

藏药白脉软膏多成分定量、指纹图谱结合多元统计分析的质量控制研究

梁 军, 刘彩凤, 刘冬涵, 钟琳瑛, 洪婷婷, 张钰明, 武慧超*, 杜守颖*

北京中医药大学, 北京 102488

摘 要:目的 建立白脉软膏的指纹图谱并测定其主要成分的含量, 结合多元统计分析对其 2 个产地 14 个批次质量进行科学全面地评价, 为其质量控制提供依据。方法 采用 HPLC 法对白脉软膏中的主要成分甘草苷、甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素进行含量测定, 建立了白脉软膏的指纹图谱, 通过指纹图谱相似度分析、聚类分析、主成分分析 (PCA) 和因子分析对 2 个产地的不同批次白脉软膏质量进行全面评价。结果 甘草苷、甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素的含量测定方法学考察符合要求, 质量分数分别为 0.051~0.200 mg/g、0.136~0.622 mg/g、0.030~0.345 mg/g、0.001~0.069 mg/g。建立的白脉软膏指纹图谱共标定 17 个共有峰, 经对照品指认共鉴定出甘草苷、甘草酸铵、甘松新酮 3 个色谱峰, 14 批样品的相似度均大于 0.975。聚类分析中 2 个产地 14 批白脉软膏可以分为 4 类, 其中西藏林芝市生产的批次 S1~S11 聚为一类, 甘肃省兰州市生产的 S12 聚为一类, S13 聚为一类, S14 聚为一类。PCA 和因子分析结果显示甘肃省兰州市生产的 3 个批次 S12~S14 主成分综合得分均高于西藏林芝市生产的 11 个批次 S1~S11, 推测是因为产地生产条件或药材来源变化导致了质量的差异, 与聚类分析结果一致。结论 首次建立白脉软膏含量测定、指纹图谱结合多元统计分析的质量控制方法科学可靠, 不但可以用于白脉软膏的质量控制, 还可以对其不同产地批次质量进行全面评价, 为白脉软膏质量标准的提高和中药批次间的质量评价提供借鉴。

关键词: 白脉软膏; 甘草苷; 甘草酸铵; 甘松新酮; 姜黄素; 指纹图谱; 多元统计分析; 质量控制; HPLC; 相似度分析; 聚类分析; 主成分分析; 因子分析

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)02-0356-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.02.011

Quality control of Tibetan medicine Baimai Ointment based on multi-component determination, fingerprint and multivariate statistical analysis

LIANG Jun, LIU Cai-feng, LIU Dong-han, ZHONG Lin-ying, HONG Ting-ting, ZHANG Yu-ming, WU Hui-chao, DU Shou-ying

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To establish a fingerprint method of Baimai Ointment (BO) and determine the content of its main components. The BO of 14 batches from two production areas was scientifically and comprehensively evaluated based on multivariate statistical analysis, which provided the basis for the quality control. **Methods** HPLC method was used to determine the content of liquiritin, ammonium glycyrrhizinate, nardosinone and curcumin in BO, and the fingerprint of BO was established. The fingerprint similarity analysis, cluster analysis, principal component analysis (PCA) and factor analysis were performed to comprehensively evaluate the different batches of BO in two producing areas. **Results** The methodological determination of liquiritin, ammonium glycyrrhizinate, nardosinone and curcumin met the requirements, and the content was 0.051—0.200 mg/g, 0.136—0.622 mg/g, 0.030—0.345 mg/g, 0.001—0.069 mg/g, respectively. The established fingerprints of BO were calibrated with 17 common peaks. Three chromatographic peaks of liquiritin, ammonium glycyrrhizinate and nardosinone were identified by reference. The similarity of 14 batches of sample was greater than 0.975. In the cluster analysis, 14 batches of BO from two producing areas can be divided into four categories, among which batches S1—S11 produced by Linzhi City of Tibet were grouped into one category. And S12 produced in Lanzhou City of Gansu Province was clustered into one class, and S13 was clustered into one class, S14 was grouped into one class. The results of PCA and

收稿日期: 2019-08-03

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项 (2017-JYB-JS-011)

作者简介: 梁 军, 男, 安徽宿州人, 在读硕士研究生, 研究方向为中药新剂型、新技术。E-mail: 20170931905@bucm.edu.cn

*通信作者 杜守颖, 博士, 教授, 主要从事中药新剂型新技术研究。Tel: (010)84738615 E-mail: dushouying@263.net

武慧超, 博士, 助理研究员, 主要从事民族药学研究。Tel: (010)64286010 E-mail: wuhuichao1011@126.com

factor analysis showed that the comprehensive scores of the three batches of S12—S14 produced in Lanzhou City of Gansu Province were higher than the 11 batches of S1—S11 produced by Linzhi City of Tibet, presumably because of the changes in production conditions or sources of medicinal materials. The result was consistent with cluster analysis. **Conclusion** This study is the first to establish a scientific and reliable quality control method of Tibetan medicine BO based on multi-component determination, fingerprint and multivariate statistical analysis. It can be used not only for the quality control of Baimai Ointment, but also for the comprehensive evaluation of batch quality consistency. It provides reference for the improvement of the quality standard of BO and the quality evaluation among Chinese medicine batches.

