

热痹痛合剂 HPLC 指纹图谱的建立和芍药苷、柚皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI 的测定

邱琼华, 李隽永, 韦倩, 毛桂福*

柳州市中医医院 (柳州市壮医医院), 广西 柳州 54500

摘要: 目的 建立热痹痛合剂的 HPLC 指纹图谱和热痹痛合剂中芍药苷、柚皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI 的 HPLC 测定方法。方法 指纹图谱分析采用 Agilent 1260 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.2%磷酸溶液为流动相, 梯度洗脱; 检测波长为 212 nm; 体积流量为 1 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL。对指纹图谱进行相似度评价, 并运用聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘法-判别分析分析热痹痛合剂样品图谱。采用 HPLC 法测定芍药苷、柚皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI, 采用 Agilent 1260 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.2%磷酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长 230 nm (芍药苷)、280 nm (柚皮苷、黄芩苷)、260 nm (川续断皂苷 VI); 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量为 10 μL。结果 10 批热痹痛合剂样品的指纹图谱中有 26 个共有峰, 相似度均大于 0.99, 化学模式识别将 10 批样品分为 2 大类, OPLS-DA 分析筛选出 4 个对制剂质量差异影响较大的化合物。含量测定中芍药苷、柚皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI 分别在 27.238~272.384、38.207~382.066、77.864~778.642、51.015~510.015 μg/mL 线性良好, 平均回收率分别为 95.34%、103.51%、103.51%、102.68%, RSD 值分别 0.65%、1.12%、0.86%、2.41%。结论 所建立的方法准确、合理, 重复性好, 可用于热痹痛合剂的质量控制和评价。

关键词: 热痹痛合剂; 指纹图谱; 相似度评价; 聚类分析; 芍药苷; 柚皮苷; 黄芩苷; 川续断皂苷 VI; 高效液相色谱
中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)04-0737-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.04.009

Establishment of HPLC fingerprint of Rebitong Mixture and determination of paeoniflorin, naringin, baicalin, and asperosaponin VI

QIU Qiong-hua, LI Juan-yong, WEI Qian, MAO Gui-fu

Liuzhou Traditional Chinese Medical Hospital (Liujicouh Si Ywcuengh YihYen), Liuzhou 545001, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of Rebitong Mixture and to simultaneously determine the contents of paeoniflorin, naringin, baicalin, and asperosaponin VI in Rebitong Mixture by HPLC method. **Methods** The fingerprint analysis was adopted on Agilent 1260 C₁₈ (250 mm × 4.6mm, 5 μm) with the mobile phase consisted of acetonitrile - 0.2% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 212 nm with column temperature 30 ℃. Similarity of fingerprints was evaluated, and cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were used to analyze the sample patterns. The contents of paeoniflorin, naringin, baicalin, and asperosaponin VI in Rebitong Mixture were determined by HPLC method on Agilent 1260 C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). Acetonitrile - 0.2% phosphoric acid was used as the mobile phase by gradient elution. The detection wavelength were 230 nm for paeoniflorin, 280 nm for naringin and baicalin, and 260 nm for asperosaponin VI. The flow rate was 1 mL/min, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** There were 26 common peaks in the fingerprints of 10 batches of Rebitong Mixture samples, and the similarity was all above 0.99. The 10 batches of samples were divided into 2 categories with chemical pattern recognition, and four peaks that had a greater impact on the quality of preparations were selected by OPLS-DA analysis. The linearity of paeoniflorin, naringin, baicalin, and asperosaponin VI was 27.238 — 272.384, 38.207 — 382.066, 77.864 — 778.642, 51.015 — 510.015 μg/mL, and the average recoveries were 95.34%, 103.51%, 103.51%, and 102.68% with RSD values of 0.65%, 1.12%, 0.86%,

收稿日期: 2022-01-30

基金项目: 广西中医药壮瑶医药院内制剂孵化基地项目 (桂中医药发[2021]7 号)

作者简介: 邱琼华 (1987—), 女 (侗族), 广西柳州人, 主管中药师, 从事中药及中药制剂质量控制、新制剂研发。E-mail: 651068882@qq.com

*通信作者: 毛桂福, 主任药师, 主要从事新制剂研发及质量控制。E-mail: maogf2005@sina.com

and 2.41%, respectively. **Conclusion** The method is accurate, reasonable, and reproducible, and can be used for the quality control and evaluation of Rebitong Mixture.

Key words: Rebitong Mixture; fingerprints; acquaintance evaluation; cluster analysis; paeoniflorin; naringin; baicalin; asperosaponin VI; HPLC

热痹痛合剂为柳州市中医医院的院内制剂,已注册使用 20 多年,处方由赤芍、黄芪、厚朴、桑寄生、续断、薏苡仁、绵茵陈、生地黄、黄芩、天冬、麦冬等 16 味中药组成,具有清热养血、利湿通络、补益肝肾的功效,临床上用于热邪炽盛所致的风湿性关节炎、类风湿性关节炎、颈椎病、腰痛等症。该制剂由于申报时间较早,质量标准缺乏有效的质量控制指标,难以对制剂质量进行控制和评价。指纹图谱具有系统性、整体性等优点,能客观、全面地反映中药制剂的化学信息,同时结合相似度评价、CA、PCA、OPLS-DA 等化学计量分析方法可直观地反映制剂不同批次间的质量差异,可为复方中关键质量化合物的研究提供参考^[1-4]。此外,特征性成分的含量测定是质量标准的核心^[5-6]。因此本实验建立热痹痛合剂的指纹图谱和主要指标成分芍药苷、柚皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI 的测定方法,为该制剂的全面质量控制和产品质量、稳定性评价提供参考。

