

基于指纹图谱和多成分含量测定的清瘟护肺颗粒质量评价^Δ

周慧英^{1*}, 王园¹, 王亚妮¹, 杨允², 王博², 杨栓柱³, 曹利平³, 张红¹, 龙凯花^{1#} (1. 陕西省中医药研究院中药研究所, 西安 710003; 2. 西北大学生命科学学院, 西安 710069; 3. 陕西省中医医院肺病科, 西安 710003)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)03-0338-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.03.11



摘要 目的 为清瘟护肺颗粒质量评价及临床应用提供科学依据。方法 以14批清瘟护肺颗粒为样品,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》建立其高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并进行色谱峰指认和相似度评价。应用聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)对14批样品进行化学模式识别分析。同时,采用HPLC法测定样品中新绿原酸(NGA)、绿原酸(CHA)、隐绿原酸(CGA)、连翘酯苷A(FTA)、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸(3,5-O-DA)、4,5-O-二咖啡酰奎宁酸(4,5-O-DA)及安格洛苷C(AGC)的含量。结果 指纹图谱和含量测定的方法学考察结果均符合相关要求。14批样品的HPLC指纹图谱中共标示出14个共有峰,并指出其中7个共有峰[NGA(峰2)、CHA(峰3)、CGA(峰5)、FTA(峰11)、3,5-O-DA(峰12)、4,5-O-DA(峰13)和AGC(峰14)];各样品的相似度均大于0.94。CA、PCA结果显示,样品可被分为3类;OPLS-DA结果显示,4号峰(未知)、11号峰(FTA)、8号峰(未知)、9号峰(未知)、1号峰(未知)为差异性成分。14批样品中NGA、CHA、CGA、3,5-O-DA、FTA、4,5-O-DA、AGC的含量范围分别为0.210 4~0.458 7、0.269 1~0.506 3、0.228 1~0.461 1、0.443 9~1.044 6、0.066 7~0.155 7、0.062 8~0.143 8、0.057 4~0.105 7 mg/g。结论 本研究建立的HPLC指纹图谱及多成分含量测定方法高效、可靠,可用于清瘟护肺颗粒的质量评价。

关键词 清瘟护肺颗粒;高效液相色谱法;指纹图谱;聚类分析;主成分分析;正交偏最小二乘-判别分析;含量测定

Quality evaluation of Qingwen hufei granules based on fingerprints combined with multi-component content determination

ZHOU Huiying¹, WANG Yuan¹, WANG Yani¹, YANG Yun², WANG Bo², YANG Shuanzhu³, CAO Liping³, ZHANG Hong¹, LONG Kaihua¹ (1. Institute of Chinese Materia Medica, Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China; 2. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China; 3. Dept. of Pulmonary Disease, Shaanxi Provincial Hospital of Chinese Medicine, Xi'an 710003, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To provide a scientific basis for the quality evaluation and clinical application of Qingwen hufei granules. **METHODS** Fourteen batches of Qingwen hufei granules were used as samples to establish high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints using the *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (2012 Edition)*. The chromatographic peaks were identified and the similarity was evaluated. Cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were used to conduct chemical pattern recognition analysis on the 14 batches of samples. Meanwhile, the contents of neochlorogenic acid (NGA), chlorogenic acid (CHA), cryptochlorogenic acid (CGA), forsythoside A (FTA), 3,5-O-dicaffeoylquinic acid (3,5-O-DA), 4,5-O-dicaffeoylquinic acid (4,5-O-DA), and angoroside C (AGC) in the samples were determined by HPLC. **RESULTS** The methodological investigation results of both the fingerprint and the content determination complied with the relevant requirements. Fourteen common peaks were indicated in the HPLC fingerprints of the 14 batches of samples, and 7 of them were identified [NGA (peak 2), CHA (peak 3), CGA (peak 5), FTA (peak 11), 3,5-O-DA (peak 12), 4,5-O-DA (peak 13), and AGC (peak 14)]; the similarity of each sample was greater than 0.94. The results of CA and PCA showed that the samples could be classified into 3 categories; the results of OPLS-DA indicated that peak 4 (unknown), peak 11 (FTA), peak 8 (unknown), peak 9 (unknown), and peak 1 (unknown) were the differential components. The content ranges of NGA, CHA, CGA, 3,5-O-DA, FTA, 4,5-O-DA and AGC in the 14 batches of samples were 0.210 4-0.458 7, 0.269 1-0.506 3, 0.228 1-0.461 1, 0.443 9-1.044 6, 0.066 7-0.155 7, 0.062 8-0.143 8, and 0.057 4-0.105 7 mg/g, respectively. **CONCLUSIONS** The HPLC fingerprint and multi-component