Key words: Baimai Ointment; liquiritin; ammonium glycyrrhizinate; nardosinone; curcumin; fingerprint; multivariate statistical analysis; quality control; HPLC; similarity analysis; cluster analysis; principal component analysis; factor analysis

中药质量的可控保证了其临床用药的安全、有效。目前主要采用控制某个或几个成分的含量来评价中药的质量,但中药及中药复方化学成分复杂,多成分、多靶点的特点决定了其多指标、多组分质量评价模式的必然性^[1-5]。指纹图谱技术能较为全面地反映中药及其制剂中所含化学成分的信息及不同批次间的相互关系,进而对药品质量进行整体描述和评价,目前已经在藏药及其复方的质量控制研究中得到了广泛的应用^[6-9]。然而,指纹图谱技术不足以把不同批次中药得到的信息量进行充分地整合分析,而结合多元统计分析,如聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)及因子分析等方法可以对复杂的化学数据信息进行充分整合,更加形象地反映不同批次间的质量差异^[10-12],有利于不同产地批次药物的质量控制。

白脉软膏为藏医经典的外用制剂,400年前《藏医临床札记》中就记载了白脉软膏,现收载于《卫生部药品标准·藏药》第一册,用于白脉病、瘫痪、偏瘫、筋腱强直、外伤引起的经络及筋腱断伤、手足挛急、跛行等^[13-14]。白脉软膏的临床疗效显著,且具有较高的临床药用价值^[15-16],但目前并无成分及质量评价研究相关报道,无相关质控指标成分,《中国药典》2015年版亦无收录,对其质量控制和临床用药具有局限性。本课题根据前期筛选出的相关文献报道且与其功效相关的成分和体外经皮透过性的研究^[17],首次建立了白脉软膏的指纹图谱及主要成分的含量测定方法,结合多元统计分析更加科学全面地评价其批次间的质量,有助于白脉软膏质量的控制及其标准的完善。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Thermo UltiMate 3000 高效液相色谱(HPLC)仪, TCC-3000SD 检测器,四元低压梯度泵,柱温箱,自动进样器, DAD 检测器, Chromeleon 7 色谱

工作站,赛默飞世尔科技中国有限公司;色谱柱: Waters X Select[®] HSS T₃ C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); SB25-12DTD 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; BSA224S Sartorius 型分析天平, 赛多利斯科学仪器北京有限公司; DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海一恒科技有限公司。

1.2 试药

白脉软膏, S1~S14 批次样品生产批号依次: 170543、170603、170756、170762、170770、170771、170774、170777、170881、170897、170915、180103、180310、180415。其中 S1~S11 批次白脉软膏生产于西藏林芝市, S12~S14 批次白脉软膏生产于甘肃省兰州市, 西藏奇正藏药股份有限公司; 对照品甘草苷、甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素, 批号分别为 111610-201607、110731-201619、111832-201704、110823-201706, 质量分数分别为 93.1%、93.0%、98.2%、98.7%, 中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈, 色谱纯, Fisher 公司; 磷酸, 色谱纯, TED 公司; 娃哈哈纯净水, 杭州娃哈哈集团有限公司; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Waters X Select[®] HSS T₃ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 进行梯度洗脱, 梯度洗脱程序: 0~10 min, 85%~77%乙腈; 10~25 min, 77%~47%乙腈; 25~30 min, 47%乙腈; 30~40 min, 47%~20%乙腈; 40~50 min, 20%~5%乙腈; 50~55 min, 5%乙腈; 55~60 min, 5%~85%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 15 μL; 检测波长: 甘草苷、甘草酸铵为 237 nm, 甘松新酮为 254 nm, 姜黄素为 430 nm。在上述色谱条件下, 样品中甘草苷、甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素的保留时间与对照品保持一致, 4 种成分的色谱峰能达到较好的分离, 且纯

度检查符合要求。

2.2 对照品储备液的制备

取甘草苷、甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素对照品适量，精密称定，加甲醇分别制成含甘草苷 434.400 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草酸铵 281.400 $\mu\text{g/mL}$ 、甘松新酮 26.860 $\mu\text{g/mL}$ 、姜黄素 9.280 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

取白脉软膏 1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加甲醇 20 mL，超声处理 30 min。超声后补足减失的质量，摇匀后用 0.45 μm 微孔滤膜，滤过，取续滤液，即得。

2.4 白脉软膏中 4 种主要成分含量测定

2.4.1 线性与范围、检测限(LOD)和定量限(LOQ)
取“2.2”项下各成分对照品储备液适量，加甲醇稀释定容，制得含甘草苷 3.475 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草酸铵

