

• 药剂与工艺 •

血塞通滴丸皂苷类成分含量测定及批次一致性评价研究

侯一哲¹, 黎 翩², 肖红敏², 陈景丽², 李 正¹, 李文龙^{1*}

1. 天津中医药大学中药制药工程学院, 天津 300193

2. 朗天药业(湖北)有限公司, 湖北 黄石 435000

摘要: 目的 建立血塞通滴丸超高压液相色谱(UPLC)的指纹图谱方法并测定其主要成分含量, 并结合相关化学计量学方法对产品质量批次一致性进行系统、全面和科学的评价。方法 采用 Agilent 1290 UPLC, Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱, 以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 对 5 种皂苷类成分三七皂苷 R₁ (R₁) 及人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁、Rd (Rg₁、Re、Rb₁、Rd) 进行含量测定, 并建立了血塞通滴丸的指纹图谱, 通过对指纹图谱的相似度分析、主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)对血塞通滴丸的批次一致性进行全面评价, 同时采用 Hotelling's T² 和 DModX 2 种统计量, 为不同批次产品的质量设定控制范围。结果 14 批样品中, 5 种皂苷含量较为稳定, 设定的质控范围分别为 R₁ 24.69~30.03 mg/g、Rg₁ 102.60~122.44 mg/g、Re 12.93~15.45 mg/g、Rb₁ 99.74~112.12 mg/g 和 Rd 23.35~31.75 mg/g。建立的指纹图谱共标定 15 个共有峰, 经对照品化学指认共鉴定出 R₁、Rg₁、Re、Rb₁、Rd 5 个色谱峰。14 批样品的相似度均大于 0.998。PCA 分析中 14 批样品无异常批次, 表明血塞通滴丸的批次一致性较高, 但存放时间差异在指纹图谱上有所体现; OPLS-DA 分析得出, 在造成 14 批样品有渐变趋势的变量中, 已定量的 Rb₁ 和 Rd 影响较大; Hotelling's T² 和 DModX 的控制上限分别为 31.17 和 1.82。结论 所建方法科学准确, 简便可靠, 不但可以用于血塞通滴丸的质量控制, 而且可以对其批次质量一致性进行全面评价, 可为解决中药质量批次一致性的共性问题提供借鉴。

关键词: 血塞通滴丸; 含量测定; 指纹图谱; 化学计量学; 一致性评价

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)11-2552-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.008

Determination of saponins in Xuesaitong Drop Pills and study on batch consistency evaluation techniques

HOU Yi-zhe¹, LI Pian², XIAO Hong-min², CHEN Jing-li², LI Zheng¹, LI Wen-long¹

1. College of Pharmaceutical engineering of TCM, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Langtian Pharmaceutical (Hubei) Co., Ltd., Huangshi 435000, China

Abstract: Objective To establish the fingerprint of Xuesaitong Dropping Pills (XDP) using ultra-high pressure liquid chromatography (UPLC), determine the content of its main components and propose a chemometrics method for the systemic, comprehensive and scientific quality evaluation. **Methods** The Agilent 1290 UPLC and Acquity UPLC BEH C₁₈ column were used for the establishment of the UPLC fingerprints of 14 batches of XDP with acetonitrile and water as mobile phase for gradient elution, and the content of five kinds of notoginsenosides was determined. Then, the further quality assessment of XDP was carried out with similarity evaluation, principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). Meanwhile, the Hotelling's T² and DModX control ranges were set for the different batches of samples. **Results** Among the 14 batches, the content of five kinds of notoginsenosides was relatively stable, and the quality control ranges for notoginsenosides R, ginsenoside Rg₁, Re, Rb₁, Rd were set at 24.69—30.03 mg/g, 102.60—122.44 mg/g, 12.93—15.45 mg/g, 99.74—112.12 mg/g, and 23.35—31.75 mg/g, respectively. In this research, 15 chromatographic peaks were recognized as common peaks in the fingerprints, five peaks were identified with standard references compounds, which were notoginsenoside R₁, ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re,

收稿日期: 2019-02-22

基金项目: 国家重大新药创制项目 (2018ZX09201011)

作者简介: 侯一哲 (1991—), 男, 硕士研究生, 主要从事中药质量控制技术研究。E-mail: 779610304@qq.com

*通信作者 李文龙 (1980—), 男, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事中药制药过程分析技术研究。E-mail: wshliwenlong@126.com

ginsenoside Rb₁ and ginsenoside Rd. The similarity values of the drugs were all above 0.998. In the PCA analysis, 14 batches of samples had no abnormal batch, indicating that the quality was relatively stable, however, the difference of the storage time was reflected in the fingerprint. According to the OPLS-DA result, the quantitative ginsenoside Rb₁ and ginsenoside Rd had greater influence on the variables causing the gradual trend in 14 batches of samples. The upper limit of control for Hotelling's T² and DModX was 31.17 and 1.82, respectively. **Conclusion** The established method was accurate, reliable, and simple. It can be used not only for the quality control of XDP, but also for the comprehensive evaluation of batch consistency. The study also provides a reference for solving the common problem of the consistency evaluation of Chinese materia medica.