^Δ基金项目 陕西省重点研发计划项目(No.2024SF-YBXM-489); 陕西省科协青年人才托举计划项目(No.20230321);陕西省中医药管理局委托项目(No.SZY-KJCYC-2025-ZY-006);国家中医药管理局曹利平全国名中医传承工作室建设项目(No.国中医药办人教函[2022]245号)

* 第一作者 研究实习员,硕士。研究方向:中药药效物质基础。
E-mail:zhying617@163.com

通信作者 副研究员,硕士。研究方向:中药药效物质基础。
E-mail:longkaihua@126.com

content determination methods established in this study are efficient and reliable, and can be used for the quality evaluation of Qingwen hufei granules.

KEYWORDS Qingwen hufei granules; high-performance liquid chromatography; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; content determination

清瘟护肺颗粒(医疗机构制剂备案号:陕药监函〔2020〕60号)由全国名中医曹利平主任医师结合中医温病学知识,在中医温病经典方剂“银翘散”“玄麦甘桔汤”和名方“四君子汤”基础上加减而成,其组方包含金银花、连翘、大青叶、玄参、麦冬、防风、紫苏叶、淡竹叶、茵陈、桔梗、浙贝母、苦杏仁、党参、茯苓、炒白术、甘草共16味药材^[1]。该制剂主治瘟病初起,见发热、干咳、咽痛、食少等症状,主要用于急性呼吸道感染性疾病的治疗,包括普通感冒、流行性感、COVID-19感染轻症、肺炎支原体感染等^[2],是陕西省首批用于预防 COVID-19 感染的中药制剂^[3]。近期研究表明,清瘟护肺颗粒可有效改善急性呼吸道感染(风热证)临床症状及各项相关临床指标,且用药期间无不良反应^[2]。

中药制剂的质量直接影响临床疗效与用药安全,然而该制剂现行质量标准主要采用薄层和显微鉴别,难以全面反映其内在质量和批次间的一致性。中药指纹图谱能有效评价中药材质量一致性与稳定性,可较为全面地反映中药化学成分的特性^[4-5]。将中药指纹图谱分析与含量测定方法、化学模式识别技术相结合的方案,能更好地反映中药制剂的定性和定量状态,深入揭示中药复杂成分间的相互作用规律,目前已被广泛应用于中药及复方制剂的质量控制^[6-7]。因此,本研究共收集了陕西省中医医院制剂中心生产的14批清瘟护肺颗粒,主要以2020年版《中国药典》(一部)中该制剂君药金银花、连翘的质量标准为参照,选取绿原酸、3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸(3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid,简称为“3,5-*O*-DA”)、连翘酯苷A(forsythoside A,简称为“FTA”)等7种指标性成分作为关键含量检测指标,建立该制剂的指纹图谱及多成分含量测定方法,并进行化学模式识别分析,旨在为其整体质量评价及药效物质基础研究提供科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

配备VWD检测器及Agilent Chem Station工作站的1260型高效液相色谱(HPLC)仪购自美国Agilent公司;KQ-100型超声波清洗器购自昆山市超声仪器有限公司;BS210S型万分之一电子分析天平、BT25S型十万分之一电子分析天平均购自北京赛多利斯天平有限公司。

