

UPLC 指纹图谱结合多元数据统计方法分析评价越鞠保和丸质量

牛辰瑾¹, 王 静¹, 杨晓楠², 郑新元^{1*}, 安 劼³

1. 天津市药品检验研究院, 天津 300070

2. 天津国际生物医药联合研究院有限公司, 天津 300457

3. 天津市药品检验研究院武清药品检验所, 天津 300350

摘要: **目的** 建立越鞠保和丸 UPLC 指纹图谱, 采用多元数据统计方法分析评价不同企业产品质量。 **方法** 采用 UPLC 法建立越鞠保和丸的指纹图谱, 确定共有峰, 进行相似度的评价, 采用聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘法-判别分析综合分析越鞠保和丸质量。 **结果** 越鞠保和丸的 UPLC 指纹图谱的相似度均大于 0.90。共确定了 16 个共有峰, 指认了其中 7 个色谱峰。越鞠保和丸样品分为 3 类, 4 个主成分累积方差贡献率为 81%, 筛选出 5 个共有峰 VIP>1 的化合物, 依次为峰 9 (西红花苷 I)、峰 3 (栀子苷)、峰 13 (蒙本内酯)、峰 16 (苍术素)、峰 4 (阿魏酸), 这些成分是影响越鞠保和丸质量差异的标志性成分。 **结论** UPLC 指纹图谱结合多元数据统计可作为评价越鞠保和丸质量的方法。

关键词: 越鞠保和丸; 指纹图谱; 相似度; 聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘法-判别分析; 西红花苷 I; 栀子苷

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2025)04-0897-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.04.010

Quality of Yueju Baohe Pills based on UPLC fingerprinting combined with multivariate statistical methods

NIU Chenjin¹, WANG Jing¹, YANG Xiaonan², ZHENG Xinyuan¹, AN Jie³

1. Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China

2. Tianjin International Joint Academy of Biomedicine Ltd., Tianjin 300457, China

3. Tianjin Institute for Drug Control Wuqing Drug Inspection, Tianjin 300350, China

Abstract: Objective To establish the UPLC fingerprint and evaluate quality of Yueju Baohe Pills from different manufacturers using multivariate statistical methods. **Methods** Fingerprints of Yueju Baohe Pills were established using UPLC method, common peaks were identified, and similarities were evaluated. The quality of Yueju Baohe Pills was comprehensively analyzed using HCA, PCA, and OPLS-DA. **Results** The similarities of Yueju Baohe Pills UPLC fingerprints were above 0.90. A total of 16 common peaks were identified, of which 7 chromatographic peaks were identified. The samples of Yueju Baohe Pills were divided into three categories, and the cumulative variance contribution rate of the four principal components was 81%. Five compounds with a common peak VIP > 1 were screened, namely peak 9 (crocin I), peak 3 (geniposide), peak 13 (pyrolide), peak 16 (atractylodes), and peak 4 (ferulic acid), which were characteristic components affecting the quality differences of Yueju Baohe Pills. **Conclusion** UPLC fingerprints combined with multivariate statistical methods can be used as a method for evaluating the quality of Yueju Baohe Pills.

Key words: Yueju Baohe Pills; fingerprint; similarity; HCA; PCA; OPLS-DA; crocin I; geniposide

越鞠保和丸最早记载于元代朱震亨《丹溪心法》中的越鞠丸、保和丸, 后经数代中医人不断探索精进, 明代王肯堂订补的《古今医鉴·郁证》中才首次完整收录了该方的药味、功效和用法^[1]。越鞠保和丸的处方由姜栀子、麸炒六神曲、醋香附、川

芎、苍术、木香、槟榔 7 味中药组成, 目前仅有水丸一种剂型, 标准收载于《中国药典》2020 年版一部, 现行标准中除川芎、木香薄层色谱鉴别外仅对栀子苷进行定量分析^[2]。越鞠保和丸药味复杂, 君臣佐使相辅相成, 共同起效。水丸是原粉入药的剂

