峰的指认和归属分析。以15批样品的共有峰峰面积为变量,采用层次聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘-判别分析对样品进行化学模式识别分析。采用HPLC法测定15批样品中腺嘌呤、5-羟甲基糠醛、延胡索乙素、柚皮苷、脱氢紫堇碱、新橙皮苷、甘草酸的含量。**结果** 15批样品的HPLC指纹图谱中共标定出19个共有峰,各批次样品的相似度均大于0.95。化学模式识别分析结果显示,15批样品共聚为3类,筛选出的差异性成分有3个[峰7(5-羟甲基糠醛)、峰17(新橙皮苷)和峰15(柚皮苷)]。7种成分在各自进样质量浓度范围内线性关系均良好($R^2 \geq 0.9994$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%($n=6$);平均加样回收率为98.95%~103.81%,RSD为0.61%~2.75%($n=6$);含量分别为0.031~0.106、0.267~0.824、0.089~0.144、1.344~2.091、0.089~0.178、1.328~2.028、0.040~0.150 mg/g。**结论** 所建立的HPLC指纹图谱及多指标成分含量测定方法准确、可靠,结合化学模式识别分析可用于健脾和胃方的质量控制。

关键词 健脾和胃方;指纹图谱;化学成分;含量测定;层次聚类分析;主成分分析;正交偏最小二乘-判别分析

Fingerprints, chemical pattern recognition analysis, and multi-index content determination of Jianpi hewei formula

HE Dongdong¹, ZONG Hui¹, WANG Chongyang¹, WAN Juanjuan¹, MAO Xuepu¹, HUANG Chuansheng², WANG Xinchun², WANG Liping¹(1. School of Pharmacy, Shihezi University/Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resource and Utilization, Ministry of Education, Xinjiang Shihezi 832002, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Shihezi University, Xinjiang Shihezi 832008, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish HPLC fingerprint for Jianpi hewei formula (JPHWF), conduct chemical pattern recognition analysis, and determine the contents of seven components in the formula, aiming to provide a scientific basis for quality control and further research of JPHWF. **METHODS** Taking 15 batches of standard decoctions of JPHWF as samples, the HPLC fingerprint was established using the *Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprint (2012 edition)*. Subsequently, similarity evaluation, as well as identification and attribution analysis of chromatographic peaks, were conducted. Using the common peak areas from the 15 batches of samples as variables, chemical pattern recognition analyses were performed on the samples through hierarchical cluster analysis, principal component analysis, and orthogonal partial least squares-discriminant analysis. The contents of adenine, 5-hydroxymethylfurfural, tetrahydropalmatine, naringin, dehydrocorydaline, neohesperidin and glycyrrhizic acid in 15 batches of samples were determined by HPLC. **RESULTS** There were 19 common peaks in the characteristic chromatograms for 15 batches of samples with the similarities of more than 0.95. Results of chemical pattern recognition analysis showed that 15 batches of samples could be clustered into 3 categories, and 3 differential compounds were found [peak 7 (5-hydroxymethylfurfural), peak 17 (neohesperidin), and peak 15 (naringin)]. The 7 components were linearly good in the respective concentration ranges ($R^2 \geq 0.9994$); RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2% ($n=6$); the average recovery rate of 98.95%-103.81%, RSD of 0.61%-2.75% ($n=6$); the contents of them were 0.031-0.106, 0.267-0.824, 0.089-0.144, 1.344-2.091, 0.089-0.178, 1.328-2.028, 0.040-0.150 mg/g, respectively. **CONCLUSIONS** Established HPLC fingerprinting method coupled with multi-index content determination is validated to be accurate and reliable, and its combination with chemical pattern recognition analysis can be applied to the quality control of JPHWF.

