

[18] Luo S Q, Lin L Z, Cordell G A, *et al.* Polyoxypregnanes from *Marsdenia tenacissima*[J]. *Phytochemistry*, 1993, 34 (6): 1615-1620.

[19] Zeng Q H, Zhang F, Gao S H, *et al.* Simultaneous determination of six C21 steroids of Xiao-Ai-Ping injection in rat plasma by LC-MS/MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(2): 223-230.

[20] 胡 超, 赵洪庆, 刘 检, 等. 基于谱效关系及活性验证的百合地黄汤抗抑郁成分研究[J]. *药学学报*, 2024, 59(5): 1364-1373.

[21] 涂济源, 柯 畅, 王 燕, 等. 子芩与枯芩 UPLC 指纹图谱建立及抗炎作用的谱效关系研究[J]. *中药材*, 2023, 46(6): 1454-1461.

[22] 孙 飞, 吴相亲, 戚 悦, 等. 基于偏最小二乘算法探究山楂和焦山楂消食健脾功效成分[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(4): 958-965.

[23] 孔欠文, 胡玉洁, 薛晓川, 等. 通关藤中 4 种 C₂₁甾体化合物逆转卵巢癌细胞紫杉醇耐药的作用评价[J]. *中国药学杂志*, 2022, 57(9): 706-717.

[24] Li D, Li C P, Song Y Z, *et al.* *Marsdenia tenacissima* extract and its functional components inhibits proliferation and induces apoptosis of human Burkitt leukemia/lymphoma cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Leuk Lymphoma*, 2016, 57(2): 419-428.

[25] 薛红利, 黄学娣, 何 东, 等. 通光藤提取物对血液肿瘤细胞株增殖和凋亡的影响[J]. *四川大学学报 (医学版)*, 2012, 43(2): 174-179.

[26] 徐园园, 王明慧, 魏永利, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker) 的科学计量分析[J]. *中草药*, 2024, 55(4): 1297-1308.

[27] 白 钢, 张铁军, 刘昌孝, 等. 基于监管科学的中药质量评价方法的整合研究思路和发展方向[J]. *中草药*, 2022, 53(20): 6313-6318.

基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别评价十五味龙胆花丸质量

邱 毅¹, 德 央¹, 郭丽萍¹, 王 涛², 达娃卓玛¹, 李文兵², 兰 钧^{1*}
[1. 西藏自治区食品药品检验研究院, 国家药品监督管理局中药 (藏药) 质量控制重点实验室, 西藏拉萨 850000; 2. 西南民族大学, 青藏高原民族药用资源保护与利用国家民委重点实验室, 四川省羌彝药用资源保护与利用技术工程实验室, 四川 成都 610225]

摘要: **目的** 评价十五味龙胆花丸质量。**方法** 建立 HPLC 指纹图谱, 分析采用 Agilent 5 HC C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 0.1% 磷酸-乙腈, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 254 nm, 再进行主成分分析、聚类分析。**结果** 8 个厂家 115 批样品中有 9 个共有峰, 除 3 个厂家个别样品外, 同一厂家不同批次的相似度均大于 0.950, 而不同厂家的在 0.903~0.986 之间。2 个主成分累积方差贡献率为 74.899%, 各厂家样品根据不同距离聚为 2 类、3 类或 4 类。**结论** HPLC 指纹图谱结合化学模式识别稳定可靠, 可为十五味龙胆花丸的质量控制提供参考。

关键词: 十五味龙胆花丸; 质量评价; HPLC 指纹图谱; 主成分分析; 聚类分析

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2025)07-2332-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.07.031

