

基于 HPLC 指纹图谱、多指标成分含量测定及化学计量学的湿热痹片质量评价

高 森¹, 王 苹², 唐 钺³, 白 雪⁴, 文柳静⁵, 李正翔¹

1. 天津医科大学总医院 药剂科, 天津 300052

2. 天津现代创新中药科技有限公司, 天津 300392

3. 天津医科大学药学院, 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070

4. 天士力控股集团研究院中药开发中心, 创新中药关键技术国家重点实验室, 天津 300402

5. 天津医科大学肿瘤医院药学部, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津 300060

摘 要: **目的** 建立指纹图谱和多指标定量与化学计量学相结合的湿热痹片质量评价方法。**方法** 采用 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃; 检测波长分别为 303 nm (检测桑皮苷 A、桑皮苷 F、桑辛素 M) 和 270 nm (检测连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、苍术素醇、白术内酯 II、苍术素); 流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min。利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723 版) 建立湿热痹片的 HPLC 指纹图谱, 确定共有峰并进行相似度评价; 并对桑皮苷 A、桑皮苷 F、桑辛素 M、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、苍术素醇、白术内酯 II、苍术素的含量测定方法进行方法学验证; 基于指纹图谱共有峰峰面积测定结果, 采用聚类分析和主成分分析等化学计量学方法对不同批次的湿热痹片进行质量评价。**结果** 湿热痹片 HPLC 指纹图谱确认了 16 个共有峰, 指认 9 个共有峰, 10 批湿热痹片样品相似度均大于 0.95, 相似度良好; 9 种成分在各自的质量浓度范围内线性关系良好 ($r^2 \geq 0.999 1$), 平均加样回收率分别为 98.87%、97.44%、97.94%、98.39%、100.13%、99.06%、96.80%、98.44%、99.15%, RSD 分别为 1.42%、1.17%、1.30%、0.91%、0.86%、1.23%、1.08%、1.37%、0.79%; 10 批次样品中桑皮苷 A、桑皮苷 F、桑辛素 M、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、苍术素醇、白术内酯 II、苍术素的质量浓度分别在 0.192~0.289、0.057~0.095、0.113~0.158、0.309~0.375、1.537~1.916、0.478~0.596、0.049~0.072、0.279~0.354、0.629~0.759 mg/g。10 批湿热痹片聚为 2 类; 主成分 1~6 是影响湿热痹片质量评价的主要因子。**结论** 所建立的方法操作便捷、结果准确、重复性好, 可用于湿热痹片的质量控制和评价。

关键词: 湿热痹片; HPLC; 指纹图谱; 化学计量学; 聚类分析; 主成分分析; 桑皮苷 A; 桑皮苷 F; 桑辛素 M; 连翘酯苷 B; 连翘酯苷 A; 连翘苷; 苍术素醇; 白术内酯 II; 苍术素; 质量评价

中国分类号: R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2020)21-5454-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.21.009

Quality evaluation of Shirebi Tablets based on combinative methods of HPLC fingerprint, quantitative analysis of multi-components and chemometrics analysis

GAO Sen¹, WANG Ping², TANG Cheng³, BAI Xue⁴, WEN Liu-jing⁵, LI Zheng-xiang¹

1. Department of Pharmacy, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

2. Tianjin Modern Innovation TCM Technology Co., Ltd., Tianjin 300392, China

3. Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics (Theranostics), College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

4. State Key Laboratory of Chinese Medicine Key Technology Innovation, Tasly Holding Group Academy of Traditional Chinese Medicine Development Center, Tianjin 300402, China

收稿日期: 2020-06-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81872236); 天津市自然科学基金项目 (18JCYBJC95100)

作者简介: 高 森 (1980—), 男, 副主任药师, 主要从事中西药质量控制、医院药学和药物评价研究。

Tel: 13920249696 E-mail: gaosenyjk@163.com

5. Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Treatment, State Cancer Clinical Medical Research Center, Tianjin Medical University Cancer Hospital, Tianjin 300060, China

Abstract: Objective To establish a quality evaluation method of Shirebi Tablet based on HPLC fingerprints, quantitative analysis of multi-components and chemometrics analysis. **Methods** The chromatographic column was Waters Symmetry C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), and the column temperature was set at 30 °C. The detection wavelength was set at 303 nm (for mulberroside A, mulberroside F and moracin M) and 270 nm (for forsythoside B, forsythoside A, forsythin, atractylodinol, atractylenolide II, and atractylodin). The mobile phase was composed of acetonitrile-0.2% phosphate acid solution in gradient elution manner at a flow rate of 1.0 mL/min. The HPLC fingerprint of Shirebi Tablet was established, the common peaks were determined by similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM (Version 2012.130723), and the similarity was calculated. The content determination methods for mulberroside A, mulberroside F, moracin M, forsythoside B, forsythoside A, forsythin, atractylodinol, atractylenolide II, and atractylodin were validated. The chemometrics methods such as cluster analysis and principal component analysis were used to evaluate the quality of Shirebi Tablet from different batches based on the results of fingerprint common peak area. **Results** The fingerprint of Shirebi Tablet was established. Sixteen common peaks were identified. The similarity of fingerprints of 10 batches of Shirebi Tablet was more than 0.95. Nine components had good linear relationship in the range of mass concentration ($r^2 \geq 0.999$), and the average recoveries were 98.87%, 97.44%, 97.94%, 98.39%, 100.13%, 99.06%, 96.80%, 98.44% and 99.15% with the RSDs of 1.42%, 1.17%, 1.30%, 0.91%, 0.86%, 1.23%, 1.08%, 1.37% and 0.79%, respectively. The concentrations of mulberroside A, mulberroside F, moracin M, forsythoside B, forsythoside A, forsythin, atractylodinol, atractylenolide II, and atractylodin in 10 batches were 0.192—0.289, 0.057—0.095, 0.113—0.158, 0.309—0.375, 1.537—1.916, 0.478—0.596, 0.049—0.072, 0.279—0.354, and 0.629—0.759 mg/g, respectively. The results of cluster analysis showed that 10 batches of Shirebi Tablet were clustered into two groups, and the results of principal component analysis showed that the principal components 1—6 were the main factor affecting the quality evaluation of Shirebi Tablets. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the quality control and evaluation of Shirebi Tablet.