Key words: Xuesaitong Drop Pills; content determination; fingerprint; chemometrics; consistency evaluation

“安全，有效，质量可控”是药品质量的基本要求，而批次之间的一致性为药品安全性和有效性的前提。在中药国际化进程中，一个关键的共性问题就是如何评价其质量的批次一致性^[1-2]。传统中药制剂通常以批次生产的方法进行，其中原料质量、工艺操作条件和操作人员等的变化都会影响到批次间的一致性^[3-4]。目前，在中药质量的整体评价和确保产品内在质量一致性中，指纹图谱相似度评价是一种应用较为成熟的技术^[5-10]。指纹图谱相似度评价通常是以计算 2 个数据向量之间夹角的余弦来确认 2 个指纹图谱之间的相似性。然而，此方法存在一定缺陷，如只考虑方向而忽略了浓度的不同、相关系数易受大峰的影响等^[11]，不能完全代表中药指纹图谱的化学等效性。因此，开发一套综合评估产品批次间一致性和确定批次差异来源的方法极为重要，反之，完善的方法可以进一步理解生产过程，有助于提高产品质量^[12]。

化学计量学是通过统计学或数学方法在化学体系的测量值与体系状态之间建立联系，在中药质量控制与评价中具有重要意义。该统计方法主要包括主成分分析（principal component analysis, PCA）、聚类分析（hierarchical cluster analysis, HCA）、偏最小二乘法（partial least square, PLS）以及在其基础上开发的各种算法。中药具有化学成分复杂、多成分协同作用等特点，致使其分析方法过于复杂。PCA 是一种常用的降维方法，适用于中药多种化学指标的分析，可使复杂的多指标问题简单化，且结果准确，可解释性强。迄今为止，基于色谱指纹图谱并结合化学计量学对中药质量的分析方法已成为国内外的主流趋势。其在原药材和复方制剂的质量控制方面已获得较多的研究成果^[13-18]。

血塞通滴丸（Xuesaitong Dropping Pills, XDP）是我国中药部颁标准第 17 册收录的血塞通片改变剂型而得，由三七总皂苷加适量基质滴制而成，具有活血祛瘀、通脉活络等功效，常用于脑络瘀阻、

中风偏瘫、胸痹心痛等症^[19]。目前，XDP 的研究多集中在成型工艺、临床应用和现代药理作用上^[20-22]，而关于其产品质量一致性评价鲜有报道。本实验以 XDP 为例，对其批次质量一致性评价方法进行研究。首先，通过 UPLC 技术测定了其中 5 种有效成分的含量，从直观上观察其变化情况，并在统计分析的基础上，为 5 种有效成分的含量设定了合适的质量控制范围。然后，采用指纹图谱技术对样品质量一致性进行相似度评价，再进一步结合相关化学计量学手段对不同批次的 XDP 产品质量进行分析比较，在此基础上为 Hotelling's T² 和 DModX 2 种统计量设定了控制限和警戒限。本研究较为全面的对该产品质量的一致性进行评价，有助于实现该品种的标准化、现代化和国际化。

1 仪器与材料

Agilent 1290 超高效液相色谱仪（UPLC），美国 Agilent 公司，包括 G7120A 二元溶剂管理系统、G7129B 自动进样器及柱温箱一体机、G7117A DAD 检测器和 Open LAB CDS Workstation Plus 工作站；SB-5200 DTDN 超声波清洗机，宁波新芝生物科技股份有限公司；AB135-S 十万分之一电子天平，瑞典 Mettler Toledo 公司。

XDP，由湖北朗天药业有限公司提供，具体信息见表 1；三七皂苷 R₁（R₁，批号 FY1587B0324）、人参皂苷 Rg₁（Rg₁，批号 FY1542B0622）、人参皂

表 1 14 批 XDP 样品信息

Table 1 Sample information of 14 batches of XDP

样品	生产时间	生产批号	样品	生产时间	生产批号
S1	2015	20150501	S8	2017	20170201
S2	2015	20150801	S9	2017	20170402
S3	2015	20151201	S10	2017	20170701
S4	2016	20160201	S11	2017	20171001
S5	2016	20160501	S12	2018	20180201
S6	2016	20160801	S13	2018	20180502
S7	2016	20161101	S14	2018	20180904

