

金骨莲胶囊 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究

刘 慧^{1,2}, 肖金超^{1,2}, 张庆捷³, 蒲 健³, 谭 丹³, 李勇军⁴, 王爱民⁴, 郑 林¹, 黄 勇^{1*}

1. 贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室/药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550004

2. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550004

3. 贵州益佰制药股份有限公司, 贵州 贵阳 550008

4. 贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵州 贵阳 550004

摘要: 目的 建立金骨莲胶囊 HPLC 指纹图谱, 并结合化学模式识别方法对其进行质量一致性评价, 为该制剂的质量控制提供参考。方法 采用 ACE Excel 5 C₁₈-PFP (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱进行检测; 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 进行梯度洗脱; 体积流量为 0.8 mL/min; 柱温为 40 °C; 检测波长为 210 nm; 进样量为 10 μL; 建立 12 批金骨莲胶囊指纹图谱。对 12 批金骨莲胶囊指纹图谱进行相似度评价、层次聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA) 和主成分分析 (PCA), 并结合正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 寻找不同批次金骨莲胶囊的差异成分。结果 建立的金骨莲胶囊 HPLC 指纹图谱共标定了 19 个共有峰, 其中 2、8、11 号峰归属于汉桃叶, 5、7、10、12、15 号峰归属于大血藤, 16、17、19 号峰归属于透骨香, 1 号峰为 5 味药材共有, 3 号峰归属于八角枫和大血藤, 13 号峰归属于大血藤和透骨香, 4、9、14、18 号峰归属于大血藤和汉桃叶, 6 号峰归属于大血藤、汉桃叶和透骨香。通过与对照品对比指出 2、3、6、7、9、12、13、15、16 号峰分别为富马酸、没食子酸、原儿茶酸、红景天苷、绿原酸、香草酸、表儿茶素、鹅掌楸苷、滇白珠苷 A。12 批金骨莲胶囊指纹图谱相似度均在 0.910 以上, HCA、PCA 2 种分析方法均把样品分为了 3 类, 结合 OPLS-DA 筛选出了导致各批次之间产生差异的 7 个差异性标志物, 分别为 15 (鹅掌楸苷)、14、6 (原儿茶酸) 18、16 (滇白珠苷 A)、19、9 (绿原酸) 号色谱峰。结论 该分析方法简单可行、具有良好精密度、重复性和稳定性, 建立的指纹图谱可为金骨莲胶囊的质量评价提供参考。

关键词: 金骨莲胶囊; HPLC; 指纹图谱; 相似度评价; 模式识别; 质量评价; 层次聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘法-判别分析; 汉桃叶; 大血藤; 透骨香; 八角枫; 富马酸; 没食子酸; 原儿茶酸; 红景天苷; 绿原酸; 香草酸; 表儿茶素; 鹅掌楸苷; 滇白珠苷 A

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)14-4185-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.14.008

HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of Jingulian Capsules

LIU Hui^{1,2}, XIAO Jin-chao^{1,2}, ZHANG Qing-jie³, PU Jian³, TAN Dan³, LI Yong-jun⁴, WANG Ai-min⁴, ZHENG Lin¹, HUANG Yong¹

1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics/State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

3. Guizhou Yibai Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550008, China

4. Engineering Research Center for Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of Jingulian Capsules (JGLC), and evaluate its quality consistency by combining with the chemical pattern recognition, in order to provide reference for its quality control. **Methods** The detection was

收稿日期: 2021-03-04

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1708100); 国家自然科学基金项目 (81960763); 贵州省科技计划项目 (黔科合平台人才 [2019] 54075660); 2020 年国家大学生创新创业训练计划项目 (10660-462); 贵阳市科研创新团队项目 (筑科合同 [2017] 30-29 号)

作者简介: 刘 慧 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及质量控制研究。E-mail: liuhui554321@126.com

*通信作者: 黄 勇, 男, 博士, 教授, 研究方向为中药药效物质基础及新药研究开发。

Tel: (0851)86908468 E-mail: HUANGY2020@126.com

performed on ACE Excel 5 C₁₈-PPF (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with the mobile phase consisting of acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution for gradient elution at a flow rate of 0.8 mL/min, the column temperature was 40 °C, the detection wavelength was 210 nm, and the injection volume was 10 μL to establish the HPLC fingerprints of 12 batches of JGLC. Then the further assessment of 12 batches of samples were carried out by similarity evaluation, hierarchical clustering analysis (HCA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) was used to find the different components of different batches of JGLC. **Results** The HPLC fingerprints of JGLC was set up with 19 common peaks, peaks 2, 8 and 11 belonged to Hantaoye [*Schefflerae Leucanthae Ramulus et Folium* (SLRF)], peaks 5, 7, 10, 12, and 15 belonged to Daxueteng [*Sargentodoxae Caulis* (SC)], peaks 16, 17 and 19 belonged to Touguxiang [*Gaultheriae Yunnanensis Herba seu Radix* (GYHR)], peak 1 belonged to all of the five herbs, peak 3 belonged to Bajiaofeng (*Alangii Radix*) and SC, and peak 13 belonged to SC and GYHR, peaks 4, 9, 14 and 18 belonged to SC and GYHR, peak 6 belonged to SC, SLRF and GYHR, and nine common peaks of them were identified, namely, fumaric acid, gallic acid, protocatechuic acid, salidroside, chlorogenic acid, vanillic acid, epicatechin, liriiodendrin and gaultheroside A (corresponding to peaks 2, 3, 6, 7, 9, 12, 13, 15 and 16) by comparing with the reference substances. The similarities of 12 batches of JGLC were all above 0.910. The samples were classified into three clusters by HCA and PCA, and seven differential markers that caused differences in the 12 batches samples were found by OPLS-DA. **Conclusion** The proposed fingerprint method is simple, accurate, reproducible and stable, which could provide scientific reference for the quality evaluation of JGLC.