1.2 主要药品与试剂

14批清瘟护肺颗粒(批号分别为20210926、20220101、20220701、20221202、20210715、20210724、

20221228、20210929、20211005、20211013、20211226、20220418、20220428、20220506,编号分别为S1~S14,规格均为10 g)均由陕西省中医医院提供;对照品新绿原酸(neochlorogenic acid,简称为“NGA”,批号CHB220328,纯度 $\geq 98\%$)、绿原酸(chlorogenic acid,简称为“CHA”,批号CHB231010,纯度 $\geq 98\%$)、隐绿原酸(cryptochlorogenic acid,简称为“CGA”,批号CHB230830,纯度 $\geq 98\%$)、FTA(批号CHB231017,纯度 $\geq 98\%$)、3,5-*O*-DA(批号CBH231227,纯度 $\geq 98\%$)、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸(4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid,简称为“4,5-*O*-DA”,批号CHB240104,纯度 $\geq 98\%$)、安格洛昔C(angoroside C,简称为“AGC”,批号CHB240217,纯度 $\geq 98\%$)均购自成都克洛玛生物科技有限公司;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用Agilent ZORBAX Eclipse Plus-C₁₈色谱柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m),以甲醇(A)、0.1%磷酸(B)为流动相进行梯度洗脱(0~12 min,10%A \rightarrow 16%A;12~35 min,16%A \rightarrow 18%A;35~38 min,18%A \rightarrow 30%A;38~80 min,30%A \rightarrow 34%A;80~95 min,34%A \rightarrow 58%A;95~100 min,58%A \rightarrow 90%A);流速为0.8 mL/min;柱温为30 $^{\circ}$ C;检测波长为330 nm;进样量为10 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液

精密称取对照品NGA、CHA、CGA、FTA、3,5-*O*-DA、4,5-*O*-DA、AGC适量,分别置于不同10 mL容量瓶中,用50%甲醇稀释并定容,制成质量浓度分别为1.401、1.125、1.185、1.344、0.759、0.594、0.864 mg/mL的对照品储备液。分别量取NGA、CHA、CGA、FTA对照品储备液5 mL以及3,5-*O*-DA、4,5-*O*-DA、AGC对照品储备液1 mL,置于25 mL容量瓶中,加50%甲醇定容至刻度,制成上述成分质量浓度分别为280.2、225.0、237.0、268.8、30.36、23.76、34.56 μ g/mL的混合对照品溶液。

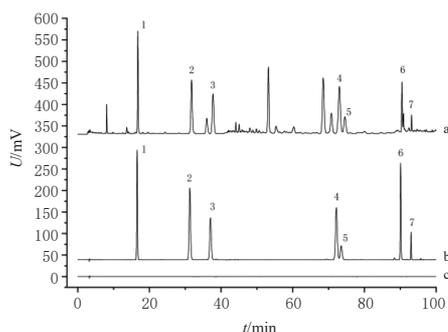
2.2.2 供试品溶液

将清瘟护肺颗粒研细,精密称定约2 g样品放入100 mL具塞锥形瓶中,加甲醇30 mL,超声处理30 min,放冷,滤过。滤液蒸干,残渣加适量10%甲醇使其溶解,然后转移至10 mL容量瓶中,加10%甲醇至刻度,摇匀,用0.45 μ m微孔滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 指纹图谱的建立及分析

2.3.1 专属性考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液、“2.2.2”项下供试品溶液(编号S7)和空白溶剂(10%甲醇),分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图(图1)。结果显示,供试品溶液图谱中7个成分的色谱峰位置均与混合对照品溶液图谱一致,其色谱峰与相邻色谱峰间的分离度均大于1.5,理论板数均大于5 000,且空白溶剂不干扰测定,表明该方法专属性良好。



1: NGA; 2: CHA; 3: CGA; 4: FTA; 5: 3, 5-O-DA; 6: 4, 5-O-DA; 7: AGC; a: 供试品溶液; b: 混合对照品溶液; c: 空白溶剂。

图1 供试品溶液、混合对照品溶液与空白溶剂的色谱图

2.3.2 精密度试验

取同一份清瘟护肺颗粒供试品溶液(编号S7),按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录色谱图。以FTA峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间的RSD为0.019%~0.637%、相对峰面积的RSD为0.049%~0.596%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验

取同一批次清瘟护肺颗粒(编号S7),按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。以FTA峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间的RSD为0.004%~0.082%、相对峰面积的RSD为0.062%~2.520%($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验

取同一份清瘟护肺颗粒供试品溶液(编号S7),分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。以FTA峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间的RSD为0.006%~0.142%、相对峰面积的RSD为0.210%~3.066%($n=6$),表明该供试品溶液在室温放置24 h内理化性质稳定。

2.3.5 指纹图谱的建立及相似度评价

取“2.2.2”项下14批清瘟护肺颗粒的供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。将图谱的数据文件转换成“AIA”格式,然后导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》。以编号S7样品的图谱为参照图谱,设置时间窗宽度为0.3 min,进行多点校正和Mark峰匹配后生产指纹图谱,采用中位数法生成对照图

