

本文引用: 廖卓, 包晴, 高元航, 李海英, 王璐, 唐林, 杨磊. 整合指纹图谱与多成分含量测定的益肾固精暖脐贴质量评价研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(1): 59-64.

整合指纹图谱与多成分含量测定的益肾固精暖脐贴 质量评价研究

廖卓^{1,2}, 包晴¹, 高元航¹, 李海英², 王璐², 唐林², 杨磊^{2*}

1. 湖南中医药大学第一临床学院, 湖南长沙 410007; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007

[摘要] **目的** 建立益肾固精暖脐贴高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱,并测定不同批次益肾固精暖脐贴中6种成分(桂皮醛、丁香酚、羟基- α -山椒素、羟基- β -山椒素、母丁香酚、蛇床子素)的含量,为益肾固精暖脐贴质量控制提供参考。**方法** 采用高效液相色谱法建立15批益肾固精暖脐贴指纹图谱,进行相似度评价和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)筛选差异性成分,并对6种指标成分进行含量测定。**结果** 建立益肾固精暖脐贴HPLC指纹图谱及6种指标成分的含量测定方法,15个批次相似度范围为0.874-0.999,标定共有峰21个,指出6个色谱峰,筛选出12个差异性成分。15批益肾固精暖脐贴中6种成分含量稳定。**结论** 建立的益肾固精暖脐贴指纹图谱及6种成分的含量测定方法准确、稳定、重复性好,可用于益肾固精暖脐贴的质量控制。

[关键词] 益肾固精暖脐贴; 指纹图谱; 含量测定; 质量评价; 相似度评价; 正交偏最小二乘法-判别分析

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.01.008

Quality evaluation of Yishen Gujing Nuanqi Patch through integration of fingerprinting and multi-component content determination

LIAO Zhuo^{1,2}, BAO Qing¹, GAO Yuanhang¹, LI Haiying², WANG Lu², TANG Lin², YANG Lei^{2*}

1. The First Clinical School of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] **Objective** To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint for Yishen Gujing Nuanqi Patch (YSGJNQP) and to determine the content of six components (cinnamic aldehyde, eugenol, hydroxy- α -sanshool, hydroxy- β -sanshool, parent eugenol, and osthole) in different batches, so as to provide the reference for the quality control of YSGJNQP. **Methods** Fingerprints of 15 batches of YSGJNQP were established by HPLC. The similarity evaluation and orthogonal partial least square method-discriminant analysis (OPLS-DA) were used to screen out the differential components, and the content of six index components was determined. **Results** The HPLC fingerprint of YSGJNQP and the content determination method of the six index components were established. The similarity among 15 batches of samples ranged from 0.874 to 0.999, twenty-one common peaks and six chromatographic peaks were identified, and 12 differential components were screened out. The content of the six index components was found to be stable across the 15 batches of YSGJNQP. **Conclusion** The established HPLC fingerprint of YSGJNQP and the content determination method of its six components are accurate, stable, and reproducible. Consequently, it can be

[收稿日期] 2024-09-26

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2022JJ80094, 2024JJ6362); 湖南省卫生健康高层次人才项目(湘卫函[2024]43号)。

[通信作者] * 杨磊, 女, 主任药师, 硕士研究生导师, E-mail: 263649560@qq.com。

effectively used for the quality control of YSGJNQP.

[**Keywords**] Yishen Gujing Nuanqi Patch; fingerprint; content determination; quality evaluation; similarity evaluation; orthogonal partial least square method-discriminant analysis

本实验方剂选自《摄生秘剖》卷四中的固精益肾暖脐膏,处方主要由肉桂、母丁香、蛇床子、花椒、韭菜子、附子、硫黄、麝香组成^[1]。具有温补脾肾、兴阳起痿、固护肾精之功效,用于治疗男子精寒、阳事痿弱、白浊遗精等症。本课题组前期利用现代制剂技术对传统制剂进行改良,创新性将药物治疗、穴位治疗和灸法相结合,研制了一种新型穴位贴膏剂^[2]。

