

基于指纹图谱和一测多评 (QAMS) 法的丹红化瘀口服液质量评价研究

唐 清, 匡艳辉*, 李雯珊, 林 娟, 王德勤

广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广东 广州 510515

摘要: 目的 建立一测多评 (QAMS) 与指纹图谱结合的方法评价丹红化瘀口服液 (Danhong Huayu Oral Solution, DHOS)。方法 采用 Waters XBridge C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.5%甲酸水溶液进行梯度洗脱, 柱温 30 °C, 检测波长 286 nm, 体积流量 1 mL/min。结果 建立了 DHOS HPLC 指纹图谱, 确定了 18 个共有峰, 并指认了其中丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 D、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、丹酚酸 B、丹酚酸 A 共 8 个共有峰。通过相似度评价、主成分分析对 10 批 DHOS HPLC 指纹图谱进行综合分析, 10 批制剂的相似度计算均大于 0.9, 找到影响指纹图谱的主要成分为丹酚酸 A、丹酚酸 D 等。以新橙皮苷为内参物, 建立了可同时测定 DHOS 中丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 D、柚皮苷、丹酚酸 B 含量的一测多评法, 6 种主要成分 QAMS 法与外标法的测定结果间无显著差异, 10 批 DHOS 中丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 D、柚皮苷、新橙皮苷、丹酚酸 B 质量浓度分别为 3.853 2~4.390 4、0.264 0~0.425 7、0.560 7~0.855 0、0.889 2~1.797 8、0.754 2~1.091 8、0.178 2~0.382 4 mg/mL。结论 建立 DHOS 的 HPLC 指纹图谱评价方法和一测多评含量测定法, 为 DHOS 提供了切实可行的整体质量评价方法。

关键词: 丹红化瘀口服液; HPLC; 指纹图谱; 一测多评; 丹参素钠; 原儿茶醛; 丹酚酸 D; 柚皮苷; 丹酚酸 B; 质量评价
中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)06-1663-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.06.008

Quality evaluation of Danhong Huayu Oral Solution based on fingerprint combined with quantitative analysis of multi-components by single marker

TANG Qing, KUANG Yan-hui, LI Wen-shan, LIN Juan, WANG De-qin

Guangzhou Baiyunshan Hutchison Whampoa Chinese Medicine Co., Ltd., Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To establish a comprehensive assessment system for Danhong Huayu Oral Solution (丹红化瘀口服液, DHOS) through integrating quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) and fingerprint. **Methods** HPLC analysis was performed on a Waters XBridge C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, eluted at 30 °C with acetonitrile-0.5% formic acid aqueous solution as mobile phase in gradient elution. The detection wavelength was 286 nm and the flow rate was 1 mL/min. **Results** The fingerprint of DHOS was established, 18 common peaks were calibrated. Eight common peaks were identified, including sodium danshensu, protocatechualdehyde, salvianolic acid D, naringin, hesperidin, neohesperidin, salvianolic acid B and salvianolic acid A. The fingerprints of 10 batches of DHOS were comprehensively analyzed with similarity evaluation and principal component analysis, leading to the results that the similarity of 10 batches of preparations was greater than 0.9, and the main components affecting the fingerprint were identified as salvianolic acid A and salvianolic acid D. Furthermore, by using the neohesperidin as internal reference standard, QAMS was established to determine the contents of sodium danshensu, protocatechualdehyde, salvianolic acid D, naringin and salvianolic acid B in DHOS. And there was no significant difference between the quantitative results of external standard method (ESM) and QAMS method. Contents of the six main components above were 3.853 2—4.390 4, 0.264 0—0.425 7, 0.560 7—0.855 0, 0.889 2—1.797 8, 0.754 2—1.091 8, 0.178 2—0.382 4 mg/mL, respectively. **Conclusion** The fingerprint and the QAMS method of DHOS were established in this study, which will provide a feasible method to evaluate the quality of DHOS.