收稿日期: 2025-01-06

作者简介: 牛辰瑾, 女, 主管中药师, 从事中药质量标准研究。E-mail: 397894083@qq.com

*通信作者: 郑新元, 男, 副主任药师, 从事中药质量标准研究。E-mail: zxytjys@163.com

型,药材未经溶剂提取,充分保留更多的有效成分,单独测定某个或几个化合物均不能对该药的质量进行整体评价,而指纹图谱作为中药领域一种重要的质量评价方法,结合多种技术手段对整体信息进行分析处理,描绘出大量化学成分的数据分布情况,化零为整,可以实现对药品质量的整体评价的结果^[3]。采用 UPLC 法可以快速检测多种化学成分,在中药复方制剂的质量控制中应用越来越广泛^[4]。多元统计分析通过处理和分析多个变量数据,发现变量之间的复杂关系以及数据中的模式和结构,并从中提取有用的信息。针对中药制剂中的复杂成分,可以利用多元统计方法对指纹图谱数据进行分类和识别,从中提取出有用的信息,帮助区分不同企业和不同批次的样品,确保药材的真实性和一致性,并揭示数据中的潜在结构和关系,并且可通过该方法制定标准化的质量控制流程,检测到质量的偏差或异常,可以识别和提取对药材质量有显著影响的特征变量,进而建立有效的质量评价体系^[5-7]。越鞠保和丸的生产厂家众多,国家药品监督管理局数据库中显示共有 18 家生产企业,现有的标准有待完善。本研究建立越鞠保和丸的 UPLC 指纹图谱,结合聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)方法,在整体评价的基础上体现出差异性成分的信息,完善越鞠保和丸的质量标准,为促进越鞠保和丸的质量提升提供参考。

1 仪器与材料

Agilent 1290 型超高效液相色谱仪(二极管阵列检测器、四元泵、自动进样器、柱温箱、在线脱气机),XSE205DU 十万分之一分析天平(Mettler Toledo 公司)。

甲醇、乙腈(色谱纯,Merck 公司),磷酸(色谱纯,阿拉丁生化科技股份有限公司),水为超纯水。栀子苷(批号 110749-201919,质量分数为 97.1%)、阿魏酸(批号 110773-201915,质量分数为 99.4%)、西红花苷 I(批号 111588-201704,质量分数为 88.4%)、西红花苷 II(批号 111589-201705,质量分数为 92.2%)、绿原酸(批号 110753-202119,质量分数为 96.3%)、藁本内酯(批号 111737-201910)、苍术素(批号 11924-201806,质量分数为 99.5%)对照品和栀子(批号 120986-202111)、川芎(批号 120918-201813)、香附(批号 121059-201808)、槟榔(批号 120915-201813)、木香(批号 120921-

202010)、茅苍术(批号 120932-201708)对照药材均购自中国食品药品检定研究院。

保定中药制药股份有限公司(企业 A,产品编号 A1~A8)、北京同仁堂制药有限公司(企业 B,产品编号 B1~B31)、北京御生堂集团石家庄制药有限公司(企业 C,产品编号 C1~C32)、河北龙海药业有限公司(企业 D,产品编号 D1~D15)、河北永丰药业有限公司(企业 E,产品编号 E1~E5)、药都制药集团股份有限公司(企业 F,产品编号 F1~F9) 6 家企业共 100 批越鞠保和丸样品,均为 2022 年国家抽检样品,其中共有 48 个批号,相同批号样品为全国不同地区抽取。各阴性样品均为购买市售检验合格药材按照越鞠保和丸处方和制备工艺模拟制备。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液,梯度洗脱(0~15 min、5%~15%乙腈,15~18 min、15%乙腈,18~30 min、15%~20%乙腈,30~40 min、20%~45%乙腈,40~53 min、45%~80%乙腈,53~55 min、80%乙腈);波长切换检测,切换程序为 0 min、254 nm,13 min、321 nm,30 min、440 nm,40 min、254 nm;柱温 35 ℃;体积流量 0.3 mL/min;进样量 2 μL。理论塔板数按栀子苷计不低于 8 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取栀子苷、阿魏酸、西红花苷 I 和西红花苷 II 对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为 100、5、10、2 μg/mL 的混合对照品溶液①;再分别取绿原酸、藁本内酯、苍术素对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度均为 10 μg/mL 的混合对照品溶液②。