十五味龙胆花丸为藏医经典方剂, 记载于《藏医医诀补遗》^[1], 由白花龙胆、檀香、诃子等 15 味中藏药材组成, 具有清热理肺、止咳化痰之功, 用于支气管炎、肺气肿、咳嗽气喘、声音嘶哑的治疗^[2], 对慢性支气管炎^[3]、咳嗽变异性哮喘^[4-5]临床效果显著。目前, 国内有 8 个厂家生产十五味龙胆花丸, 但该制剂现行法定标准较简单, 仅规定了性状^[6], 难以对其质量进行有效控制和评价。因此, 本实验建立十五龙胆花丸 HPLC 指纹图谱, 并采用主成分分析、聚类分析进行化学模式识别, 以期为该制剂质量评价

提供参考。

1 材料

1.1 仪器 Waters 2695-2998 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); ME55 型电子天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); GWB-1T/2T 型超纯水器 (北京普析通用仪器有限责任公司); KQ5200DB 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与药物 丁香酚 (批号 110725-202318, 纯度 99.6%)、甘草酸铵 (批号 110731-202122, 纯度 94.4%)、

收稿日期: 2025-01-03
基金项目: 西藏自治区食品药品检验研究院-国家药品监督管理局中药 (藏药) 质量控制重点实验室资助项目 (XZSYJY-KY-2023-06)
作者简介: 邱 毅 (1994—), 男, 药师, 从事藏药质量标准及其质量控制研究。E-mail: 1124288110@qq.com
* 通信作者: 兰 钧 (1984—), 女, 主管药师, 从事藏药质量标准及其质量评价研究。E-mail: 623793676@qq.com

异荛草苷（批号 111974-201401，纯度 94.0%）、没食子酸（批号 110831-201906，纯度 91.5%）、柯里拉京（批号 111623-200302，纯度 95.0%）、鞣花酸（批号 111959-201903，纯度 88.8%）对照品均购于中国食品药品检定研究院；诃子联苯酸（批号 DST220831-064，纯度 98.0%）、诃子酸（批号 DST220420-065，纯度 98.0%）、异金雀花素（批号 DST220210-330，纯度 98.8%）对照品均购于成都德思特生物技术有限公司。乙腈为色谱纯；其余试剂均为分析纯；水为超纯水。十五味龙胆花丸共 115 批，来自 8 个厂家，由西藏自治区食品药品检定研究院收集，其中厂家 A 12 批、厂家 B 15 批、厂家 C 10 批、厂家 D 28 批、厂家 E 25 批、厂家 F 11 批、厂家 G 5 批、厂家 H 9 批。

2 方法与结果

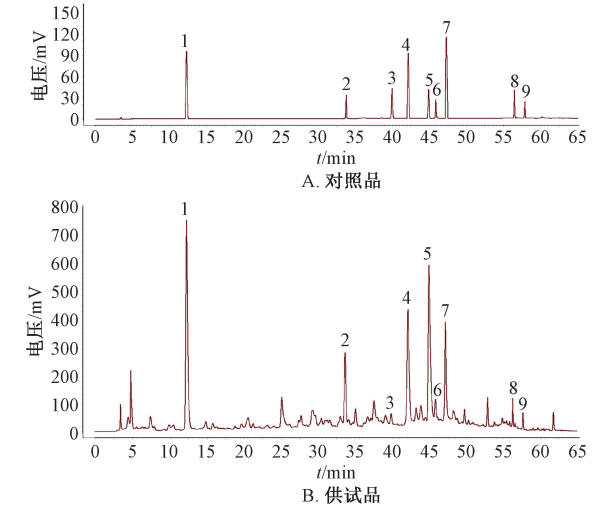
2.1 色谱条件 Agilent 5 HC C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0.1% 磷酸（B），梯度洗脱（0~5 min，2% A；5~40 min，2%~20% A；40~50 min，20%~35% A；50~60 min，35%~100% A；60~65 min，100% A）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 254 nm；进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液制备 取没食子酸、柯里拉京、异荛草苷、诃子联苯酸、异金雀花素、诃子酸、甘草酸铵、丁香酚、鞣花酸对照品适量，加 50% 甲醇制成每 1 mL 各含 0.1 mg 上述成分溶液，即得。