Key words: Jingulian Capsules; HPLC; fingerprint; similarity evaluation; pattern recognition; quality evaluation; hierarchical clustering analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; *Schefflerae Leucanthae Ramulus et Folium*; *Sargentodoxae Caulis*; *Gaultheriae Yunnanensis Herba seu Radix*; *Alangii Radix*; fumaric acid; gallic acid; protocatechuic acid; salidroside; chlorogenic acid; vanillic acid; epicatechin; liriiodendrin; gaultheroside A

金骨莲胶囊 (Jingulian Capsules, JGLC) 源于经典苗药组方, 由大血藤、八角枫、透骨香、汉桃叶和金铁锁 5 味药材为主要原料, 采用水煮、浓缩等工艺精制而成的复方中药制剂, 为治疗风湿痹症的全国苗药独家品种和贵州益佰制药股份有限公司的拳头产品^[1-2]。具有祛风除湿、消肿止痛之功效 (苗医: 抬奥、抬蒙、僵见风)。收载于《国家中成药标准汇编》^[3]和《国家基本医疗保险药品目录》^[4]。临床上主要用于风湿痹症所致的关节肿痛、屈伸不利的治疗, 疗效独特^[5-7]。现行质量标准仅对大血藤、透骨香和金铁锁进行薄层色谱鉴别, 以及对汉桃叶中富马酸进行含量限定 (不低于 0.01%), 难以体现制剂的整体特性和内在品质。为了更全面地评价 JGLC 的质量, 本研究采用 HPLC 法建立了 12 批 JGLC 指纹图谱, 共标定了 19 个共有峰, 经鉴定其中的 9 个色谱峰分别为富马酸、没食子酸、原儿茶酸、红景天苷、绿原酸、香草酸、表儿茶素、鹅掌楸苷、滇白珠苷 A。在指纹图谱相似度评价的基础上, 结合化学模式识别分析方法对 12 批 JGLC 进行质量研究, 旨在为该制剂建立更系统、全面的质量控制标准提供借鉴与参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪, 美国 Thermo

Fisher Scientific 公司, 包括系统控制器、输液泵 (LPG-3400SD)、柱温箱 (TCC-3000SD)、温控样品室 (WPS-300SL)、UV-DAD 检测器 (DAD-3000)、脱气组件、低压梯度组件、Chromeleon 7 色谱数据工作站和自动进样器; KQ-500DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; EL-240 型电子天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; WP-UP-IV-20 型超纯水机, 四川沃特尔科技发展有限公司。

1.2 试剂

JGLC, 规格: 每粒装 0.25 g, 批号分别为 180502、191001、191007、191005、190409、190410、191002、200708、200711、200707、200706、200710, 依次编号为 S1~S12, 贵州益佰制药股份有限公司; 大血藤 (产地湖北, 批号 YL-17920190401)、透骨香 (产地贵州, 批号 YL-17520190401)、汉桃叶 (产地贵州, 批号 JYL-20191006)、八角枫 (产地河南, 批号 YL-17720190401)、金铁锁 (产地贵州, 批号 YL-17820190302) 药材均由贵州益佰制药股份有限公司提供, 经贵州医科大学药学院生药学教研室龙庆德教授鉴定, 大血藤为木通科植物大血藤 *Sargentodoxa cuneata* (Oliv.) Rehd. et Wils. 的干燥藤茎; 透骨香为杜鹃花科植物滇白珠 *Gaultheria yunnanensis* (Prance) Rehd. 的干燥全株; 汉桃叶为五加科植物白花鹅掌柴 *Schefflera leucanthe* Vig. 的干

燥带叶茎枝；八角枫为八角枫科植物八角枫 *Alanglum chinese* (Lour.) Hars 及瓜木 *Alanglum platanifolium* (Steb. et Zuce.) Harms 的干燥枝根（白金条）；金铁锁为石竹科植物金铁锁 *Psammosilene tunnicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu 的干燥根。富马酸（批号 181120，质量分数 $\geq 99\%$ ）、红景天苷（批号 181020，质量分数 $\geq 98\%$ ）对照品购于北京世纪奥科生物技术有限公司；没食子酸（批号 110831-201906，质量分数 91.5%）、绿原酸（批号 110753-201716，质量分数 99.3%）对照品购于中国食品药品检定研究院；原儿茶酸（批号 MUST-20110310，质量分数 99.78%）对照品购于成都曼思特生物科技有限公司；香草酸（批号 AF20020852，质量分数 99.29%）、表儿茶素（批号 AF8030805，质量分数 98%）、鹅掌楸苷（批号 AF91002701，质量分数 $\geq 98\%$ ）对照品购于成都埃法生物科技有限公司；滇白珠苷 A（批号 20190223，质量分数 $> 98\%$ ）对照品为实验室自制。乙腈、甲醇为色谱纯；其他试剂均为分析纯；水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 ACE Excel 5 C₁₈-PFP（250 mm \times 4.6 mm，5 μ m）色谱柱；流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液；梯度洗脱：0~40 min，5%~20%乙腈；40~50 min，20%~25%乙腈；50~55 min，25%~35%乙腈；体积流量为 0.8 mL/min；进样量为 10 μ L；柱温为 40 $^{\circ}$ C；检测波长为 210 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密称取富马酸、没食子酸、原儿茶酸、红景天苷、绿原酸、香草酸、表儿茶素、鹅掌楸苷、滇白珠苷 A 对照品适量，加入甲醇，制成质量浓度分别为 1.120、1.002、1.038、1.046、1.182、0.402、1.032、0.950、1.116 mg/mL 的对照品溶液。