11.256 $\mu\text{g/mL}$ 、甘松新酮 10.744 $\mu\text{g/mL}$ 、姜黄素 0.742 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液，取上述混合对照品溶液以甘草苷 0.348、0.695、1.043、1.390、1.738、2.085、3.475 mg/L、甘草酸铵 1.126、2.251、3.377、4.502、5.628、6.754、11.256 mg/L、甘松新酮 1.074、2.149、3.223、4.298、5.372、6.446、10.744 mg/L、姜黄素 0.074、0.148、0.223、0.297、0.371、0.445、0.742 mg/L 进样，按“2.1”项下色谱条件进行分析。以峰面积为纵坐标 (Y)，进样量为横坐标 (X)，绘制标准曲线，计算回归方程及相关系数 (r)；分别以信噪比 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 的进样质量浓度确定 LOD 和 LOQ，结果见表 1。各成分在各自质量浓度范围内线性关系良好。

2.4.2 专属性考察 分别精密吸取阴性对照溶液(甲醇)、供试品溶液、混合对照品溶液适量，按“2.1”项色谱条件下进样，结果见图 1，样品中其他峰对

表 1 甘草苷、甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素的回归方程及 LOD、LOQ

Table 1 Standard curve, LOD, LOQ of liquiritin, ammonium glycyrrhetate, nardosinone and curcumin

成分	回归方程	r	线性范围/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOD/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOQ/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
甘草苷	$Y=0.025\ 2\ X-0.001\ 1$	0.999\ 7	0.348~3.475	0.028	0.094
甘草酸铵	$Y=0.009\ 7\ X-0.006\ 6$	0.999\ 8	2.251~11.256	0.002	0.008
甘松新酮	$Y=0.029\ 1\ X-0.025\ 4$	0.999\ 4	1.074~10.744	0.051	0.172
姜黄素	$Y=0.147\ 8\ X-0.015\ 4$	0.999\ 1	0.074~0.742	0.009	0.031

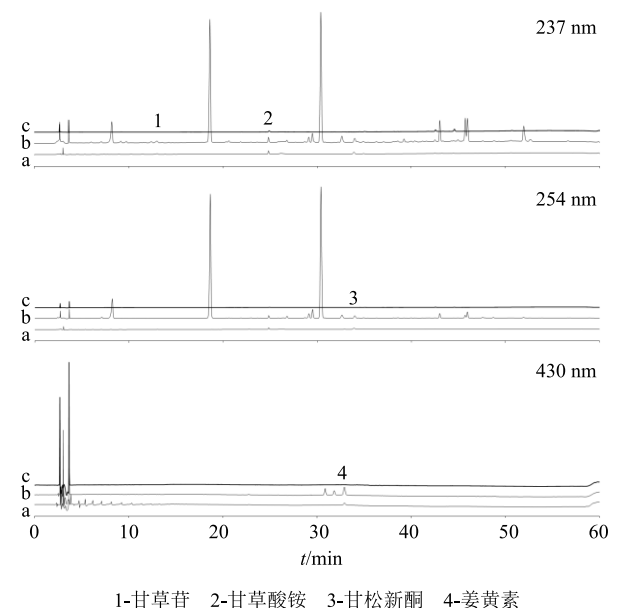


图 1 混合对照品 (a)、白脉软膏样品 (b) 和阴性对照 (c) 中 4 种成分的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of four components in mixed control (a), BO sample (b), and negative control (c)

各成分的测定不产生干扰，方法专属性良好。

2.4.3 精密度考察 取同一质量浓度(甘草苷 1.043 mg/L、甘草酸铵 3.377 mg/L、甘松新酮 3.223 mg/L、姜黄素 0.223 mg/L)的混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件于 1 d 内连续进样 6 次，测定各成分峰面积，计算峰面积的 RSD，结果表明，甘草苷、甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素峰面积的 RSD 分别为 0.60%、1.45%、0.57%、2.81%，说明仪器的精密度良好。

2.4.4 稳定性考察 取同一份供试品溶液(批号 170915)，按“2.1”项下色谱条件，分别于配制后 0、3、6、9、12、24 h 进样，测定各成分峰面积，计算峰面积的 RSD 值，结果表明，甘草苷、甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素峰面积的 RSD 分别为 1.65%、0.58%、0.68%、0.68%，表明供试品溶液在 24 h 内的稳定性良好。

2.4.5 重复性考察 取同一批次(批号 170915)的白脉软膏 1 g，共 6 份，精密称定，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样，

测定峰面积, 计算峰面积的 RSD 值, 结果表明, 甘草苷、甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素峰面积的 RSD 分别为 2.43%、2.39%、2.56%、2.56%, 说明多次重复测定得到的结果偏差较小, 具有较好的重复性。