益肾固精暖脐贴由多种中药材组成中药复方制剂,每一味中药均含多种化学成分,各类成分之间相互作用从而形成了一个复杂的体系。单一或多指标性成分含量测定难以体现中药多成分整体作用优势。中药指纹图谱结合多指标成分定量可全面反映化学成分的信息,为中药质量控制的有效分析方法^[3-6]。化学模式识别技术可以对指纹图谱中的差异标志峰进行筛选^[7-8]。二者结合能更加系统、全面、准确地对益肾固精暖脐贴进行质量评价。

本研究采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)建立益肾固精暖脐贴指纹图谱,并结合相似度评价、正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least square method-discriminant analysis, OPLS-DA)对其进行整体性评价及差异标志物筛选,最后进行多指标性成分的含量测定,为益肾固精暖脐贴的质量标准提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪、Poroshell 120 色谱柱(4 μm , 4.6 mm \times 150 mm)、Agilent TC-C₁₈(5 μm , 4.6 mm \times 250 mm),均购自美国安捷伦科技有限公司;SK5200H 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);AUX-220 型分析天平(日本 SHIMADZU 公司)。

1.2 试剂与试药

肉桂(批号:230402,产地:河北)、母丁香(批号:230403,产地:安徽)、麝香(批号:2022YR185,产地:四川)、花椒(批号:230702,产地:湖南)、附子(批号:

230301,产地:甘肃)、蛇床子(批号:221201,产地:浙江)、硫黄(批号:230501,产地:云南)、韭菜子(批号:230603,产地:广西)均购自湖南南国药都饮片公司,经湖南中医药大学第一附属医院杨磊主任药师鉴定为正品。

益肾固精暖脐贴(批号:2023110201,2023110202,2023110301,2023110401,2023110801,2023110901,2023111101,2023111201,2023111301,2023111402,2023111403,2023111701,2023111702,2023111703,2023111801,湖南中医药大学第一附属医院制剂中心)。桂皮醛对照品(批号:110710-202223)、丁香酚对照品(批号:110725-201917)、母丁香酚对照品(批号:112065-202001)、蛇床子素对照品(批号:110822-202111)均购自中国食品药品检定研究院;羟基- α -山椒素对照品(批号:AFCD2611,成都埃法生物科技有限公司);羟基- β -山椒素对照品(批号:J19GB155243,上海源叶生物科技有限公司)。

色谱乙腈(批号:W51A1H,霍尼韦尔贸易有限公司);磷酸(批号:20211027,国药集团化学试剂有限公司);其余试剂均为分析纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱研究

2.1.1 色谱条件 Poroshell 120 色谱柱(4 μm , 4.6 mm \times 150 mm),流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱程序:0~20 min,10%~20% A;20~30 min,20% A;30~40 min,20%~30% A;40~50 min,30%~40% A;50~55 min,40%~50% A;55~65 min,50% A;65~71 min,50%~60% A;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;体积流量 1 mL/min;检测波长 0~40 min 为 322 nm,40~60 min 为 280 nm,60~71 min 为 322 nm;进样量 20 μL 。

2.1.2 溶液制备 混合对照品溶液的制备:精密称定桂皮醛、丁香酚、羟基- α -山椒素、羟基- β -山椒素、母丁香酚、蛇床子素对照品适量,用甲醇溶解配置成 3.675 mg/mL 桂皮醛、0.550 mg/mL 丁香酚、

0.190 mg/mL 羟基- α -山椒素、0.387 mg/mL 羟基- β -山椒素、0.021 mg/mL 母丁香酚、0.018 mg/mL 蛇床子素的混合对照溶液。

供试品溶液的制备:取 10 贴益肾固精暖脐贴,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加入 50 mL 的甲醇,超声提取 15 min,静置 12 h,用甲醇补足减失的重量,混匀提取液,取其上清液,使用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,即得。

2.1.3 方法学考察 精密度考察:选取益肾固精暖脐贴(批号:20231108),按“2.1.2”方法制备供试品溶液,连续进样 6 次,以 18 号峰作为参照峰,计算相对保留时间的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.09%~1.43%,相对峰面积 RSD 为 0.12%~6.61%,表明仪器精密度良好。