昔 Re(Re, 批号 FY1538B0707)、人参皂昔 Rb₁(Rb₁, 批号 FY1533B0702)、人参皂昔 Rd (Rd, 批号 FY1537B1109), 质量分数均≥98%, 均购自南京飞宇生物科技有限公司; 甲醇、乙腈, 质量分数均≥99.5%, 色谱纯, 美国 Fisher 公司; 屈臣氏纯净水, 广州屈臣氏食品饮料有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent 1290 UPLC; 色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 检测波长 203 nm; 流动相为乙腈-水; 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 1 μL; 进样前后运行时间均为 5 min; 梯度洗脱: 0~9 min, 19%乙腈; 9~11 min, 19%~28%乙腈; 11~19 min, 28%乙腈; 19~23 min, 28%~44%乙腈; 23~26 min, 44%~95%乙腈; 26~30 min, 95%乙腈。

2.2 供试品溶液制备

精密称定 XDP 样品 0.420 g, 置于 50 mL 棕色量瓶中, 加入适量甲醇, 超声 5 min 后(频率 40 kHz, 功率 200 W), 恢复至室温, 再用甲醇定容至刻度, 摇匀, 冷冻 24 h, 取上清过 0.22 μm 有机微孔滤膜, 即得供试品溶液。

2.3 混合对照品溶液制备

分别称取 R₁、Rg₁、Re、Rb₁ 和 Rd 各 7.36、15.47、

6.19、15.56、7.45 mg 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容, 摇匀, 作为贮备液, 备用, 各成分质量浓度分别为 0.736、1.547、0.619、1.556、0.745 mg/mL。

2.4 XDP 中 5 种皂昔类成分含量测定及其方法学考察

XDP 是由三七总皂昔经加工制成, 其中的有效成分为三七皂昔类成分, 虽然《中国药典》2015 年版中规定了三七总皂昔中的 5 种成分为指标性成分, 但在 XDP 中关于 Re 的定量研究未见报道, 所以本研究在原有标准的基础上, 采用更加高效、准确和稳定的 UPLC 技术, 增加了对 Re 的定量分析, 提升了原有的质量标准。

2.4.1 线性关系考察 取“2.3”项下配好的混合对照品贮备液, 精密吸取 5 mL, 用甲醇定量至 10 mL 容量瓶中, 摇匀, 记为混标 1; 然后从混标 1 溶液中, 精密吸取 5 mL, 甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 记为混标 2; 同理, 分别逐级 2 倍稀释得混标 3、混标 4 和混标 5。连同对照品贮备液共同按照“2.1”项下的方法, 进样测定, 以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归计算, 分别得到 5 个指标性成分的线性回归方程。同时, 根据信噪比 (S/N) 为 3 和 10 时确定检测限和定量限, 结果见表 2。

2.4.2 精密度试验 选取“2.3”项下配好的对照品

表 2 5 个指标性成分的线性方程、检测限和定量限

Table 2 Linear regression equations, LODs and LOQs of five index components

成分	线性方程	r^2	线性范围/(mg·mL ⁻¹)	定量限/(μg·mL ⁻¹)	检测限/(μg·mL ⁻¹)
R ₁	$Y=1.425 \times 10^3 X+5.466$	0.999 7	0.023~0.736	0.634	0.190
Rg ₁	$Y=1.542 \times 10^3 X+25.360$	0.999 7	0.048~1.547	0.739	0.222
Re	$Y=1.467 \times 10^3 X+5.124$	0.999 8	0.019~0.619	0.887	0.266
Rb ₁	$Y=1.208 \times 10^3 X+9.636$	0.999 8	0.049~1.556	0.877	0.263
Rd	$Y=1.304 \times 10^3 X+6.191$	0.999 7	0.023~0.745	0.357	0.107

溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 根据 5 个皂昔 R₁、Rg₁、Re、Rb₁ 和 Rd 的浓度分别计算其 RSD 值, 其 RSD 结果分别为 0.53%、0.30%、0.85%、0.27%、0.30%, 均在 1% 以内, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 参照“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液 (S₁), 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 根据 5 个皂昔 R₁、Rg₁、Re、Rb₁ 和 Rd 的质量浓度分别计算其 RSD 值。其 RSD 结果分别为 0.50%、0.47%、0.36%、0.53%、0.41%, 均在 1%

以内, 表明实验重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 选取“2.2”项下配好的供试品溶液 (S₁), 按“2.1”项下的方法分别在 0、2、4、8、12、24 h 各进样 1 次, 根据 5 个皂昔 R₁、Rg₁、Re、Rb₁ 和 Rd 质量浓度计算其 RSD 值。其 RSD 结果分别为 1.35%、1.64%、1.75%、1.54%、1.40%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 加样回收率试验 取同一批样品 (S₁) 按照“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按照供试品浓度-对照品大致 1:1 比例分别加入按“2.3”