^Δ 基金项目 兵团科技计划项目重点领域科技攻关项目(No. 2023AB045, No. 2024AB071);兵团指导性科技计划(No. 2022ZD048);石河子大学高层次人才科研启动专项(No. RCZK202374)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中药药效物质基础。
E-mail: 20232015009@stu.shzu.edu.cn

通信作者 副教授,硕士生导师。研究方向:中药药效物质基础。
E-mail: 13779211045@163.com

KEYWORDS Jianpi hewei formula; fingerprint; chemical constituents; content determination; hierarchical cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares-discriminant analysis

慢性胃炎是一种胃黏膜的慢性炎症性疾病,发病机制复杂,涉及幽门螺杆菌感染、不良饮食习惯及遗传因素等多重诱因^[1]。该病在病理学上可表现为胃黏膜萎缩,并伴随肠上皮化和异型增生等癌前病变特征,与胃癌的发生呈显著正相关^[2]。对于慢性胃炎,现代医学目前尚缺乏针对性的治疗方案,患者病情常反复发作、迁延不愈。中医药干预通过多靶点作用机制,可以部分逆转相关病理改变,且毒副作用小,适合长期治疗^[3]。

中医将慢性胃炎归属于“胃脘痛”“胃痞”等范畴,认为慢性胃炎是由脾胃虚寒导致的。健脾和胃治法针对脾胃虚弱、脾胃不和,采用补益脾气的中药,调和脾胃之气,可以达到脾升胃降的作用^[4]。健脾和胃方是石河子大学第一附属医院中医科治疗慢性胃炎的临床经验方,由党参、白术、木香、莪术、焦麦芽、焦神曲、焦山楂、枳壳、延胡索和甘草10味中药组成,具有健脾和胃、补益脾气的功效^[5]。该方已被临床证实对慢性胃炎具有良好的治疗效果,特别是对慢性萎缩性胃炎、胃癌前病变疗效显著。但目前针对该方的质量控制尚无系统研究,导致其质量控制标准不统一。

中药指纹图谱可以从整体上宏观地表征中药主要化学成分^[6-7];层次聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)等化学模式识别技术结合指纹图谱已被广泛应用于中药复方的质量控制和评价^[8-9]。因此,本研究采用高效液相色谱(HPLC)法建立健脾和胃方的指纹图谱,并结合化学模式识别技术进行分析,同时对其中7种主要成分(腺嘌呤、5-羟甲基糠醛、延胡索乙素、柚皮苷、脱氢紫堇碱、新橙皮苷和甘草酸)进行含量测定,旨在为其质量控制、医院制剂开发和临床应用提供数据支撑。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有:1260 Infinity II型HPLC仪(美国Agilent公司)、KH-300DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、BAS224S型万分之一电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]、XW-80A型漩涡混合器(上海驰唐电子有限公司)、Fresco 21型高速冷冻离心机[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]。

1.2 主要药品与试剂

对照品腺嘌呤(批号 MUST-23103001)、5-羟甲基糠醛(批号 MUST-23102711)、延胡索乙素(批号 MUST-24022721)、柚皮苷(批号 MUST-24033001)、脱氢紫堇碱(批号 MUST-23071017)、新橙皮苷(批号 MUST-23100812)、甘草酸(批号 MUST-23110110)均购自曼斯特(成都)生物科技有限公司,纯度均不低于98%;乙腈、甲醇和磷酸均为色谱级。

1.3 中药饮片

党参(批号 DS231101、DS231002,产地甘肃)、白术(批号 BZ231002,产地安徽;批号 BZ240101,产地四川)、木香(批号 MX231101、MX221001,产地云南)、枳壳(批号 ZK231001,产地江西;批号 ZK240101,产地四川)、莪术(批号 EZ230701,产地广西;批号 EZ230201,产地四川)、焦麦芽(批号 JMY210101,产地安徽;批号 JMY220901,产地四川)、焦神曲(批号 JSQ210701,产地安徽;批号 JSQ231001,产地四川)、焦山楂(批号 JSZ210401,产地山东;批号 JSZ230901,产地河北)、延胡索(批号 YHS230602、YHS230703,产地浙江)和甘草(批号 GC231001,产地甘肃;批号 GC231201,产地新疆)均购自亳州市善安堂中药饮片公司或四川国强中药饮片公司,经石河子大学第一附属医院药学部王彪主管药师鉴定均为真品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Waters Symmetry C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),以乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~15 min, 2%A→10%A; 15~30 min, 10%A→35%A; 30~40 min, 35%A→80%A; 40~50 min, 80%A→2%A);检测波长为254 nm;柱温为35℃;流速为1 mL/min;进样量为10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 健脾和胃方标准汤剂制备