1 仪器与试药

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (Agilent 公司); SQP 电子分析天平 (Sartorius 公司); KQ-800DE 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); GWB-1 超纯水机 (北京普析)。

绿原酸 (批号 MUST-21070910, 质量分数 99.4%)、芍药苷 (批号 MUST-20110118, 质量分数 98.69%)、毛蕊异黄酮-7-O-葡萄糖苷 (批号 MUST-21030920, 质量分数 99.86%)、柚皮苷 (批号 MUST-20041803, 质量分数 98.06%)、新橙皮苷 (批号 MUST-20041707, 质量分数 98.08%)、黄芩苷 (批号 MUST-20030408, 质量分数 98.58%)、川续断皂苷 VI (批号 MUST-21012211, 质量分数 98.95%) 对照品均购于成都曼斯特生物科技有限公司,乙腈 (弗顿) 为色谱纯,磷酸 (成都科龙) 为分析纯。

热痹痛合剂共 10 批,批号分别为 20181201、20190601、20190901、20191101、20200201、20200701、20210201、20210701、20211001、20211101,均为柳州市中医医院制剂室配制,规格为 250 mL/瓶。制剂所用原料均为中药饮片,原料饮片产地、等级信息完备,经本院唐凤岚副主任中

药师鉴定为正品。

2 HPLC 指纹图谱的建立

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液的制备 精密量取 5 mL 热痹痛合剂置 25 mL 量瓶中,加纯化水至刻度,摇匀,以 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称取绿原酸、芍药苷、毛蕊异黄酮-7-O-葡萄糖苷、柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI 对照品各约 10 mg,并分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并加至刻度,得各对照品储备液。取各对照品储备液 1 mL 置同一个 10 mL 量瓶中,加甲醇配制成质量浓度分别为 100.4、112.6、10.10、102.46、99.55、107.61、109.37 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.2 色谱条件

Agilent 1260 C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m),以乙腈 (A) - 0.2% 磷酸溶液 (B) 为流动相,梯度洗脱: 0~10 min, 5% A; 10~20 min, 5% $\rightarrow$ 10% A; 20~60 min, 10% $\rightarrow$ 18% A; 60~95 min, 18% $\rightarrow$ 33% A; 95~105 min, 33% $\rightarrow$ 70% A; 105.01~110 min, 5% A; 检测波长为 212 nm; 体积流量为 1 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L。

2.3 精密度试验

取批号 20210701 热痹痛合剂样品,制备供试品溶液,连续进样 6 次,以黄芩苷色谱峰为参照,测定主要共有峰,计算得其相对保留时间 RSD 值为 0.01%~0.18%,相对峰面积 RSD 值为 0.10%~2.54%。

2.4 重复性试验

取批号 20210701 热痹痛合剂样品,平行制备 6 份供试品溶液,进样测定,以黄芩苷色谱峰为参照,测定主要共有峰,计算其相对保留时间 RSD 值为 0.02%~0.42%,相对峰面积 RSD 值为 0.26%~2.89%。

2.5 稳定性试验

取批号 20210701 热痹痛合剂样品,制备供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、18、24 h 进样测定,以黄芩苷色谱峰为参照,测定主要共有峰,计算其相对保留时间 RSD 值为 0.01%~0.53%,相对

峰面积 RSD 值为 0.19%~2.76%。

2.6 相似度分析和共有峰指认

分别制备 10 批热痹痛合剂供试品溶液, 批号分别为 20181201 (S1)、20190601 (S2)、20190901 (S3)、20191101 (S4)、20200201 (S5)、20200701 (S6)、20210201 (S7)、20210701 (S8)、20211001 (S9)、20211101 (S10), 进样检测, 记录各样品色谱图。通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012A 版), 剪切 0~5、105~110 min 的色谱峰, 设置时间宽度为 0.5 min, 采用 S2 号样品色谱图参照图谱, 用中位数法生成共有模式对照图谱(R), 指纹图谱叠加图和对参照图谱见图 1、2。

以对照图谱为参照, 计算热痹痛合剂样品的相似度, 结果见表 1, 可见各批热痹痛合剂样品相似度均在 0.99 以上, 表明各批热痹痛合剂是严格按照相应的生产操作规程进行配制, 工艺较为稳定。

经全谱峰匹配后, 10 批热痹痛合剂样品中共确定了 26 个主要共有峰, 用对照品色谱图比对后, 指认了 7、9、16、18、20、21、26 号共有峰, 分别为绿原酸、芍药苷、毛蕊异黄酮-7-O-葡萄糖苷、柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI。由于黄芩苷为热痹痛合剂中主要有效成分之一, 其含量较大, 分离度好, 故选择为参照峰(S), 26 个共有峰相对峰面积情况见表 2, 结果 10 批热痹痛合剂样品的共有峰面积 RSD 值在 3.29%~37.09%, 说明热痹痛合剂不同批次间化学成分含量差异较大。