Key words: Danhong Huayu Oral Solution; HPLC; fingerprint; QAMS; sodium danshensu; protocatechualdehyde; salvianolic acid D; naringin; salvianolic acid B; quality evaluation

收稿日期: 2021-09-01

基金项目: 国家药典委员会药品标准制修订—丹红化瘀口服液质量标准提升 (2019Z012); 广州市科学技术协会 2019 年“广州市院士专家工作站”建设项目资助 (600180)

作者简介: 唐 清, 助理研究员, 研究方向为质量控制及制剂工艺。Tel: 15692028384

*通信作者: 匡艳辉 (1984—), 高级工程师, 研究方向为质量控制及制剂工艺。Tel: (020)66282450

丹红化瘀口服液 (Danhong Huayu Oral Solution, DHOS) 由成都中医药大学陈达夫教授根据王清任的“血府逐瘀汤”加减化裁研制而成, 该处方由丹参、当归、川芎、桃仁、红花、柴胡和枳壳 7 味药组成, 具有活血化瘀、行气通络的功效, 用于气滞血瘀引起的视物不清、突然不见症; 视网膜中央静脉阻塞症的吸收期见上述证候者^[1-3]。DHOS 的质量标准收载于《中国药典》2020 年版一部, 标准中建立了原儿茶醛的 HPLC 含量测定方法, 但该成分是丹参药材在提取浓缩过程中所产生的中间体, 并不太稳定^[4-6]; 且单一成分的检测并不能全面反映产品的综合质量。

为了完善 DHOS 的质控方法, 本研究建立了 DHOS HPLC 指纹图谱^[7], 确定了 18 个共有峰。通过相似度评价、主成分分析^[8-10](principal component analysis, PCA) 对 10 批 DHOS 进行了综合评价, 同时采用一测多评法^[11-12]对其中 6 种成分(丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 D、柚皮苷、新橙皮苷、丹酚酸 B) 进行含量测定, 并用外标法验证了其测定结果的可行性, 为保障产品安全有效, 建立一种全面的质量评价系统提供了科学的依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

CP225D 型十万分之一天平、BT 214D 型万分之一天平, 德国 Sartorius 公司; U3000 液相色谱仪, 美国赛默飞世尔科技有限公司; Waters 2695 高效液相色谱仪, 美国 Waters 科技有限公司。

1.2 试药

对照品丹参素钠(批号 110855-201614, 质量分数 98.1%)、原儿茶醛(批号 110810-201608, 质量分数 99.3%)、橙皮苷(批号 110721-201115, 质量分数 95.3%)、新橙皮苷(批号 111857-201703, 质量分数 99.2%)、丹酚酸 B(批号 111562-201716, 质量分数 94.1%) 购自中国食品药品检定研究院; 对照品丹酚酸 D(批号 P11D9F77364, 质量分数 \geq 95%) 购自上海源叶生物科技有限公司; 对照品柚皮苷(批号 Y-006-171216, 质量分数 $>$ 98%)、丹酚酸 A(批号 D-011-180827, 质量分数 $>$ 98%) 购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 色谱级乙腈, 德国默克公司; 分析级甲醇等常规分析试剂。

10 批 DHOS 来源于广州白云山和记黄埔中药有限公司, 批号分别为 D17A001、D17A002、D17A003、D17A005、D17A006、D17A007、

D17A008、G17A016、G18A009、I19A001, 分别编号 S1~S10。缺丹参、缺枳壳阴性样品, 广州白云山和记黄埔中药有限公司现代中药研究院自制。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 取丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 D、柚皮苷、新橙皮苷、丹酚酸 B 对照品适量, 精密称定, 加 80% 甲醇制成含丹参素钠 0.803 0 mg/mL、原儿茶醛 0.048 0 mg/mL、丹酚酸 D 0.112 2 mg/mL、柚皮苷 0.154 2 mg/mL、新橙皮苷 0.142 0 mg/mL、丹酚酸 B 0.047 8 mg/mL 的混合对照品溶液。于 4 °C 冰箱保存备用, 临用前经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 取 DHOS, 精密量取 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇至刻度, 摇匀, 0.45 μ m 微孔滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 阴性样品对照溶液的制备 分别取缺丹参、缺枳壳阴性样品, 按照“2.2.2”项下供试品溶液制备方法, 分别制备得缺丹参、缺枳壳的阴性样品溶液, 备用。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Waters XBridge 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-0.5% 甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~25 min, 5%~12% 乙腈; 25~30 min, 12%~15% 乙腈; 30~70 min, 15%~25% 乙腈; 70~71 min, 25%~90% 乙腈; 71~75 min, 90% 乙腈; 检测波长为 286 nm; 柱温为 30 °C; 体积流量为 1 mL/min; 进样量为 10 μ L。

2.3 DHOS 指纹图谱共有模式的建立和共有峰的确证

2.3.1 精密度考察 精密量取 DHOS (S9), 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 按“2.2”项下色谱条件进样, 记录 HPLC 色谱图。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2012 版进行评价, 相似度均大于 0.96, 结果表明仪器的精密度良好。

2.3.2 稳定性考察 精密量取 DHOS (S9), 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、10、24、48 h 按“2.2”项下色谱条件进样, 记录 HPLC 色谱图, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2012 版进行评价, 相似度均大于 0.92, 结果表明供试品溶液放置 48 h 内稳定。