稳定性考察:选取益肾固精暖脐贴(批号:20231108),按“2.1.2”方法制备供试品溶液,按“2.1.1”色谱方法分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样分析,以 18 号峰作为参照峰,共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.03%~0.91%,相对峰面积 RSD 0.20%~6.10%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

重复性考察:选取益肾固精暖脐贴(批号:20231108),按“2.1.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,以 18 号峰作为基

峰,各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.07%~0.69%,相对峰面积 RSD 为 1.51%~8.82%,表明该方法重复性良好。

2.1.4 益肾固精暖脐贴 HPLC 指纹图谱的建立及相似度评价 取 15 批样品,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样,得到 15 批样品的 HPLC 色谱图(图 1),导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)进行分析,采用中位数法,时间窗宽度设置为 0.3 min,经多点校正后,进行 Mark 谱匹配,生成益肾固精暖脐贴共有模式的对照指纹图谱(图 2),共标定益肾固精暖脐贴 21 个共有峰。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)进行分析,选定 S5 色谱图为对照图谱,计算相似度。15 批样品指纹图谱与对照图谱的相似度为 0.874~0.999,表明各批次相似度较高,所建立的指纹图谱可以较全面地反映益肾固精暖脐贴整体质量。

2.2 OPLS-DA

为进一步确认不同批次益肾固精暖脐贴之间的差异性化学成分,采用 OPLS-DA 拟合模型,以变量重要性投影(variable importance projected value, VIP) > 1.0 为标准,筛选出色谱峰 12 个(图 3)。通过对照品指认出峰 14 为桂皮醛、峰 19 为羟基- β -山椒素、峰 20 为丁香酚、峰 18 为羟基- α -山椒素(图 2)。