2.4.6 加样回收率考察 取已知含量同一批次(批号 170915) 的白脉软膏 0.5 g, 共 6 份, 精密称定, 分别加入质量浓度为 17.376、25.100、25.744、7.840 mg/L 的甘草苷、甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素的对照品溶液适量, 使之与所取供试品中 4 种成分的含量之比在 1:1 左右, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件进行测定。计算甘草苷、甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素平均加样回收率分别为 92.06%、105.73%、95.61%、95.88%, RSD 值分别为 1.33%、1.01%、1.87%、0.78%, 表明方法的准确度良好。

2.4.7 样品含量测定 取白脉软膏 1 g, 精密称定, 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1”项下的色谱条件进行测定, 将测定的 4 种成分的峰面积值代入“2.4.1”项下各成分的回归方程, 计算白脉软膏样品中 4 种成分的质量浓度, 结果见表 2。结果表明, 甘草苷、甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素质量分数分别为 0.051~0.200 mg/g、0.136~0.622 mg/g、0.030~0.345 mg/g、0.001~0.069 mg/g, 其中甘肃省兰州市生产的 S13、S14 批次白脉软膏中 4 种成分含量与西藏林芝市有较明显差异, 仍需要结合更多信息量进行批次间质量比较, 因此在多成分含量测定的基础上进一步进行指纹图谱分析。

2.5 白脉软膏指纹图谱研究

按“2.1”项下的色谱条件进行 DAD 全波长扫描, 扫描范围 190~450 nm, 通过对比各个波长下的峰数、峰的响应值大小及主要成分的响应情况, 最终选定指纹图谱的检测波长为 237 nm。

2.5.1 精密度试验 选取批号为 170771 (S6) 的白脉软膏, 精密称定样品 1 g, 按“2.3”项下的供试品溶液制备方法制备样品, 按“2.1”项下的色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图, 并代入指纹图谱相似度评价软件进行分析, 得出各共有峰的相对保留时间 RSD<0.12%, 相对峰面积的 RSD<3.15%, 并且其相似度为 1.000, 说明仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 选取批号为 170771 (S6) 的白脉软膏样品, 精密称定样品 1 g, 按“2.3”项下的供试品溶液制备方法制备样品, 按“2.1”项下色谱条件分别在 0、3、6、9、12、24 h 各测定 1 次, 记

表 2 14 批白脉软膏中 4 种成分的含量测定结果

Table 2 Determination results of four components in 14 batches of BO

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	甘草苷	甘草酸铵	甘松新酮	姜黄素
S1	0.088	0.141	0.145	0.017
S2	0.078	0.149	0.122	0.012
S3	0.069	0.146	0.113	0.002
S4	0.099	0.147	0.183	0.005
S5	0.057	0.151	0.110	0.003
S6	0.072	0.136	0.148	0.003
S7	0.081	0.142	0.119	0.007
S8	0.081	0.139	0.116	0.008
S9	0.097	0.154	0.131	0.023
S10	0.069	0.211	0.135	0.017
S11	0.051	0.210	0.091	0.007
S12	0.051	0.189	0.030	0.069
S13	0.200	0.622	0.345	0.001
S14	0.181	0.519	0.299	—

“—” 低于定量限

“—” below the limit of quantitation

录色谱图, 代入色谱指纹图谱相似度软件进行分析, 得出各共有峰相对保留时间的 RSD<0.14%, 相对峰面积的 RSD<2.09%, 并且其相似度为 1.000, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.3 重复性试验 选取批号为 170771 (S6) 的白脉软膏样品, 精密称定样品 1 g, 共 6 份, 按“2.3”项下的供试品溶液制备方法制备样品, 按“2.1”项下的色谱条件进样, 记录色谱图, 将得到的 6 张色谱图代入指纹图谱相似度软件进行分析, 得出各共有峰相对保留时间的 RSD<0.05%, 相对峰面积的 RSD<5.23%, 并且其相似度为 1.000, 表明方法的重复性良好。

2.5.4 指纹图谱的建立及相似度评价 取 14 批白脉软膏样品各 1 g, 精密称定, 按照“2.3”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, 共标定出 17 个共有峰, 通过与混合对照品溶液色谱图比对, 确认 4 号峰为甘草苷, 8 号峰为甘草酸铵, 10 号峰为甘松新酮。以

共有模式作为对照指纹图谱,对 14 批白脉软膏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 0.975。结果表明 14 批样品指纹图谱相似度较高,说明 2 个产地 14 批样品质量较为接近,但其中甘肃省兰州市生产的 S12、S13 批次白脉软膏相似度分别为 0.977 和 0.984,与西藏林芝市 S1~S11 批次相似度均在 0.990 以上有差异,因此进一步结合多元统计分析的方法进行信息整合,比较不同产地批次间的质量。14 批样品指纹图谱叠加图见图 2。