2.3.3 重复性考察 精密量取 DHOS (S9), 按

“2.1.2”项下方法分别制备 6 份供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件进样，记录 HPLC 色图谱，采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2012 版进行评价，相似度均大于 0.99，结果表明方法重复性好。

2.3.4 指纹图谱的建立 分别取 10 批次 DHOS 供试品溶液，按“2.1.2”项下方法分别制备供试品溶液，在“2.2”项下色谱条件进行 HPLC 分析，记录

色谱图，结果见图 1。

2.3.5 共有峰的获得和参照峰的确认 分析 10 批 DHOS 的测定结果，其中有 18 个色谱峰稳定重现（图 1）。因 14 号峰稳定性良好，分离度高，故选择该峰为参照峰。

2.3.6 特征峰的指认 结合混合对照品溶液与缺丹参阴性供试品、缺枳壳阴性供试品的色谱图（图 2）分析 10 批样品的测定结果，指认了其中 8 个成

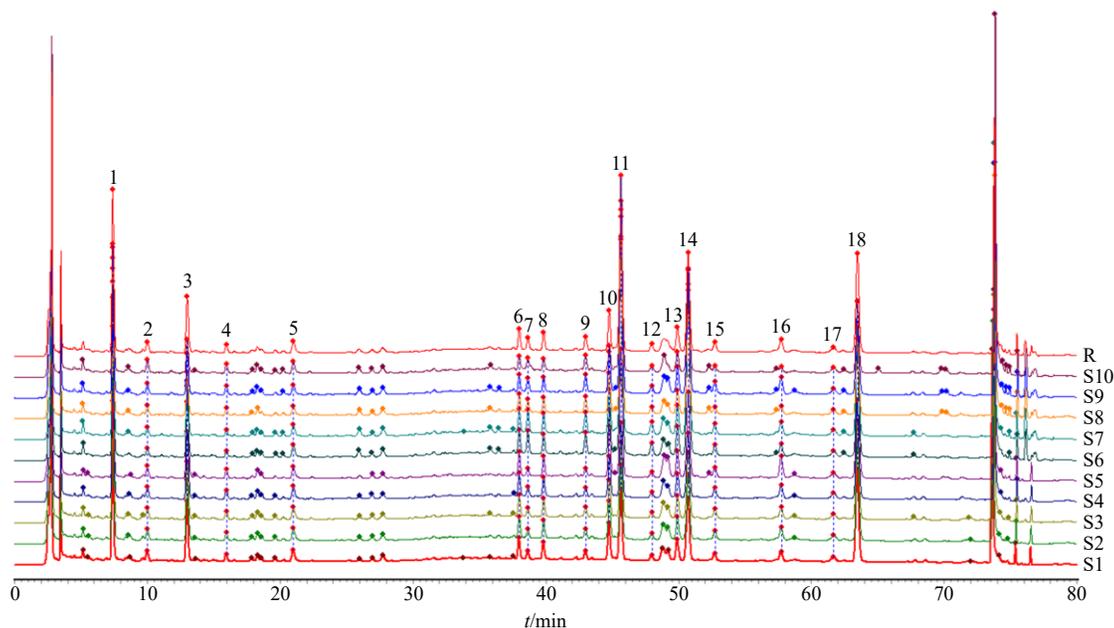
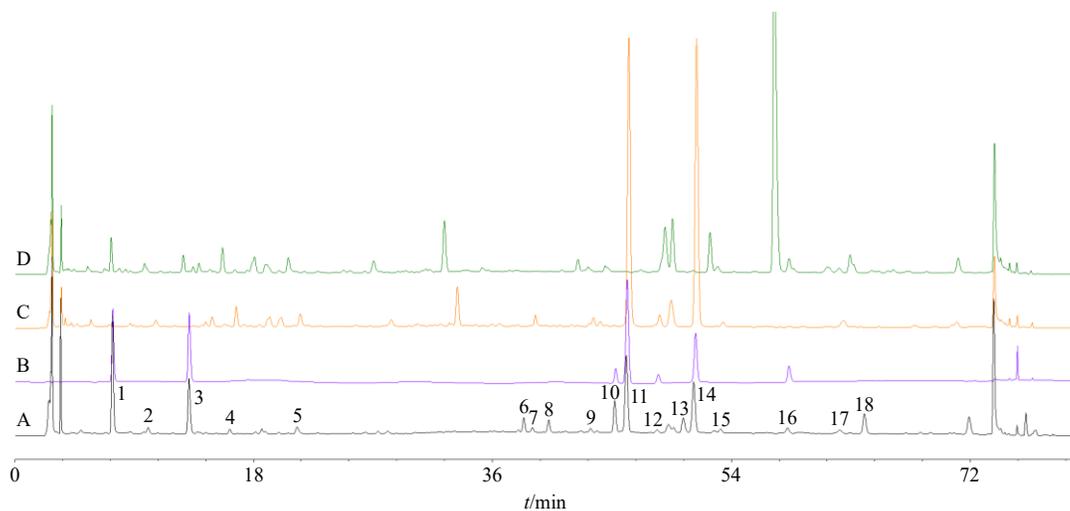