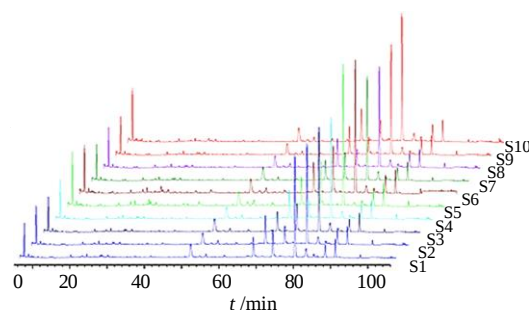
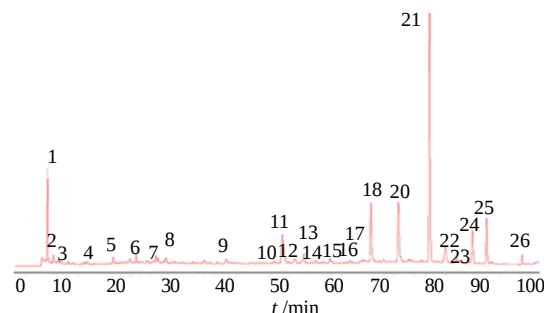


图 1 10 批热痹痛合剂样品指纹图谱叠加图

Fig. 1 Fingerprint of 10 batches of Rebitong Mixture samples overlay



7-绿原酸 9-芍药苷 16-毛蕊异黄酮-7-O-葡萄糖苷 18-柚皮苷
20-新橙皮苷 21-黄芩苷 26-川续断皂苷 VI
7-chlorogenic acid 9-paeoniflorin 16-calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside
18-naringin 20-neohesperidin 21-baicalin 26-asperosaponin VI

图 2 10 批热痹痛合剂共有模式对照指纹图谱

Fig. 2 Common characteristic peak spectrum of 10 batches of Rebitong Mixture

表 1 10 批热痹痛合剂指纹图谱相似度评价结果

Table 1 Evaluation results of fingerprint similarity of 10 batches of Rebitong Mixture

编号	相似度										R
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
S1	1.000	0.997	0.997	0.990	0.980	0.983	0.997	0.989	0.997	0.990	0.996
S2	0.997	1.000	0.999	0.990	0.979	0.982	0.998	0.990	0.998	0.990	0.996
S3	0.997	0.999	1.000	0.990	0.981	0.983	0.999	0.990	1.000	0.989	0.996
S4	0.990	0.990	0.990	1.000	0.993	0.992	0.990	0.999	0.990	0.999	0.998
S5	0.980	0.979	0.981	0.993	1.000	0.997	0.981	0.993	0.981	0.993	0.993
S6	0.983	0.982	0.983	0.992	0.997	1.000	0.982	0.992	0.982	0.992	0.993
S7	0.997	0.998	0.999	0.990	0.981	0.982	1.000	0.990	1.000	0.990	0.996
S8	0.989	0.990	0.990	0.999	0.993	0.992	0.990	1.000	0.990	1.000	0.997
S9	0.997	0.998	1.000	0.990	0.981	0.982	1.000	0.990	1	0.990	0.996
S10	0.990	0.990	0.989	0.999	0.993	0.992	0.990	1.000	0.990	1.000	0.997
R	0.996	0.996	0.996	0.998	0.993	0.993	0.996	0.997	0.996	0.997	1.000

表 2 10 批热痹痛合剂特征峰保留时间和相对峰面积

Table 2 Characteristic peak retention time and relative peak area of 10 batches of Rebitong Mixture

编号	t_R/min	相对峰面积										峰面积 RSD/%
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
1	6.155	0.201	0.173	0.201	0.173	0.187	0.188	0.197	0.161	0.194	0.158	8.79
2	7.302	0.016	0.025	0.026	0.025	0.025	0.024	0.026	0.026	0.026	0.026	12.08
3	8.199	0.008	0.009	0.010	0.011	0.015	0.013	0.011	0.012	0.010	0.011	17.00
4	13.126	0.024	0.011	0.013	0.008	0.01	0.01	0.012	0.009	0.012	0.009	37.09
5	18.642	0.024	0.027	0.028	0.026	0.023	0.021	0.028	0.025	0.028	0.026	9.55
6	23.015	0.015	0.024	0.023	0.022	0.026	0.023	0.022	0.021	0.024	0.022	12.80
7	26.785	0.038	0.021	0.022	0.020	0.039	0.033	0.020	0.016	0.019	0.016	35.92
8	27.194	0.016	0.02	0.022	0.023	0.023	0.027	0.020	0.020	0.020	0.020	13.65
9	40.106	0.014	0.028	0.033	0.023	0.039	0.051	0.031	0.026	0.026	0.025	33.64
10	49.248	0.012	0.014	0.015	0.015	0.011	0.013	0.018	0.014	0.016	0.014	13.53
11	50.819	0.230	0.215	0.245	0.261	0.221	0.212	0.248	0.261	0.246	0.263	8.10
12	53.176	0.037	0.039	0.043	0.029	0.042	0.058	0.043	0.028	0.042	0.028	23.73
13	54.916	0.046	0.047	0.055	0.044	0.055	0.054	0.055	0.044	0.056	0.045	10.55
14	57.147	0.012	0.016	0.018	0.010	0.010	0.009	0.018	0.011	0.019	0.012	27.12
15	59.847	0.032	0.024	0.025	0.024	0.025	0.024	0.026	0.033	0.026	0.024	12.29
16	65.961	0.01	0.016	0.019	0.016	0.014	0.016	0.014	0.019	0.019	0.018	19.18
17	66.465	0.012	0.015	0.016	0.012	0.012	0.018	0.012	0.012	0.016	0.013	16.93
18	67.663	0.305	0.31	0.343	0.245	0.284	0.253	0.346	0.245	0.345	0.245	14.89
19	70.066	0.014	0.013	0.015	0.011	0.015	0.014	0.014	0.011	0.014	0.01	14.11
20	72.866	0.211	0.194	0.217	0.325	0.427	0.379	0.218	0.325	0.217	0.325	28.99
21	78.779	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
22	81.794	0.117	0.117	0.125	0.143	0.101	0.046	0.128	0.144	0.127	0.144	24.52
23	83.864	0.034	0.034	0.040	0.037	0.039	0.038	0.036	0.031	0.036	0.036	7.53
24	86.960	0.165	0.163	0.167	0.148	0.165	0.141	0.168	0.149	0.167	0.148	6.51
25	89.636	0.169	0.179	0.183	0.185	0.178	0.17	0.181	0.185	0.184	0.185	3.29
26	96.396	0.017	0.032	0.039	0.027	0.03	0.032	0.039	0.027	0.039	0.027	22.46