项下方法重新配制的对照品溶液 (R_1 、 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 、 R_d 质量浓度分别为 0.239、0.963、0.123、0.957、0.317 mg/mL), 摇匀后, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算各成分加样回收率及 RSD, 结果其平均回收率分别为 98.20%、98.88%、98.96%、98.31%、97.84%, 均在 95%~102%, RSD 分别为 0.51%、0.76%、1.10%、0.57%、0.51%, 表明该方法准确性良好。

2.4.6 样品中 5 种皂苷的含量测定 按照“2.2”项下方法制备 14 批 XDP 的供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行分析, 由标准曲线可以分别计算出 R_1 、 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 和 R_d 的质量浓度, 然后, 计算每克 XDP 样品中各成分的质量分数, 详细结果见表 3。分别计算其 RSD 值, 结果为 3.26%、2.94%、2.96%、1.95% 和 5.08%。结果说明, 5 种成分在一定范围内保持稳定, R_d 的波动变化稍微偏大。根据平均值 ± 3 倍的标准偏差设定其质量控制范围, 分别为 R_1 24.69~30.03 mg/g、 R_{g1} 102.60~122.44 mg/g、 R_e 12.93~15.45 mg/g、 R_{b1} 99.74~112.12 mg/g、 R_d 23.35~31.75 mg/g。

2.5 指纹图谱研究方法学考察

2.5.1 精密度试验 选取批号为 20150501 的滴丸

表 3 14 批 XDP 样品中 5 种有效成分的定量测定结果

Table 3 Content of five active ingredients in 14 batches of XDP

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	R_1	R_{g1}	R_e	R_{b1}	R_d
S1	26.431	110.881	13.794	104.724	28.604
S2	26.628	110.330	13.598	103.030	29.713
S3	28.390	116.515	14.572	103.920	28.902
S4	25.631	105.770	13.331	102.008	27.951
S5	28.357	115.583	14.432	106.312	27.968
S6	28.442	114.531	14.439	109.029	28.766
S7	28.743	116.363	14.632	108.453	28.562
S8	27.099	110.302	14.182	105.465	26.302
S9	27.220	110.087	13.649	106.174	28.653
S10	27.798	117.965	14.379	104.897	26.052
S11	27.172	112.513	14.235	106.281	26.695
S12	26.790	110.596	14.342	107.141	26.048
S13	27.385	112.178	14.588	107.709	25.297
S14	26.964	111.697	14.471	107.887	26.161
平均值	27.361	112.522	14.189	105.931	27.548
RSD/%	3.257	2.939	2.964	1.948	5.081

样品, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图, 并代入色谱指纹图谱相似度软件进行分析, 得出各共有峰的保留时间 RSD<0.31%, 峰面积的 RSD<4.70% 并且其相似度均为 1.000, 说明仪器精密度良好。

2.5.2 重复性试验 选取批号为 20150501 的滴丸样品, 按照“2.2”项下的配制方法配制 6 份, 然后同时按“2.1”项下色谱条件连续进样, 记录色谱图, 将得到的 6 张色谱图代入色谱指纹图谱相似度软件进行分析, 得出各共有峰保留时间的 RSD<0.25%, 峰面积的 RSD<3.78%, 并且其相似度为 1.000, 表明方法的重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 选取批号为 20150501 的滴丸样品, 按“2.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 各测定 1 次, 记录色谱图, 代入色谱指纹图谱相似度软件进行分析, 得出各共有峰保留时间的 RSD<0.43%, 峰面积的 RSD<4.98%, 并且其相似度为 1.000, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6 指纹图谱的建立及相似度评价

取 14 批 XDP 样品, 按照“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行分析, 将所得的色谱数据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)》, 以 S1 样品图谱作为参照图谱, 采用中位数法, 时间窗设为 0.1 min, 经多点校正后, 进行色谱峰的匹配, 生成指纹图谱共有模式, 共确认出 15 个共有峰, 通过与混合对照品溶液色谱峰图比对, 确认 2 号峰为 R_1 , 3 号峰为 R_{g1} , 4 号峰为 R_e , 12 号峰为 R_{b1} , 14 号峰为 R_d 。以共有模式作为对照指纹图谱, 对 14 批 XDP 样品指纹图谱进行相似度评价, 结果所有批次样品指纹图谱相似度均大于 0.998。结果表明 14 批样品指纹图谱相似度很高, 其质量一致性较好。14 批样品指纹图谱叠加图见图 1。

2.7 PCA

PCA 是一种常用的数据分析方法, 它可以通过线性变换将原始数据变换为一组各维度线性无关的表示, 以此来提取数据中的主要特征分量使其尽可能多的反应原始变量的信息, 常用于高维数据的降维, 以排除众多化学信息共存中相互重叠的信息。它是将原始变量进行转换, 得到少数几个互不相关 (即正交) 的综合变量, 同时这些变量要尽可能多的表征原始变量的数据结构特征而不丢失信息, 通常表现为原始变量的线性组合。高纬向低纬转换, 首