精密移取各单一对照品溶液适量，用 50%甲醇逐步稀释，最终配制成含富马酸、没食子酸、原儿茶酸、红景天苷、绿原酸、香草酸、表儿茶素、鹅掌楸苷、滇白珠苷 A 质量浓度分别为 17.920、8.016、24.912、16.736、37.824、6.432、16.512、30.400、17.856 μ g/mL 的混合对照品溶液，置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱冷藏备用。

2.2.2 供试品溶液 取 JGLC 内容物 1.0 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入 50%甲醇 25 mL，

称定质量，超声处理（300 W、40 kHz）30 min，取出，冷却后称定质量，50%甲醇补足减失的质量，摇匀，取适量溶液过 0.22 μ m 微孔滤膜，取续滤液，即得。

2.2.3 单味药材溶液 分别称取 JGLC 处方药材大血藤、透骨香、汉桃叶、八角枫、金铁锁各约 50 g，根据制剂的处方工艺分别制备各单味药材样品。按“2.2.2”项下方法制备药材溶液，即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一份样品（批号 191001），按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进行检测，连续进样分析 6 次，记录所得图谱，以 15 号峰鹅掌楸苷为参照峰（分离度良好，峰面积较大且为所有批次共有），计算主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果显示各色谱峰的相对保留时间的 RSD 为 0.01%~0.08%，相对峰面积的 RSD 为 0.30%~2.69%，说明该仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取同一份样品（批号 191001），按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进行检测分析，以 15 号峰鹅掌楸苷为参照峰，计算主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果显示，各色谱峰的相对保留时间的 RSD 为 0.02%~0.37%，相对峰面积的 RSD 为 0.56%~4.73%，说明该分析方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一份样品（批号 191001），按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进行检测，以 15 号峰鹅掌楸苷为参照峰，计算主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果显示，各色谱峰的相对保留时间的 RSD 为 0.03%~0.42%，相对峰面积的 RSD 为 1.12%~4.77%，说明供试品溶液在 24 h 稳定性良好。

2.4 指纹图谱的建立及相似度评价

2.4.1 指纹图谱的建立 取 12 批 JGLC (S1~S12)，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进行检测，记录色谱图。将色谱图以 AIA 格式导入《中药指纹图谱相似度评价系统》（2012 版）进行分析，以 S1 号样品的色谱图为参照图谱，设定时间窗宽度为 0.1 min，对 12 批制剂进行多点校正后自动峰匹配，12 批制剂的指纹图谱叠加图见图 1，共标定了 19 个共有峰，其中 15 号色谱峰（鹅掌楸苷）保留时间适中、分离度良好，峰面积较大，

作为参照峰 (S)。以中位数法生成对照指纹图谱 (R), 结果见图 1。

2.4.2 共有峰的指认 按“2.1”项下色谱条件分别测定供试品溶液和混合对照品溶液, 见图 2。通过各峰的保留时间及化学成分的紫外光谱图对比, 共指认了 9 个成分, 分别为 2 (富马酸)、3 (没食子酸)、6 (原儿茶酸)、7 (红景天苷)、9 (绿原酸)、12 (香草酸)、13 (表儿茶素)、15 (鹅掌楸苷)、16 (滇白珠苷 A) 号峰。

2.4.3 共有峰的归属 通过将单味药材溶液和 JGLC 溶液的 HPLC 色谱图进行比较, 对指纹图谱共有峰进行药材归属, 见图 3。1 号为 5 味药材共有; 2、8、11 号峰来源于汉桃叶; 5、7、10、12、15 号峰来源于大血藤; 16、17、19 号峰来源于透骨

香; 3 号为八角枫和大血藤共有; 13 号为大血藤和透骨香共有; 4、9、14、18 号峰为大血藤和汉桃叶共有; 6 号为大血藤、汉桃叶和透骨香共有。结果表明制剂与单味药材的相关性良好。

2.4.4 指纹图谱相似度评价 采用《中药指纹图谱相似度评价系统》(2012 版) 对 12 批 JGLC 的指纹图谱进行相似度计算, 见表 1。12 批制剂的相似度均在 0.910 以上, 说明该制剂各批次之间相似度良好, 质量较稳定。

2.5 化学模式识别

2.5.1 层次聚类分析(hierarchical clustering analysis, HCA) [8-9] 运用 SPSS 20.0 软件, 以 12 批 JGLC 的 19 个共有峰的相对峰面积为变量, 采用 Ward 法, 以欧氏距离作为度量标准进行 HCA, 见图 4。当欧