Key words: Shirebi Tablet; HPLC; fingerprints; chemometrics analysis; cluster analysis; principal component analysis; mulberroside A; mulberroside F; moracin M; forsythoside B; forsythoside A; forsythin; atractylodinol; atractylenolide II; atractylodin; quality evaluation

湿热痹片由桑枝、连翘、苍术、忍冬藤、黄柏、薏苡仁、川牛膝等 12 味中药材加工而成，临床上主要用于湿热痹阻所致肌肉或关节红肿热痛，有沉重感，步履艰难，发热，口渴不欲饮，小便短赤等病症的治疗^[1]。现代研究表明，湿热痹片能够明显改善佐剂性关节炎大鼠关节滑膜组织中基质金属蛋白酶-1 及基质金属蛋白酶-3 的高表达^[2]，调节关节炎模型大鼠外周血 T 淋巴细胞及细胞因子网络平衡^[3]，减少醋酸刺激所致的小鼠扭体反应次数，抑制小鼠腹腔毛细血管通透性增高及二甲苯所引起的耳廓肿胀，减轻类风湿关节炎模型大鼠足爪肿胀程度、降低外周血白细胞数目及关节炎积分，具有良好的镇痛抗炎作用^[4]；其对湿热痹阻型膝关节骨性关节炎^[5-6]、急性痛风性关节炎^[7]、类风湿关节炎、强直性脊柱炎疗效显著^[8]。

湿热痹片现收载于《中国药典》2015 年版一部，为独家生产品种，方中苍术燥湿健脾、祛风散寒，黄柏清热燥湿、泻火除蒸，共为君药；连翘清热散结、疏散风热，粉萆薢祛风除湿，薏苡仁利水渗湿、

除痹散结，防己祛风止痛、利水消肿，合为臣药；桑枝祛风湿、利关节，防风祛风止痉、胜湿止痛，威灵仙祛风湿、通经络，忍冬藤、地龙清热通络，共为佐药；川牛膝逐瘀通经、通利关节，引药下行，为使药，诸药合奏，以达祛风除湿、清热消肿、通络定痛之功。苍术为菊科植物茅苍术或北苍术的干燥根茎，苍术素醇、苍术素等聚乙烯炔类和白术内酯 II 等倍半萜类为其主要活性成分；连翘为木犀科植物连翘的干燥果实，连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷等为其特征成分；桑枝为桑科植物桑的干燥嫩枝，主要含有桑枝多糖、黄酮类和生物碱类等活性成分，桑皮苷 A、桑皮苷 F 和桑辛素 M 等为其代表性成分。本研究根据“君、臣、佐、使”中医配伍理论，结合中药质量标志物^[9-10]以君药所含成分为主，兼顾臣佐使药所含成分的确认原则，将以上 9 种成分作为湿热痹片定量测定目标成分，用于对湿热痹片的综合质量评价。

中药指纹图谱具有整体性、信息量大、特征性强的特点，是综合评价中药及其制剂质量一致性和

稳定性的有效方法, 聚类分析 (CA)、主成分分析 (PCA) 等化学计量学分析方法将指纹图谱提供的多维信息进行充分整合、正确表达, 有利于揭示中药及其制剂, 尤其是中成药复方制剂复杂成分间隐藏的规律, 避免了综合评价时主观加权的弊端。湿热痹片现行质量标准^[1]和文献报道^[11-13]仅对其方中单味药材所含 1~2 种成分进行了定量测定研究, 中成药复方制剂具有多成分、多靶点, 成分间相互协调、相互制约, 整体作用等特点, 现有的单成分质量控制方法难以全面反映其整体质量, 本研究采用 HPLC 梯度洗脱法, 建立湿热痹片 HPLC 指纹图谱, 结合多指标成分含量测定、聚类分析和主成分分析, 为更加全面评价湿热痹片整体质量提供参考依据。