2.7 聚类分析 (CA) [7-8]

计算 26 个共有峰的相对峰面积, 在软件 SPSS Statistics 20.0 导入 10 批样品的 10×26 数据矩阵 (表 2) 进行聚类分析, 以组间连接法进行聚类分析, 以平方 Euclidean 距离为度量标准, 结果见图 3。结果显示, 10 批样品被聚为 2 大类, S1~S3、S7、S9 被聚为第 1 类, S4、S5、S6、S8、S10 被聚为第 2 类。可见不同批次样品之间的质量存在一定差异。

2.8 主成分分析 (PCA)

以 10 批热痹痛合剂样品 26 个共有峰面积为特征, 获取 10×26 数据矩阵, 导入 SPSS Statistics 20.0

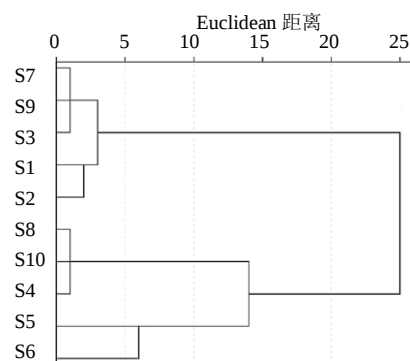


图 3 热痹痛合剂指纹图谱聚类分析的树状图

Fig. 3 Dendrogram of cluster analysis of Rebitong Mixture

软件进行 PCA, 结果见表 3。提取出 4 个特征值大于 1 的主成分, 累积方差贡献率为 94.643%, 说明 4 个主成分即可代表样品的大部分信息^[9]。导出因子载荷矩阵, 见表 4。可知 1、12、13、19、21、23、25 号色谱峰在主成分 1 上具有较高的正载荷, 4、5、15、18 号色谱峰在主成分 2 上具有较高的正载荷, 14、26 号色谱峰在主成分 3 上具有较高的正载荷, 色谱峰 6、22 号在主成分 4 上具有较高的正载荷。运用 SIMCA-P 14.1 软件绘制 PCA 得分图, 见图 4, 可见 10 批热痹痛合剂样品在 PCA 模式下大致可分为 2 大类, 与聚类分析结果相似。

表 3 热痹痛合剂主成分特征值和方差贡献率

Table 3 Characteristic value and variance contribution rate of main components of Rebitong Mixture

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	15.274	58.748	58.748
2	4.921	18.929	77.677
3	3.299	12.690	90.367
4	1.112	4.276	94.643
5	0.820	3.152	97.795
6	0.338	1.301	99.096

2.9 正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) ^[10]

为更好地区分不同批次间的质量差异, 将 10 批热痹痛合剂样品的共有峰面积数据导入 SIMCA-P 14.1 软件进行 OPLS-DA 拟合, 其 $R^2X=0.977$, $R^2Y=0.998$, $Q^2=0.992>0.5$, 说明建立的模型稳定可信, 得分图和载荷图见图 5。可知, 在 95% 置信区间范围内, 10 批样品被分为 2 大类, 与 CA、PCA 结果基本一致, 且在象限中距离中心点 (0, 0) 越远的共有峰, 对模型的贡献越大。运用变量重要性投影 (VIP) 法筛选出对样品分类影响较大的成分, 见图 6。以 $VIP>1.0$ 作为标准, 发现 4 个共有峰对样品分类起关键作用, 重要性顺序为 20 号 (新橙皮苷)、21 号 (黄芩苷)、18 号 (柚皮苷)、11 号, 这 4 个成分即为 OPLS-DA 分析下引起热痹痛合剂质量差异的关键化合物。

CA 是根据实验数据本身定量或定性的某些特征进行归类, 找到众多共性下的差异的一种多元统计分析方法, 体现“物以类聚”的分类原则; PCA 是最常见的基于特征分析的降维方法, 能在损失较少指标信息特征的情况下将多个具有相关性的指标转换成少数几个相互独立的综合指标, 达到化繁为简的目的; OPLS-DA 则是一种将主成分分析、