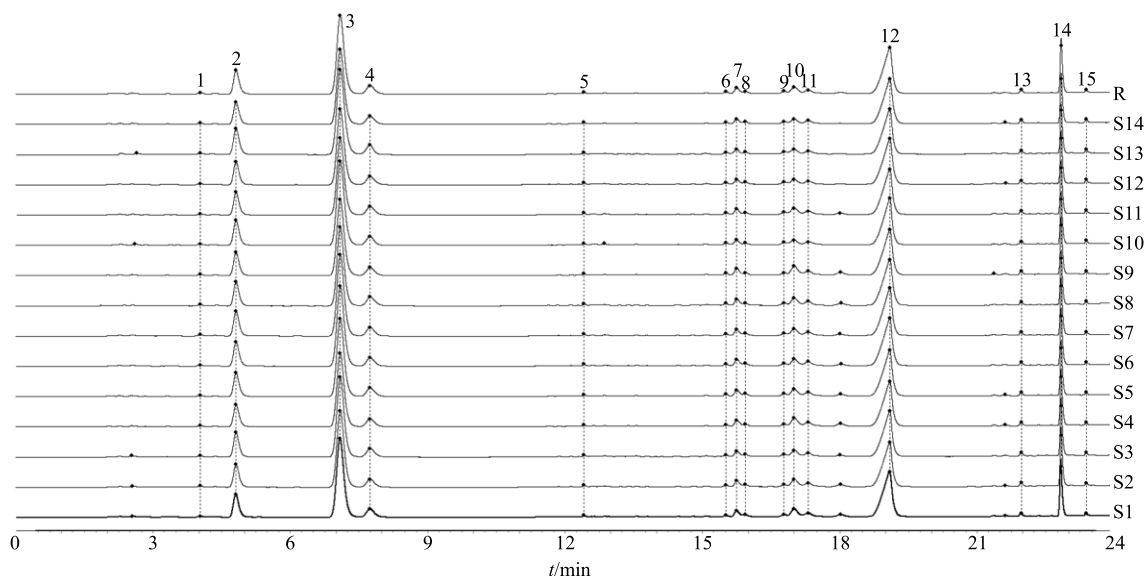


图 1 14 批 XDP 样品的 UPLC 指纹图谱

Fig. 1 UPLC fingerprints of 14 batches of XDP

先需要找到最佳的一个投影方向(主成分 1),使投影后的信息尽可能分散,而这种分散程度可以用方差来表示,方差越大,说明数据的某特征维度越分散,该特征越重要。然后,在寻找下一个投影方向(主成分 2),如果还按照方差最大原则,这个投影方向几乎与第一个方向重合,这是没有意义的,因此,应加入其他约束条件,即正交。直观上讲,投影后的变量之间不存在相关性,因为相关性意味着信息的重复,所以应保证新变量之间各不相关。为此,可以引用数学上的协方差表示其相关性,当协方差为零时,两变量之间不相关。

假设有 n 个样品,每个样品具有 m 个特征,那么构成的原始数据矩阵为

$$X = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1m} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2m} \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ x_{n1} & x_{n2} & \cdots & x_{nm} \end{bmatrix}$$

假设该矩阵中每一行都经过了零均值化处理,即每个变量都减去了该行的平均值,对于这个原始矩阵可求其协方差矩阵:

$$1/m XX^T = \begin{bmatrix} 1/m \sum_{i=1}^m x_{1i}^2 & 1/m \sum_{i=1}^m x_{1i}x_{2i} & \cdots & 1/m \sum_{i=1}^m x_{1i}x_{ni} \\ 1/m \sum_{i=1}^m x_{2i}x_{1i} & 1/m \sum_{i=1}^m x_{2i}^2 & \cdots & 1/m \sum_{i=1}^m x_{2i}x_{ni} \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ 1/m \sum_{i=1}^m x_{ni}x_{1i} & 1/m \sum_{i=1}^m x_{ni}x_{2i} & \cdots & 1/m \sum_{i=1}^m x_{ni}^2 \end{bmatrix}$$

从中可以发现,矩阵对角线上的元素是 2 个变量的方差,其他元素是变量间的协方差,两者都被统一到了一个矩阵-协方差矩阵中,按照之前讲的优化原则,方差最大,协方差为零,要达到 PCA 降维目的,等价于将协方差矩阵对角化:即除对角线外的其他元素化为 0,并且在对角线上将元素按大小从上到下排列,这样就达到了优化目的。

设原始数据矩阵 X 对应的协方差矩阵为 C ,而 P 是一组基按行组成的矩阵,设 $Y=PX$,则 Y 为 X 对 P 做基变换后的数据。设 Y 的协方差矩阵为 D ,则可推导出 D 与 C 的关系: $D=YY^T/m=(PX)(PX)^T/m= PXX^TP^T/m=P(XX^T/m)P^T=PCP^T$ 。