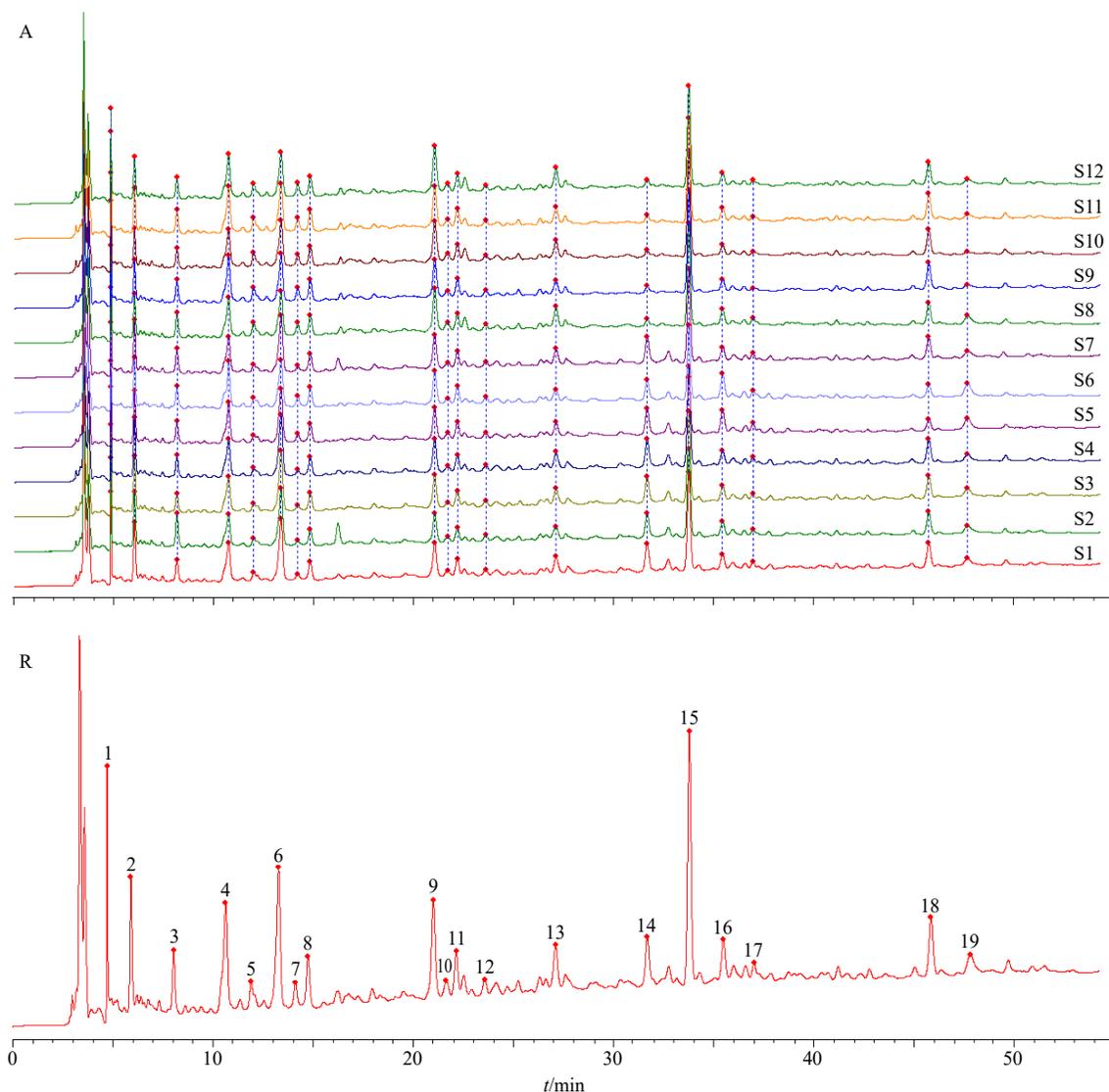


图 1 12 批 JGLC 的 HPLC 指纹图谱叠加图 (A) 及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC superimposed fingerprint of 12 batches of JGLC (A) and its reference fingerprint (R)