1 仪器与试药

LC-20AT 型高效液相色谱仪, 日本 Shimadzu 公司; KQ-200KDE 型超声波清洗机, 昆山市超声仪器有限公司; BP211D 型电子天平, 德国 Sartorius 公司。对照品连翘酯苷 B (批号 111811-201603, 质量分数 96.6%)、连翘酯苷 A (批号 111810-201707, 质量分数 97.2%)、连翘苷 (批号 110821-201816, 质量分数 95.1%)、白术内酯 II (批号 111976-201501, 质量分数 99.9%) 和苍术素 (批号 111924-201806, 质量分数 99.5%) 均来源于中国食品药品检定研究院; 对照品桑皮苷 A (批号 PRF7102141, 质量分数 99.1%) 和桑皮苷 F (批号 PS010079, 质量分数 99.3%) 来源于成都普瑞法科技开发有限公司; 对照品桑辛素 M (批号 CFS201801, 质量分数 98.0%) 来源于武汉天植生物技术有限公司; 对照品苍术素醇 (批号 BD250093, 质量分数 98.0%) 来源于上海毕得医药科技有限公司; 专属性试验所用药材来源于天津市中药饮片厂有限公司, 经天津医科大学药学院唐铖博士鉴定, 苍术为菊科植物北苍术 *Atractylodes chinensis* (DC.) Koidz. 的干燥根茎, 黄柏为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮, 连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实, 粉萆薢为薯蓣科植物粉背薯蓣 *Dioscorea hypoglauca* Palibin 的干燥根茎, 薏苡仁为禾本科植物薏苡 *Coix lacryma-jobi* L. var. *mayuen* (Roman.) Stapf. 的干燥成熟种仁, 防己为防己科植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的干燥根, 桑枝为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥嫩枝, 忍冬藤为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥茎枝, 地龙为钜

蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的干燥体, 防风为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的干燥根, 威灵仙为毛茛科植物威灵仙 *Clematis chinensis* Osbeck 的干燥根和根茎, 川牛膝为苕科植物川牛膝 *Cyathula officinalis* Kuan 的干燥根; 湿热痹片 (规格: 片心质量 0.25 g, 批号 190409、190415、191102、190507、190403、190804、190901、191206、190810、190502, 编号 S1~S10) 来源于辽宁上药好护士药业 (集团) 有限公司; 乙腈为色谱纯, 德国 Merck 公司; 其它试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 混合对照品溶液的制备 精密称取对照品桑皮苷 A、桑皮苷 F、桑辛素 M、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、苍术素醇、白术内酯 II、苍术素各适量, 用 70% 甲醇溶液制成质量浓度分别为 0.398、0.132、0.216、0.478、2.124、0.832、0.104、0.538、0.992 mg/mL 的混合对照品储备液; 精密吸取混合对照品储备液 2.5 mL, 用 70% 甲醇定容至 50 mL, 制成质量浓度分别为桑皮苷 A 19.9 $\mu\text{g/mL}$ 、桑皮苷 F 6.6 $\mu\text{g/mL}$ 、桑辛素 M 10.8 $\mu\text{g/mL}$ 、连翘酯苷 B 23.9 $\mu\text{g/mL}$ 、连翘酯苷 A 106.2 $\mu\text{g/mL}$ 、连翘苷 41.6 $\mu\text{g/mL}$ 、苍术素醇 5.2 $\mu\text{g/mL}$ 、白术内酯 II 26.9 $\mu\text{g/mL}$ 、苍术素 49.6 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 湿热痹片供试品溶液的制备 取湿热痹片适量, 除去糖衣后研细, 取约 2.0 g, 精密称定, 精密加入 70% 甲醇溶液 25 mL, 称定质量, 超声提取 30 min, 放冷后 70% 甲醇溶液补足减失的质量, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 得湿热痹片供试品溶液。

2.1.3 阴性样品溶液的制备 按《中国药典》2015 年版湿热痹片质量标准项下的处方量及工艺, 分别制备缺桑枝、缺连翘、缺苍术的 3 种阴性样品, 再按上述方法制成阴性样品溶液。

2.2 色谱条件

Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 流动相为乙腈-0.2% 磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~12.0 min, 15.0% 乙腈; 12.0~27.0 min, 15.0%~26.0% 乙腈; 27.0~44.0 min, 26.0%~45.0% 乙腈; 44.0~63.0 min, 45.0%~58.0% 乙腈; 63.0~75.0 min, 58.0%~15.0% 乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长分别为 303 nm (0~27.0 min 检测桑皮苷 A、桑皮苷 F 和桑辛素 M) ^[14-15] 和

270 nm (27.0~75.0 min 检测连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、苍术素醇、白术内酯 II 和苍术素)^[16-18]; 进样量 10 μ L。

2.3 HPLC 指纹图谱建立

2.3.1 精密度试验 取湿热痹片 (编号 S1) 适量, 按上述方法制备供试品溶液, 连续进样测定 6 次, 以 7 号峰 (连翘酯苷 A) 为参照峰, 测得其余 15 个共有峰相对保留时间 RSD 在 0.46%~1.78%, 相对峰面积 RSD 在 0.59%~1.86%。

2.3.2 稳定性试验 取湿热痹片 (编号 S1) 同一份供试品溶液, 于 0、3、6、9、12、18、24 h 依法进样测定, 以 7 号峰 (连翘酯苷 A) 为参照峰, 测得其余 15 个共有峰相对保留时间 RSD 在 0.32%~1.52%, 相对峰面积 RSD 在 0.48%~1.39%, 表明湿热痹片供试品溶液 24 h 内稳定。

2.3.3 重复性试验 取湿热痹片 (编号 S1) 适量, 平行制备 6 份供试品溶液, 依法进样测定, 以 7 号峰 (连翘酯苷 A) 为参照峰, 测得其余 15 个共有峰相对保留时间 RSD 在 0.73%~1.92%, 相对峰面积 RSD 在 1.05%~1.72%。