2.6 CA

以 2 个产地 14 批白脉软膏指纹图谱中 17 个共有峰的峰面积标准化后的数据为变量,运用 SPSS

25.0 数据统计分析软件对其进行系统聚类分析,选用组间联接聚类方法,采用欧式距离度量标准。聚类结果见图 3。结果显示,14 批白脉软膏可以分为 4 类,其中西藏林芝市生产的批次 S1~S11 聚为一类,甘肃省兰州市生产的批次 S12 聚为一类, S13 聚为一类, S14 聚为一类。结果说明甘肃省兰州市生产的白脉软膏与西藏林芝市生产的白脉软膏质量有所差异,进一步通过 PCA 和因子分析对不同产地批次质量进行排序比较。

2.7 PCA 和因子分析

采用 SPSS 25.0 统计软件对 14 批白脉软膏样品的指纹图谱数据进行 PCA 及因子分析。将 14 个批次白脉软膏样品的 17 个共有峰峰面积导入 SPSS

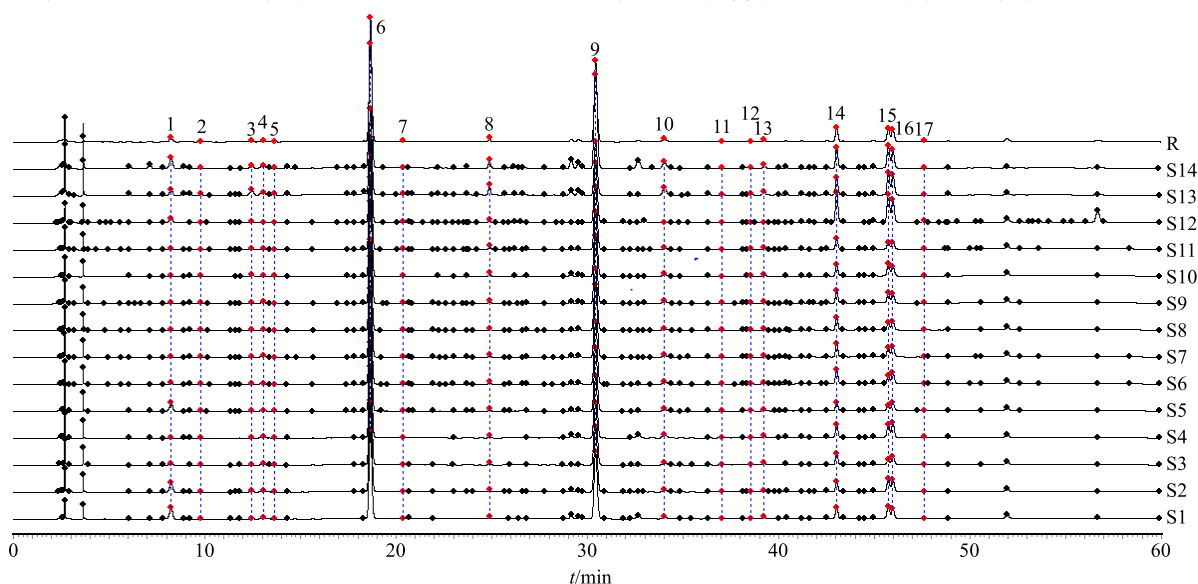


图 2 14 批白脉软膏指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 2 Fourteen batches of BO fingerprint and its control fingerprint (R)

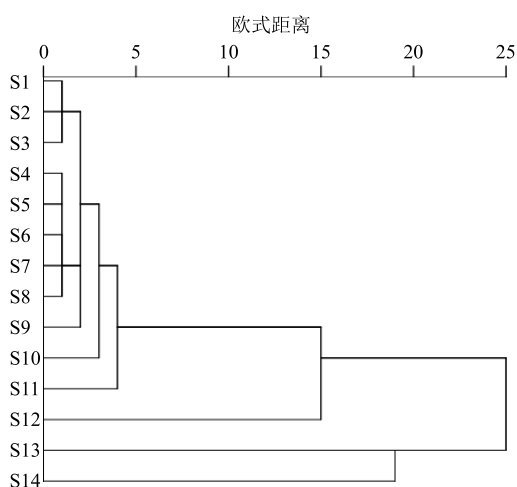


图 3 14 批白脉软膏样品聚类分析结果

Fig. 3 Cluster analysis results of 14 batches of BO sample

25.0 统计软件,对数据进行标准化处理后,以相关性矩阵确认各个峰之间的相互关系,以特征值和方差累积贡献率对主成分个数进行筛选,进一步通过因子载荷矩阵和载荷图及主成分得分进行解释。

2.7.1 相关性分析 PCA 和因子分析的前提条件是所分析的变量有一定的相关性,将 17 个共有峰峰面积导入 SPSS 25.0 统计软件分析后得到的相关系数矩阵,结果表明大部分峰面积之间的相关系数值均大于 0.3,因此符合分析的条件。