谱R,并以对照图谱R为参照进行相似度评价。结果显示,14批样品的图谱共生成14个共有峰,通过与混合对照品溶液图谱(图1b)比对,指认出其中7个共有峰,分别为NGA(峰2)、CHA(峰3)、CGA(峰5)、FTA(峰11)、3,5-O-DA(峰12)、4,5-O-DA(峰13)和AGC(峰14)。14批样品(编号S1~S14)的相似度分别为0.972、0.984、0.992、0.992、0.983、0.981、0.992、0.993、0.943、0.996、0.996、0.997、0.949、0.996,均在0.94以上,表明不同批次清瘟护肺颗粒的制备工艺相对稳定。14批清瘟护肺颗粒的指纹图谱及对照图谱R见图2。

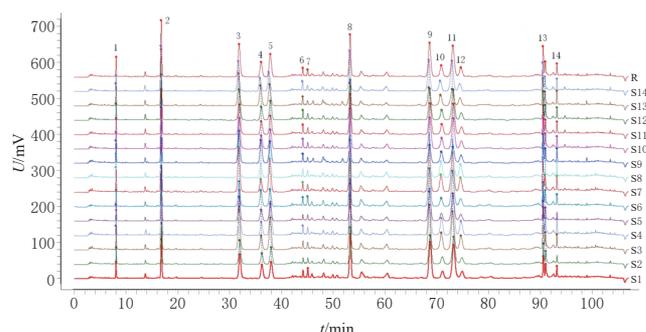


图2 14批清瘟护肺颗粒的指纹图谱与对照图谱R

2.4 化学识别模式分析

2.4.1 聚类分析

将14批清瘟护肺颗粒样品的14个共有峰峰面积导入SPSS 27.0软件,通过组间连接和平方欧氏距离法绘制聚类分析图(图3)。结果显示,当平方欧氏距离为10时,14批清瘟护肺颗粒样品被分为3类:第1类为S1~S2、S5~S6、S10~S12、S14号样品;第2类为S9、S13号样品;第3类为S3~S4、S7~S8号样品。该结果提示,14批清瘟护肺颗粒样品的成分存在一定差异。

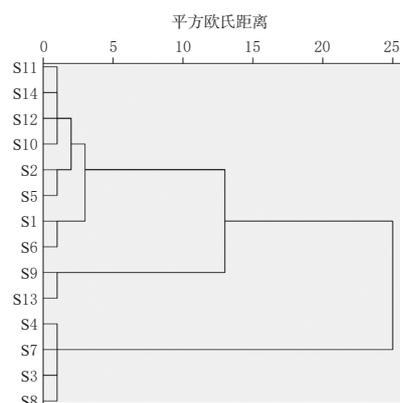


图3 14批清瘟护肺颗粒样品的聚类分析图

2.4.2 主成分分析

将14批清瘟护肺颗粒样品的14个共有峰峰面积导入SPSS 27.0软件,经标准化处理后进行主成分分析(principal component analysis, PCA)。提取特征值 $>1^{[8]}$ 的4个主成分,其方差累积贡献率为99.529%(主成分1~4的方差贡献率分别为63.918%、21.593%、8.471%、

5.547%)。根据因子载荷矩阵分析结果可知, NGA、CHA、CGA对主成分1的贡献较大, 峰4对主成分2的贡献较大, 峰6对主成分3的贡献较大。采用GraphPad Prism 10软件依据各批次主成分得分(表1)绘制PCA得分图(图4)。结果显示, 14批清瘟护肺颗粒样品被分为3类: 第1类为S1~S2、S5~S6、S10~S12、S14号样品; 第2类为S9、S13号样品; 第3类为S3~S4、S7~S8号样品。该结果与聚类分析结果一致。

根据主成分得分计算各批次样品的综合得分[综合得分=(主成分1得分×63.918+主成分2得分×21.593+主成分3得分×8.471+主成分4得分×5.547)/99.529], 综合得分越高表示样品质量越好^[9]。结果(表1)表明, 14批清瘟护肺颗粒样品的质量存在差异, 其中S7、S4、S3和S8样品的质量较好。