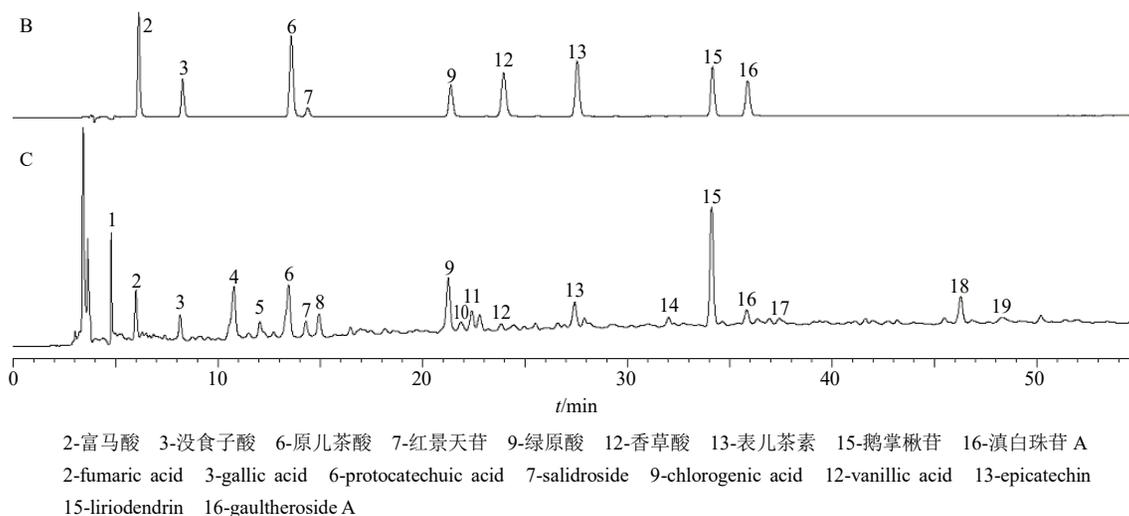


图2 混合对照品溶液 (B) 和 JGLC 溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatogram of mixed reference substances solution (B) and JGLC solution (C)

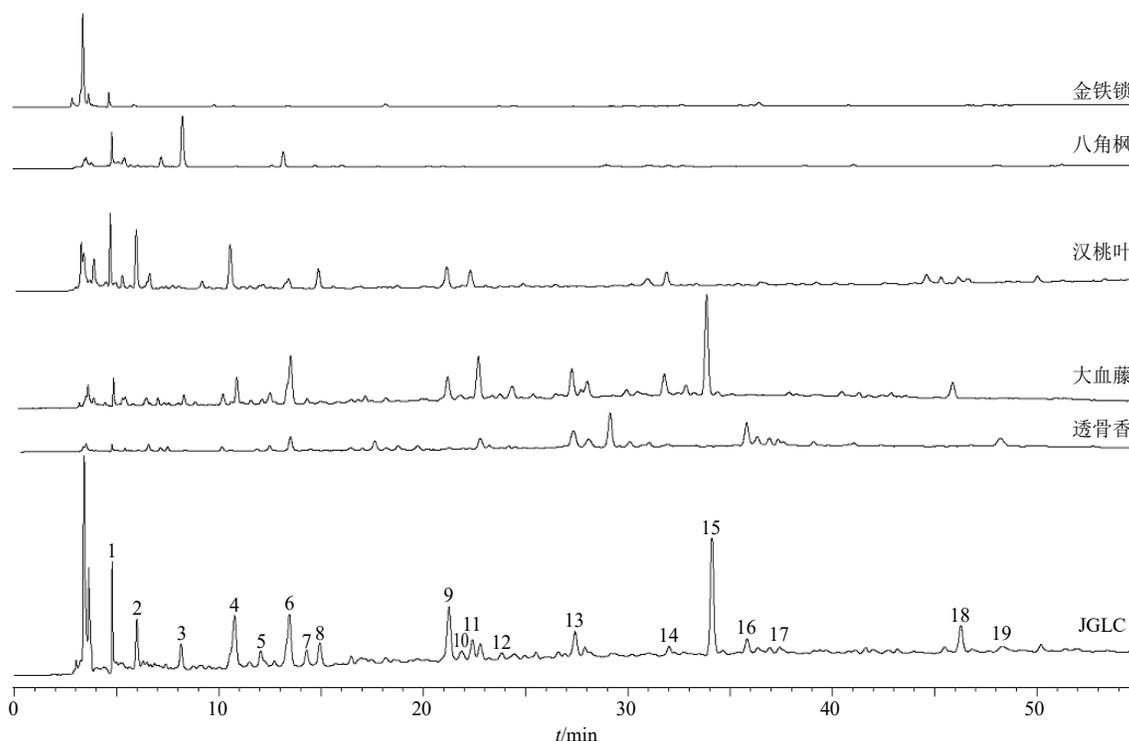


图3 JGLC 及单味药材溶液 HPLC 图

Fig. 3 HPLC chromatogram of JGLC and its single herb solution

氏距离为 20 时, 12 批样品共聚为 2 类: S1~S7 聚为一类; S8~S12 聚为另一类。当欧氏距离为 10 时, 12 批样品共聚为 3 类: S1~S4、S7 批次样品聚为第 1 类; S5~S6 批次样品聚为第 2 类; S8~S12 聚为第 3 类。

2.5.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) [10] 以 12×19 峰面积数据矩阵为数据, 运用 SIMCA 11.0 软件对 12 批 JGLC 进行 PCA, 特征值、方差贡献率及累计方差贡献率见表 2。提取的前 3

个主成分的累积方差贡献率达到 85.324%, 表明前 3 个主成分能够反映 JGLC 的基本特征和大部分信息。图 5 为 PCA 得分图, 将 12 批样品分为 3 类, 结果与 HCA 基本一致, 也进一步验证了聚类分析的分类结果。

根据变量离原点的距离判定变量对主成分的影响权重, 离远点越远则表明该变量对主成分的影响权重越大 [11]。由载荷散点图 (图 6) 分析得到 5、14、9 (绿原酸)、2 和 10 号色谱峰对主成分 1 的贡