2.7.2 特征值、方差贡献率和因子载荷 PCA 的前 10 个成分特征值及方差贡献率见表 3,以特征值 > 1 为提取标准,得到前 3 个主成分的方差累积贡献率为 87.212% > 85%,因此 3 个主成分代表了白脉软膏中 17 个成分量的 87.212% 的信息量,具有很好的

表 3 特征值和方差贡献率

Table 3 Characteristic value and variance contribution rate

峰号	初始特征值			提取载荷平方和		
	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	9.006	52.976	52.976	9.006	52.976	52.976
2	3.430	20.178	73.153	3.430	20.178	73.153
3	2.390	14.059	87.212	2.390	14.059	87.212
4	0.960	5.646	92.859			
5	0.598	3.516	96.375			
6	0.371	2.180	98.555			
7	0.116	0.680	99.235			
8	0.055	0.324	99.559			
9	0.035	0.209	99.768			
10	0.020	0.120	99.888			

代表性,足以评价白脉软膏的质量。以成分数目为横坐标,特征值为纵坐标做图,由图 4 可以看出,第 1 个成分的特征值很高,对解释白脉软膏中 17 个成分信息量贡献最大,第 4 个成分以后的特征值都较小,对于信息量的贡献很小,因此选择 3 个主成分是合适的。

在确定了 3 个主成分的个数后,还需要知道 3 个主成分主要来源于哪些峰的影响,主要成分属于哪些主成分,从而有利于质量的控制研究。因子负荷能反映各指标对主成分贡献的大小^[18],本实验采用最大方差法得到旋转后的因子载荷矩阵及因子载荷图,见表 4 和图 5。结果表明,第 1 主成分的信息主要来自于峰 2 (P2)~P5、P8、P10~P13,信息量最大。第 2 主成分的信息主要来自于 P7、P14~P17。第 3 主成分的信息主要来自于 P1、P6、P9。结果表明含量测定的主要成分 P4、P8、P10 贡献于第 1 个主成分,因此第 1 个主成分对白脉软膏质量影响最大。

2.7.3 白脉软膏的不同产地批次间质量评价 PCA

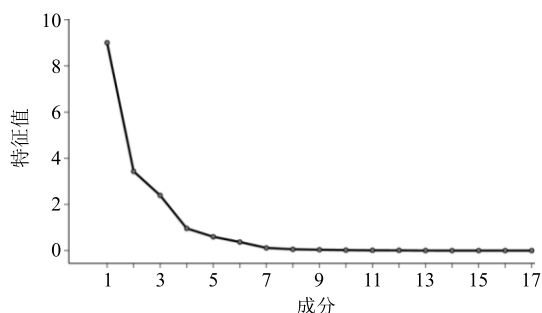


图 4 因子的碎石图

Fig. 4 Scree plot of factors

表 4 旋转后的因子载荷矩阵

Table 4 Factor load matrix after rotation

峰号	主成分			峰号	主成分		
	1	2	3		1	2	3
1	0.186	0.227	0.502	10	0.933	0.082	0.301
2	0.844	0.373	-0.307	11	0.945	0.235	0.158
3	0.858	0.456	0.035	12	0.735	-0.142	0.149
4	0.891	0.238	0.332	13	0.900	-0.131	0.343
5	0.911	0.330	-0.174	14	-0.047	0.959	0.099
6	0.247	0.047	0.884	15	0.262	0.932	0.127
7	0.204	0.607	-0.597	16	0.337	0.896	0.041
8	0.853	0.409	0.204	17	0.136	0.949	0.142
9	0.109	0.096	0.944				