2.2.2 供试品溶液的制备 取越鞠保和丸适量,研细,取约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶内,精密加入 70%甲醇 25 mL,称定质量,加热回流 30 min,放冷,再称定质量,用 70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 单味药材和阴性样品溶液的制备 取各药材以及按处方配比、【制法】项下的工艺分别制成缺姜栀子、醋香附、川芎、苍术、木香、槟榔和麸炒六神曲的阴性样品,按供试品溶液的制备项下方法制得各样品溶液。

2.3 指纹图谱的建立

取 18 批越鞠保和丸（6 家企业各 3 批），制备供试品溶液，进样分析，得到 UPLC 色谱图，见图 1。将色谱图导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》2012 版，时间窗宽度设置为 0.1 min，使用多点校正自动匹配建立指纹图谱，以中位数法生成越鞠保和丸对照指纹图谱。

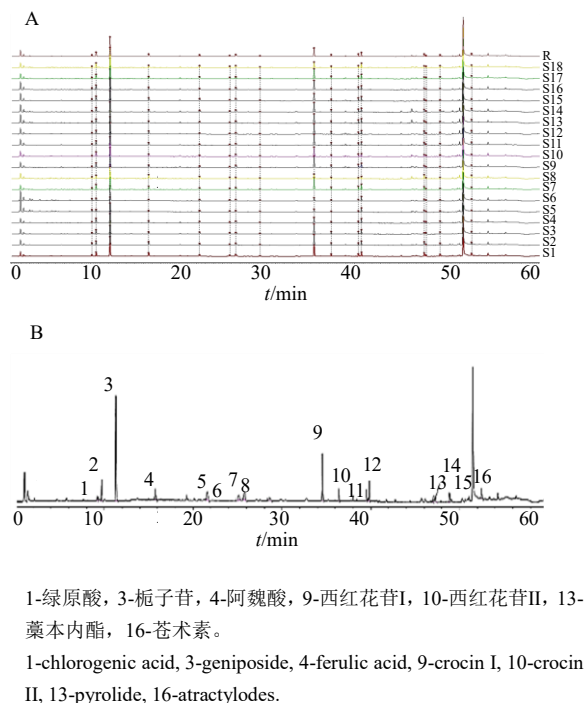


图 1 越鞠保和丸 UPLC 指纹图谱 (A) 和对照指纹图谱 (B)

Fig. 1 UPLC fingerprints of Yueju Baohe Pills (A) and reference fingerprint (B)

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密称取越鞠保和丸样品（批号 22082174），制备供试品溶液，连续进样 6 次。栀子苷是越鞠保和丸中指标性成分，化学性质稳定，保留时间稳定，故选定栀子苷（峰 3）作为参照峰。计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，结果共有峰的相对保留时间 RSD 值均小于 0.4%，相对峰面积 RSD 值均小于 2.9%，相似度均为 0.997。

2.4.2 重复性试验 精密称取越鞠保和丸样品（批号 22082174）6 份，制备供试品溶液，进样分析，以栀子苷为参照峰，计算得共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别小于 0.5%、3.3%，相似度均为 0.997。

2.4.3 稳定性试验 取精越鞠保和丸样品（批号 22082174）溶液，分别于 0、2、4、10、18、24 h 进

行分析，以栀子苷为参照峰，计算得共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别小于 0.4%、3.1%，相似度均为 0.997，说明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 指纹图谱色谱峰指认和相似度计算