2.3.4 方法建立及相似度分析 取 10 个批次的湿热痹片样品各适量, 按上述方法制备供试品溶液, 依法进样测定, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723 版) 进行分析 (参考图谱: S1, 对照图谱生成方法: 平均数, 时间窗宽度: 0.1 min), 生成对照图谱, 多点校正法建立指纹图谱, 色谱图见图 1。共标示出 16 个共有峰, 其中 7 号峰 (连翘酯苷 A) 稳定性好, 色谱响应值较高, 保留时间较

为适中, 故选择其作为参照峰 (S)。10 批湿热痹片样品相似度和相对峰面积测定结果分别见表 1、2。由表 1 可知, 10 个批次湿热痹片色谱图与对照指纹图谱 (R) 相比较, 各批次样品的指纹图谱相似度分别为 0.992、0.990、0.973、0.985、0.994、0.987、0.985、0.965、0.987、0.986, 均大于 0.95, 表明湿热痹片各批次间共有成分基本一致; 由表 2 可知, 10 个批次间各成分含有量存在一定差异。

2.3.5 主要特征峰归属 精密吸取“2.1.1”项下对照品储备液各适量, 依法进样测定, 记录所检测色谱图, 与指纹图谱各主要共有峰进行对比, 确认出其中 9 个色谱峰, 分别为 1 号峰桑皮苷 A、2 号峰桑皮苷 F、4 号峰桑辛素 M、6 号峰连翘酯苷 B、7 号峰连翘酯苷 A、9 号峰连翘苷、11 号峰苍术素醇、13 号峰白术内酯 II 和 14 号峰苍术素。

2.4 9 种成分含有量测定

2.4.1 专属性试验 精密吸取“2.1.1”项下混合对照品溶液及“2.1.2”项下各溶液适量, 依法进样检测, 记录色谱图。结果湿热痹片供试品色谱图中目标成分桑皮苷 A、桑皮苷 F、桑辛素 M、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、苍术素醇、白术内酯 II、苍术素均能达到有效分离, 分离度 >1.5 , 理论塔板数按各成分色谱峰计均 $\geq 3\,500$, 阴性样品对湿热痹片中 9 种成分的定量测定无干扰, 色谱图见图 2。

2.4.2 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项下混合对照品储备液 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL, 分别用 70% 甲醇溶液定容至 20 mL, 制成系列质量浓度混合对照品溶液, 依法进样测定桑皮苷 A、桑皮

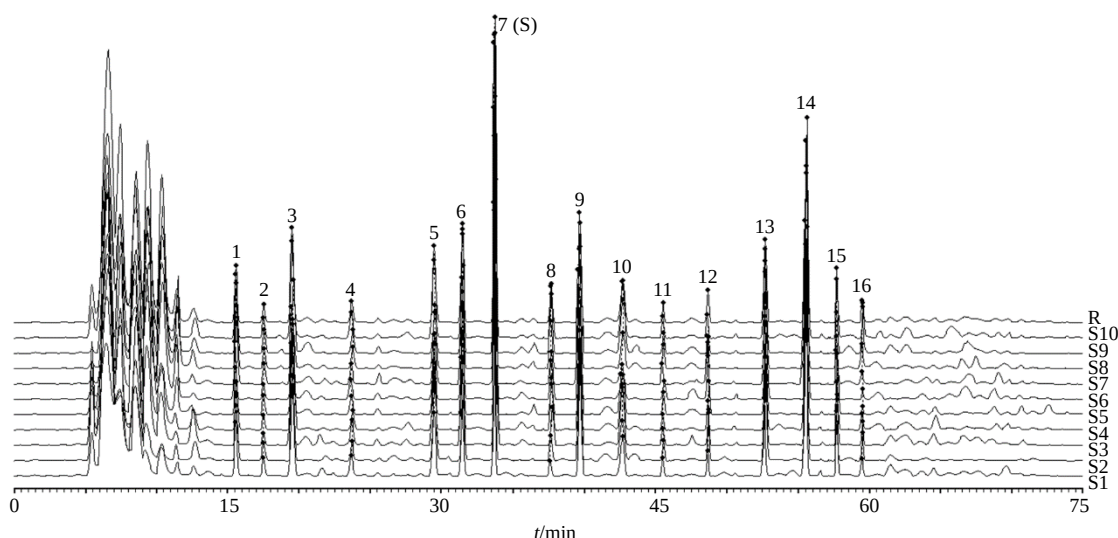


图 1 10 批湿热痹片 HPLC 指纹图谱 (S1~S10) 和对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC fingerprints of 10 batches of Shirebi Tablet (S1—S10) and referential fingerprint (R)

表 1 10 批湿热痹片 HPLC 指纹图谱的相似度结果

Table 1 HPLC fingerprints similarity results of 10 batches of Shirebi Tablet

编号	相似度										
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.987	0.963	0.986	0.991	0.970	0.980	0.933	0.971	0.987	0.992
S2	0.987	1.000	0.958	0.976	0.985	0.974	0.977	0.937	0.975	0.980	0.990
S3	0.963	0.958	1.000	0.951	0.959	0.935	0.934	0.955	0.940	0.969	0.973
S4	0.986	0.976	0.951	1.000	0.982	0.962	0.969	0.919	0.969	0.989	0.985
S5	0.991	0.985	0.959	0.982	1.000	0.984	0.977	0.950	0.988	0.977	0.994
S6	0.970	0.974	0.935	0.962	0.984	1.000	0.987	0.968	0.989	0.955	0.987
S7	0.980	0.977	0.934	0.969	0.977	0.987	1.000	0.947	0.967	0.965	0.985
S8	0.933	0.937	0.955	0.919	0.950	0.968	0.947	1.000	0.956	0.922	0.965
S9	0.971	0.975	0.940	0.969	0.988	0.989	0.967	0.956	1.000	0.960	0.987
S10	0.987	0.980	0.969	0.989	0.977	0.955	0.965	0.922	0.960	1.000	0.986
R	0.992	0.990	0.973	0.985	0.994	0.987	0.985	0.965	0.987	0.986	1.000