表1 14批清瘟护肺颗粒样品的主成分得分和综合得分

样品编号	主成分得分				综合得分
	主成分1	主成分2	主成分3	主成分4	
S1	-1.120	1.745	-0.784	-0.360	-0.405
S2	-0.733	-0.677	0.951	-1.944	-0.615
S3	1.399	0.403	0.265	-0.233	0.882
S4	1.449	0.577	0.378	0.052	0.989
S5	-0.753	-0.627	0.916	-1.856	-0.612
S6	-1.105	1.964	-1.039	0.001	-0.351
S7	1.486	0.560	0.386	0.096	1.011
S8	1.265	0.430	0.273	-0.225	0.814
S9	0.286	-1.252	-2.173	-0.110	-0.400
S10	-0.529	-0.426	0.600	1.285	-0.181
S11	-0.618	-0.434	0.679	1.061	-0.243
S12	-0.619	-0.429	0.606	1.204	-0.239
S13	0.212	-1.390	-1.681	-0.101	-0.404
S14	-0.619	-0.445	0.623	1.130	-0.247

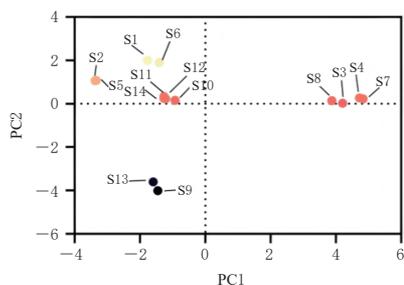


图4 14批清瘟护肺颗粒样品的PCA得分图

2.4.3 正交偏最小二乘-判别分析

将14批清瘟护肺颗粒样品的14个共有峰峰面积导入SIMCA 14.1软件进行正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA), 以变量重要性投影值(variable importance in projection, VIP值) $>1^{[10]}$ 为条件筛选质量差异成分。结果(图5)显示, 有5个引起样品批次间质量差异的主要成分, 按VIP值大小排序依次为4号峰(未知)、11号峰(FTA)、8号峰(未知)、9号峰(未知)、1号峰(未知)。

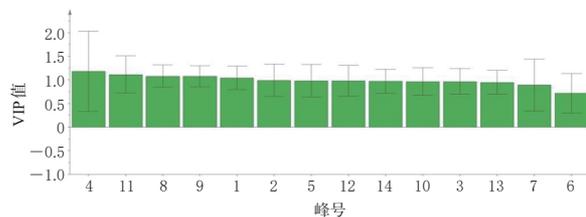


图5 14批清瘟护肺颗粒样品共有峰的VIP得分图

2.5 7个指标成分的含量测定

2.5.1 线性关系考察

将“2.2.1”项下混合对照品溶液以50%甲醇稀释1、2、3、4、5、6倍, 得到6个不同质量浓度的溶液, 经0.45 μm微孔滤膜滤过后, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。以质量浓度(X)为横坐标、色谱峰峰面积(Y)为纵坐标进行回归分析。依据信噪比10:1确定各成分的定量限, 依据信噪比3:1确定各成分的检测限。结果显示, 各待测成分在进样质量浓度范围内均与其峰面积线性关系良好($r \geq 0.9996$)。7个指标成分的线性回归分析及检测限、定量限结果见表2。

表2 7个指标成分的线性回归分析及检测限、定量限结果

成分	线性回归方程	线性范围/(μg/mL)	r	检测限/(μg/mL)	定量限/(μg/mL)
NGA	$Y=17.768X+0.6886$	46.70~280.20	1.0000	0.247	0.618
CHA	$Y=33.390X-8.8689$	37.50~225.00	1.0000	0.382	0.688
CGA	$Y=14.921X-0.0638$	39.50~237.00	0.9999	0.158	0.264
FTA	$Y=20.418X+32.5620$	44.80~268.80	1.0000	0.074	0.210
3,5-O-DA	$Y=47.547X-26.6660$	5.06~30.36	0.9996	0.041	0.090
4,5-O-DA	$Y=46.202X+0.3122$	3.96~23.76	1.0000	0.033	0.050
AGC	$Y=16.183X+0.2943$	5.76~34.56	1.0000	0.044	0.074

2.5.2 精密度的试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(编号S7)适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定6次, 记录峰面积。结果显示, NGA、CHA、CGA、FTA、3,5-O-DA、4,5-O-DA、AGC峰面积的RSD分别为0.09%、0.08%、0.07%、0.07%、0.17%、0.07%、0.23%($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验