图 1 10 批 DHOS HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of 10 batches of DHOS



A-DHOS B-混合对照品 C-缺丹参阴性样品 D-缺枳壳阴性样品 1-丹参素钠 3-原儿茶醛 10-丹酚酸 D 11-柚皮苷 12-橙皮苷 14-新橙皮苷 16-丹酚酸 B 18-丹酚酸 A
 A-DHOS B-mixed reference substances C-negative sample without *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* D-negative sample without *Aurantii Fructus* 1-danshensu sodium 3-protocatechualdehyde 10-salvianolic acid D 11-naringin 12-hesperidin 14-neohesperidin 16-salvianolic acid B 18-salvianolic acid A

图 2 DHOS 指纹图谱特征峰归属

Fig. 2 Attribution of characteristic peaks of DHOS fingerprints

分,分别为丹参素钠(1号峰)、原儿茶醛(3号峰)、丹酚酸D(10号峰)、柚皮苷(11号峰)、橙皮苷(12号峰)、新橙皮苷(14号峰)、丹酚酸B(16号峰)、丹酚酸A(18号峰)。

2.3.7 指纹图谱的相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2012版对10批DHOS HPLC指纹图谱进行评价,计算各色谱图的整体相

似度。供试品指纹图谱与对照指纹图谱(R)的相似度均大于0.90,表明10批DHOS相似度良好。结果见表1。

2.3.8 指纹图谱共有模式的确立 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2012版对10批DHOS进行模式识别,通过中位数法获得DHOS HPLC指纹图谱的共有模式,结果见图1中“R”。

表1 10批DHOS样品相似度评价结果

Table 1 Similarity of HPLC fingerprints of 10 batches of DHOS

批号	相似度										
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	1.000	0.999	0.999	0.999	0.998	0.998	0.996	0.986	0.959	0.999
S2	1.000	1.000	0.999	0.999	0.999	0.998	0.998	0.995	0.986	0.957	0.999
S3	0.999	0.999	1.000	0.999	0.998	0.997	0.998	0.997	0.983	0.953	0.998
S4	0.999	0.999	0.999	1.000	1.000	0.999	0.999	0.996	0.984	0.956	0.999
S5	0.999	0.999	0.998	1.000	1.000	0.999	0.999	0.996	0.984	0.955	0.999
S6	0.998	0.998	0.997	0.999	0.999	1.000	0.999	0.993	0.981	0.947	0.997
S7	0.998	0.998	0.998	0.999	0.999	0.999	1.000	0.997	0.977	0.948	0.997
S8	0.996	0.995	0.997	0.996	0.996	0.993	0.997	1.000	0.973	0.957	0.995
S9	0.986	0.986	0.983	0.984	0.984	0.981	0.977	0.973	1.000	0.971	0.989
S10	0.959	0.957	0.953	0.956	0.955	0.947	0.948	0.957	0.971	1.000	0.967
R	0.999	0.999	0.998	0.999	0.999	0.997	0.997	0.995	0.989	0.967	1.000

2.4 DHOS 指纹图谱的模式识别研究

2.4.1 PCA 将10批DHOS指纹图谱共有峰的峰面积为变量,通过SPSS 22.0软件对原始数据做标准化处理后,进行PCA。以主成分的特征值与方差贡献率为选择的主要依据,根据主成分个数的提取原则^[13-14]——取特征值大于1的主成分,本实验可提取3个主成分,第1主成分特征值为9.232,方差贡献率为51.289%;第2主成分特征值为6.638,累计方差贡献率为88.165%;第3主成分特征值为1.124,累积方差贡献率为94.411%。因此主成分1~3可以代表DHOS共有峰的大部分信息,见表2。结合样品PCA碎石图(图3)可见,PCA中特征值的变化情况,图中的曲线自第4个主成分开始存在1个明显的拐点,说明前3个主成分的分析结果基本显示出了不同批次DHOS之间的相似度和差异性,可以代表DHOS的质量。