2.3 供试品溶液制备 取本品约 2.00 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入 25 mL 50% 甲醇，密塞，超声处理 30 min，放冷，50% 甲醇补足减失的质量，摇匀，滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 色谱峰归属 取对照品、供试品溶液适量，在“2.1”项色谱条件下进样测定，根据保留时间和紫外光谱图进行归属，共指出 9 种成分，见图 1。



1. 没食子酸 2. 柯里拉京 3. 异荛草苷 4. 诃子联苯酸
5. 鞣花酸 6. 异金雀花素 7. 诃子酸 8. 甘草酸铵 9. 丁香酚

图 1 色谱峰归属 HPLC 色谱图

2.4.2 精密度试验 取本品（批号 2022120202）适量，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，以峰 3（异荛草苷）为参照，测得各共有峰相对保留时间 RSD 为 0.31%~1.00%，相对峰面积 RSD 为 1.08%~2.79%，表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取本品（批号 2022120202）6 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，以峰 3（异荛草苷）为参照，测得各共有峰相对保留时间 RSD 为 0.32%~1.36%，相对峰面积 RSD 为 0.93%~3.66%，表明该方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取本品（批号 2022120202）6 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，于 0、4、8、16、32 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，以峰 3（异荛草苷）为参照，测得各共有峰相对保留时间 RSD 为 0.29%~1.20%，相对峰面积 RSD 为 0.39%~3.64%，表明溶液在 32 h 内稳定性良好。

2.5 化学计量学研究

2.5.1 相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”（2012 年版），以厂家 A 样品（S1）为参照，选择平均数法，设定时间窗宽度为 0.1 min，经多点校正后进行 Mark 峰匹配，生成对照图谱，计算相似度。

2.5.1.1 同一厂家不同批次样品 表 1、图 2 显示，除厂家 A 有 1 批样品相似度为 0.909，厂家 C 有 1 批样品相似度为 0.929，厂家 H 有 1 批样品相似度为 0.876 外，8 个厂家不同批次样品的均在 0.950 以上，表明其质量具有较好的一致性。

表 1 同一厂家不同批次十五味龙胆花丸相似度测定结果								
序号	D	E	B	A	F	C	H	G
1	0.970	0.969	0.973	0.909	0.970	0.929	0.876	0.984
2	0.973	0.969	0.990	0.985	0.970	0.976	0.975	0.991
3	0.982	0.972	0.991	0.991	0.972	0.978	0.985	0.996
4	0.998	0.973	0.993	0.993	0.973	0.979	0.988	0.997
5	0.998	0.984	0.993	0.995	0.981	0.982	0.992	0.999
6	0.998	0.986	0.994	0.996	0.990	0.983	0.995	
7	0.998	0.989	0.996	0.997	0.993	0.989	0.996	
8	0.998	0.991	0.996	0.997	0.994	0.993	0.997	
9	0.998	0.991	0.996	0.997	0.994	0.994	0.999	
10	0.999	0.991	0.996	0.997	0.994	0.998		
11	0.999	0.993	0.996	0.998	0.997			
12	0.999	0.995	0.997	0.999				
13	0.999	0.995	0.997					
14	0.999	0.995	0.998					
15	0.999	0.996	0.998					
16	0.999	0.996						
17	0.999	0.996						
18	0.999	0.997						
19	0.999	0.997						
20	0.999	0.997						
21	0.999	0.997						
22	0.999	0.998						
23	0.999	0.998						
24	1.000	0.998						
25	1.000	0.999						
26	1.000							
27	1.000							
28	1.000							