取党参10 g、白术10 g、木香3 g、枳壳10 g、焦三仙(焦麦芽、焦神曲、焦山楂)各10 g、莪术6 g、延胡索26 g、甘草3 g,加8倍量水,首次冷浸0.5 h,煎煮1 h,纱布过滤;第2次加入6倍量水,煎煮40 min,纱布过滤;合并2次滤液,减压浓缩至500 mL,即得健脾和胃方标准汤剂,备用。15批次健脾和胃方样品(编号S1~S15)由各单味饮片采用随机数表法组合而得(具体组合信息可扫描本文首页二维码,进入“增强出版”页面查看附表1)。

2.2.2 混合对照品溶液制备

精密称取腺嘌呤、5-羟甲基糠醛、延胡索乙素、柚皮苷、脱氢紫堇碱、新橙皮苷和甘草酸对照品,用50%甲醇溶解制成质量浓度分别为0.51、5.04、5.12、5.08、5.20、0.52、5.02 mg/mL的单一对照品溶液。分别精密移取上述各单一对照品溶液适量,用50%甲醇稀释并定容至同一5 mL容量瓶中,得上述7种成分质量浓度分别为50.47、199.27、198.69、396.26、99.77、297.61、199.40 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备

精密量取健脾和胃方标准汤剂750 μL,加750 μL甲醇,超声10 min,以14 000 r/min离心10 min,取上清液经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 单味饮片对照溶液、缺味阴性样品溶液制备

取处方量的饮片,按“2.2.1”项下方法制备单味饮片对照溶液和缺味阴性样品溶液。

2.3 指纹图谱的建立及分析

2.3.1 方法学考察

(1)精密度:取健脾和胃方样品(编号S3),按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次。以15号峰(柚皮苷)为参照峰,计算各特征峰相对保留时间和相对峰面积,其RSD分别小于0.61%和1.94%($n=6$),表明方法精密度良好。

(2)稳定性:取健脾和胃方样品(编号S3),按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,在室温下分别放置0、2、4、6、8、10、12、24 h时,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以15号峰(柚皮苷)为参照峰,计算各特征峰相对保留时间和相对峰面积,其RSD分别小于1.10%和2.93%($n=8$),表明供试品溶液在室温放置24 h内稳定性良好。

(3)重复性:取健脾和胃方样品(编号S3),按“2.2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以15号峰(柚皮苷)为参照峰,计算各特征峰相对保留时间和相对峰面积,其RSD分别小于0.61%和1.71%($n=6$),表明方法重复性良好。

2.3.2 指纹图谱建立及相似度评价

取15批健脾和胃方样品(编号S1~S15),分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录HPLC色谱图。将相关色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》,选取编号S3样品的图谱为参照图谱,设置时间窗宽度为0.1 min,采用中位数法,进行多点校正和全峰匹配,生成15批样品的叠加指纹图谱及其对照谱图R,详见图1。以对照图谱R为参照,计算15批健脾和胃方样品图谱的相似度。结果显示,15批样品共标定出19个共有峰;15批样品图谱与对照图谱R的相似度在0.956~0.998之间,均大于0.95,表明不同批次样品间具有高度相似性。

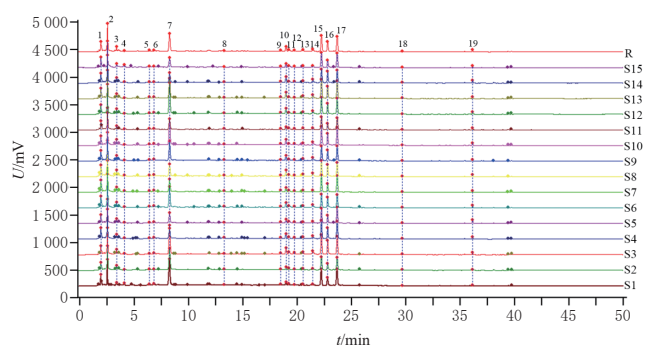
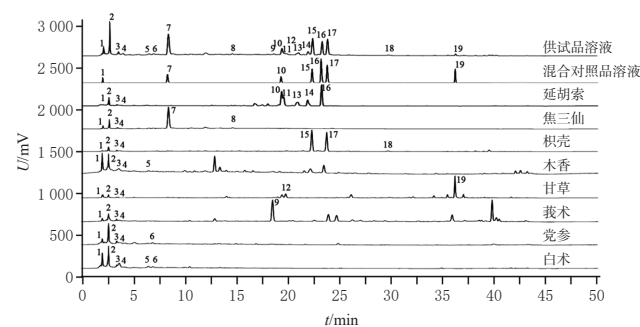