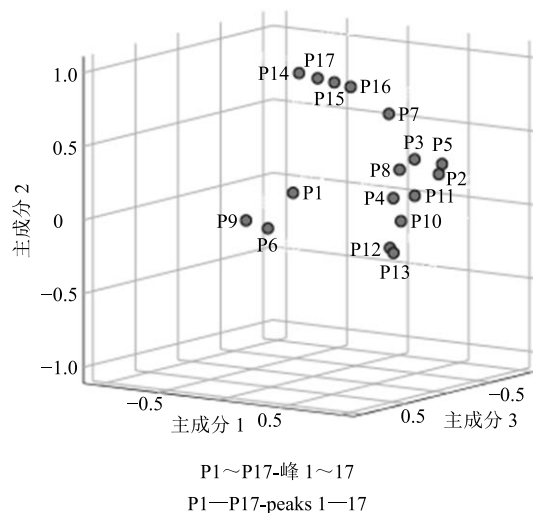


图 5 旋转后的因子载荷图

Fig. 5 Factor load diagram after rotation

的综合得分可判别样品质量优劣^[19-20]。一般情况下,样品的综合得分越高,说明该样品的质量越好。通过计算各主成分所对应的的特征向量,得到各主成分的线性模型如下: $Z_1=0.123 X_1+0.279 X_2+0.319 X_3+0.312 X_4+0.300 X_5+0.316 X_6+0.119 X_7+0.321 X_8+0.109 X_9+0.296 X_{10}+0.316 X_{11}+0.194 X_{12}+0.254 X_{13}-0.152 X_{14}+0.236 X_{15}+0.245 X_{16}+0.204 X_{17}$; $Z_2=-0.062 X_1+0.070 X_2+0.020 X_3-0.155 X_4+0.005 X_5-0.244 X_6+0.371 X_7-0.041 X_8-0.210 X_9-0.225 X_{10}-0.124 X_{11}-0.244 X_{12}-0.321 X_{13}+0.406 X_{14}+0.324 X_{15}+0.315 X_{16}+0.355 X_{17}$; $Z_3=0.282 X_1-0.308 X_2-0.105 X_3+0.012 X_4-0.257 X_5+0.446 X_6-0.263 X_7-0.016 X_8+0.524 X_9-0.047 X_{10}-0.099 X_{11}-0.130 X_{12}-0.056 X_{13}+0.260 X_{14}+0.193 X_{15}+0.118 X_{16}+0.233 X_{17}$ 。

其中, $Z_1\sim Z_3$ 分别表示第 1~3 个主成分得分, $X_1\sim X_{17}$ 分别表示 17 个共有峰峰面积的标准化数据,将各样本数据代入上述模型后,得到各批次样本的主成分得分。 F 表示样品主成分综合得分, $F=0.530 Z_1+0.202 Z_2+0.141 Z_3$,式中 0.530、0.202、0.141 分别为主成分 1~3 的方差贡献率,主成分得分计算结果及排名见表 5。结果表明,甘肃省兰州市生产的 3 个批次白脉软膏 S12~S14 得分排名均高于西藏林芝市生产的 11 个批次 S1~S11,推测可能是产地生产条件或者药材来源不同的影响,这与聚类分析结果一致。提示厂家应该注意不同产地白

表 5 样品的主成分得分及排名

Table 5 Principal component scores and ranking of samples

编号	Z_1	Z_2	Z_3	Z	排名
S1	-0.984	-0.505	0.413	-0.565	14
S2	-1.088	-0.323	0.295	-0.600	8
S3	-1.735	-1.351	-0.385	-1.247	11
S4	-0.326	-0.303	0.163	-0.211	5
S5	-2.380	-0.917	-0.064	-1.456	13
S6	-1.072	-0.072	-0.070	-0.593	7
S7	-1.372	-0.235	0.367	-0.723	9
S8	-1.715	-0.396	-0.571	-1.070	10
S9	-0.646	-0.553	-0.445	-0.517	6
S10	-0.052	0.493	-1.356	-0.119	4
S11	-2.270	-0.315	-0.631	-1.356	12
S12	0.040	6.022	1.536	1.454	3
S13	7.867	0.477	-3.156	3.821	1
S14	5.734	-2.022	3.904	3.181	2

脉软膏质量的控制,保证软膏质量的稳定、均一。

3 讨论

为了能够尽可能地反映白脉软膏中的成分信息,使各个色谱峰有较高的响应值和达到较好的分离,本实验前期进行了提取方法、流动相、检测波长的考察及指纹图谱梯度洗脱条件的摸索。因为白脉软膏中含有的药材成分大多为脂溶性成分,因此分别用有机溶剂甲醇和醋酸乙酯进行超声提取,结果表明,甲醇提取成分响应值更高,峰的个数更多,因此采用甲醇进行提取。

酸能有效降低了酚羟基和羧基等的离子化,从而提高柱内分离效果^[21],白脉软膏中含有酸类成分,因此流动相考察了乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水、甲醇-0.1%磷酸水、乙腈-0.05%磷酸水、乙腈-0.2%磷酸水的洗脱条件,结果显示,在乙腈-0.1%磷酸水的洗脱条件下对白脉软膏化学成分分离效果最好,因此选用该体系。

在进行检测波长选择时,分别在药典中规定的检测波长 237、254、430 nm 下测定白脉软膏中甘草苷、甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素的含量;指纹图谱的波长选择时,采用 DAD 检测器进行 190~450 nm 全波长扫描,每隔 20 nm 提取 1 个波长进行对比,结果显示在 237 nm 波长下色谱峰较多,响应值较高信息较完全,因此选用 237 nm 作为指纹图谱检测波长。综上,确定了“2.1”项下的色谱条件和“2.3”项下的制备方法。