由上述推导可得,若有矩阵 P 能使 X 的协方差矩阵对角化,则 P 就是 PCA 的变换。可用于 PC 的化学计量学软件较多,本实验采用 SIMCA 14.1 软件(Umetrics, MKS Instruments Inc., Sweden)进行多变量数据分析。

2.7.1 指纹图谱的 PCA 模型建立及相关分析 采用 SIMCA 14.1 软件对 14 批 XDP 样品的指纹图谱数据进行 PCA。以相关性矩阵、主成分特征值和方差累积贡献率对主成分进行筛选和确认各个峰之间的相互关系;进一步通过得分图和载荷图对模型进行解释;最终,应用 Hotelling's T^2 和 DModX 2 种控制图对不同批次的样品质量进行监测。

模型自动拟合后,前 6 个主成分的特征值和方差累积贡献率见表 4,其中 PC1 和 PC2 方差累积贡献率为 72.5%,代表了 15 个共有峰的主要信息,以

这 2 个主成分描绘相关标度载荷图, 由图 2 可知, 第 1 主成分信息主要由色谱峰 1~5、8、9、12 贡献, 第 2 主成分信息主要由色谱峰 6、7、10、11、13~15 贡献。

将 14 批样品按照生产年份分为 4 类, 分别为 2015、2016、2017 和 2018 年产品, 然后其绘制 3D 得分图, 将样本的多元变量通过降维的方式投影在 3D 平面上, 以观察样本的整体分布情况, 如图 3 所示。由图可以看出, 14 批样品并无明显聚类趋势,

表 4 主成分特征值与方差贡献率

Table 4 Eigenvalue and variance contribution rate of PCA

主成分	特征值	方差累积贡献率/%	方差贡献率/%
1	5.331	38.1	38.1
2	4.816	72.5	34.4
3	1.473	83.0	10.5
4	1.062	90.6	7.6
5	0.533	94.4	3.8
6	0.299	96.5	2.1

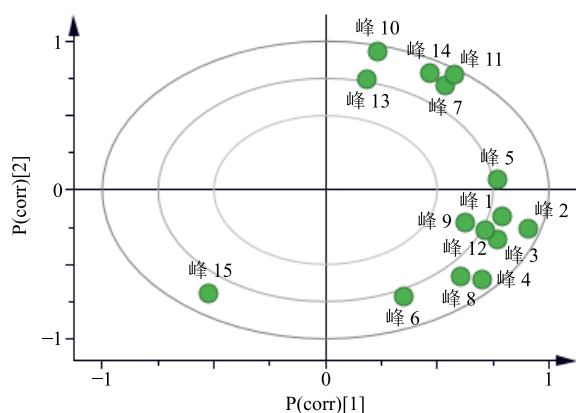


图 2 14 批样品的主成分相关标度载荷图

Fig. 2 Principal component correlation scale load diagram for 14 batches of samples

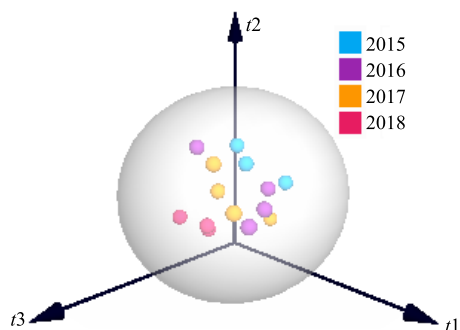


图 3 不同生产时间的 XDP 样品的三维主成分得分图

Fig. 3 Principal component scores scatter 3-D plot of XDP samples at different production time

说明其批次一致性较好。2016 年 4 批样品中 S4 与其他样品相距较远, 说明其质量有一定变化; 而 2017 年 4 批样品分布相对分散, 说明当年所产样品质量存在一定的差异。并且这 14 批样品在三维空间中, 同年样品分布较为集中, 尤以 2015 年与 2018 年明显。

2.7.2 Hotlling's T^2 和 DModX 控制限的建立 Hotlling's T^2 和 DModX 控制图是为了监测不同批次产品而开发的, 是 2 个互补的多变量分析手段。

Hotlling's T^2 表示的是每个选定观察点与模型平面中原点的距离, 为模型的内部变化度量, 代表样品中信息与主成分模型中其他样品差异; DModX 表示数据在变量 X 空间到主成分模型的距离, 为模型外部的数据变化度量, 代表样品中未被模型解释的变化。通常认为在控制限度以下的产品为正常批次产品, 超出控制限的为异常批次样品。Hotlling's T^2 和 DModX 统计量作为批次一致性评价指标, 两者具有不同的监控作用, 互为补充。当发现某个批次超出或控制限时, 在贡献图上可以分析批次过程的异常波动受哪些变量的影响。