表 1 12 批 JGLC 相似度评价结果

Table 1 Results of similarity evaluation of 12 batches of JGLC

编号	相似度												
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	R
S1	1.000	0.996	0.999	1.000	0.967	0.977	1.000	0.974	0.976	0.973	0.971	0.970	0.995
S2	0.996	1.000	0.996	0.996	0.970	0.978	0.997	0.970	0.969	0.964	0.965	0.962	0.991
S3	0.999	0.996	1.000	0.999	0.972	0.978	0.999	0.970	0.970	0.967	0.966	0.964	0.993
S4	1.000	0.996	0.999	1.000	0.967	0.977	1.000	0.974	0.976	0.972	0.971	0.970	0.995
S5	0.967	0.970	0.972	0.967	1.000	0.990	0.967	0.935	0.932	0.915	0.928	0.929	0.966
S6	0.977	0.978	0.978	0.977	0.990	1.000	0.978	0.968	0.963	0.949	0.961	0.961	0.984
S7	1.000	0.997	0.999	1.000	0.967	0.978	1.000	0.975	0.975	0.972	0.971	0.969	0.995
S8	0.974	0.970	0.970	0.974	0.935	0.968	0.975	1.000	0.993	0.994	0.996	0.997	0.991
S9	0.976	0.969	0.970	0.976	0.932	0.963	0.975	0.993	1.000	0.995	0.999	0.995	0.990
S10	0.973	0.964	0.967	0.972	0.915	0.949	0.972	0.994	0.995	1.000	0.997	0.996	0.987
S11	0.971	0.965	0.966	0.971	0.928	0.961	0.971	0.996	0.999	0.997	1.000	0.997	0.989
S12	0.970	0.962	0.964	0.970	0.929	0.961	0.969	0.997	0.995	0.996	0.997	1.000	0.988
R	0.995	0.991	0.993	0.995	0.966	0.984	0.995	0.991	0.990	0.987	0.989	0.988	1.000

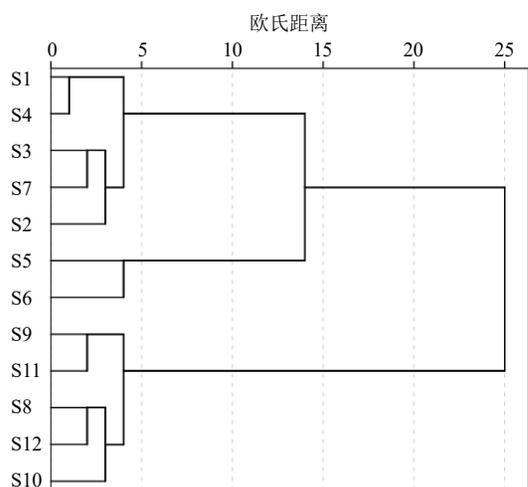


图 4 12 批 JGLC (S1~S12) 指纹图谱的聚类分析树状图
Fig. 4 Dendrogram of hierarchical clustering analysis of 12 batches of JGLC (S1—S12)

表 2 JGLC PCA 特征值与累积方差贡献率

Table 2 Eigenvalue and total variance of PCA of JGLC

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	9.685	50.973	50.973
2	4.264	22.440	73.413
3	2.263	11.911	85.324

献率较大; 16 (滇白珠苷 A)、17、18、19、11、15 (鹅掌楸苷) 号色谱峰对主成分 2 的贡献较大。

2.5.3 正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) [12-13]

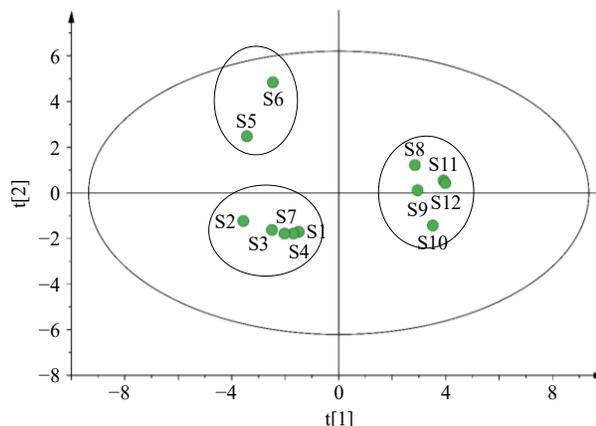
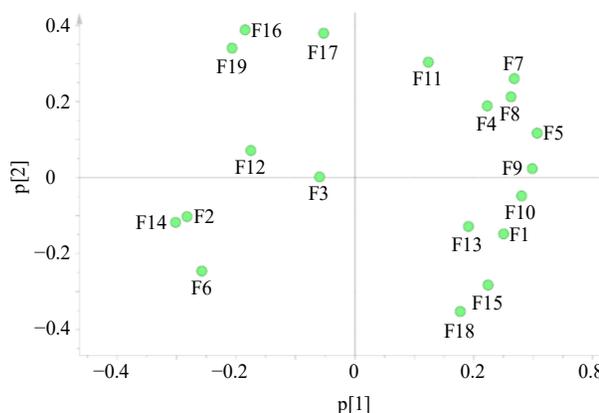


图 5 12 批 JGLC 样品的 PCA 得分图
Fig. 5 PCA score plot of 12 batches of JGLC



F1~F19 为 1~19 号色谱峰
F1—F19 are chromatographic peaks 1—19

图 6 12 批 JGLC 主成分模型载荷图
Fig. 6 Loading plot of 12 batches of JGLC

将12批样品的19个共有峰峰面积导入SIMCA 11.0, 对12批样品进行OPLS-DA, 在该模型下 R^2_X 为0.829, R^2_Y 为1.000, Q^2 为0.907, 均大于0.5, 表明该模型具有较好预测能力^[14-15]。为验证所建模型是否存在过拟合现象, 进一步采用200次响应排序检验, 结果所有通过随机排序计算得到的 R^2 和 Q^2 值均小于原始值, 且 Q^2 回归直线与 Y 轴有负截距图(图7), 说明模型是有效的, 不存在过度拟合^[16], 可用于JGLC差异标志物的筛选。12批样品共分为3类(图8)与聚类分析和PCA分类结果一致。