表 2 10 批湿热痹片 HPLC 图谱共有峰的相对峰面积

Table 2 Relative peak areas of common peaks for 10 batches of Shirebi Tablet

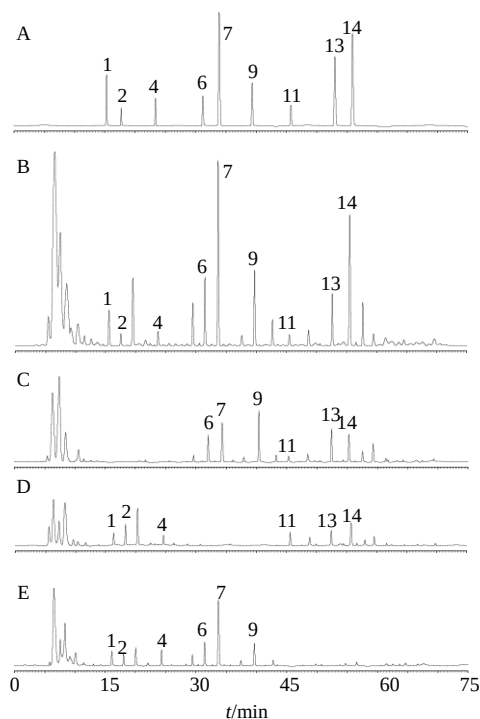
编号	相对峰面积															
	1	2	3	4	5	6	7 (S)	8	9	10	11	12	13	14	15	16
S1	0.264	0.081	0.606	0.117	0.384	0.512	1.000	0.089	0.635	0.321	0.062	0.087	0.424	0.893	0.258	0.081
S2	0.291	0.111	0.455	0.135	0.535	0.612	1.000	0.128	0.604	0.38	0.079	0.185	0.474	0.937	0.119	0.109
S3	0.178	0.042	0.462	0.109	0.489	0.262	1.000	0.133	0.369	0.312	0.059	0.1	0.271	0.531	0.185	0.066
S4	0.277	0.074	0.750	0.126	0.327	0.546	1.000	0.272	0.527	0.384	0.063	0.115	0.406	0.975	0.116	0.097
S5	0.221	0.106	0.451	0.107	0.249	0.511	1.000	0.145	0.542	0.381	0.082	0.121	0.451	0.792	0.224	0.081
S6	0.253	0.080	0.258	0.120	0.199	0.497	1.000	0.211	0.495	0.196	0.082	0.148	0.384	0.834	0.146	0.144
S7	0.300	0.120	0.417	0.107	0.293	0.533	1.000	0.12	0.553	0.086	0.070	0.177	0.355	0.973	0.178	0.063
S8	0.178	0.059	0.161	0.079	0.230	0.225	1.000	0.135	0.342	0.151	0.051	0.058	0.272	0.546	0.040	0.078
S9	0.308	0.105	0.313	0.132	0.211	0.526	1.000	0.281	0.547	0.397	0.078	0.053	0.422	0.798	0.131	0.163
S10	0.274	0.090	0.677	0.141	0.500	0.503	1.000	0.187	0.404	0.378	0.071	0.075	0.397	0.956	0.258	0.127
平均值	0.254	0.087	0.455	0.117	0.342	0.473	1.000	0.170	0.502	0.299	0.070	0.112	0.386	0.824	0.166	0.101
RSD/%	18.56	28.28	40.53	15.36	37.40	26.53	0.00	38.57	19.69	37.84	15.33	41.57	17.80	20.03	41.77	33.77

苷 F、桑辛素 M、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、苍术素醇、白术内酯 II、苍术素的峰面积，以质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归，得 9 种成分回归方程、相关系数 (R^2) 和线性范围见表 3。

2.4.3 精密度考察 取“2.1.1”项下混合对照品溶液，连续进样 6 次，测得桑皮苷 A、桑皮苷 F、桑辛素 M、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、苍术素醇、白术内酯 II、苍术素峰面积的 RSD 分别为 1.05%、1.28%、1.14%、1.01%、0.56%、0.68%、1.27%、1.09%、0.73%。

2.4.4 重复性考察 取湿热痹片 (S1) 适量，按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份湿热痹片供试品溶液，依法进样测定桑皮苷 A、桑皮苷 F、桑辛素 M、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、苍术素醇、白术内酯 II、苍术素的峰面积，计算各成分含量，结果 9 种成分含量的 RSD 分别为 1.63%、0.87%、1.75%、1.44%、0.86%、1.34%、1.79%、1.63%、1.20%。

2.4.5 稳定性考察 取湿热痹片 (S1) 同一份供试品溶液，于制备后 0、3、6、9、12、18、24 h 依法进样测定，结果湿热痹片供试品溶液 24 h 内稳定，桑皮苷 A、桑皮苷 F、桑辛素 M、连翘酯苷 B、连