取同一份样品(编号S7), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于室温下放置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, NGA、CHA、CGA、FTA、3,5-O-DA、4,5-O-DA、AGC峰面积的RSD分别为0.22%、0.15%、0.10%、0.25%、1.82%、2.04%、0.38%($n=6$), 表明该供试品溶液在室温放置24 h内稳定性良好。

2.5.4 重复性试验

取同一份样品(编号S7), 按“2.2.2”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, 记录峰面积, 并采用外标法计算各成分的含量。结果显示, NGA、CHA、CGA、FTA、3,5-O-DA、4,5-O-DA、AGC含量的RSD分别为2.28%、2.55%、2.34%、1.41%、2.14%、2.00%、1.39%($n=6$), 表明该方法重复性良好。

2.5.5 加样回收率试验

取已知含量的样品(编号S7)6份,每份1.0 g,置于100 mL具塞锥形瓶中,加甲醇30 mL使其溶解。分别按各成分含量100%的比例加入319 μ L NGA对照品储备液、472 μ L CHA对照品储备液、409 μ L CGA对照品储备液、1 504 μ L FTA对照品储备液、203 μ L 3,5-O-DA对照品储备液、254 μ L 4,5-O-DA对照品储备液、115 μ L AGC对照品储备液,按“2.2.2”项下方法制备加样回收试验用供试品溶液,然后按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果显示,NGA、CHA、CGA、FTA、3,5-O-DA、4,5-O-DA、AGC的平均加样回收率分别为96.12%、95.71%、96.08%、96.44%、97.01%、103.20%、102.24%,RSD分别为1.99%、0.91%、2.38%、2.31%、1.15%、1.81%、0.70%($n=6$),表明该方法的准确度较好。

2.5.6 多成分含量测定

取14批清瘟护肺颗粒样品,按“2.2.2”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7个成分的含量。平行测定3次,取平均值。结果(表3)显示,NGA、CHA、CGA、3,5-O-DA、FTA、4,5-O-DA、AGC的含量范围分别为0.210 4~0.458 7、0.269 1~0.506 3、0.228 1~0.461 1、0.443 9~1.044 6、0.066 7~0.155 7、0.062 8~0.143 8、0.057 4~0.105 7 mg/g。该结果提示,各批次样品中相同成分的含量存在一定波动。其中,S3、S4、S7、S8样品中各成分的含量较其他批次样品高。

表3 14批清瘟护肺颗粒中7个成分的含量测定结果(mg/g, $n=3$)

编号	NGA	CHA	CGA	3,5-O-DA	FTA	4,5-O-DA	AGC
S1	0.2104	0.2778	0.2281	0.8966	0.0726	0.0709	0.0813
S2	0.2193	0.2691	0.2295	0.7076	0.0671	0.0652	0.0574
S3	0.4391	0.4812	0.4403	1.0102	0.1529	0.1431	0.1006
S4	0.4540	0.5056	0.4611	1.0446	0.1544	0.1426	0.1046
S5	0.2206	0.2714	0.2318	0.7160	0.0667	0.0628	0.0586
S6	0.2140	0.2848	0.2346	0.9386	0.0788	0.0763	0.0795
S7	0.4587	0.5063	0.4604	1.0445	0.1557	0.1438	0.1057
S8	0.4377	0.4804	0.4391	0.9970	0.1440	0.1327	0.1007
S9	0.2972	0.3589	0.2962	0.4479	0.0877	0.0929	0.0967
S10	0.2438	0.3457	0.2633	0.8139	0.0874	0.1001	0.0818
S11	0.2392	0.3371	0.2584	0.8108	0.0824	0.0940	0.0803
S12	0.2431	0.3448	0.2623	0.8063	0.0813	0.0929	0.0798
S13	0.2973	0.3589	0.2953	0.4439	0.0835	0.0875	0.0982
S14	0.2392	0.3372	0.2585	0.8052	0.0806	0.0919	0.0849

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

清瘟护肺颗粒为复方制剂,由多味药材组成,且所含化学成分极性差异较大。本研究对比其他色谱柱[TC-C₁₈(2)(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m)、Poroshell 120 PFP(150 mm \times 4.6 mm,2.7 μ m)]发现,使用Agilent ZORBAX Eclipse Plus-C₁₈色谱柱(250 mm \times 4.6 mm,5