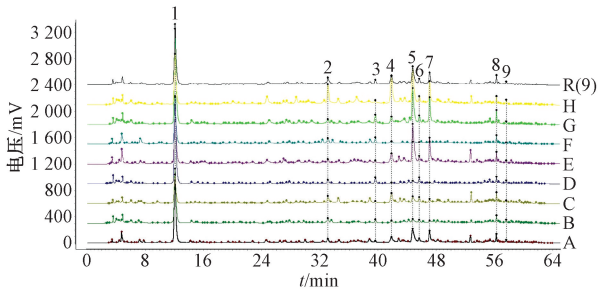


图 2 不同厂家十五味龙胆花丸 HPLC 指纹图谱

2.5.1.2 不同厂家样品 表 2 显示，不同厂家样品相似度为 0.903~0.986，表明其质量存在一定的差异。

表 2 不同厂家十五味龙胆花丸相似度测定结果

厂家	G	B	E	C	D	A	F	H	R
G	1.000	0.977	0.875	0.913	0.972	0.930	0.975	0.777	0.971
B	0.977	1.000	0.813	0.938	0.987	0.880	0.978	0.732	0.944
E	0.875	0.813	1.000	0.879	0.768	0.988	0.840	0.956	0.955
C	0.913	0.938	0.879	1.000	0.906	0.921	0.941	0.877	0.958
D	0.972	0.987	0.768	0.906	1.000	0.842	0.981	0.678	0.919
A	0.930	0.880	0.988	0.921	0.842	1.000	0.899	0.944	0.986
F	0.975	0.978	0.840	0.941	0.981	0.899	1.000	0.771	0.957
H	0.777	0.732	0.956	0.877	0.678	0.944	0.771	1.000	0.903
R	0.971	0.944	0.955	0.958	0.919	0.986	0.957	0.903	1.000

2.5.2 主成分分析 将共有峰峰面积导入 SPSS 23.0 软件，采用降维因子分析，以特征值>1 为提取原则，结果见表 3，碎石图见图 3。由此可知，特征值>1 的主成分有 2 个，累积方差贡献率为 74.899%；除峰 3（异荭草苷）、6（异金雀花素）、8（甘草酸铵）、9（丁香酚）外，其余 5 个共有峰（没食子酸、柯里拉京、诃子联苯酸、鞣花酸、诃子酸）的公因子方差均在 0.808 以上，可作为造成不同厂家样品差异的主要因素。

表 3 主成分载荷矩阵、公因子方差

峰号	载荷矩阵		公因子方差
	主成分 1	主成分 2	
1	0.320	0.840	0.808
2	0.684	-0.637	0.873
3	0.657	0.189	0.467
4	0.850	-0.409	0.890
5	0.966	0.212	0.977
6	0.805	-0.164	0.676
7	0.954	0.178	0.942
8	0.465	0.674	0.671
9	0.601	-0.275	0.437
特征值	4.792	1.949	—
方差贡献率/%	53.249	21.651	—
累积方差贡献率/%	53.249	74.899	—

主成分得分图见图 4。由此可知，厂家 B、C、D 样品接近，厂家 A、E、G 样品接近，厂家 F、H 样品与其他厂家样品距离较远。

2.5.3 聚类分析 将共有峰峰面积导入 SPSS 23.0 软件，采用组建连接-块区间度量标准法进行分析，结果见图 5。

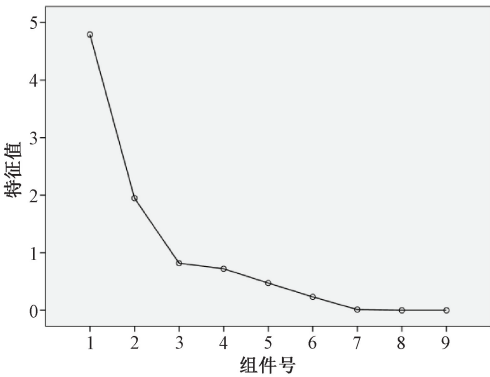


图 3 主成分分析碎石图

由此可知，5≤距离<9 时，8 个厂家样品可分为 4 类；9≤距离<24 时，8 个厂家样品可分为 3 类，即厂家 B、C、D、F 为 1 类，厂家 A、E、G 为 1 类，厂家 H 为 1 类；距离≥24 时，8 个厂家样品可分为 2 类，即厂家 B、C、D、F 为 1 类，厂家 A、E、G、H 为 1 类，与主成分分析基本一致。