1-桑皮苷 A 2-桑皮苷 F 4-桑辛素 M 6-连翘酯苷 B 7-连翘酯苷 A 9-连翘苷 11-苍术素醇 13-白术内酯 II 14-苍术素
1-mulberoside A 2-mulberoside F 4-moracin M 6-forsythoside B 7-forsythoside A 9-forsythidin 11-atractylodinol 13-atractylenolide II 14-atractylodin

图 2 混合对照品 (A)、湿热痹片 (B)、桑枝阴性样品 (C)、连翘阴性样品 (D) 和苍术阴性样品 (E) 的 HPLC 图
Fig. 2 HPLC of mixed reference (A), Shirebi Tablet (B), negative sample without *Mori Ramulus* (C), negative sample without *Forsythiae Fructus* (D), and negative sample without *Atractylodis Rhizoma* (E)

表 3 湿热痹片中 9 种成分的线性关系

Table 3 Linear relationships of nine constituents in Shirebi Tablet

成分	回归方程	R^2	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
桑皮苷 A	$Y=1.1073\times 10^6 X-538.4$	0.999 1	1.99~39.80
桑皮苷 F	$Y=1.3549\times 10^6 X+327.9$	0.999 5	0.66~13.20
桑辛素 M	$Y=9.9826\times 10^5 X+1001.6$	0.999 9	1.08~21.60
连翘酯苷 B	$Y=1.9275\times 10^6 X-859.1$	0.999 2	2.39~47.80
连翘酯苷 A	$Y=1.0996\times 10^6 X+526.2$	0.999 7	10.62~212.40
连翘苷	$Y=1.2581\times 10^6 X-335.8$	0.999 3	4.16~83.20
苍术素醇	$Y=8.1367\times 10^5 X-279.5$	0.999 7	0.52~10.40
白术内酯 II	$Y=1.5819\times 10^6 X+544.7$	0.999 5	2.69~53.80
苍术素	$Y=1.7352\times 10^6 X-635.8$	0.999 8	4.96~99.20

翘酯苷 A、连翘苷、苍术素醇、白术内酯 II、苍术素峰面积的 RSD 分别为 1.03%、1.41%、1.26%、

1.15%、0.79%、1.08%、1.42%、1.13%、0.89%。

2.4.6 加样回收率考察 取同一批次 9 种成分含量已知的湿热痹片 (S1) 样品适量, 除去糖衣后研细, 取 9 份, 每份约 1.0 g, 精密称定, 按照《中国药典》2015 年版四部要求分别精密加入根据样品含量另行配制的混合对照品溶液 (桑皮苷 A 0.234 mg/mL、桑皮苷 F 0.076 mg/mL、桑辛素 M 0.124 mg/mL、连翘酯苷 B 0.318 mg/mL、连翘酯苷 A 1.642 mg/mL、连翘苷 0.534 mg/mL、苍术素醇 0.058 mg/mL、白术内酯 II 0.292 mg/mL 和苍术素 0.716 mg/mL) 0.5、1.0、1.5 mL 各 3 份, 再按“2.1.2”项下方法制成加样供试品溶液, 依法进行测定, 计算桑皮苷 A、桑皮苷 F、桑辛素 M、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、苍术素醇、白术内酯 II、苍术素的回收率, 结果桑皮苷 A、桑皮苷 F、桑辛素 M、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、苍术素醇、白术内酯 II、苍术素平均回收率分别为 98.87%、97.44%、97.94%、98.39%、100.13%、99.06%、96.80%、98.44%、99.15%, RSD 分别为 1.42%、1.17%、1.30%、0.91%、0.86%、1.23%、1.08%、1.37%、0.79%。

2.4.7 样品含量测定 取 10 个批次的湿热痹片样品, 每个批次平行制备 3 份湿热痹片供试品溶液, 依法进样测定桑皮苷 A、桑皮苷 F、桑辛素 M、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、苍术素醇、白术内酯 II、苍术素的峰面积, 分别计算 9 种成分的含量, 结果见表 4。10 批次样品中桑皮苷 A、桑皮苷 F、桑辛素 M、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、苍术素醇、白术内酯 II、苍术素的质量分数分别在 0.192~0.289、0.057~0.095、0.113~0.158、0.309~0.375、1.537~1.916、0.478~0.596、0.049~0.072、0.279~0.354、0.629~0.759 mg/g。

2.5 基于化学计量学的湿热痹片质量分析

2.5.1 CA CA 是一种通过数据建模简化数据的方法, 依据研究对象的某些特征加以归类, 建立样本间的相似关系, 现已广泛应用于中药及其制剂的质量评价中。以 10 个不同批次湿热痹片样品中 16 个共有峰的相对峰面积为变量, 采用 SPSS 26.0 软件组间联接系统聚类法, 以 Euclidean 距离为测度进行聚类分析, 结果见图 3。当类间距离为 10 时, 10 批样品可聚为 4 类, S6、S9、S7 为第 I 类, S4、S10、S1、S5、S2 为第 II 类, S3 为第 III 类, S8 为第 IV 类; 当类间距离为 15 时, 10 批样品可聚为 2 类, 上述第 I、II 类聚为一类, 第 III、IV 类聚为一类。