通过对照品溶液色谱图对比分析，共确定了 16 个共有峰，指认了其中 7 个色谱峰，峰 1、3、4、9、10、13、16 分别为绿原酸、栀子苷、阿魏酸、西红花苷I、西红花苷II、藜芦内酯和苍术素。峰 1、5、8、16 来源于苍术，峰 2、3、7、9~12 来源于姜栀子，峰 15 来源于醋香附，峰 1、5、6 来源于木香，峰 4、5、13、14 来源于川芎。16 个共有峰中并未出现麸炒六神曲和槟榔的色谱峰。色谱峰归属、阴性样品和供试品色谱图见图 2。对 6 家企业 100 批样品的色谱图和对照指纹图谱进行相似度计算，相似度均大于 0.90，结果见表 1。

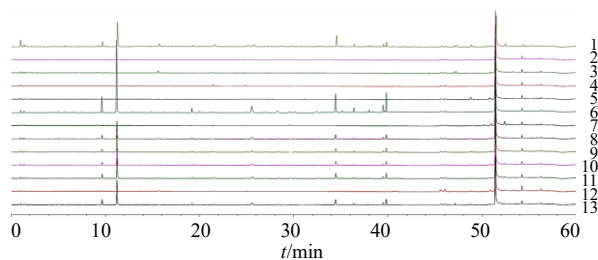


图 2 越鞠保和丸和处方各药味、阴性样品的 UPLC 图

Fig. 2 UPLC chromatograms of Yueju Baohe Pills, relevant herbs, and negative samples

2.6 多元统计分析

聚类分析是通过一个大的对称矩阵将指纹图谱中众多复杂的数据合理地分成若干类，逐步归群成类的方法^[8]，能客观地反映不同企业以及相同企业不同批次越鞠保和丸的内在组合关系。采用 HIPLLOT PRO 软件对 100 批越鞠保和丸样品中 16

表 1 越鞠保和丸 UPLC 指纹图谱相似度
Table 1 UPLC fingerprint similarity of Yueju Baohe Pills

编号	批号	相似度	编号	批号	相似度	编号	批号	相似度	编号	批号	相似度
A1	201206	0.994	B18	19082160	0.989	C12	474052	0.928	D5	21040316	0.979
A2	220101	0.993	B19	21082164	0.996	C13	474056	0.922	D6	21110616	0.977
A3	211107	0.994	B20	21082164	0.996	C14	474055	0.922	D7	21080316	0.976
A4	210804	0.984	B21	21082166	0.986	C15	474053	0.925	D8	22020116	0.993
A5	211106	0.997	B22	21082163	0.990	C16	474052	0.923	D9	21110316	0.989
A6	211106	0.995	B23	21082163	0.990	C17	474054	0.918	D10	21110316	0.988
A7	220203	0.993	B24	21082162	0.996	C18	474053	0.927	D11	21110616	0.972
A8	211107	0.995	B25	21082160	0.995	C19	474053	0.922	D12	21110616	0.984
B1	21082163	0.993	B26	21082165	0.985	C20	474059	0.918	D13	21120116	0.990
B2	21082160	0.996	B27	21082160	0.996	C21	474038	0.925	D14	21090216	0.955
B3	21082165	0.984	B28	21082165	0.987	C22	474057	0.915	D15	21040316	0.980
B4	21082166	0.985	B29	22082167	0.982	C23	474048	0.914	E1	10821040114	0.998
B5	21082161	0.996	B30	21082160	0.994	C24	474056	0.921	E2	10821060414	0.997
B6	20082023	0.984	B31	22082173	0.994	C25	474057	0.914	E3	10821110114	0.994
B7	21082163	0.992	C1	474054	0.915	C26	474057	0.913	E4	10821040114	0.997
B8	21082166	0.986	C2	474048	0.910	C27	474058	0.915	E5	10821020214	0.992
B9	21082165	0.985	C3	474055	0.921	C28	474067	0.918	F1	210501	0.990
B10	21082163	0.984	C4	474057	0.911	C29	474054	0.914	F2	210501	0.991
B11	21082160	0.994	C5	474054	0.919	C30	474051	0.930	F3	220101	0.995
B12	21082163	0.994	C6	474054	0.917	C31	474042	0.914	F4	220102	0.996
B13	21082166	0.986	C7	474053	0.923	C32	474062	0.912	F5	210501	0.991
B14	21082164	0.996	C8	474053	0.923	D1	21110216	0.968	F6	210601	0.997
B15	21082166	0.987	C9	474043	0.921	D2	21100116	0.977	F7	210601	0.995
B16	21082165	0.984	C10	474050	0.928	D3	21100216	0.972	F8	201101	0.990
B17	19082134	0.988	C11	474051	0.933	D4	20120116	0.976	F9	210501	0.990