初始因子载荷矩阵见表3,由表中可知,第1主成分信息主要来自色谱峰1、2、5~8、10、15、18;第2类主成分信息主要来自色谱峰3、4、11、14、16;第3类主成分信息主要来自色谱峰12。前

表2 主成分特征值及累积方差贡献率

Table 2 Eigen value and contribution rate of principal component analysis

主成分	初始特征值		
	特征值	方差贡献率/%	累积贡献率/%
1	9.232	51.289	51.289
2	6.638	36.876	88.165
3	1.124	6.246	94.411

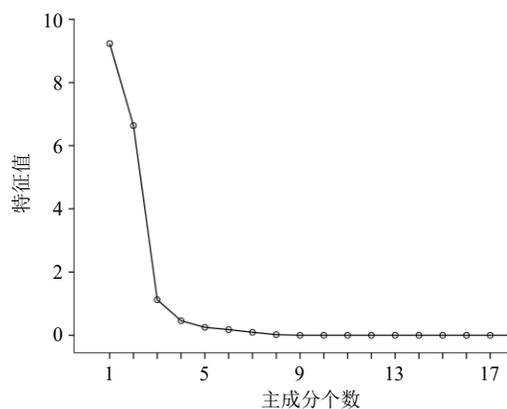


图3 样品PCA碎石图

Fig. 3 PCA scree plot of various samples

表3 主要因子荷载矩阵

Table 3 Main factors loading matrix

峰号	主成分 1	主成分 2	主成分 3
1	0.816	-0.518	-0.093
2	0.819	0.517	0.232
3	0.034	0.948	-0.251
4	0.377	0.898	0.213
5	0.946	0.242	0.154
6	0.915	-0.263	-0.271
7	0.876	-0.411	0.187
8	0.920	-0.289	-0.080
9	0.657	-0.553	0.425
10	0.926	0.267	-0.217
11	-0.273	0.872	0.392
12	-0.344	-0.735	0.521
13	0.671	0.698	-0.097
14	-0.478	0.827	0.283
15	0.832	0.270	0.164
16	-0.270	0.955	-0.007
17	0.740	0.430	-0.110
18	0.966	0.010	0.183

3 名变量的权重值分别为 0.966、0.946、0.926，分别对应峰 18(丹酚酸 A)、峰 5 和峰 10(丹酚酸 D)，即这 3 个色谱峰在区分不同批次 DHOS 指纹图谱中起了决定性作用。

2.4.2 不同批次 DHOS 综合评价 根据各主成分载荷向量乘以各主成分特征值的算术平方根计算各批次样品的综合得分，结果见表 4。S2~S7 得分均靠前，其结果与相似度评价结果基本一致，该数据可以作为评判批次差异的标准之一。

2.5 6 种指标成分的测定

2.5.1 线性关系考察 分别精密吸取“2.1.1”项下的混合对照品溶液 I(丹参素钠 0.803 0 mg/mL、原儿茶醛 0.048 0 mg/mL、丹酚酸 D 0.112 2 mg/mL、

表4 综合得分排序

Table 4 Sorting meter of comprehensive scores

批号	得分	排名	批号	得分	排名
S1	-0.958 030	8	S6	2.065 581	1
S2	0.549 514	5	S7	1.163 753	4
S3	0.403 703	6	S8	-3.143 630	9
S4	1.614 674	3	S9	-3.143 630	10
S5	2.000 035	2	S10	-0.552 010	7

柚皮苷 0.154 2 mg/mL、新橙皮苷 0.142 0 mg/mL、丹酚酸 B 0.047 8 mg/mL)，加 80%甲醇稀释 2、4、10、20、40 倍制得混合对照品溶液 II~VI，将不同质量浓度的混合对照品溶液 I~VI 注入液相色谱仪中，按“2.2”项下色谱条件进行分析，以峰面积积分值(Y)对进样量(X)进行回归分析，得到丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 D、柚皮苷、新橙皮苷、丹酚酸 B 的回归方程及线性范围，结果分别为丹参素钠 $Y=60\ 538 X-15\ 212$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 0.201~0.902 μg; 原儿茶醛 $Y=4\ 276\ 113 X-6829$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 0.012~0.480 μg; 丹酚酸 D $Y=1\ 160\ 540 X-4216$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 0.028~1.122 μg; 柚皮苷 $Y=1\ 592\ 783 X-9771$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 0.038~1.541 μg; 新橙皮苷 $Y=1\ 951\ 384 X-8696$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 0.036~1.419 μg; 丹酚酸 B $Y=1\ 351\ 722 X-5003$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 0.012~0.478 μg。