Hotlling's T^2 和 DModX 的控制图如图 4、5, 图中的 T^2 Crit (99%) 和 D Crit 为控制限, 其控制上限分别为 31.17 和 1.82; T^2 Crit (95%) 为警戒限, 上限为 18.09。这 14 批滴丸样品在控制限之下, 均为正常批次产品, 在 2 张控制图上处于受控状态, 这也证明所建立的 PCA 模型较好的表征了样品的正常波动。说明这 14 批滴丸样品批次质量一致性较好, 与相似度评价结果相对应, 并且较于相似度阈值解释性更强。

2.8 正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)

由上述分析可知, 这 14 批 XDP 样品虽然一致

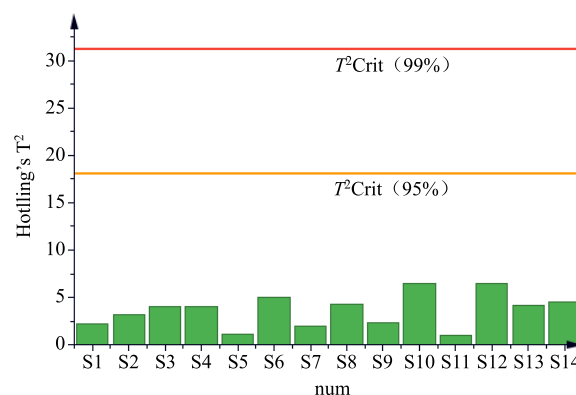


图 4 14 批 XDP 样品 Hotelling's T^2 控制图

Fig. 4 Hotelling's T^2 control chart of 14 batches of XDP

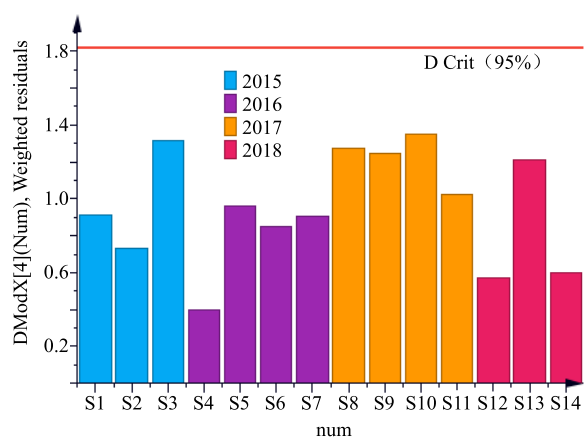


图 5 不同生产时间样品的 DModX 控制图

Fig. 5 DModX control chart of XDP samples at different production time

性较好, 未见异常批次, 但也可以观测出其具有分类趋势。为了更好地分析上述不同类别样本之间的差异, 进一步筛选出对上述样本分类贡献较大的变量。本实验利用 OPLS-DA 中的变量重要性投影值 (VIP) 为重要的变量进行搜寻, 见图 6。由图可得, VIP 值在 1 左右, 趋势变化不大。峰 6~15 的 VIP 值均大于 1 (代表这些变量对整体模型的贡献度高于平均水平), 而峰 1 至峰 5 变量对模型的影响较小。可以说明, 造成 14 批样品按生产年份相互聚集现象 (即差异) 的原因主要是变量峰 6~15, 其中峰 14 (Rd) 与峰 12 (Rg₁) 为本研究所定量的有效成分。

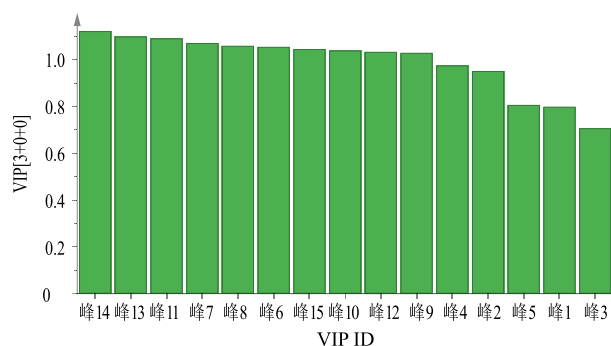


图 6 14 批 XDP 样品各活性成分的 VIP 值

Fig. 6 VIP value of each active ingredient of 14 batches of XDP

3 讨论

由前所述可知, 多成分的含量测定和指纹图谱技术并不足以对产品批次质量的一致性进行科学全面的评价, 不能够对其数据进行深入挖掘, 并容易忽略隐藏在众多共性下的差异。而通过结合相关化学计量学等方法可以从指纹图谱中获得更加全面的