图1 15批样品的HPLC叠加指纹图谱及其对照图谱R

2.3.3 共有峰的指认及归属

将健脾和胃方供试品溶液(编号S3)图谱与混合对照品溶液图谱(取“2.2.2”项下混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定所得)进行比对,共指认出7个色

谱峰,分别是1号峰腺嘌呤、7号峰5-羟甲基糠醛、10号峰延胡索乙素、15号峰柚皮苷、16号峰脱氢紫堇碱、17号峰新橙皮苷和19号峰甘草酸。将健脾和胃方供试品溶液(编号S3)图谱与单味饮片对照溶液图谱、缺味阴性样品溶液图谱(分别取“2.2.4”项下单味饮片对照溶液、缺味阴性样品溶液按“2.1”项下色谱条件进样测定所得)进行比对可知,1~4号峰为各饮片水煎液共有;7号峰和8号峰归属于焦三仙(焦麦芽、焦神曲、焦山楂);9号峰归属于莪术;10、11、13、14和16号峰归属于延胡索;12和19号峰归属于甘草;15、17和18号峰归属于枳壳;5号峰归属于白术和木香;6号峰归属于党参和白术。结果见图2、图3。



1:腺嘌呤;7:5-羟甲基糠醛;10:延胡索乙素;15:柚皮苷;16:脱氢紫堇碱;17:新橙皮苷;19:甘草酸。

图2 供试品溶液、混合对照品溶液及各单味饮片对照溶液的HPLC叠加图

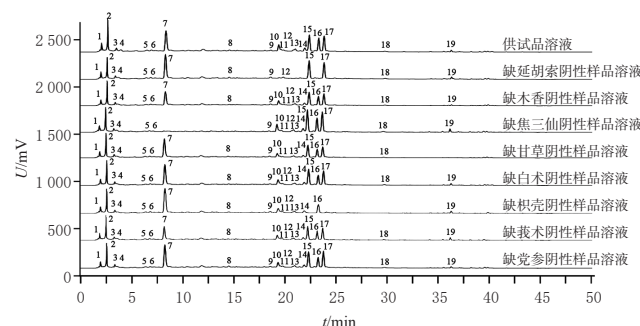


图3 供试品溶液和各缺味阴性样品溶液的HPLC叠加图

2.4 化学模式识别分析

2.4.1 HCA

将15批样品的共有峰峰面积导入SPSS 22.0软件,采用组间连接、平方欧氏距离法进行HCA。结果(图4)显示,当平方欧氏距离为15时,15批样品可聚为3大类:编号为S4~S5、S7~S8、S11~S12、S15的样品聚为第1类;编号为S9的样品为第2类;编号为S1~S3、S6、S10、S13~S14的样品聚为第3类。该结果表明,各批次样品的成分有一定差异。

2.4.2 PCA

以15批样品的共有峰峰面积为变量,将其导入SIMCA 14.1软件进行PCA。以特征值>1为筛选标准,

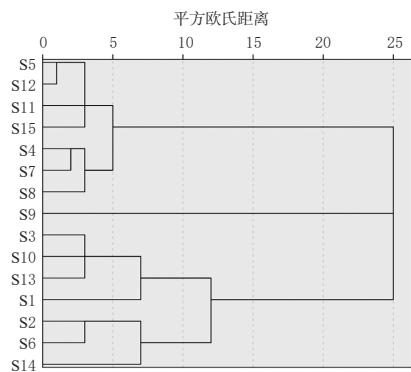


图4 15批样品的HCA树状图

共得到5个主成分,其累积方差贡献率为85.446%(第1主成分的方差贡献率为32.350%,第2主成分的方差贡献率为21.295%,第3主成分的方差贡献率为12.310%,第4主成分的方差贡献率为10.394%,第5主成分的方差贡献率为9.097%),可反映15批样品的主要信息。其中,第1~5主成分中方差贡献率较高的成分分别为峰16(脱氢紫堇碱)、峰6、峰18、峰17(新橙皮苷)和峰19(甘草酸)。PCA得分图(图5)显示,15批样品可分为3类:编号为S1~S2、S5、S11~S12的样品聚为第1类;编号为S6~S9的样品聚为第2类;编号为S3~S4、S10、S13~S15的样品聚为第3类。该结果与HCA结果相近。其中,PCA的主成分由全体变量共同贡献,HCA结果可能由某些高方差变量主导,最终导致二者聚类结果略有不同。