本研究首次建立了白脉软膏主要成分的 HPLC 含量测定方法,甘草苷、甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素的方法学考察结果均符合要求,说明此测定方法适应于 4 种成分的含量测定。通过测定了 14 个批次的白脉软膏,得到的甘草苷、甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素的质量分数分别为 0.051~0.200 mg/g、0.136~0.622 mg/g、0.030~0.345 mg/g、0.001~0.069 mg/g,其中,西藏林芝市生产的 S1~S11 批次 4 种成分的整体含量较为均一、稳定。但甘肃省兰州市生产的 S13、S14 批次除姜黄素外其余 3 个成分含量明显较西藏林芝市高,因此需要对各个主要成分的质量进行控制。

指纹图谱相似度评价结果均大于 0.975,相似度较好。聚类分析将 2 个产地 14 个批次分为 4 类,西藏林芝市生产的批次 S1~S11 聚为一类,甘肃省兰州市生产的批次 S12 聚为一类,S13 聚为一类,S14 聚为一类,说明甘肃省兰州市生产的白脉软膏与西

藏林芝市生产的白脉软膏质量有所差异。PCA 的结果显示,甘肃省兰州市生产的白脉软膏 3 个批次主成分综合得分均高于西藏林芝市生产的 11 个批次,与聚类分析结果一致。可能是因为产地或药材来源变化导致的质量差异,提示厂家注意产地生产条件的变化,保证质量的一致性。

综合聚类分析和 PCA 结果,基于白脉软膏定量分析方法和指纹图谱,本课题所建立的定量分析、指纹图谱及多元统计分析的方法可用于白脉软膏的质量控制及质量标准的提高,为中药不同产地批次间的质量评价研究提供借鉴。

参考文献

- [1] 荆文光,张 权,邓 哲,等. 指纹图谱、多成分定量与化学计量学相结合的厚朴药材质量评价 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(5): 975-982.
- [2] 刘昌孝. 中药质量标志物 (Q-marker): 提高中药质量标准及质量控制理论和促进中药产业科学发展 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4517-4518.
- [3] Liu C X. Determination of quality markers is basis for establishing quality standard and control of Chinese herbal medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(4): 299-300.
- [4] 刘晶晶,王晶娟,张贵君. 现行中药质量标准研究的误区及其解决方案 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 258-260.
- [5] 褚延斌,苏小琴,李德坤,等. 中药注射剂质量控制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 345-353.
- [6] 陈文静,梁文仪,李 师,等. 基于指纹图谱分析和多成分同时定量的藏药毛诃子质量评价研究 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1210-1215.
- [7] La M P, Zhang F, Gao S H, *et al.* Constituent analysis and quality control of *Lamiophlomis rotata* by LC-TOF/MS and HPLC-UV [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 102: 366-376.
- [8] 宋 霞,王慧春,海 平,等. 藏药二十五味珍珠丸中肉桂酸的含量测定及 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(12): 2190-2198.
- [9] Duan B L, Zhao Z Q, Lin L, *et al.* Antidiabetic effect of Tibetan medicine Tang-Kang-Fu-San on high-fat diet and streptozotocin-induced type 2 diabetic rats [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2017, 2017: 1-9.
- [10] 李 宁. UPLC-Q-Orbitrap HRMS 结合主成分分析的复方血栓通胶囊质量评价研究 [J]. 中草药, 2018, 49(19): 4552-4560.
- [11] 李岩岩,祁龙凯,林 励,等. UPLC 法同时测定降香中 7 个黄酮类成分含量及主成分分析 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39(2): 240-248.
- [12] 刘雯雪,王昭懿,赵崇军,等. 黄丝郁金挥发油含量测定及指纹图谱的建立 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5923-5928.
- [13] Breunig J J, Silbereis J, Vaccarino F M, *et al.* Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(51): 20558-20563.
- [14] 陈 帅,张小海,张宏艺. 白脉软膏外敷治疗急性踝关节扭伤临床疗效观察 [J]. 江西医药, 2017, 52(2): 126-127.
- [15] 谢 莉. 白脉软膏联合康复训练与单纯康复训练治疗脑梗死后肢体痉挛患者临床疗效对比分析 [J]. 中国实用医药, 2018, 13(36): 123-125.
- [16] 陈维武,刘 静,陆 洁,等. 白脉软膏对脑卒中的治疗作用研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(2): 196-200.
- [17] 梁 军,武慧超,杜守颖,等. 白脉软膏主要成分体外经皮透过性的研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(12): 2486-2492.
- [18] 马鸿雁,周婉珊,褚夫江,等. 苦参中黄酮类成分的高效液相指纹图谱及 5 种成分的含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16): 2690-2695.
- [19] 徐 男,孙 蓉,李元媛,等. 基于 HPLC 指纹图谱、多成分定量结合化学计量学方法评价不同产地三棱药材的质量 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1682-1689.
- [20] 陈鸿平,刘 飞,郭 换,等. 两基原中药决明子 UPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3826-3832.
- [21] Escarpa A, González M C. Fast separation of (poly) phenolic compounds from apples and pears by high-performance liquid chromatography with diode-array detection [J]. *J Chromatogr A*, 1999, 830(2): 301-309.