个共有峰进行聚类分析，采用组间连接的聚类方法，以欧式距离平方作为度量标准进行聚类分析，探讨不同批次间样本数据的一致性，结果见图 3。100 批越鞠保和丸样品分为 3 类，A、B、E、F 企业样品聚为一类，C 企业和 5 批次 D 企业样品为一类，剩余 D 企业 10 批为一类。由聚类分析结果可见不同企业生产的越鞠保和丸质量存在差异，而个别企业不同批次间质量也不尽相同。

主成分分析可将原始数据众多高维变量通过线性拟合降维处理，具有提取数据准确，分析结果可信度强的特点^[9]。将 100 批样品中 16 个共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件进行主成分分析，计算相关矩阵的特征值及其方差贡献率。以特征值大于 1 为基准，得到越鞠保和丸指纹图谱共有峰特征值，

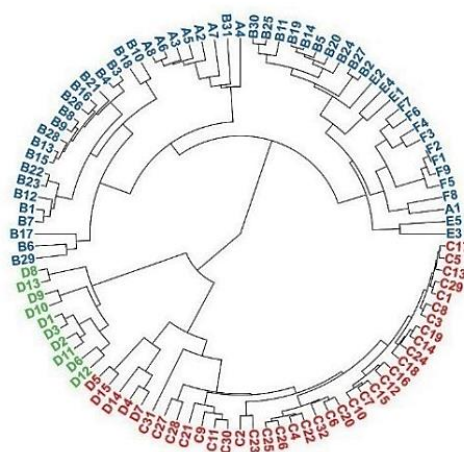


图 3 越鞠保和丸指纹图谱共有峰聚类分析
Fig. 3 Hierarchical cluster analysis of Yueju Baohe Pills

经主成分分析可知主成分 1~4 的累积方差贡献率分别是 0.388、0.623、0.738、0.810，4 个主成分累积方差贡献率为 81%。 Q^2 为模型预测指数，数值大于 0.5 证明模型预测能力良好，经软件分析该值为 0.552。由图 4 得分散点图可见越鞠保和丸样品分为 3 类，分析结果基本与聚类分析一致，D 企业不同批次间差异较大。