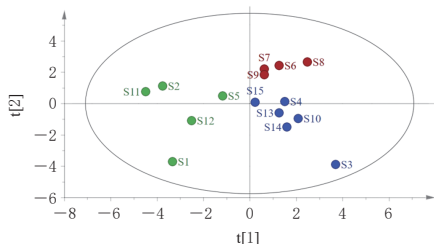
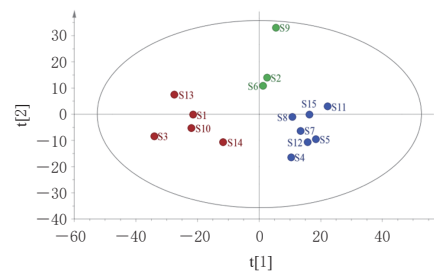


图5 15批样品的PCA得分图

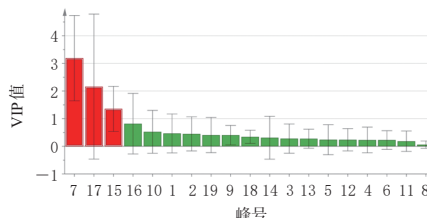
2.4.3 OPLS-DA

以15批样品的共有峰峰面积为变量,将其导入SIMCA 14.1软件进行OPLS-DA。该模型稳定性参数 $R^2Y=0.794$,预测参数 $Q^2=0.615$,均大于0.5,表明建立的OPLS-DA模型具有较高的稳定性与较好的预测能力。OPLS-DA得分图(图6A)显示,15批样品可分为3类:编号为S1、S3、S10、S13~S14的样品聚为第1类;编号为S2、S6、S9的样品聚为第2类;编号为S4~S5、S7~S8、S11~S12、S15的样品聚为第3类。该结果与HCA结果相近。

本研究以变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)值 >1 为标准,共筛选出3个差异性成分,分别为峰7(5-羟甲基糠醛)、峰17(新橙皮苷)和峰15(柚皮苷),详见图6B。



A. OPLS-DA得分图



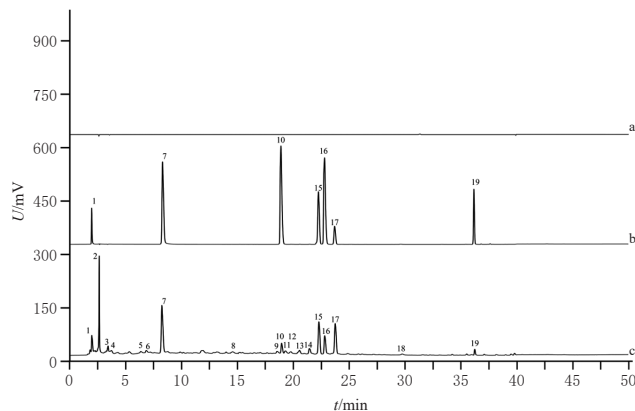
B. VIP得分图

图6 15批样品的OPLS-DA得分图和VIP得分图

2.5 多指标成分含量测定

2.5.1 专属性考察

取空白溶剂(50%甲醇)、混合对照品溶液和供试品溶液(编号S1),分别按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果(图7)显示,供试品溶液和混合对照品溶液中7个成分的保留时间一致,7个成分的色谱峰与相邻色谱峰间的分离度均大于1.5,理论板数以各待测成分峰计均不低于5000,且空白溶剂不干扰测定,说明该方法专属性良好。



1:腺嘌呤;7:5-羟甲基糠醛;10:延胡索乙素;15:柚皮苷;16:脱氢紫堇碱;17:新橙皮苷;19:甘草酸;a:空白溶剂;b:混合对照品溶液;c:供试品溶液。

图7 空白溶剂、混合对照品溶液和供试品溶液的HPLC色谱图

2.5.2 线性关系考察

精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液,用甲醇稀释2、5、10、50、100倍,取混合对照品原溶液及系列稀释液,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以各成分质量浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)进行线性拟合。结果(表1)显示,各成分在其进样质量浓度范围内线性关系均良好。