2.5.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL，连续进样 6 次，记录 HPLC 图。测得丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 D、柚皮苷、新橙皮苷、丹酚酸 B 峰面积的 RSD 分别为 0.43%、0.37%、0.33%、0.35%、0.42%、0.53%，结果表明仪器的精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 精密量取 DHOS (S9)，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，分别在 0、2、4、8、10、24、48 h 按“2.2”项下色谱条件进样，记录 HPLC 图，测得丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 D、柚皮苷、新橙皮苷、丹酚酸 B 峰面积的 RSD 分别为 1.24%、1.57%、1.29%、0.59%、2.41%、0.61%，结果表明供试品溶液放置 48 h 内稳定。

2.5.4 重复性试验 精密量取 DHOS (S9)，按“2.1.2”项下方法分别制备 6 份供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件进样，记录 HPLC 图，计算丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 D、柚皮苷、新橙皮苷、丹酚酸 B 平均质量浓度分别为 4.289 4、0.420 0、0.840 9、1.765 0、1.076 0、0.377 4 mg/mL，RSD 分别为 1.33%、1.16%、1.35%、1.34%、1.22%、1.23%，结果表明该方法重复性好。

2.5.5 加样回收率试验 精密量取 DHOS (S9) 0.5 mL，共 6 份，分别精密添加丹参素钠 2.145 0 mg/mL、原儿茶醛 0.210 0 mg/mL、丹酚酸 D 0.392 1 mg/mL、柚皮苷 0.864 5 mg/mL、新橙皮苷 0.541 5 mg/mL、丹酚酸 B 0.190 5 mg/mL 的混合对照品溶液 1 mL，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，定容至 10 mL，

按“2.2”项下色谱条件测定,计算加样回收率,测得丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 D、柚皮苷、新橙皮苷、丹酚酸 B 的平均加样回收率分别为 97.80%、101.34%、102.81%、99.07%、99.69%、90.66%,RSD 分别为 3.09%、2.88%、2.35%、2.25%、2.87%、3.66%,结果表明该方法具有良好的加样回收率。

2.5.6 相对校正因子 (f_{ri}) 的计算 分别精密吸取不同质量浓度的混合对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件测定,记录各色谱峰峰面积。以新橙皮苷为内标,按照公式计算 f_{ri} [$f_{ri} = A_i C_r / (A_r C_i)$ (A_i 为内标的峰面积, A_r 为待测成分的峰面积, C_i 为内标的质量浓度, C_r 为待测成分的质量浓度)],计算得到丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 D、柚皮苷、丹酚酸 B

相对于新橙皮苷的 f_{ri} 分别为 3.224、0.457、1.675、1.233、1.488。

2.5.7 f_{ri} 重现性考察 分别考察了 Waters e2695 和 U30002 台仪器上丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 D、柚皮苷、丹酚酸 B 的检测结果, f_{ri} 见表 5,结果显示各成分 f_{ri} 的 RSD 均 < 4%,表明不同仪器对各成分 f_{ri} 无显著影响。

2.5.8 待测组分色谱峰的定位 精密吸取混合对照品溶液,分别在 Waters e2695 和 U3000 2 台仪器上测定并计算丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 D、柚皮苷、丹酚酸 B 的相对保留值 (t_{ri})。结果显示不同仪器对 t_{ri} 的影响不大,其 RSD 均 < 5% (表 6),表明可根据 t_{ri} 对各成分的色谱峰进行定位。

表 5 不同高效液相色谱仪的 f_{ri}

Table 5 f_{ri} obtained from different HPLC instruments

不同仪器	f_{ri} 丹参素钠/新橙皮苷	f_{ri} 原儿茶醛/新橙皮苷	f_{ri} 丹酚酸 D/新橙皮苷	f_{ri} 柚皮苷/新橙皮苷	f_{ri} 丹酚酸 B/新橙皮苷
Waters 2695	3.224	0.457	1.675	1.233	1.488
U3000	3.122	0.465	1.781	1.270	1.507
平均值	3.173	0.461	1.728	1.252	1.498
RSD/%	1.61	0.87	3.07	1.48	0.63