表 4 湿热痹片中 9 种成分含量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 4 Results of content determination of nine constituents in Shirebi Tablet ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)								
	桑皮苷A	桑皮苷F	桑辛素M	连翘酯苷B	连翘酯苷A	连翘苷	苍术素醇	白术内酯II	苍术素
S1	0.232±0.004	0.078±0.001	0.126±0.002	0.317±0.003	1.634±0.013	0.539±0.006	0.057±0.001	0.296±0.002	0.712±0.011
S2	0.217±0.001	0.069±0.001	0.135±0.001	0.342±0.005	1.571±0.025	0.512±0.003	0.062±0.001	0.317±0.005	0.696±0.007
S3	0.192±0.002	0.057±0.001	0.149±0.003	0.309±0.004	1.537±0.016	0.517±0.005	0.049±0.001	0.253±0.004	0.629±0.012
S4	0.198±0.003	0.064±0.001	0.128±0.002	0.324±0.002	1.429±0.021	0.478±0.007	0.051±0.001	0.279±0.005	0.683±0.009
S5	0.203±0.001	0.085±0.002	0.113±0.001	0.348±0.006	1.592±0.009	0.542±0.008	0.069±0.002	0.327±0.001	0.658±0.004
S6	0.249±0.003	0.071±0.001	0.121±0.001	0.356±0.002	1.726±0.017	0.529±0.005	0.054±0.001	0.291±0.004	0.707±0.011
S7	0.237±0.004	0.083±0.002	0.137±0.002	0.335±0.004	1.652±0.024	0.523±0.007	0.067±0.002	0.305±0.002	0.714±0.005
S8	0.263±0.004	0.083±0.001	0.138±0.001	0.363±0.005	1.916±0.011	0.578±0.002	0.072±0.001	0.354±0.005	0.759±0.008
S9	0.289±0.002	0.095±0.002	0.151±0.003	0.375±0.003	1.857±0.007	0.596±0.008	0.063±0.001	0.339±0.001	0.726±0.012
S10	0.275±0.003	0.087±0.001	0.158±0.002	0.361±0.001	1.739±0.026	0.551±0.009	0.069±0.002	0.341±0.003	0.743±0.009

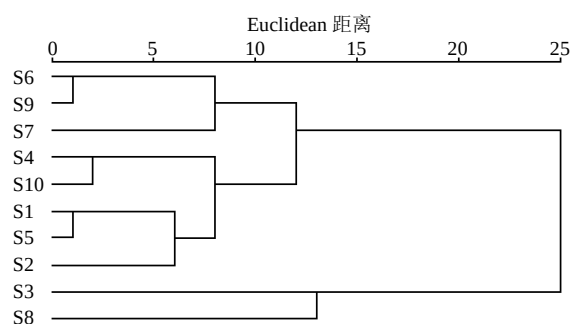


图 3 10 批湿热痹片聚类树状图

Fig. 3 Dendrogram of ten batches of Shirebi Tablet

结果表明湿热痹片的指纹图谱与样品的不同期间批次有关,可能与制剂所用原药材产地来源、采收季节以及原药材批间质量差异等有关。

2.5.2 PCA 将 10 批湿热痹片指纹图谱中 16 个共有峰的峰面积导入统计软件 SPSS 26.0 中,进行 PCA,计算相关系数的特征值和方差贡献率,提取出 9 种主成分,结果见表 5 和图 4。由表 5 可知前 6 个主成分特征值大于 1,即 4.765、3.535、2.448、1.527、1.299、1.046,对方差的贡献率分别为 29.780、22.096、15.298、9.542、8.121、6.538,累计方差贡献率为 91.375%,大于 85%,表明提取前 6 个主成分即可代表湿热痹片 16 个共有峰 91.375%的信息,可以被用于评价湿热痹片的质量。

3 讨论

本实验在优化供试品溶液制备方式时,以湿热痹片供试品色谱图中色谱峰数量、分离效果以及定量测定目标成分桑皮苷 A、F 及桑辛素 M、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、苍术素醇、白术内酯 II、苍术素综合提取率为指标,依次对提取溶剂(70%

表 5 特征值和方差贡献率

Table 5 Characteristic value and variance contribution rate

主成分	特征值	方差贡献率/%	累计方差贡献率/%
1	4.765	29.780	29.780
2	3.535	22.096	51.876
3	2.448	15.298	67.174
4	1.527	9.542	76.715
5	1.299	8.121	84.837
6	1.046	6.538	91.375
7	0.581	3.630	95.005
8	0.505	3.154	98.158
9	0.295	1.842	100.000

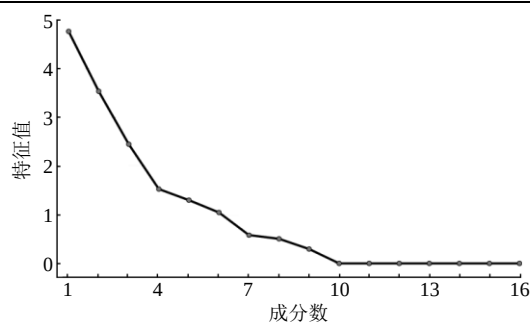


图 4 样品 PCA 碎石图

Fig. 4 PCA scree plot of various samples

乙醇溶液^[14-15]、95%乙醇溶液、甲醇^[17-19,21]、70%甲醇溶液^[16,20]和提取方式(超声波超声提取^[15-21]、加热回流提取^[14])进行了考察,结果显示以 70%甲醇为提取溶剂超声提取时出峰较多,色谱峰分离效果较佳,定量测定 9 种目标成分综合提取效果最佳;随后以 70%甲醇为提取溶剂对超声提取时间进行考

察(15、30、45、60 min)进行对比考察,结果提取 30 min 定量测定 9 种目标成分均能提取完全,最终确定以 70%甲醇超声提取 30 min 作为湿热痹片供试品溶液的制备方法。