表1 各成分的线性关系考察结果

化学成分	回归方程	R ²	线性范围/(μg/mL)
腺嘌呤	Y=20.83X-2.70	0.999 4	0.50~50.47
5-羟甲基糠醛	Y=9.70X+6.24	0.999 9	1.99~199.27
延胡索乙素	Y=20.98X-1.05	0.999 6	1.99~198.69
柚皮苷	Y=8.21X+22.88	0.999 4	3.96~396.26
脱氢紫堇碱	Y=28.37X-6.86	0.999 9	0.99~99.77
新橙皮苷	Y=10.94X+16.46	0.999 6	2.98~297.61
甘草酸	Y=4.90X-8.71	0.999 6	1.99~199.40

2.5.3 精密度考察

精密量取“2.2.2”项下混合对照品溶液,用甲醇稀释5倍后,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,腺嘌呤、5-羟甲基糠醛、延胡索乙素、柚皮苷、脱氢紫堇碱、新橙皮苷和甘草酸峰面积的RSD分别为0.05%、0.08%、0.73%、0.63%、0.32%、0.69%和0.83%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.5.4 稳定性考察

取编号S1样品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,分别在室温下放置0、2、4、8、12、24 h时,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,腺嘌呤、5-羟甲基糠醛、延胡索乙素、柚皮苷、脱氢紫堇碱、新橙皮苷和甘草酸峰面积的RSD分别为1.11%、0.50%、0.56%、1.04%、1.47%、0.48%和1.16%(n=6),表明供试品溶液在室温放置24 h内稳定良好。

2.5.5 重复性考察

按“2.2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液(编号S1),分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并采用外标法计算各成分含量。结果显示,腺嘌呤、5-羟甲基糠醛、延胡索乙素、柚皮苷、脱氢紫堇碱、新橙皮苷和甘草酸含量的RSD分别为0.71%、0.60%、0.78%、0.57%、0.61%、0.87%和0.69%(n=6),表明该方法重复性良好。

2.5.6 加样回收率考察

精密量取6份已知成分含量的健脾和胃方标准汤剂(编号S1),每份2 mL,按标准汤剂中已知成分含量1:1的比例加入各单一对照品溶液适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算各成分的平均加样回收率。结果显示,腺嘌呤、5-羟甲基糠醛、延胡索乙素、柚皮苷、脱氢紫堇碱、新橙皮苷和甘草酸的平均加样回收率分别为98.95%、100.72%、100.60%、103.81%、100.85%、100.23%和99.23%,RSD分别为1.28%、1.26%、1.10%、0.66%、0.61%、0.73%和2.75%(n=6),表明该方法的准确度较高。

2.5.7 样品含量测定

取15批次样品,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并采用外标法计算各成分含量。每批样品平行测定3次,取平均值。结果(表2)显示,15批样品中腺嘌呤、5-羟甲基

糠醛、延胡索乙素、柚皮苷、脱氢紫堇碱、新橙皮苷和甘草酸含量范围分别为0.031~0.106、0.267~0.824、0.089~0.144、1.344~2.091、0.089~0.178、1.328~2.028、0.040~0.150 mg/g。

表2 15批样品中各成分的含量测定结果(n=3,mg/g)

编号	腺嘌呤	5-羟甲基糠醛	延胡索乙素	柚皮苷	脱氢紫堇碱	新橙皮苷	甘草酸
S1	0.036	0.722	0.126	1.788	0.121	1.821	0.058
S2	0.070	0.555	0.098	1.418	0.101	1.359	0.040
S3	0.078	0.773	0.140	2.091	0.178	1.977	0.099
S4	0.099	0.286	0.100	1.972	0.148	1.971	0.101
S5	0.073	0.267	0.144	1.590	0.113	1.766	0.150
S6	0.036	0.549	0.122	1.413	0.137	1.458	0.101
S7	0.038	0.307	0.129	1.788	0.127	1.833	0.084
S8	0.101	0.327	0.116	1.702	0.155	1.562	0.079
S9	0.087	0.514	0.090	1.582	0.142	1.655	0.082
S10	0.078	0.718	0.105	1.979	0.160	2.028	0.101
S11	0.031	0.269	0.089	1.344	0.089	1.328	0.083
S12	0.106	0.355	0.135	1.716	0.111	1.717	0.103
S13	0.077	0.824	0.097	1.767	0.148	1.773	0.100
S14	0.094	0.557	0.103	2.043	0.169	1.983	0.092
S15	0.081	0.267	0.102	1.440	0.149	1.386	0.121