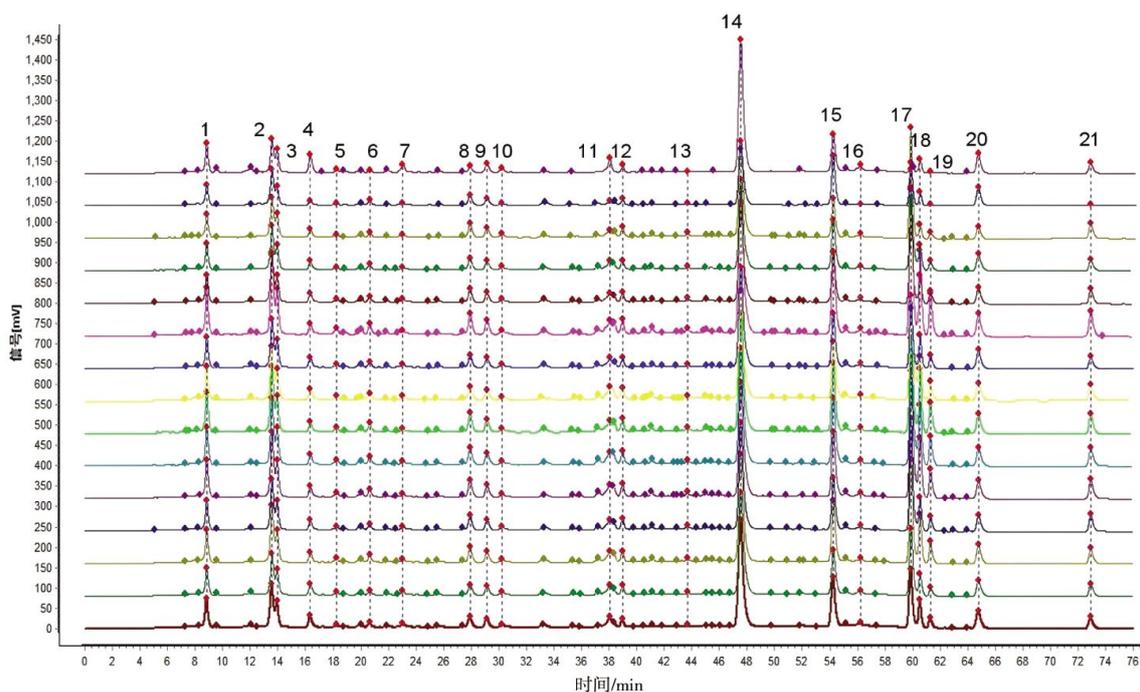


图 1 15 批益肾固精暖脐贴 HPLC 叠加指纹图谱

Fig.1 Overlapping HPLC fingerprints of 15 batches of YSGJNQP

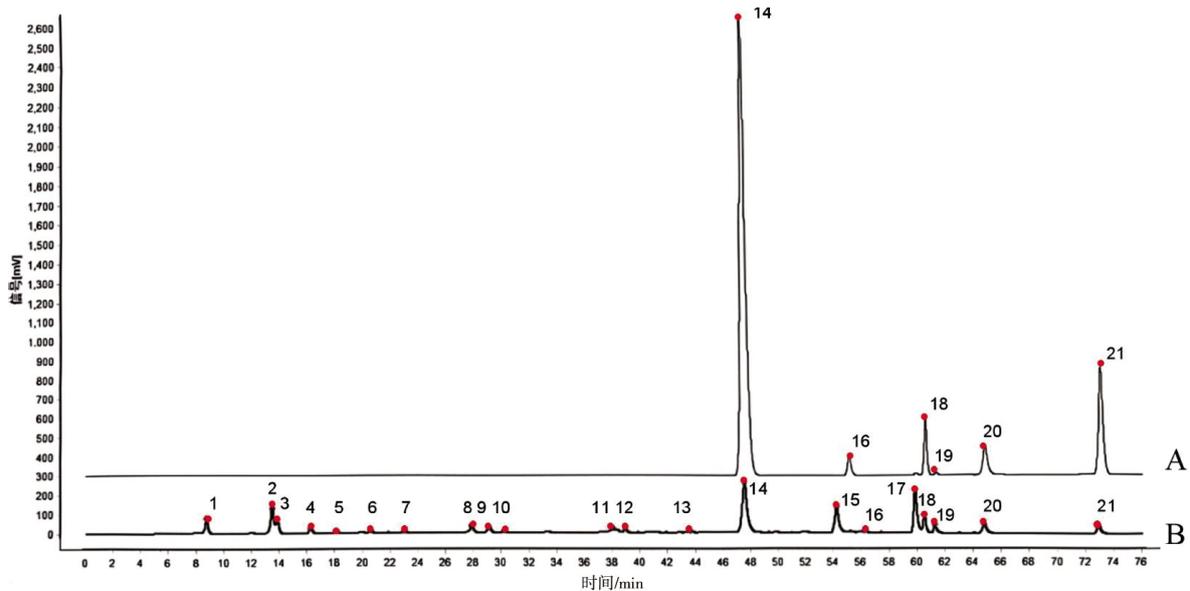


图 2 对照指纹图谱及混合对照品溶液叠加 HPLC 图

Fig.2 Overlapping HPLC chromatograms of reference fingerprint and mixed reference standards

注:14.桂皮醛;16.丁香酚;18.羟基- α -山椒素;19.羟基- β -山椒素;20.母丁香酚;21.蛇床子素;A.混合对照品;B.对照指纹图谱。

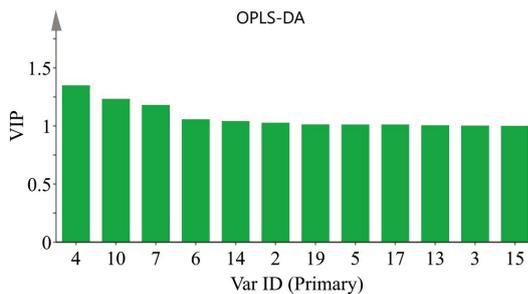


图 3 15 批益肾固精暖脐贴的 OPLS-DA 的 VIP 值图

Fig.3 OPLS-DA VIP values of 15 batches of YSGJNQP

2.3 益肾固精暖脐贴 6 种成分含量测定

2.3.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ (5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm), 流动相: 乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱程序: 0~20 min, 10%~20%A; 20~30 min, 20%A; 30~40 min, 20%~30%A; 40~50 min, 30%~40%A; 50~55 min, 40%~50%A; 55~65 min, 50%A; 65~71 min, 50%~60%A; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 流速: 1 mL/min; 检测波长 0~59 min 为 280 nm; 60 min 之后 322 nm; 进样量 20 μ L。