μ m)的分离效果、色谱峰峰形均较好。此外,本研究还分别考察了不同流动相(甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸、乙腈-0.1%磷酸和甲醇-0.1%甲酸)及不同检测波长(220、230、250、270、290、310、330 nm),经综合比较色谱峰数量、峰面积、峰形、分离度和基线稳定性等关键参数,最终确定流动相为甲醇-0.1%磷酸、检测波长为330 nm。

3.2 供试品溶液制备方法的确定

本研究以色谱峰的信息丰富度、峰形和相对峰面积作为综合评估标准,系统探讨了不同提取溶剂(50%、70%、100%甲醇)、超声时间(30、45、60 min)以及蒸发干燥后所用溶剂(水、100%甲醇、50%甲醇和10%甲醇)对目标成分提取效果的影响。经实验分析,最终确定供试品溶液的最佳制备条件为:采用体积分数为100%的甲醇作为提取溶剂,设定超声提取时间为30 min,蒸干后使用10%甲醇溶解。

3.3 指纹图谱化学模式识别的结果分析

本研究通过聚类分析和PCA与OPLS-DA发现,14批清瘟护肺颗粒样品可被分为3类,表明不同批次清瘟护肺颗粒成分存在一定差异。这种差异可能与中药饮片原料质量的批次间差异以及制剂生产工艺等导致的成分含量变化有关。本研究以VIP值 >1 为条件,共筛选出5个影响批次间质量差异的主要成分,分别为4号峰(未知)、11号峰(FTA)、8号峰(未知)、9号峰(未知)、1号峰(未知)。本课题组后续将对仍未指认的成分进行研究确认,以更全面地评价清瘟护肺颗粒的质量。

3.4 含量测定成分的选择

清瘟护肺颗粒以金银花、连翘为君,疏解风热、清热解毒;大青叶、玄参、麦冬、防风、紫苏叶、淡竹叶、茵陈为臣,助君清肺止咳、透邪生津、兼利湿邪;桔梗、浙贝母、苦杏仁、党参、茯苓、炒白术为佐,宣肺化痰、健脾益气、防邪复犯;甘草为使,调和诸药。全方共奏疏解风热、清肺止咳、固护脾胃之功^[11]。NGA、CHA、CGA、FTA、3,5-O-DA、4,5-O-DA、AGC多为样品色谱图中响应值较高的成分,且大多是该制剂中君药金银花、连翘在2020年版《中国药典》(一部)中收录的含量测定指标性成分。其中,CHA、3,5-O-DA、4,5-O-DA为金银花的指标性成分,FTA为连翘的指标性成分,AGC为臣药玄参的指标性成分^[12]。现代药理学研究表明,CHA具有抗菌、抗炎、抗病毒等多种生理活性,可通过调控微RNA-223/NOD样受体蛋白3信号轴降低脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠的炎症反应,缓解肺组织病理损伤^[13];3,5-O-DA能降低炎症因子水平,对脂多糖诱发的急性肺损伤小鼠具有保护作用^[14]。Wu等^[15]研究发现,CHA、3,5-O-DA、4,5-O-DA等咖啡酰奎宁酸类化合物均有一定的化痰功效,且在氨水致小鼠咳嗽模型中具有延长咳嗽潜伏期、降低咳嗽频率的作用。FTA作为连翘的活性成分,已被证实具有抗炎、抗氧化、抗感染、调节免疫等药理学特性,还能

通过环指蛋白99介导的转化生长因子激酶1/核因子- κ B信号通路减轻肺损伤^[16],有效改善小鼠肺部甲型流感病毒感染症状^[17]。AGC是玄参中具有较强抗氧化特性,能够调节炎症反应的主要成分之一^[18]。NGA通过调节核因子E2相关因子/血红素加氧酶1、AMP活化的蛋白激酶途径对脂多糖诱导的炎症反应发挥保护作用,可能是治疗急性肺炎的天然抗炎剂^[19]。CGA对经滴鼻感染H9N2亚型禽流感病毒的小鼠肺损伤展现出保护作用^[20]。以上7个成分可能是清瘟护肺颗粒疏风解热、清肺止咳的关键药效成分。因此,本研究对这7个成分进行了含量测定。

综上所述,本研究建立的HPLC指纹图谱结合多成分定量方法,具有准确性高、重复性好及操作简便的特点。该方法不仅是对现有的薄层与显微鉴别方法的补充,而且有助于提升清瘟护肺颗粒的质量评价与控制水平,为其质量标准的制定提供科学依据。