3 讨论

3.1 健脾和胃方的方解

健脾和胃方由党参、白术、木香、莪术、焦三仙(焦麦芽、焦神曲、焦山楂)、枳壳、延胡索和甘草10味中药组成,对慢性胃炎具有良好的临床疗效。方中,党参归脾、肺二经,能补脾养胃,为补中益气的良药^[10];白术甘温补虚、苦温燥湿,既能补气以健脾,又能燥湿,炒用补气健脾效果明显^[11],二者共为君药。木香辛温,具有温中和胃、健脾消滞之功效^[12],为臣药。莪术味苦、辛,性温,具有行气、破血、消积、止痛的功效^[13];焦三仙具有消胀除满、通畅胃腑的功效;枳壳味苦,性微寒,具有理气宽中、行滞消胀之功效^[14];延胡索性温,味辛、苦,是活血化瘀、行气止痛之妙品^[15],六者共为佐药。甘草调和诸药,疏肝行气^[16],为使药。10味中药共奏健脾和胃、理气通滞之效,达到治疗慢性胃炎的效果。

3.2 色谱条件的优化

本课题组在实验前期优化了HPLC色谱条件,考察了不同流动相(甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液)、柱温(35、40、45℃)和流速(0.8、1.0、1.2 mL/min)对该方化学成分分离效果、峰形等的影响,结合全波长扫描,最后确定了本研究中的色谱条件。在该色谱条件下,色谱峰的峰形和分离度良好,保证了分析方法的准确性和可靠性。

3.3 指纹图谱分析

本研究基于HPLC法对健脾和胃方标准汤剂进行了指纹图谱研究,不同批次样品的指纹图谱相似度均在0.95以上,表明不同批次饮片的整体质量较稳定。指纹图谱中共标定了19个共有峰,通过与混合对照品溶液图谱比对确定了其中7个主要成分,分别是腺嘌呤、5-羟甲基糠醛、延胡索乙素、柚皮苷、脱氢紫堇碱、新橙皮苷和

甘草酸。并且,笔者通过与缺味阴性样品溶液和单味饮片对照溶液色谱图进行对比,明确了7种成分的药材归属,为揭示健脾和胃方的药效物质基础提供了参考。然而,本研究中用于指纹图谱建立的饮片样本量有限,后续在医院制剂开发和申报过程中有必要进一步增加饮片样本量,建立更加完善的质量控制体系。

3.4 化学模式识别的结果分析

本研究使用SPSS 22.0、SIMCA 14.1软件对15批样品进行HCA、PCA和OPLS-DA。HCA、PCA和OPLS-DA均将15批样品聚为3大类,表明各批次样品的成分有一定差异。以VIP值>1为标准筛选出3个差异性成分,分别为峰7(5-羟甲基糠醛)、峰17(新橙皮苷)和峰15(柚皮苷);其中峰17(新橙皮苷)在PCA中为第4主成分中方差贡献率较大的化合物,其余2个差异性成分未被主成分捕获,说明类别差异可能隐藏在次要方差中。

3.5 含量测定成分选取依据及结果分析

腺嘌呤、5-羟甲基糠醛、延胡索乙素、柚皮苷、脱氢紫堇碱、新橙皮苷和甘草酸是健脾和胃方样品HPLC色谱图中响应较高的成分,且多是该方中药材在2020年版《中国药典》(一部)中收载的用于含量测定的指标性成分,因此本研究将其作为定量分析指标。如柚皮苷和新橙皮苷是枳壳的指标成分,具有促进胃肠运动和抗溃疡的作用^[17];延胡索乙素是延胡索的指标成分,具有镇静、止痛等作用^[18];甘草酸为甘草的特征性活性成分,具有抗炎、调节免疫的作用^[19];腺嘌呤、5-羟甲基糠醛和脱氢紫堇碱都具有抗炎、抗肿瘤等作用^[20-22]。以上7种成分可能是健脾和胃方发挥治疗慢性胃炎作用的重要物质,因此本研究对这7种成分进行了含量测定。含量测定结果显示,15批样品中腺嘌呤、5-羟甲基糠醛、延胡索乙素、柚皮苷、脱氢紫堇碱、新橙皮苷和甘草酸的含量范围分别为0.031~0.106、0.267~0.824、0.089~0.144、1.344~2.091、0.089~0.178、1.328~2.028、0.040~0.150 mg/g。结果提示,7种成分在15批样品中的含量存在一定差异,这可能与药材产地、提取工艺或储存条件有关。

综上所述,本研究所建立的HPLC指纹图谱及多指标成分含量测定方法稳定、可行,为揭示健脾和胃方的药效物质基础提供了参考,也为健脾和胃方的质量控制、后续医院制剂开发和临床应用奠定了基础。

参考文献

[1] 王晓楠,张亚峰,许翠萍.慢性萎缩性胃炎的诊治进展[J].中南医学科学杂志,2020,48(3):323-326.