2.3.2 溶液的制备 混合对照品溶液和供试品溶液制备同“2.1.2”项方法。阴性样品溶液制备: 制备缺肉桂、缺母丁香、缺花椒、缺蛇床子的贴膏阴性样品, 按照供试品溶液制备方法制得阴性样品溶液。空白样品溶液制备: 制备不含药物成分的贴膏

空白样品, 按照供试品溶液制备方法制得空白样品溶液。

2.3.3 方法学考察 专属性考察: 取“2.3.2”项下制备的溶液, 按“2.3.1”的色谱条件进样, 由结果可知, 6 种成分色谱峰保留时间一致, 分离度良好, 且无阴性干扰。详见图 4。

线性关系考察: 精密吸取“2.3.2”项下制备混合对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL 置于 1 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 即得到系列质量浓度的对照品溶液。按照“2.3.1”项下色谱条件进行进样分析。以各成分进样质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y), 得 6 种成分的线性回归方程、 R^2 值及线性范围, 结果见表 1。由结果可知, 在一定质量浓度范围内, 6 种成分线性关系均良好。

表 1 6 种成分线性关系考察

指标成分	回归方程	R^2	线性范围/ μ g
桂皮醛	$y=7\ 485.500\ 0x-9.413\ 8$	0.999 8	4.20~42.03
丁香酚	$y=748.240\ 0x-0.591\ 2$	0.999 8	0.85~8.55
羟基- α -山椒素	$y=2\ 738.600\ 0x-2.013\ 2$	0.999 8	0.35~3.56
羟基- β -山椒素	$y=1\ 172.900\ 0x-0.820\ 3$	0.999 8	0.55~5.51
母丁香酚	$y=9\ 081.900\ 0x+6.362\ 7$	0.999 8	0.25~2.54
蛇床子素	$y=1\ 716.700\ 0x-1.709\ 9$	0.999 8	0.04~0.48