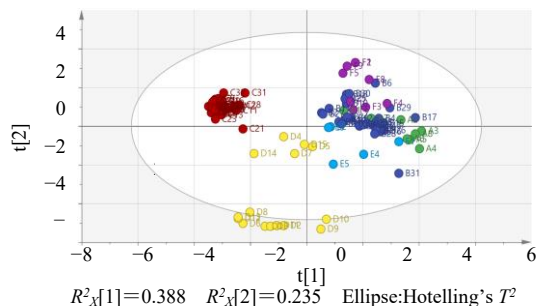


图 4 越鞠保和丸主成分分析得分散点图

Fig. 4 PCA scatter plot of Yueju Baohe Pills

正交偏最小二乘法可筛选出对组间差异贡献率较大的成分。使用 SIMCA 14.1 软件在主成分分析的基础上进行正交偏最小二乘法判别分析，计算预测变量重要性投影 (VIP)，6 家企业样品得分散点图见图 5。越鞠保和丸样品基本可分为 3 类，企业 C、D 各为一类，其他企业为一类。自变量拟合指数 (R^2_X) 为 0.943，因变量拟合指数 (R^2_Y) 为 0.768，模型预测指数 (Q^2) 为 0.694，对不同企业的越鞠保和丸预测率为 69%，以上参数均大于 50%，即表明模型拟合结果可接受，预测能力可信用度较高。对数据进行 200 次置换检验， Q^2 回归线与纵轴交点小于 0，见图 6。该模型不存在过度拟合，可有效区分不同企业的越鞠保和丸，证明不同企业间的产品存在差异。VIP 是筛选差异化合物的重要指标之一，选取 VIP 值 > 1 的化合物作为差异性标志物，在 0.95 的置信区间内，OPLS-DA 分析提取的变量 VIP 图见图 7。筛选出 5 个共有峰 VIP > 1 的化合物，依次为峰 9 (西红花苷 I)、峰 3 (栀子苷)、峰 13 (藁本内酯)、峰 16 (苍术素)、峰 4 (阿魏酸)，这些成分是影响越鞠保和丸质量差异的标志性成分^[10]，值得在处方指标成分上加以重视。

3 讨论

分别考察了 BEH、HSS T3 和 BEH SHIELD 3 种色谱柱以及水-甲醇、水-乙腈、0.1%磷酸水溶液-乙腈 3 种流动相体系，结果发现使用 HSS T3 效果最好，水-甲醇体系色谱峰分离度较差，分析

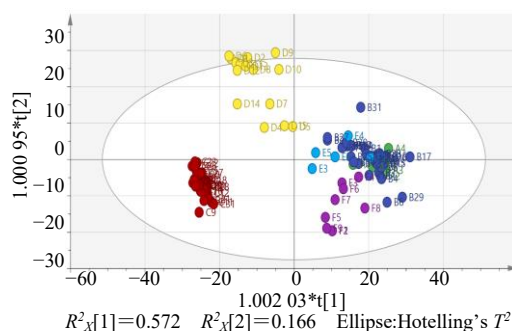


图 5 越鞠保和丸 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 OPLS-DA score of Yueju Baohe Pills

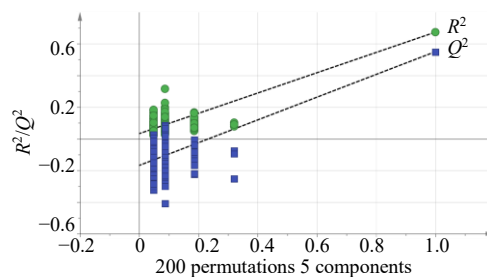


图 6 100 批越鞠保和丸 OPLS-DA 模型置换检验

Fig. 6 Permutation test of OPLS-DA for 100 batches of Yueju Baohe Pills

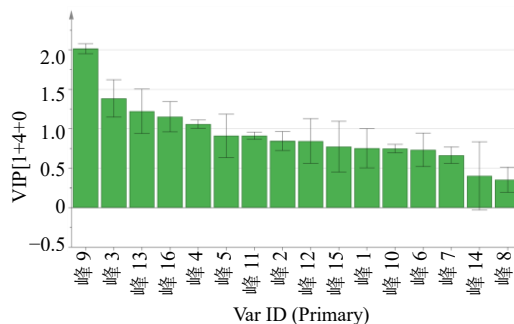


图 7 越鞠保和丸 16 个共有峰 VIP 值

Fig. 7 VIP values of 16 shared peaks of Yueju Baohe Pills

时间较长，水-乙腈体系色谱峰有拖尾现象，最终选择 0.1%磷酸水溶液-乙腈为流动相。经全波谱检测，各色谱峰最大吸收波长相差较大，单一波长不能更全面显示更多的色谱峰信息，综合色谱峰数、各色谱峰响应值等因素，最终确定波长在 321、440、254 nm 切换。对柱温、体积流量进行考察，最终确定柱温 35 °C、体积流量 0.3 mL/min。