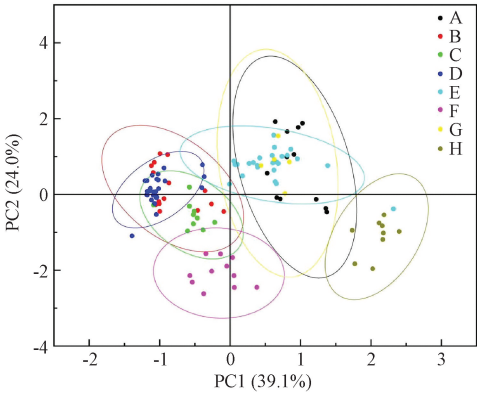


图 4 主成分分析得分图

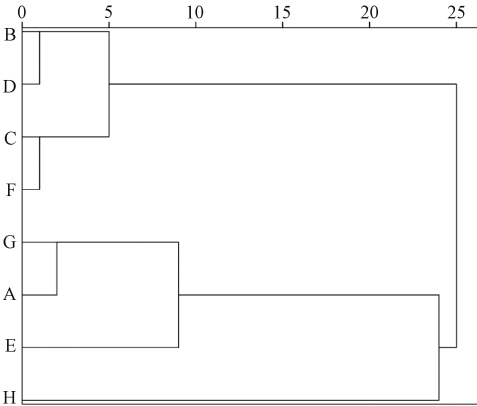
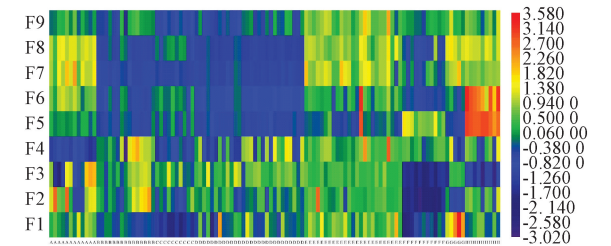


图 5 聚类分析图

采用 Origin 2018 软件，以 Z 分数 [标准化为 $N(0, 1)$] 法共有峰峰面积进行归一化处理，并绘制热图，见图 6。由此可知，厂家 A、E 样品相近，厂家 B、D 样品相近；厂家 F 样品中峰 2（柯里拉京）、3（异荭草苷）含量明显低于其他厂家样品中，与厂家 C 样品相近；厂家 H 样品中峰 5（鞣花酸）、6（异金雀花素）含量明显高于其他

厂家样品中；厂家 G 样品中峰 1（没食子酸）含量明显高于其他厂家样品中，与主成分分析基本一致。



注：横坐标为 8 个厂家 115 批十五味龙胆花丸，纵坐标为共有峰峰面积。颜色深浅反映对应成分含量高低。

图 6 聚类热图

3 讨论

目前，关于十五味龙胆花丸质量控制的研究主要集中在显微鉴别^[7]、含量测定^[8-11]、药理作用^[12]等方面，缺乏整体质量分析与评价。另外，不同地区、企业生产十五味龙胆花丸时，所用的诃子、毛诃子及余甘子存在药用部位（去核或不去核）等方面差异^[13-18]，可能会对没食子酸、柯里拉京、鞣花酸等成分的含量产生影响^[19-21]。