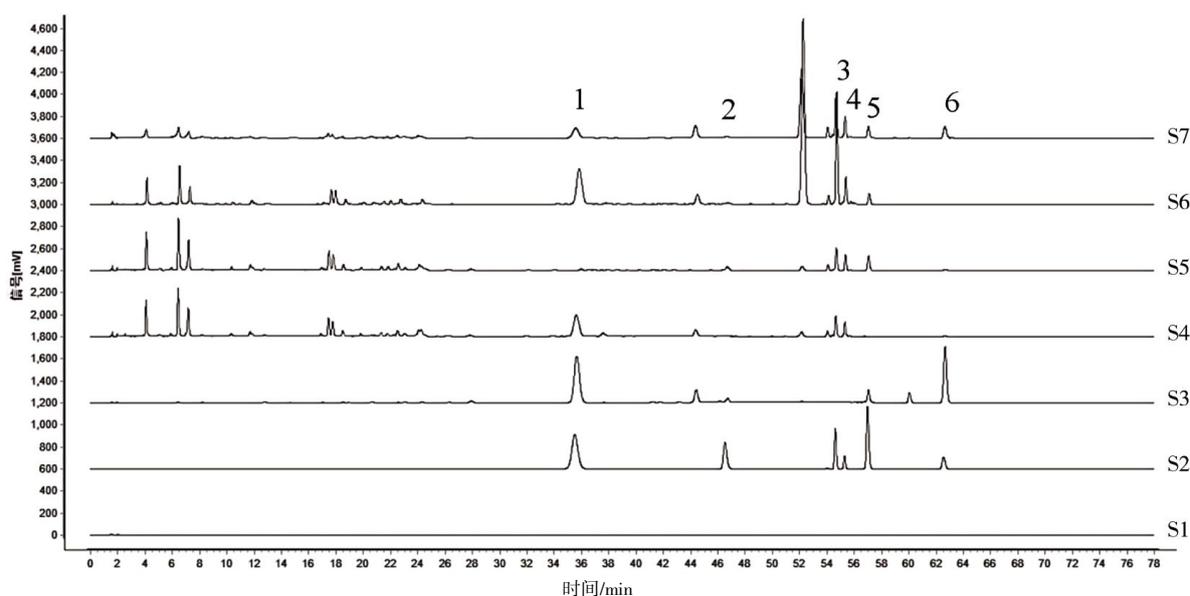


图4 专属性考察色谱图

Fig.4 Chromatograms for specificity evaluation

注: S1. 空白样品; S2. 混合对照; S3. 缺花椒阴性样品; S4. 缺母丁香阴性样品; S5. 缺肉桂阴性样品; S6. 缺蛇床子阴性样品; S7. 供试品溶液。1. 桂皮醛; 2. 丁香酚; 3. 羟基- α -山椒素; 4. 羟基- β -山椒素; 5. 母丁香酚; 6. 蛇床子素。

精密度考察:取同一批次贴膏,按照“2.3.2”项下方法制备成供试品溶液,按照“2.3.1”项下色谱条件连续进样6次,结果显示桂皮醛、丁香酚、羟基- α -山椒素、羟基- β -山椒素、母丁香酚、蛇床子素峰面积RSD分别为0.68%、0.96%、0.97%、0.86%、0.90%、0.82%。表明仪器精密度良好。

稳定性考察:取同一批次贴膏,按照“2.3.2”项下方法制备成供试品溶液,按照“2.3.1”项下色谱条件,分别于0、2、4、8、12、24 h进样测定,结果显示桂皮醛、丁香酚、羟基- α -山椒素、羟基- β -山椒素、母丁香酚、蛇床子素峰面积RSD分别为0.68%、1.31%、0.40%、0.35%、0.66%、0.44%。表明供试品溶液在24 h内的稳定性良好。

重复性考察:取同一批次的贴膏,按照“2.3.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,按照“2.3.1”项下色谱条件进行进样测定。结果显示桂皮醛、丁香酚、羟基- α -山椒素、羟基- β -山椒素、母丁香酚、蛇床子素含量RSD分别为2.37%、1.80%、0.15%、0.76%、0.65%、0.20%。表明该方法重复性良好。

加样回收率考察:取同一批贴膏6份,精密称定,按照质量浓度1:1的比例加入6种对照品,依据“2.3.2”项下操作方法进行供试品溶液的制备,再依据“2.3.1”项下色谱条件进行测定。结果显示桂皮醛、丁香酚、羟基- α -山椒素、羟基- β -山椒素、母丁香

酚、蛇床子素的平均加样回收率分别为100.71%、94.73%、99.74%、103.80%、94.01%、97.24%;RSD分别为0.36%、0.24%、2.29%、2.69%、0.52%、0.52%。表明该方法准确可靠。

2.3.4 样品含量测定 取15批样品,按照“2.3.2”项下方法制备成供试品溶液,按照“2.3.1”项下色谱条件进行检测,每批样品平行测定3次,记录峰面积,并计算每批贴膏中桂皮醛、丁香酚、羟基- α -山椒素、羟基- β -山椒素、母丁香酚、蛇床子素的含量,结果见表2。每1 g本品桂皮醛、丁香酚、羟基- α -山椒素、羟基- β -山椒素、母丁香酚、蛇床子素的平均含量分别为3.735、0.166、0.152、0.321、0.030、0.022 mg/g。

3 讨论

中药多指标成分整体质量控制已成为中药质量控制的必然发展趋势,中药指纹图谱能够反应方剂所含成分,揭示成分的特征性、溯源性及可测性,具有整体性与动态性的特点,是一种有效的质量评价方法。本研究基于15批样品建立了益肾固精暖脐贴的HPLC指纹图谱及其6种指标成分的含量测定方法,通过相似度分析初步评价了15批样品的相似性,标定共有峰21个,结合OPLS-DA进一步筛选出12个特征峰,指认其中6个共有成分。

方中蛇床子的主要有效成分蛇床子素能够有效

表 2 各成分含量测定结果($n=3$, mg/g)Table 2 Results of content determination of each component ($n=3$, mg/g)