越鞠保和丸在样品提取条件筛选时，以供试品

溶液中色谱峰数量、分离效果和定量指标成分总提取率为指标,分别考察了超声和加热回流提取方式,50%甲醇、70%甲醇、甲醇和乙醇等提取溶剂,以及 30、60、90 min 的提取时间,最终选择使用 70%甲醇加热回流提取 30 min 作为供试品溶液的制备提取方式。

中药复方制剂是具有复杂成分的有机整体,药效的发挥并非单一有效成分的作用,而是其所含多元化活性成分共同作用的结果^[11]。实验通过建立越鞠保和丸 UPLC 指纹图谱确定了 16 个共有峰,并使用对照品指认了其中 7 个成分。100 批样品相似度均 ≥ 0.90 ,由相似度数据可知各企业的样品一致度较好,质量较统一。但相似度作为降维后统计指标并不能有效反映样品区别时,运用多维度不同统计学方法对现有数据进行深度剖析,经 HCA、PCA 和 OPLS-DA 分析,可直观发现不同企业样品差异较大,某些企业生产的不同批次样品也存在较大差距。而由 OPLS-DA 分析得出 16 个共有峰 VIP 值,在分析模型预测性良好的情况下,VIP 值大于 1 的 5 个化合物对越鞠保和丸质量影响较大。

越鞠保和丸生产所用原料为常见中药饮片品种,市场上供应充足而且来源广泛,仅控制部分成分的含量不能全面反映其质量和疗效。为真实反映越鞠保和丸相关物质基础、药品的复杂性和药效的多样性,并科学评价其内在质量的稳定性、均一性和不同厂家产品的差异,故开展以多参数、多成分质量评价为基础的指纹图谱探索性研究,采用多元统计分析方法有效评价越鞠保和丸一致性,为越鞠保和丸质量提升提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 冯岩,李爽姿,李志更.越鞠保和丸之浅探[J].中国中医基础医学杂志,2017,23(7):1027-1028.
- [2] 中国药典[S].一部.2020:1709.
- [3] 范鑫玉,吉田,笔雪艳,等.中药指纹图谱分类及评价概述[J].黑龙江医药,2023,36(6):1254-1258.
- [4] 石俊敏,管佳,张庆文,等.超高效液相色谱在药物分析中的应用[J].药物分析杂志,2008,28(9):1583-1588.
- [5] 李新蕊.主成分分析、因子分析、聚类分析的比较与应用[J].山东教育学院学报,2007(6):23-26.
- [6] 廖嘉穗,付娟,张日美,等.基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学及多成分定量测定的腰痹通胶囊质量评价研究[J].中草药,2024,55(8):2579-2588.
- [7] 李欣,高天鹏,张明童,等.基于多组分含量测定及多元统计分析研究茜草、大茜草及大叶茜草[J].药物分析杂志,2023,43(12):2072-2080.
- [8] 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.
- [9] Yun J, Cui C J, Zhang S H, *et al.* Use of headspace GC/MS combined with chemometric analysis to identify the geographic origins of black tea[J]. *Food Chem*, 2021, 360: 130033.
- [10] 许莉,黄晓婧,高鹏,等.基于多组分含量测定和化学计量学的风寒感冒颗粒整体质量评价研究[J].中草药,2020,51(14):3670-3678.
- [11] 刘自强,胡培,韩童童,等.顶空固相微萃取-气相色谱-质谱结合 Heracles NEO 超快速气相电子鼻分析太子参不同加工品的挥发性成分[J].中草药,2024,55(20):6874-6888.

【责任编辑 解学星】