表 4 热痹痛合剂主成分因子载荷矩阵

Table 4 Principal component factor loading matrix of Rebitong Mixture

共有峰编号	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4
1	0.904	0.390	0.092	-0.103
2	0.714	-0.649	-0.071	0.224
3	0.885	-0.313	-0.272	0.142
4	0.342	0.899	0.048	-0.224
5	0.643	0.623	0.234	0.258
6	0.833	-0.411	-0.008	0.351
7	0.891	0.400	-0.188	0.077
8	0.894	-0.380	-0.116	-0.140
9	0.876	-0.462	0.052	-0.034
10	0.423	-0.236	0.505	-0.527
11	0.680	0.188	-0.638	-0.228
12	0.942	-0.067	0.264	-0.186
13	0.970	0.017	0.175	0.044
14	-0.079	0.333	0.913	0.155
15	0.567	0.591	-0.362	-0.216
16	0.323	-0.771	0.011	0.025
17	0.783	-0.220	0.240	-0.265
18	0.646	0.518	0.531	0.151
19	0.915	0.286	0.200	0.183
20	0.775	-0.297	-0.532	0.100
21	0.938	0.205	-0.234	-0.068
22	-0.715	0.418	-0.417	0.342
23	0.963	0.046	-0.092	0.035
24	0.847	0.485	0.016	0.208
25	0.939	0.110	-0.310	0.029
26	0.543	-0.513	0.617	0.153

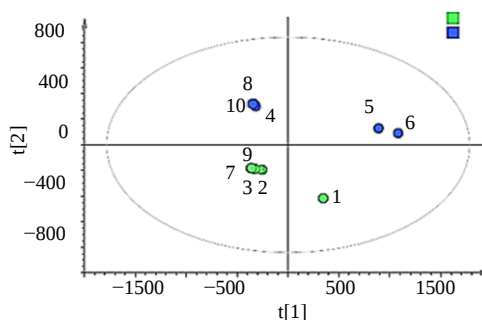


图 4 10 批热痹痛合剂主成分分析得分图

Fig. 4 Principal component analysis score chart of 10 batches of Rebitong Mixture

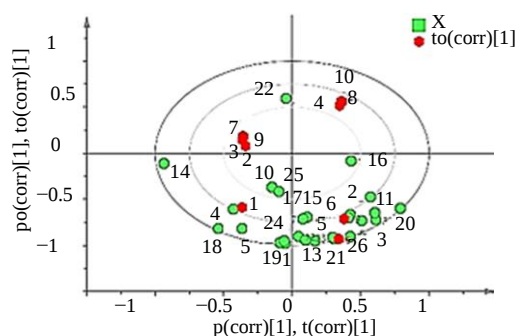


图 5 热痹痛合剂样品 OPLS-DA 得分图和载荷图
Fig. 5 OPLS-DA score graph and load graph of Rebitong Mixture samples

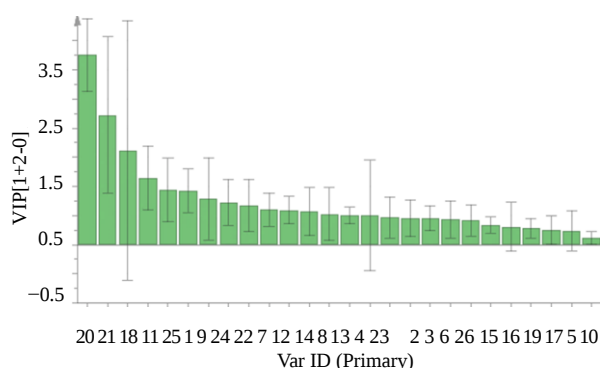


图 6 指纹图谱特征峰 OPLS-DA VIP 图
Fig. 6 OPLS-DA VIP map of characteristic peaks of fingerprint spectrum

回归分析、典型相关分析有机结合起来的多元线性回归方法，属于有监督的分析模式。3 种分析方式从不同的角度进行评价，能较好地保证评价结果的客观性。实验中 3 种不同化学模式分析均显示 10 批热痹痛合剂样品被分为 2 大类，并且第一类中 S1 (20181201) 与 S2 (20190601)、S3 (20190901)、S7 (202100201)、S9 (20211001) 稍有差别，第二类中 S5 (20200201)、S6 (20200701) 与 S4 (20191101)、S8 (202100701)、S10 (20211101) 有一定差别，显示了 3 种分析方法在结果判断上的一致性，有较好的可信度。由于 10 批热痹痛合剂样品配制时间跨度较长，所用原料批次较多，根据分类结果推测引起差异的主要原因可能与原料产地、批次、等级的不同有关，因此制剂原料的控制为保证制剂质量稳定方面起到至关重要的作用。

3 芍药苷、柚皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI 的 HPLC 法测定

3.1 色谱条件

Agilent 1260 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5

μm)，流动相为乙腈 (A) - 0.2% 磷酸溶液 (B)，梯度洗脱：0~5 min, 13%→15% A；5~15 min, 15%→17% A；15~40 min, 17%→35% A；40~45 min, 35%→13% A；检测波长 230 nm (芍药苷)、280 nm (柚皮苷、黄芩苷)、260 nm (川续断皂苷 VI)；体积流量 1 mL/min；柱温 30 ℃；进样量为 10 μL。

3.2 溶液的准备

3.2.1 供试品溶液的制备 精密量取 5 mL 热痹痛合剂，置 25 mL 量瓶中，加纯化水至刻度，摇匀，以 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

3.2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取芍药苷、柚皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI 对照品约 20 mg，分别用甲醇溶解并定容至 10 mL，得各对照品储备液。取上述各对照品储备液适量，加甲醇配制芍药苷、柚皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI 质量浓度分别为 272.38、382.06、778.64、510.15 μg/mL 的混合对照品储备液。精密吸取混合对照品储备液 2 mL，加甲醇定容至 5 mL，配制成芍药苷、柚皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI 质量浓度分别为 108.95、152.83、311.46、204.06 μg/mL 的混合对照品溶液。