批次	桂皮醛	丁香酚	羟基- α -山椒素	羟基- β -山椒素	母丁香酚	蛇床子素
2023110201	3.777	0.152	0.112	0.202	0.031	0.018
2023110202	3.703	0.149	0.088	0.166	0.027	0.020
2023110301	3.710	0.172	0.185	0.406	0.030	0.023
2023110401	3.637	0.172	0.123	0.283	0.027	0.025
2023110801	4.142	0.191	0.242	0.557	0.032	0.030
2023110901	4.228	0.226	0.251	0.573	0.033	0.030
2023111101	4.154	0.203	0.257	0.586	0.033	0.030
2023111201	3.929	0.182	0.180	0.373	0.030	0.024
2023111301	3.506	0.146	0.131	0.251	0.029	0.018
2023111402	3.412	0.155	0.108	0.236	0.026	0.022
2023111403	3.158	0.137	0.100	0.192	0.028	0.016
2023111701	3.028	0.141	0.052	0.136	0.021	0.023
2023111702	2.166	0.088	0.050	0.031	0.029	0.002
2023111703	4.512	0.133	0.053	0.032	0.031	0.017
2023111801	4.965	0.241	0.344	0.796	0.037	0.038
平均值	3.735	0.166	0.152	0.321	0.030	0.022

地补肾壮阳,改善肾阳虚证^[9];肉桂的主要药效物质为挥发油类,其中桂皮醛具有改善勃起功能的作用^[10-11];母丁香广泛应用于治疗肾虚阳痿,2020版《中华人民共和国药典》^[12]对其进行质量控制的指标性成分主要是丁香酚和母丁香酚^[13-14]。花椒的药效成分山椒素具有温中作用,且有较高的生物利用度^[15]。因此,筛选出桂皮醛、丁香酚、母丁香酚、羟基- α -山椒素、羟基- β -山椒素、蛇床子素这6种成分可作为益肾固精暖脐质量控制的指标成分。

综上,本研究建立的指纹图谱和含量测定方法可对益肾固精暖脐贴的内在质量进行整体性评价,该方法重复性、稳定性好,可为益肾固精暖脐贴的质量分析、评价与控制提供科学依据。

参考文献

- [1] 摄生秘剖[M]/牛亚华. 栖芬室藏中医典籍精选: 第二辑[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2017.
- [2] 包晴, 高元航, 廖卓, 等. 益肾固精暖脐贴制备工艺的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(6): 1018-1026.
- [3] 郭浩川, 王杰敏, 张玉玲, 等. 经典名方升陷汤配方颗粒与水煎液的 HPLC 指纹图谱相关性研究[J]. 时珍国医国药, 2024, 35(3): 633-637.
- [4] 杨新雪, 梁进京, 董蕊. 柴胡-白芍药对配方颗粒指纹图谱的建立及多指标性成分含量测定[J]. 天然产物研究与开发, 2024,

36(4): 572-580.

- [5] 吴淑辉, 刘娟, 肖婷, 等. 丹润方 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(10): 1822-1829.
- [6] 叶彬, 闫小巧, 雷婷, 等. 葛根药材 HPLC 指纹图谱与 6 种成分含量测定研究[J]. 中草药, 2023, 54(24): 8222-8227.
- [7] 孙立丽, 王萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展[J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345.
- [8] 闫艳, 葛雨竹, 张小倩, 等. 基于指纹图谱的化学模式识别法和多指标测定评价枸杞不同部位的差异性[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(7): 1193-1202.
- [9] 李军山, 李雪利, 高杰, 等. 基于蛇床子配方颗粒的标准汤剂质量标准[J]. 世界中医药, 2020, 15(14): 2043-2047, 2052.
- [10] 杨亚玲, 罗碧, 张红, 等. 肉桂质量研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(12): 2792-2799.
- [11] ONDER A, YILMAZ-ORAL D, JERKOVIC I, et al. Evaluation of relaxant responses properties of cinnamon essential oil and its major component, cinnamaldehyde on human and rat corpus cavernosum[J]. International Braz J Urol, 2019, 45(5): 1033-1042.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 22.
- [13] 周长征. 丁香柿蒂片的质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 80-83.
- [14] 杨洁瑜. 母丁香质量标准研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [15] 张萌萌, 王丹, 魏大能, 等. 基于血清药物化学的花椒温中止痛的质量标志物研究[J]. 中草药, 2022, 53(9): 2731-2739.

(本文编辑 苏维)