表 6 不同仪器 t_{ri} 结果

Table 6 t_{ri} obtained from different HPLC instruments

不同仪器	t_{ri} 丹参素钠/新橙皮苷	t_{ri} 原儿茶醛/新橙皮苷	t_{ri} 丹酚酸 D/新橙皮苷	t_{ri} 柚皮苷/新橙皮苷	t_{ri} 丹酚酸 B/新橙皮苷	t_{ri} 丹酚酸 A/新橙皮苷
Waters e2695	0.14	0.26	0.88	0.90	1.14	0.14
U3000	0.15	0.27	0.89	0.90	1.15	0.15
平均值	0.14	0.26	0.88	0.90	0.14	0.14
RSD/%	3.45	1.89	0.56	0.00	0.44	3.45

2.5.9 一测多评法 (QASM) 与外标法测定结果的比较 分别取 10 批次 DHOS 供试品溶液,按“2.1.2”项下方法分别制供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件测定,分别采用外标法和 QASM 对丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 D、柚皮苷、新橙皮苷、丹酚酸 B 含量进行测定。结果显示 2 组检测结果无显著性差异 (表 7),表明该一测多评法在 DHOS 多指标成分质量评价中应用是可行的。

3 讨论

综合参考文献,本实验对 270、286、330 nm 3 种波长下色谱图进行了考察^[1,15-16],结果显示 286 nm 下色谱峰信息较丰富,故选择 286 nm 作为检测波长。考察了 Agilent Eclipse XDB-C₁₈、Waters T3、Waters Sunfire、Waters XBridge 等不同型号色谱柱

的分离情况,发现因为流动相的 pH 较低,故 Waters XBridge 柱色谱峰型及分离度更好,且只有该型号色谱柱能较好分离 DHOS 中丹酚酸 D 与柚皮苷 2 种物质的色谱峰。结合上述实验条件,以丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 D、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、丹酚酸 B、丹酚酸 A 对照品为参照,确定了 DHOS 中 18 个共有峰,且以空白对照溶液为参考无干扰,10 批 DHOS 指纹图谱基本一致,相似度计算均大于 0.9,表明该实验建立的 DHOS 指纹图谱测定方法重复性好。

通过 PCA,本研究得到了可以代表 DHOS 大部分信息的 3 个主成分,占 18 个成分 94.411% 的信息量,具有很好的代表性,可以代表 DHOS 的质量。经分析这 3 大类成分包括丹参素钠、原儿茶醛、丹

表7 QASM与外标法测得DHOS中6种成分的含量
Table 7 Contents of six components in DHOS by QASM and ESM

样品	新橙皮苷/ (mg·mL ⁻¹)	丹参素钠/(mg·mL ⁻¹)		原儿茶醛/(mg·mL ⁻¹)		丹酚酸 D/(mg·mL ⁻¹)		柚皮苷/(mg·mL ⁻¹)		丹酚酸 B/(mg·mL ⁻¹)	
		外标法	QASM	外标法	QASM	外标法	QASM	外标法	QASM	外标法	QASM
S1	0.798 0	3.853 2	3.824 5	0.279 0	0.260 6	0.632 8	0.658 4	0.984 0	0.999 7	0.178 2	0.186 6
S2	0.832 2	4.030 4	4.000 6	0.280 6	0.262 2	0.639 6	0.665 4	1.028 6	1.044 8	0.231 6	0.242 4
S3	0.830 0	4.241 4	4.210 0	0.268 8	0.251 0	0.628 2	0.653 6	1.047 0	1.063 6	0.207 8	0.217 6
S4	0.810 2	4.131 2	4.100 6	0.302 4	0.282 4	0.683 2	0.710 8	1.012 6	1.028 8	0.252 8	0.264 7
S5	0.830 0	4.260 2	4.228 6	0.323 0	0.301 6	0.728 0	0.757 4	1.032 8	1.049 2	0.263 8	0.276 1
S6	0.785 7	4.282 7	4.251 0	0.334 9	0.312 8	0.736 5	0.766 2	0.971 3	0.986 7	0.258 9	0.271 0
S7	0.754 2	4.223 1	4.191 8	0.304 5	0.284 4	0.695 4	0.723 6	0.937 9	0.952 8	0.244 3	0.255 8
S8	0.769 1	3.950 2	3.920 8	0.264 0	0.246 6	0.560 7	0.583 3	0.889 2	0.903 2	0.182 3	0.190 8
S9	1.091 8	4.365 0	4.332 8	0.425 7	0.397 6	0.855 0	0.889 6	1.797 8	1.826 4	0.382 4	0.400 2
S10	0.947 5	4.390 4	4.384 2	0.395 4	0.375 3	0.846 0	0.811 2	1.510 2	1.597 6	0.196 6	0.180 8
P		0.728		0.402		0.608		0.859		0.756	