3.2.3 阴性样品溶液的制备 按热痹痛处方和配制工艺，分别制备缺赤芍、缺枳壳、缺黄芩、缺续断的阴性样品，并按供试品溶液的制备项下方法制备各阴性样品溶液。

3.3 系统适应性和专属性试验

对热痹痛合剂供试品溶液 (批号 20210701)、混合对照品溶液、阴性样品溶液进样分析，结果见图 7。芍药苷、柚皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI 与其相邻色谱峰的分离度均大于 1.5，理论塔板数以各色谱峰计算均在 10 000 以上。缺赤芍、枳壳、黄芩、续断的阴性对照在相应位置处未见色谱峰，方法专属性良好。

3.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品储备液 0.5、1、2、3、4 mL，分别加甲醇定容至 5 mL，得编号 1~6 的对照品溶液。进样测定，记录各色谱峰面积。以质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，计算回归方程，见表 5。

3.5 精密度试验

取混合对照品溶液连续进样 6 次，测定峰面积，计算得芍药苷、柚皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI 峰面积 RSD 值分别为 2.25%、0.10%、0.24%、0.44%。

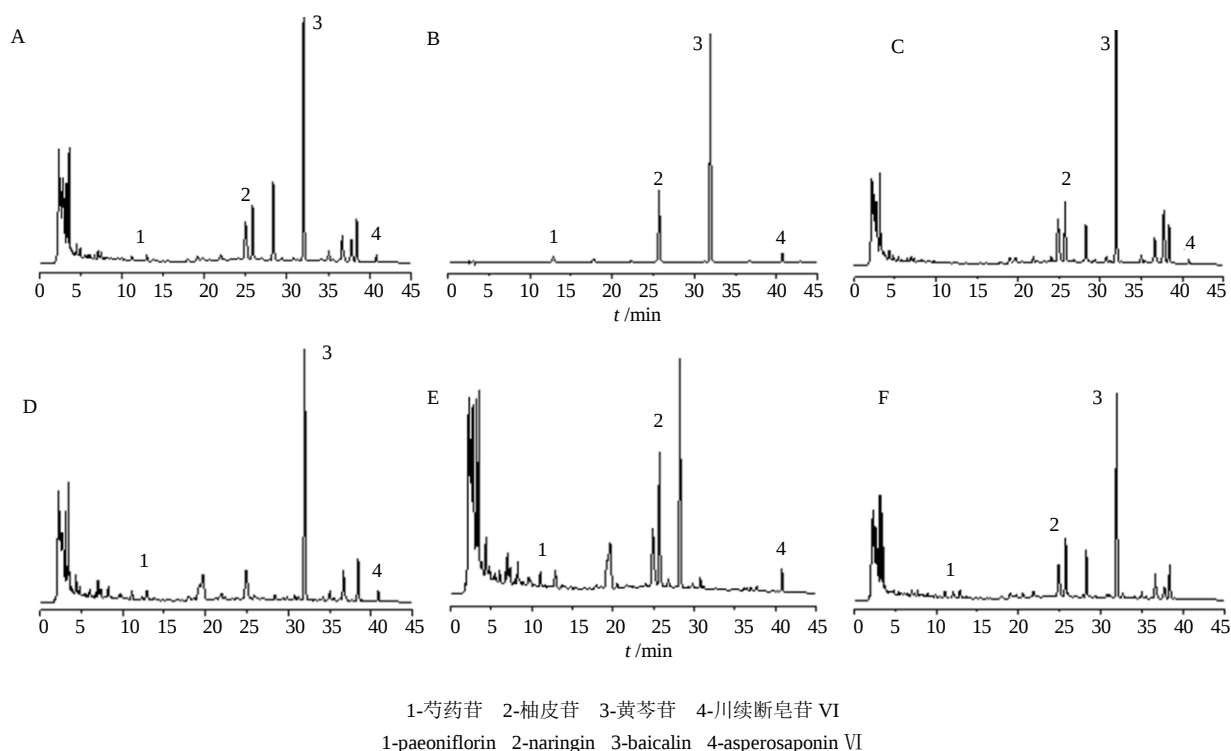


图 7 热痹痛合剂 (A)、混合对照品 (B)、缺赤芍阴性样品 (C)、缺枳壳的阴性样品 (D)、缺黄芩的阴性样品 (E) 和缺续断的阴性样品 (F) 的 HPLC 图谱

Fig. 7 HPLC chromatograms of Rebitong Mixture sample (A), mixed reference substances (B), negative sample without *Paeoniae Radix Rubra* (C), negative sample without *Aurantii Fructus* (D), negative sample without *Scutellariae Radix* (E), and negative sample without *Dipsaci Radix* (F)

表 5 4 种成分的线性关系

Table 5 Linear relationships of four constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
芍药苷	$Y=12.654 X-19.074$	0.999 9	27.238~272.384
柚皮苷	$Y=17.180 X-2.785$	1.000 0	38.207~382.066
黄芩苷	$Y=30.460 X+18.737$	1.000 0	77.864~778.642
川续断皂苷 VI	$Y=1.825 X-0.939$	1.000 0	51.015~510.015

3.6 稳定性试验

取批号 20210701 热痹痛合剂供试品溶液, 在 0、2、4、6、8、12、24 h 测定, 结果芍药苷、柚皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI 峰面积 RSD 值分别为 0.54%、2.01%、1.03%、1.86%。