本实验所建立的 115 批十五味龙胆花丸 HPLC 指纹图谱中有 9 个色谱峰，由 11 味中藏药材贡献，占整个组方药味的 78.6%。化学计量学研究表明，不同厂家十五味龙胆花丸相似度在 0.903~0.986 范围内，表明该制剂质量有一定的差异；2 个主成分累积方差贡献率为 74.899%，能揭示大部分差异信息；在 5≤距离<9、9≤距离<24、距离≥24 时，各批样品分别可聚为 4、3、2 类，上述结果相互印证，提示指纹图谱稳定可靠。另外，没食子酸、柯里拉京、诃子联苯酸、鞣花酸、诃子酸对不同企业十五味龙胆花丸质量的影响较大，可能是由于药用部位（去核或不去核）、产地等方面差异所致，导致其一致性产生分离。

参考文献：

[1] 第司桑杰嘉措. 藏医医诀补遗[M]. 西宁：青海民族出版社，2009.

[2] 杨培民，孙洪胜，姚 莉，等. 最新中成药手册[M]. 济南：山东科学技术出版社，2014.

[3] 张 亚. 藏药十五味龙胆花丸治疗慢性支气管炎的临床效果[J]. 中国民族医药杂志，2022，28(3)：12-14.

[4] 张 琦. 十五味龙胆花丸与西药联用治疗成人咳嗽变异性哮喘 57 例分析[J]. 青海医药杂志，2011，41（12）：

58-59.

[5] 仁欠多杰. 藏药十五味龙胆花丸治疗咳嗽变异性哮喘的临床观察[J]. 世界最新医学信息文摘，2018，18(91)：169.

[6] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准（藏药）[S]. 1995：196.

[7] 杨书阁，霍生青. 十五味龙胆花丸的显微鉴别[J]. 青海医药杂志，2014，44(5)：65-66.

[8] 苏 健. 高效液相色谱法测定十五味龙胆花丸中没食子酸的含量[J]. 时珍国医国药，2004，15(10)：650-651.

[9] 张幸福. 高效液相色谱法测定十五味龙胆花丸中甘草酸的含量[J]. 药物分析杂志，2009，29(4)：653-655.

[10] 程 民. 高效液相色谱法测定十五味龙胆花丸中原儿茶酸含量[J]. 中国药业，2011，20(16)：31-32.

[11] 张 妍，丁永辉，张晓萍，等. HPLC 法测定十五味龙胆花丸中龙胆苦苷和丁香酚[J]. 中成药，2011，33(12)：2094-2097.

[12] 贺 平，朱晓莉，刘 航，等. 藏药十五味龙胆花丸的体外抑菌活性研究[J]. 中国民族民间医药，2016，25(2)：3-5.

[13] 李 奕，赵文舟，吉彦成，等. 苏合香丸中诃子的药用部位及炮制异同文献研究[J]. 北京中医药大学学报，2024，47(8)：1081-1088.

[14] 李 琼，汪付田，张 琳. 诃子去核对药典品种洁白丸疗效的影响[J]. 甘肃中医，2006，19(9)：45-46.

[15] 李雪冬，潘烨华，田雨闪，等. 余甘子的本草考证及其现代研究中若干问题的探讨[J]. 中草药，2022，53（18）：5873-5883.

[16] 佚名. 太平惠民合剂局方[M]. 北京：人民卫生出版社，2007：224；226.

[17] 倪朱谟. 本草汇言[M]. 北京：人民卫生出版社，2005：372；373.

[18] 阿如罕，张金渝，韩国庆，等. 经典名方中诃子的本草考证[J/OL]. 中国实验方剂学杂志，1-15（2024-09-05）[2024-12-25]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20250465>.

[19] 梁文仪，张秋楠，常子豪，等. 余甘子药材及去核饮片质量标准修订研究[J]. 中国药学杂志，2021，56（19）：1600-1606.

[20] 陆礼和，梁建平，田素梅，等. HPLC 指纹图谱结合 4 种指标含量测定的余甘子质量评价研究[J]. 化学试剂，2024，46(11)：81-89.

[21] 常 安，王 巍，张婷婷，等. HPLC 测定诃子全果、果肉及果核中没食子酸的含量[J]. 广州化工，2014，42（7）：93-95.