[2] 国家消化系疾病临床医学研究中心(上海),国家消化道早癌防治中心联盟,中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组,等.中国胃黏膜癌前状态和癌前病变的处理策略专家共识:2020年[J].中华消化杂志,2020,40(11):731-741.

[3] 李军祥,陈諝,吕宾,等.慢性萎缩性胃炎中西医结合诊疗共识意见:2017年[J].中国中西医结合消化杂志,

2018,26(2):121-131.

[4] 杨军用,张选明,甘霞,等.蔡钢教授运用温阳法治疗慢性胃炎的经验[J].新疆中医药,2022,40(2):26-29.

[5] 张志刚,赵新芳,杨军用,等.蔡钢教授治疗慢性胃炎的临床经验初探[J].中医临床研究,2020,12(23):49-51.

[6] 易静,刘德慧,杨蓉,等.基于HPLC指纹图谱和多成分含量测定的苏合香丸质量评价研究[J].药物分析杂志,2024,44(9):1551-1559.

[7] 胡晶,丁亚明,刘爽,等.引火汤冻干粉HPLC指纹图谱建立及8种成分含量测定[J].中成药,2024,46(8):2499-2505.

[8] 张建锋,侯长周,侯晓杰,等.基于谱效关联技术的中药质量控制研究进展[J].中华中医药学刊,2025,43(3):205-209,301.

[9] 袁传裕,胡俊杰,李娟,等.基于UPLC-Q-TOF-MS/MS的疏肝和胃汤化学成分、HPLC指纹图谱、化学模式识别及含量测定研究[J].中草药,2024,55(7):2183-2196.

[10] 史奇,陈正君,刘雪枫,等.党参治疗胃溃疡的作用机制研究进展[J].中草药,2023,54(7):2338-2348.

[11] 杨丹阳,于欢,吴晓莹,等.白术化学成分及其生物活性研究进展[J].中华中医药学刊,2023,41(5):171-182.

[12] 郑加梅,尚明越,王嘉乐,等.木香的化学成分、药理作用、临床应用研究进展及质量标志物预测[J].中草药,2022,53(13):4198-4213.

[13] 魏巍,王冰瑶.莪术及其主要成分的药理作用研究进展[J].药物评价研究,2022,45(10):2154-2160.

[14] 江宝瑞,丁宏,王跃,等.枳壳的药理研究进展[J].云南中医中药杂志,2022,43(6):70-75.

[15] 陈斯.延胡索化学成分和药理作用研究进展[J].中医药信息,2021,38(7):78-82.

[16] 谢瑞强,王长福.炙甘草化学成分和药理作用研究进展[J].中医药信息,2023,40(4):84-89.

[17] 于俊保,朱佳源,梅文亚,等.枳壳及其活性成分调节胃肠动力作用机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(10):290-298.

[18] 孙梦雪,李玉婷.延胡索乙素的药理作用研究进展[J].山东化工,2024,53(13):130-133.

[19] 周晶晶,周洁,窦霞,等.不同炮制方法对甘草化学成分及药理作用的影响研究[J].中华中医药学刊,2024,42(5):244-249.

[20] 王瑞,赵红玲,向亚美,等.高效液相色谱法同时测定拟南芥中6种核苷类成分的含量[J].分析科学学报,2024,40(4):480-484.

[21] 崔宇擎,张华伟,王喜生,等.5-HMF高效液相色谱检测方法的建立及功能糖与不同产地党参、何首乌和熟地中5-HMF含量分析[J].中兽医医药杂志,2024,43(1):13-17.

[22] 高风,郭丽君,王安铸,等.脱氢紫堇碱的药理作用研究现状与展望[J].中华中医药杂志,2023,38(11):5377-5380.

(收稿日期:2025-04-04 修回日期:2025-06-27)

(编辑:林 静)