3.7 重复性试验

取批号 20210701 热痹痛合剂 6 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算芍药苷、柚皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI 峰面积, 其质量浓度的 RSD 值分别为 0.44%、0.79%、0.35%、2.55%。

3.8 回收率试验

精密量取批号 20210701 热痹痛合剂 2 mL, 置

25 mL 量瓶中, 共 6 份, 加入芍药苷、柚皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI 对照品储备液 2 mL (质量分别为 1.089、1.019、3.982、2.048 mg), 制备供试品溶液, 进样分析。结果芍药苷、柚皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI 的平均回收率分别为 95.34%、103.51%、103.51%、102.68%, RSD 值分别 0.65%、1.12%、0.86%、2.41%。

3.9 样品测定

取 10 批热痹痛样品, 分别制备供试品溶液, 进样测定各成分的峰面积值, 采用外标法计算芍药苷、柚皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI 的质量浓度, 结果见表 6。

表 6 热痹痛合剂中芍药苷、柚皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI 的测定结果 (n=3)

Table 6 Results of paeoniflorin, naringin, baicalin, and asperosaponin VI in Rebitong Mixture (n=3)

批号	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)			
	芍药苷	柚皮苷	黄芩苷	川续断皂苷 VI
20181201	0.457 8	0.809 5	2.389 1	0.767 2
20190601	0.524 5	0.656 2	1.961 0	1.156 7
20190901	0.537 1	0.673 6	1.805 2	1.213 1
20191101	0.494 8	0.455 4	1.853 2	0.921 5
20200201	1.078 0	0.714 6	2.459 4	1.445 4
20200701	1.259 7	0.649 6	2.569 4	1.485 8
20210201	0.543 1	0.533 5	1.926 3	0.972 0
20210701	0.560 7	0.599 4	1.917 0	0.956 2
20211001	0.563 0	0.693 3	1.961 0	1.169 0
20211101	0.407 5	0.812 2	2.281 0	0.714 0

4 讨论

4.1 色谱条件的选择

4.1.1 指纹图谱色谱条件分析 本实验分别考察了甲醇-0.2%磷酸溶液、乙腈-0.2%磷酸溶液两种流动相体系在梯度洗脱条件下的分离效果。结果显示甲醇-0.2%磷酸溶液洗脱所得到的指纹图谱信息较少,各成分出峰时间较长且分离度较差,故选择乙腈-0.2%磷酸溶液作为该检测条件的流动相。本实验还考察了以 90%乙腈-0.2%磷酸溶液、80%乙腈-0.2%磷酸溶液和 70%乙腈-0.2%磷酸溶液作为流动相进行梯度洗脱的情况。结果显示,当乙腈比例在 70%~90%时,热痹痛合剂色谱图无明显的色谱峰,提示热痹痛合剂所含极性小的化合物较少,选择在 70%乙腈-0.2%磷酸溶液的条件下进行梯度洗脱较为合适。此外,实验还比较了不同检测波长(203、212、230、260、280、330 nm)下获得的色谱图,当检测波长为 212 nm 时,所得色谱峰数量较多,能较全面、完整地反映本制剂的化学成分信息,因此选择在波长为 212 nm 下进行指纹图谱检测。

4.1.2 含量测定色谱条件分析 由指纹图谱信息可知,当流动相中的乙腈比例为 9%~35%时,热痹痛合剂中大多数化合物可被洗脱、检出,因此为缩短检测时间,含量测定的色谱条件将乙腈的范围设置在 13%~35%。另外,选择检测波长时,为使测定结果更准确可靠,根据全波长扫描的最大吸收波长和化合物的出峰顺序,确定采用波长切换法检

测,检测波长分别为 230 nm(芍药苷)、280 nm(柚皮苷、黄芩苷)、212 nm(川续断皂苷 VI)。

4.2 含量测定指标成分的选择

实验以中医药理论为指导,在考虑处方君臣佐使的配伍基础上,结合指纹图谱中化学模式分析的结果,综合确定含量测定的化合物。热痹痛合剂中黄芪、赤芍为君药,有行滞通痹、散瘀止痛之功,生地、厚朴、续断、薏苡仁、桑寄生等为臣药,有补肾强骨、清热祛湿之效,黄芩、石斛、枳壳、天冬、麦冬等为佐药,更助君臣药清热滋阴,全方配伍合理,诸药合用共同发挥清热养血、利湿通络、补益肝肾的功效。君药黄芪中主要成分为黄芪甲苷和毛蕊异黄酮-7-O-葡萄糖苷,前者主要采用蒸发光检测器进行检测,后者则在实验中测定时发现含量较低,因而未将上述两个成分纳入该制剂的定量指标中;芍药苷具有抗炎、镇痛作用,治疗类风湿性关节炎、延缓软骨退变等^[11-13],为君药赤芍中指标成分,故选择其作为重点检测成分之一。臣药中生地的指标成分梓醇极性较大,分离度差且性质不稳定,不适合作为检测指标;厚朴中的厚朴酚、和厚朴酚因极性较小,需在如醋酸乙酯等中等极性溶剂富集情况下才能检出。续断中的川续断皂苷 VI 具有抗骨质疏松、镇痛作用^[14-15],与制剂功效密切相关,亦选择作为含量测定指标。柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷是热痹痛合剂中含量较高的成分,也在指纹图谱 PCA、OPLS-DA 分析中被认为是影响制剂质量的重要成分。根据文献调研,柚皮苷具有解痉、镇痛、抑制骨关节炎进展和降低骨关节病变率等作用^[16-18],而黄芩苷具有抑菌、抗炎、治疗骨关节炎等作用^[19-21],说明两者均是制剂中起效的主要化合物,纳入检测指标中。