酚酸 D、丹酚酸 B、丹酚酸 A 等酚酸类成分，以及柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷等黄酮类成分，前者经多位学者研究表明^[17-19]主要为丹参中的原有成分及生产过程中产生的衍生物，后者主要为枳壳中的原有成分^[20-21]，由此可见，想要控制好 DHOS 的稳定性及一致性，首先需要对其原料来源、产地、质量及生产过程等加强控制及管理。

本研究采用 QAMS 建立了 DHOS 中丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 D、柚皮苷、新橙皮苷和丹酚酸 B 共 6 种成分同时测定的方法，而指纹图谱指认的丹酚酸 A 和橙皮苷没有纳入测定范围，是因为丹酚酸 A 极其不稳定，橙皮苷含量较低，均不适宜作为含量测定指标。

在 QAMS 中，选择了峰形较好、分离度较好的新橙皮苷作为内参物，计算该成分与其它 5 种成分的 f_{ri} 分别为 3.173、0.461、1.728、1.252、1.498，通过对比外标法及在不同仪器上的检测结果，验证了该 QAMS 的可行性及准确性。此外，本研究还发现丹酚酸 D 和柚皮苷在不同色谱柱上出峰顺序差异较大，如需将该法进行推广，还需要进一步考察其在不同色谱柱上的耐用性。

本实验运用指纹图谱、模式识别结合 QAMS 对 DHOS 的质量评价进行研究，为完善 DHOS 的质量控制方法提供了可靠依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 712.

[2] 陈乃杨. 眼底病的中医辨证论治 [J]. 内蒙古中医药, 2009, 28(16): 92-93.

[3] 李海威, 靖鹏举, 孙晓萍, 等. 丹红化瘀口服液联合卵磷脂络合碘治疗视网膜静脉阻塞的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(4): 655-658.

[4] 毕聪, 李泮霖, 张伟健, 等. 丹红注射液原料药材与成品化学成分相关性研究 [J]. 中南药学, 2018, 16(4): 433-437.

[5] 李建平, 肖礼娥, 肖馨. 丹参口服液中 4 个酚酸成分的稳定性考察及其相关性研究 [J]. 海峡药学, 2019, 31(7): 33-36.

[6] 袁晓航, 葛婷婷, 程建明. 丹参滴注液制备过程中酚酸类成分的变化研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(2): 172-174.

[7] 周昱杉, 梁洁, 信晨曦, 等. 中药复方制剂质量评价方法 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(3): 589-592.

[8] 许有诚, 赵庄, 卢日刚, 等. 主成分分析在中药质量分析及质量评价中的应用进展 [J]. 大众科技, 2021, 23(8): 37-41.

[9] 张晓瑞, 张婧涵, 李国信, 等. 主成分分析法用于射干药材评价研究 [J]. 中国药业, 2014, 23(14): 37-38.

[10] 周广峰, 刘欣. 主成分分析法在水环境质量评价中的应用进展 [J]. 环境科学导刊, 2011, 30(1): 75-78.

[11] 王智民, 钱忠直, 张启伟, 等. 一测多评法建立的技术指南 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 657-658.

[12] 陆逸林, 石上梅, 蔡宝昌, 等. 基于一测多评的中药多成分定量研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2525-2529.

[13] 杨冉冉, 姬蕾, 李二文, 等. 鸡血藤的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4530-4536.

- [14] 陈亮元, 程轩轩, 唐晓敏, 等. 指纹图谱、模式识别结合一测多评法在广金钱草质量评价中的应用研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3322-3328.
- [15] 郑江萍, 叶政德, 杨光义. 丹参配方颗粒 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 海峡药学, 2016, 28(9): 45-49.
- [16] 陈欢, 高萌, 罗小泉, 等. 不同产地枳壳药材中 12 种有效成分的主成分分析和判别分析 [J]. 中草药, 2019, 50(14): 3433-3437.
- [17] 李思谦, 章顺楠, 周立红, 等. 丹参中酚酸类成分及在水溶液中降解转化研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(4): 109-117.
- [18] Jiang R W, Lau K M, Hon P M, *et al.* Chemistry and biological activities of caffeic acid derivatives from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12(2): 237-246.
- [19] 朱金墙, 闫晨, 康立源. 丹酚酸 B 的稳定性及其降解机理研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(12): 113-115.
- [20] 龚斌, 李琴, 胡小红, 等. 枳壳化学成分及药理作用研究进展 [J]. 南方林业科学, 2019, 47(3): 40-45.
- [21] 徐云, 徐建, 白冰, 等. 枳壳主要化学成分研究进展 [J]. 食品与药品, 2018, 20(3): 244-247.

[责任编辑 郑礼胜]