本实验在优化色谱条件时,首先对比考察了甲醇-水^[14,19-20]、乙腈-水^[17,21]流动相系统,结果乙腈-水流动相系统优于甲醇-水,但定量测定目标成分连翘酯苷 A 和苍术素色谱峰拖尾严重,与相邻杂质色谱峰分离不完全。遂对比考察在流动相水中加入一定浓度的磷酸溶液^[16-17,21]、甲酸溶液和冰醋酸溶液^[15]以改善峰形,最终确定以乙腈-0.2%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱时,色谱图基线平稳,峰形较好,分离度较高。

本实验采用 HPLC 梯度洗脱法建立了湿热痹片的 HPLC 指纹图谱,对 9 种目标成分桑皮苷 A、桑皮苷 F、桑辛素 M、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、苍术素醇、白术内酯 II、苍术素进行了定量分析,并采用 CA、PCA 等化学计量学方法对不同批次湿热痹片进行分析。所建立的方法操作简单、结果准确,10 个批次湿热痹片 HPLC 指纹图谱相似度均大于 0.95,指标性成分一致性较好,但批次间目标成分桑皮苷 A、桑皮苷 F、桑辛素 M、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、苍术素醇、白术内酯 II、苍术素含有量存在一定差异,可能与制剂生产所用原药材产地来源、采收季节以及原药材批间质量差异等有关,提示药品生产企业关注原药材质量控制,不断提高和完善湿热痹片的质量控制标准,加强原药材产地来源、采收季节以及原药材内控质量标准的管理,优化制剂生产过程控制参数,确保湿热痹片产品质量稳定性和临床疗效一致性。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2015.
- [2] 辛增辉,甘丽,肖丹,等.湿热痹片对 AA 大鼠滑膜组织中 MMPs 高表达的改善作用[J].临床医学工程,2011,18(5):656-657.
- [3] 辛增辉,肖丹,甘丽,等.湿热痹片对佐剂性关节炎大鼠 T 细胞及细胞因子网络的调节作用[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(10):52-55.
- [4] 辛增辉,季春,肖丹,等.湿热痹颗粒镇痛抗炎作用的实验研究[J].中药新药与临床药理,2009,20(2):123-126.
- [5] 刘德芳,郭明阳,张俊,等.湿热痹片对湿热痹阻型膝关节骨性关节炎的疗效观察[J].临床医药实践,2009,18(32):2202-2205.
- [6] 郭明阳,刘德芳,张俊,等.湿热痹片治疗湿热痹阻型骨关节炎的临床观察[J].西南军医,2011,13(1):32-34.
- [7] 罗勇,郭明阳,郭玲林.湿热痹胶囊治疗急性痛风性关节炎临床观察[J].中国中医急症,2012,21(5):838-839.
- [8] 韩颖萍,郭进修,马宏林.湿热痹片治疗湿热痹阻型风湿病的临床观察[J].中医正骨,2002(9):3-5.
- [9] 张铁军,白钢,陈常青,等.基于“五原则”的复方中药质量标志物(Q-marker)研究路径[J].中草药,2018,49(1):1-13.
- [10] 刘昌孝,陈士林,肖小河,等.中药质量标志物(Q-Marker):中药产品质量控制的新概念[J].中草药,2016,47(9):1443-1457.
- [11] 金凤环,段彦杰.HPLC 法测定湿热痹片中盐酸小檗碱的含量[J].中国医药导报,2009,6(23):52-54.
- [12] 董斌,刘静,季雪,等.湿热痹片质量标准研究[J].中国药物评价,2016,33(1):3-6.
- [13] 梁侃,刘春丽,施法,等.RP-HPLC 法测定湿热痹片中盐酸小檗碱的含量[J].中国医疗前沿,2010,5(15):61,68.
- [14] 罗隽.桑枝有效成分分离及其指纹图谱研究[D].长沙:中南大学,2011:20.
- [15] 陈倩,孙登阳,邓霖芳,等.HPLC 法同时测定桑枝中桑皮苷 A 和桑皮黄素的含量[J].中国药房,2015,26(3):364-366.
- [16] 付云飞,李清,毕开顺.RP-HPLC 法同时测定不同产地连翘中的 7 种成分[J].中草药,2013,44(8):1043-1046.
- [17] 杨隼华,黄兰,郑显辉.不同产地连翘叶中连翘苷和连翘酯苷 A 的含量测定[J].临床医学工程,2013,20(3):288-289.
- [18] 王爱妮,刘玉强,才谦.3 种苍术的特征图谱及苍术素醇、苍术素和白术内酯 II 含量测定研究[J].药物分析杂志,2016,36(1):91-95.
- [19] 肖春萍,夏炎,张强.吉林省不同产地北苍术的质量评价研究[J].长春中医药大学学报,2018,34(5):872-875.
- [20] 支旭然,苑霖,生宁,等.HPLC-MS/MS 法测定不同采收期连翘叶中 9 种成分[J].中草药,2013,44(22):3231-3235.
- [21] 朱利霞,黄青,王茹静,等.苍术药材的质量标准研究[J].中华中医药学刊,2017,35(12):3046-3051.
- [22] 孙莲,严寒信,姑再努尔·阿布力孜.桑枝中黄酮类的 HPLC 指纹图谱的研究[J].新疆医科大学学报,2014,37(3):312-314.