参考文献

- [1] 刘琪琪,李纯,周洁,等.基于网络药理学与分子对接技术的清瘟护肺颗粒防治新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的潜在药效物质研究[J].天然产物研究与开发,2021,33(3):500-509.
- [2] 杨栓柱,陈涛,张红,等.清瘟护肺颗粒治疗急性呼吸道感染的真实世界观察性研究[J].现代中医药,2025,45(5):133-142.
- [3] 陕西中医编辑部.陕西省中医医院“清瘟护肺颗粒”“益肺解毒颗粒”防疫新型冠状病毒肺炎配置备案获批[J].陕西中医,2020,41(3):277.
- [4] 周礼杰,侯晓杰,张建锋,等.基于指纹图谱、化学模式识别及网络药理学的银黄含化滴丸质量标志物预测分析[J].中国抗生素杂志,2025,50(7):845-856.
- [5] 叶程聪,应倩逸,许霄,等.基于指纹图谱及多成分定量与网络药理学的玉屏风标准汤质量标志物(Q-Marker)预测[J].中国医院药学杂志,2025,45(15):1705-1713.
- [6] 胡静,叶晨昱,任慧,等.三桑小方水煎液HPLC指纹图谱及多指标成分定量研究[J/OL].辽宁中医杂志,2025:1-17[2025-10-19].<https://link.cnki.net/urlid/21.1128.r.20250718.1546.021>.
- [7] 赵伟,陈树和,闫斌,等.基于指纹图谱结合化学模式识别的精天颗粒质量评价[J].中国药房,2025,36(3):300-305.
- [8] 杜锦颜,莫静媛,谢询,等.天麻健脑颗粒的综合质量评价[J].中国药房,2024,35(20):2482-2487.
- [9] 闫治攀,李喜香,高丽霞.紫连生肌凝胶剂HPLC指纹图谱建立及6个成分含量测定[J].药物分析杂志,2024,44(9):1586-1596.
- [10] 刘世红,张红杨,冯书敏,等.基于UPLC指纹图谱及多指标成分定量和化学计量学的白前质量评价[J].中草药,2024,55(22):7837-7846.
- [11] 张笑颜,张红,龙凯花,等.清瘟护肺颗粒免疫调节潜在药效物质及作用机制研究[J].现代中药研究与实践,2024,38(5):26-32.
- [12] 丽妍,杨帆,孙萌,等.安格洛昔C对照品的定值研究[J].北京中医药大学学报,2023,46(2):273-280.
- [13] 刘畅,程晓丹,孙家安,等.绿原酸通过调控miR-223/NLRP3轴减轻脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤的机制[J].中南大学学报(医学版),2022,47(3):280-288.
- [14] 熊乐文,金莹,王彦予,等.金银花酚酸类化学成分、药理活性及体内代谢研究进展[J].中成药,2022,44(3):864-871.
- [15] WU Q Z, ZHAO D X, XIANG J, et al. Antitussive, expectorant, and anti-inflammatory activities of four caffeoylquinic acids isolated from *Tussilago farfara*[J]. Pharm Biol, 2016, 54(7):1117-1124.
- [16] WANG J, XIN L Y, WANG H C, et al. Forsythiaside A alleviates acute lung injury via the RNF99/TRAF6/NF- κ B signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 140:112814.
- [17] ZHENG X, CHEN Z Q, SHI S S, et al. Forsythiaside A improves influenza A virus infection through TLR7 signaling pathway in the lungs of mice[J]. BMC Complement Med Ther, 2022, 22(1):164.
- [18] 李翎熙,陈迪路,周小江.玄参化学成分、药理活性研究进展及其质量标志物分析预测[J].中成药,2020,42(9):2417-2426.
- [19] PARK S Y, JIN M L, YI E H, et al. Neochlorogenic acid inhibits against LPS-activated inflammatory responses through up-regulation of Nrf2/HO-1 and involving AMPK pathway[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2018, 62:1-10.
- [20] 张昕,张铭,何宏轩,等.隐绿原酸对H9N2-AIV致小鼠肺损伤的免疫调节和抗氧化效果[J].浙江农业学报,2022,34(1):33-40.

(收稿日期:2025-11-13 修回日期:2026-01-16)

(编辑:林 静)