4.3 含量限度的建议

实验测定了 10 批热痹痛合剂中 4 个指标性成分,按每种成分平均质量浓度的 80%作为最低含量限度,则芍药苷、柚皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI 的质量浓度限度应不小于 0.51、0.53、1.69、0.86 mg/mL,按此规定,所测结果中热痹痛合剂批号 20181201、20191101、20211101 中部分指标不合格。由于中药原料中同一成分的含量在不同批次中差异较大的情况较为普遍,指标成分的含量限度范围也可考虑以所测成分的平均转移率结合该原料药品的法定含量限度来拟定,这在一定程度上避免了原料差异导致的含量限度制定不合理。实验中 10 批

制剂由于生产时间跨度较长,受指标成分稳定性影响,转移率计算存在一定误差,故将在后期继续监测,为更合理的含量限度制定提供依据。

热痹痛合剂原标准仅有性状、理化鉴别、检查等项目,缺乏针对该制剂的专属性鉴别、指标成分的含量检测,本实验建立了热痹痛合剂的 HPLC 指纹图谱,可综合评价制剂质量,也可用于评估制剂配制质量;建立了热痹痛合剂中芍药苷、柚皮苷、黄芩苷、川续断皂苷 VI 4 种指标成分的 HPLC 测定方法,使制剂标准与国家药品标准接近。因此本研究所建立的方法准确、合理,重复性好,可用于热痹痛合剂的质量控制和评价,并为热痹痛合剂质量标准的提升提供数据支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 孙国祥,孙万阳,闫慧,等. 中药整体质量控制标准体系构建和中药一致性评价步骤 [J]. 中南药学, 2019, 17(3): 321-331.
- [2] 邹纯才,鄢海燕. 我国中药色谱指纹图谱相似度评价方法 30 年(1988—2017 年)研究进展与展望 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(10): 1969-1977.
- [3] 刘万仓,孙磊,于孟琦,等. 中药指纹图谱模式识别研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2010, 37(6): 446-450.
- [4] 成颜芬,江华娟,王琳,等. 经典名方桃红四物汤化学指纹图谱及 9 种成分含量测定研究 [J]. 中草药, 2020, 51(3): 653-661.
- [5] 张玉珊,刘谢英,姚新成,等. 高效液相色谱法同时测定茵陈蒿颗粒中 14 个化学成分 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39(7): 1229-1238.
- [6] 刘鹤,贺丹彤,邢春来,等. 甘姜苓术汤 HPLC 指纹图谱及含量测定方法的建立 [J]. 药物分析杂志, 2021, 41(1): 42-50.
- [7] 陈健,张越,王洪兰,等. 当归标准汤剂 HPLC 指纹图谱及多指标成分定量研究 [J]. 中草药, 2019, 50(20): 4942-4949.
- [8] 付小梅,孙菡,刘婧,等. 基于聚类分析和主成分分析的栀子指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2018, 49(19): 4653-4661.
- [9] 李培荣,宋小雪,闫丽莉,等. 金水六君煎物质基准 HPLC 指纹图谱的建立 [J]. 中药材, 2021(10): 2387-2391.
- [10] 李运,王苗,张国强,等. 通宣理肺丸 HPLC 指纹图谱建立及 7 种成分测定 [J]. 中成药, 2021, 43(10): 2630-2636.
- [11] 张育贵,张淑娟,边甜甜,等. 芍药苷药理作用研究新进展 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3735-3740.
- [12] 裘世杰,罗淦,汤样华,等. 芍药苷及芍药苷-6-氧-苯磺酸酯在骨伤科疾病中的应用进展 [J]. 中国中医药科技, 2021, 28(5): 864-867.
- [13] 陈谱,阮安民,周俊,等. 基于 NF- κ B 信号通路探讨芍药苷对 LPS 诱导的人软骨细胞炎症及退变的作用机制 [J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(11): 903-909.
- [14] 李广润,宫丽丽,吕亚丽,等. 川续断皂苷 VI 药理作用研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志, 2014, 33(7): 477-480.
- [15] 刘开飞. 川续断皂苷 VI 通过抑制破骨细胞生成来保护胶原诱导型关节炎引起的骨破坏 [D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
- [16] 金元宝,刘萍,刘小根,等. 柚皮苷的生物活性研究进展 [J]. 中国现代医药杂志, 2018, 20(3): 92-97.
- [17] 彭侃,鲁超,胡守业,等. 柚皮苷对骨关节炎软骨破坏的保护作用研究 [J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(13): 2418-2424.
- [18] 张保顺. 橙皮苷衍生物的合成及其药理作用的研究 [D]. 成都: 西南大学, 2011.
- [19] 王慧,周红潮,张旭,等. 黄芩苷药理作用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(4): 955-958.
- [20] 王春晓. 黄芩苷对类风湿关节炎模型小鼠的治疗作用和机制 [D]. 济南: 山东大学, 2019.
- [21] 孙标,邓翠翠,王加,等. 黄芩苷对大鼠类风湿性关节炎软骨损伤的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2021, 38(7): 1440-1446.

[责任编辑 解学星]