信息, 从而建立一套行而有效, 科学合理的质量评价方法。

本研究在 UPLC 多成分含量测定和指纹图谱相似度评价的分析基础上, 引入相关化学计量学方法对 XDP 不同批次产品的质量的一致性进行了深入的分析, 并在 PCA 模型基础上设定了 Hotelling's 和 DModX 控制限, 实现对批次产品质量进行监测。虽然, 该 14 批样品均为正常批次样品, 其有效成分含量变化和相似度评价中都没有明显的差异, 但通过 PCA 分析后可以看出 14 批样品的存放时间差异在指纹图谱上有所体现, 而且不同峰之间相互关联, 进一步通过 OPLS-DA 中的 VIP 值可以判断出, 本研究所定量的有效成分 Rd 和 Rb₁ 是造成这些差异存在的主要原因。

所以, 在实际生产过程中, 厂家可以重点关注这 2 类成分的变化, 以便更加快速、科学地评价产品批次质量一致性。该分析思路及数据处理方法可以实现对中药指纹图谱进行较为系统、整体和全面的分析和评价。为 XDP 的批次质量一致性评价提供了准确、丰富的信息, 对提高其质量标准具有重要的意义。

参考文献

- [1] 侯湘梅, 岳洪水, 张磊, 等. 中药质量一致性评价探讨 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(1): 38-45.
- [2] 张海珠, 肖小河, 王伽伯, 等. 中药质量评控的第一要义: 效应当量一致性 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1571-1575.
- [3] 汤亚, 沈红, 武洁, 等. 提取浓缩对琼玉膏品质一致性的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(7): 1106-1111.
- [4] 王元清, 韩彬, 向荣, 等. 总量统计矩结合聚类分析与主成分分析评价虎杖饮片一致性与差异性 [J]. 中草药, 2015, 46(19): 2863-2869.
- [5] Goodarzi M, Russell P J, Vander Heyden Y. Similarity analyses of chromatographic herbal fingerprints: A review [J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 804: 16-28.
- [6] Gao S M, Liu J S, Wang M, et al. Quantitative and HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics for quality evaluation of *Codonopsis Radix* processed with different methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(2): 160-168.
- [7] 周蔚昕, 刘涛, 刘钱, 等. 川芎饮片标准汤剂的 HPLC 及物理指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2018, 49(21): 5107-5115.
- [8] 秦建平, 吴建雄, 郎悦, 等. 痛宁凝胶的 HPLC-MS 指纹图谱研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(4):

- 427-430.
- [9] 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.
- [10] 侯文, 刘宏胜, 王树森, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和多成分同时测定的护肝剂质量评价研究 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5830-5835.
- [11] Lee G J, Lee J H, Park J H, *et al.* Assessment of chemical equivalence in herbal materials using chromatographic fingerprints by combination of three similarity indices and three-dimensional kernel density estimation [J]. *Anal Chim Acta*, 2018: S0003267018302599.
- [12] Zhang B L, Yang S Y, Guo D A. The quest for modernization and internationalization of traditional Chinese medicine [J]. *Engineering*, 2019, 5(1): 001-002.
- [13] 曹瑞, 窦志华, 倪丽丽, 等. HPLC 指纹图谱、Q-TOF/MS 定性及多成分定量相结合的大黄饮片质量评价研究 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1100-1110.
- [14] 康建, 周霖, 孙志, 等. 基于 UPLC 指纹图谱结合化学模式识别的冠心丹参胶囊质量控制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(17): 4051-4057.
- [15] Lu M, Hu Q M, Zhang Y T, *et al.* Comparative chemical profiling of three TCM drugs in the Paeoniaceae family by UPLC-MS/MS combined with chemometric methods [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2019, 83: 121-129.
- [16] Li H, Gong X Q, Wang Z C, *et al.* Multiple fingerprint profile and chemometrics analysis of polysaccharides from *Sarcandra glabra* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 123: 957-967.
- [17] Yang F L, Zhang Y J, Yu Y, *et al.* Quality assessment of licorice extract powder through geometric linear quantified fingerprint method combined with multicomponent quantification and chemometric analysis [J]. *Microchemical*, 2019, 146: 239-249.
- [18] Xiong H, Qi X, Qu H. Multivariate analysis based on chromatographic fingerprinting for the evaluation of batch-to-batch reproducibility in traditional Chinese medicinal production [J]. *Anal Methods*, 2012, 5(2): 465-473.
- [19] 中华人民共和国卫生部药品标准 中药成方制剂 (第 17 册) [S]. 1990.
- [20] 薛红梅, 李若梅, 王建国. 复方血塞通滴丸的体内药物动力学研究 [J]. 黑龙江科技信息, 2016(27): 24-25.
- [21] 黄木土, 陈强, 肖俊峰, 等. 血塞通滴丸成型工艺条件的优化研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2015, 29(6): 45-47.
- [22] 刘勇志. 血塞通滴丸治疗原发性肾病综合征的效果观察 [J]. 中国当代医药, 2013, 20(5): 115-116.