为进一步筛选出导致12批样品产生差异的成分, 通过提取OPLS-DA模型中19个变量的重要值(variable importance in projection, VIP), 以 $VIP > 1$ 为标准^[17], 筛选出15(鹅掌楸苷)、14、6(原儿茶酸)、18、16(滇白珠苷A)、19、9(绿原酸)号峰(图9)可能是导致样品之间产生差异的主要原因,

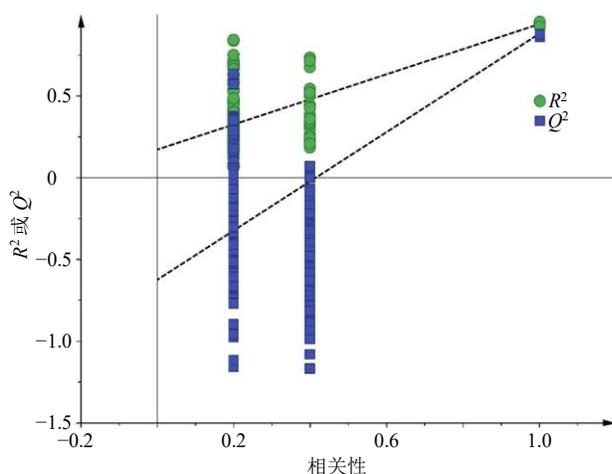


图7 OPLS-DA模型的200次响应排序检验

Fig. 7 200 response permutation tests for OPLS-DA model

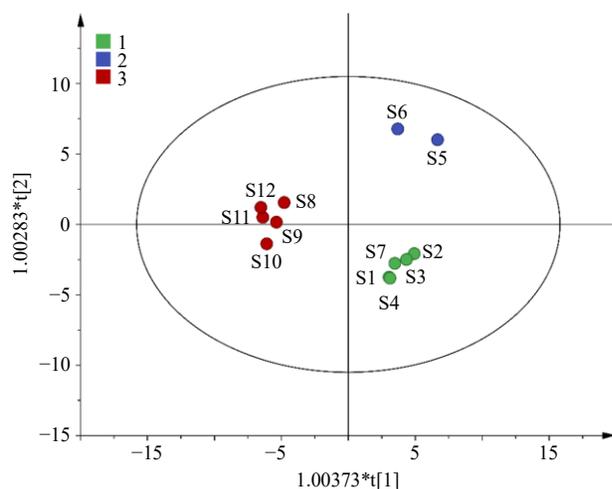


图8 12批JGLC OPLS-DA得分图

Fig. 8 OPLS-DA score plot for 12 batches of JGLC

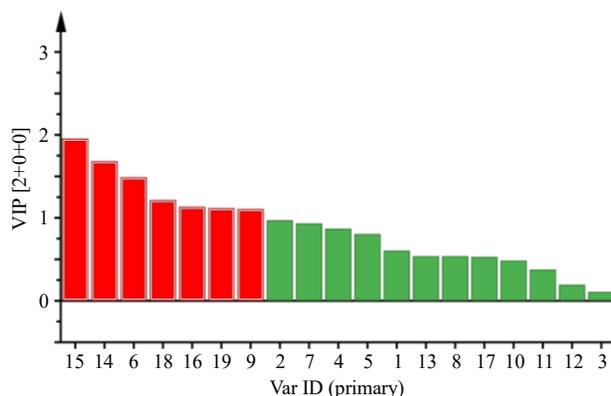


图9 JGLC的OPLS-DA的VIP值图

Fig. 9 VIP plot of OPLS-DA for JGLC

具有一定的标志性作用, 该结果与PCA载荷图中寻找的重要性权重变量基本一致。

3 讨论

在供试品溶液制备方法考察时, 分别考察了不同提取方式(超声、加热回流), 不同提取溶剂(甲醇、75%甲醇、50%甲醇、25%甲醇、无水乙醇、75%乙醇、50%乙醇、25%乙醇和水), 不同提取时间(15、30、60 min)对JGLC有效成分提取的影响, 综合色谱峰数量及响应值, 确定采用50%甲醇为提取溶剂, 超声提取30 min, 作为供试品的处理方法。

中药指纹图谱是一种综合的、可量化提供化学成分特征的色谱图, 可通过表征中药复杂成分及内在质量的关系来较为全面地反映所含化学成分的种类及数量, 从而评价中药质量的一致性及稳定性, 在中药材及中药复方制剂的质量评价中已被广泛应用^[18-21]。本研究首次采用HPLC法建立了12批JGLC的指纹图谱, 标定了19个共有峰并结合组方单味药材溶液的色谱图进行比较, 19个共有峰均得以归属, 表明制剂与药材具有良好的关联性。提示可以从药材源头入手, 以便更好地控制制剂的稳定性和均一性。通过与对照品进行比对, 鉴定了9个色谱峰, 分别为富马酸、没食子酸、原儿茶酸、红景天苷、绿原酸、香草酸、表儿茶素、鹅掌楸苷和滇白珠苷A。相似度评价结果显示各批次间的相似度均大于0.910, 说明12批JGLC的相似度良好, 质量较稳定。

从HCA结果来看, 在不同年份及月份生产的JGLC中的化学成分含量存在一定的差异, 可能与制剂所用的原药材来源、采收季节以及原药材批间质量差异有关。随后进行了无监督的PCA, 该分类结果与聚类分析一致, 也进一步验证了聚类分析的

结果。在对 JGLC 进行一致性评价的同时进行了差异性评价,通过 VIP 法筛选出了对样品组分影响较大的成分,发现 15(鹅掌楸苷)、14、6(原儿茶酸)、18、16(滇白珠苷 A)、19、9(绿原酸)号峰为差异标志物,提示在今后该药品的生产过程中应重点关注这 7 个成分的变化,进而保证药品的质量,然而 14、18、19 号峰尚未知,后续将会进一步采用液质联用等手段对未识别的成分进行鉴定,以便更好地对 JGLC 进行质量控制。

综上所述,本实验所建立的 JGLC 指纹图谱方法简单、准确度高,可用于该药品的质量控制研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 汪洪, 吴昊旻. 关节注射联合金骨莲胶囊治疗骶髂关节炎疗效观察 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2014, 22(6): 10-12.
- [2] 南运东, 徐长科. 金骨莲胶囊联合硫酸氨基葡萄糖和对乙酰氨基酚治疗膝骨性关节炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2021, 36(5): 961-966.
- [3] 国家中成药标准汇编. 脑系经络肢体脑系分册 [M]. 北京: 国家药品监督管理局, 2002. 462-464. http://www.nhsa.gov.cn/art/2020/12/28/art_37_4220.html.
- [4] 龚春燕, 敖华蓉, 王萌萌, 等. 金骨莲胶囊治疗痹阻型类风湿关节炎的临床疗效 [J]. 临床合理用药杂志, 2018, 11(16): 18-19.
- [5] 刘娣, 鞠海艳, 栗洪波, 等. 金骨莲胶囊治疗类风湿关节炎(风湿痹阻证)的临床研究 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(5): 39-43.
- [6] 李伟. 金骨莲胶囊治疗骨性关节炎的临床观察 [J]. 中医临床研究, 2019, 11(1): 75-77.
- [7] 鞠海艳. 金骨莲胶囊治疗尪痹(类风湿关节炎)风湿痹阻证的临床研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2015.
- [8] 罗虹, 刘博文, 杨慧, 等. 基于网络药理学及活性成分测定的六味地黄系列制剂质量研究 [J]. 中草药, 2020, 51(21): 5462-5477.
- [9] Fu G, Hall P, Miles N J. Performance evaluation for composites based on recycled polypropylene using principal component analysis and cluster analysis [J]. *J Clean Prod*, 2016, 115(Mar.1): 343-353.
- [10] Wang C, Wen M, Bai L, et al. Auto-classification for confocal back-scattering micro-spectrum at single-cell scale using principal component analysis [J]. *Optik-Int J Light Electron Optics*, 2015, 127(3): 1007-1010.
- [11] 刘颖, 王青, 王放, 等. 苦碟子注射液 HPLC 指纹图谱与化学模式识别分析 [J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(24): 2097-2101.
- [12] 曹亚楠, 白雪, 赵钢, 等. UPLC 指纹图谱结合化学计量学的多产地藜麦质量控制 [J]. 食品科学, 2017, 38(20): 286-291.
- [13] 林秀敏, 岳丽丹, 张振凌, 等. GC-IMS 法比较不同方法炮制酒当归特异气味成分差异 [J]. 中草药, 2020, 51(17): 4464-4472.
- [14] 刁嘉茵, 徐灿, 王淑美, 等. 中药指纹图谱与药效相关性研究进展 [J]. 药学研究, 2018, 37(3): 165-168.
- [15] 韩晴雯, 周斌, 李玉平, 等. HPLC 指纹图谱技术结合模式识别分析评价参莲胶囊的质量 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(7): 1300-1308.
- [16] 侯玉洁, 祝文君, 陈长功, 等. 基于气相色谱-质谱联用技术的乙型肝炎血清代谢标志物的探究 [J]. 色谱, 2015, 33(4): 383-388.
- [17] Triba M N, Moyec L L, Amathieu R, et al. PLS/OPLS models in metabolomics: The impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters [J]. *Mol Biosyst*, 2014, 11(1): 13-19.
- [18] 田双双, 赵晓梅, 刘珊珊, 等. 基于 UPLC 特征图谱及萜类成分含量测定的泽泻产地差异研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(7): 1545-1557.
- [19] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.
- [20] Dong R F, Su J, Nian H, et al. Chemical fingerprint and quantitative analysis of flavonoids for quality control of sea buckthorn leaves by HPLC and UHPLC-ESI-QTOF-MS [J]. *J Funct Foods*, 2017, 37: 513.
- [21] 李海波, 杨群, 区伟珍, 等. 金振口服液氨基酸特征指纹图谱及 29 种氨基酸同时定量的质量控制方法研究 [J]. 中草药, 2020, 51(23): 5972-5979.

[责任编辑 郑礼胜]