

UPLC 指纹图谱多模式识别结合多指标成分测定的清热消炎宁胶囊质量控制研究

韦卓纯, 林 绘, 彭 颖, 张丹青, 李 健

东莞市滨海湾中心医院, 广东 东莞 523905

摘要: **目的** 建立清热消炎宁胶囊 (Qingre Xiaoyanning Capsules, QXC) UPLC 指纹图谱及多指标成分定量分析方法, 结合化学模式识别技术对多批次制剂进行质量评价。**方法** 通过优化样品前处理及色谱检测方法, 建立合适 UPLC 指纹图谱和含量测定条件。色谱柱为 UPLC HSS T3 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相梯度洗脱; 检测波长 280 nm; 柱温 40 °C; 体积流量 0.5 mL/min。采用层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 和聚类热图分析对 20 批清热消炎宁胶囊进行质量评价。**结果** 清热消炎宁胶囊 UPLC 指纹图谱及含量测定方法学考察结果均符合测定要求, 获得 21 个共有峰, 运用对照品比对方式指认了 7 个色谱峰; 20 批样品的相似度均大于 0.954, 样品间一致性及稳定性良好; 由 HCA 可知, 20 批样品可大致聚成 2 类; PCA 从 21 个共有峰中提取了 4 个主成分, 通过 OPLS-DA 筛选了迷迭香酸、绿原酸、隐绿原酸、丹参素钠、新绿原酸等 8 个影响样品质量差异性较大的化合物; 7 个定量成分线性关系均良好 ($r \geq 0.9998$), 平均加样回收率 98.41%~101.18%, RSD 均不大于 1.81%; 聚类热图分析结果表明, 20 批样品可聚为 2 类。**结论** 建立的同一色谱条件下的清热消炎宁胶囊 UPLC 指纹图谱结合多指标成分定量方法专属性强、简便、准确, 可为其整体质量控制和品质评价提供参考依据。

关键词: 清热消炎宁胶囊; UPLC 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘-判别分析; 定量分析; 聚类热图分析; 质量控制; 迷迭香酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 丹参素钠; 新绿原酸

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)15-4856-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.15.011

Quality control of Qingre Xiaoyanning Capsules based on multi-pattern recognition method of UPLC fingerprint and multi-index composition determination

WEI Zhuo-chun, LIN Hui, PENG Ying, ZHANG Hui-qing, LI Jian

Binhaiwan Central Hospital of Dongguan, Dongguan 523905, China

Abstract: Objective To establish the UPLC fingerprint and multi-component quantitative analysis of Qingre Xiaoyanning Capsules (清热消炎宁胶囊, QXC), at the same time, chemical pattern recognition technology was used to evaluate the quality of multiple batches of QXC. **Methods** The sample pretreatment conditions and chromatographic analysis conditions of QXC were optimized, and the optimal UPLC fingerprint and multi-component quantitative analysis method were established. Column: UPLC HSS T3 column (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); mobile phase acetonitrile-water (containing 0.1% formic acid) with gradient elution; detection wavelengths 280 nm; column temperature 40 °C; flow rate 0.5 mL/min. Cluster analysis (CA), principal components analysis (PCA), orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) and cluster heatmap analysis were applied for evaluating the quality of 20 batches of QXC. **Results** Methodological investigation of UPLC fingerprint and content determination were well verified and meeting the analysis requirements. A total of 21 common peaks were obtained by full peak matching, and seven of them were identified by comparing with the retention time of mixed reference substance. The similarity of 20 batches of samples was greater than 0.954, which showed good consistency and stability between the samples. Twenty samples could be classified into two clusters; Four principal

收稿日期: 2023-02-20

基金项目: 东莞市社会发展科技项目 (20211800900442)

作者简介: 韦卓纯, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为中药质量控制研究。Tel: (0769)85010062 E-mail:wzc2018666@163.com

components from 21 common peaks were extracted by PCA. Eight quality differential compounds were presented in the fingerprint by OPLS-DA, including rosmarinic acid, chlorogenic acid, 4-dicaffeoylquinic acid, salvianic acid A sodium, neochlorogenic acid and so on. The resolution and linear relationship of seven components in quantitative analysis were good. The average recovery rates were 98.41%—101.18% with $RSD \leq 1.81\%$. Results of cluster heatmap analysis showed that 20 batches of QXC also could be divided into two categories. **Conclusion** In this study, the qualitative analysis of UPLC fingerprint and quantitative analysis of multiple index components based on the same chromatographic analysis conditions is specific, simple and accurate, which can provide a reference for the quality control and quality evaluation of QXC.

Key words: Qingre Xiaoyanning Capsules; ultra-performance liquid chromatography fingerprint; cluster analysis; principal components analysis; orthogonal partial least squares discriminant analysis; quantitative analysis; cluster heatmap analysis; quality control; rosmarinic acid; chlorogenic acid; 4-dicaffeoylquinic acid; salvianic acid A sodium; neochlorogenic acid

清热消炎宁胶囊(Qingre Xiaoyanning Capsules, QXC)为肿节风经水提取加工而成的清热解毒类中成药制剂^[1],临床疗效确切,安全性良好,主要含有咖啡酰类衍生物、香豆素、有机酸、黄酮、倍半萜、多糖等多种化学成分^[2-3]。目前,QXC没有统一的国家质量标准,部颁标准质量控制仅有【鉴别】和【检查】两项^[1],其他质量控制近几年未见大的突破,主要针对指标成分异嗪皮啶及活性成分迷迭香酸进行含量测定^[4-5],检测方法均采用常规的HPLC法,暂时未见QXC的指纹图谱研究报告,故QXC现行质量标准较为低下,测定一种或两种指标成分不能有效保证其质量,有必要探索整体质量控制模式研究。中药指纹图谱具有整体性强、专属性高、分析手段丰富等特点,能表征被测样品主要化学成分的整体特征,确保其内在质量的均一和稳定等^[6-7],现已广泛应用于中药及中成药制剂的整体质量评价研究^[8-12]。本实验在前期对QXC化学成分检识分析的基础上^[3],首次采用UPLC法建立20批次制剂指纹图谱,标定了21个共有峰,指认了其中7个色谱峰,进而借助化学计量学方法对多批次制剂进行质量评价,根据正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)差异性成分筛选及前期入血成分研究结果^[13],定量分析了涵盖有机酸、咖啡酰类衍生物、香豆素的7个化学成分,以期QXC的整体质量控制及质量标准的进一步提升提供有效的参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters Acquity UPLC H-Class型超高效液相色谱仪,配有四元超高压溶剂系统、自动进样恒温样本管理器、柱温箱、PDA测器和Empower 3色谱工作站,美国Waters公司;SQP型万分之一电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;XPE26

型百万分电子天平,梅特勒托利多科技(中国)有限公司;DC400型超声仪,东莞市大朗速洁超声设备制造厂;2-16N型高速离心机,湖南恒诺仪器设备有限公司;明澈TM-D 24UV型超纯水系统,默克密理博实验室设备(上海)有限公司。

1.2 试剂与药物

甲醇,分析纯,广东光华科技股份有限公司;乙腈(HPLC色谱级)、甲醇(HPLC色谱级)、甲酸(HPLC色谱级)为Fisher公司;水为实验室超纯水系统制备所得。对照品原儿茶酸(批号PS012604,质量分数98.2%)、丹参素钠(批号PS010590,质量分数98.0%)、新绿原酸(批号PS000974,质量分数98.0%)、隐绿原酸(批号PS001110,质量分数98.0%)、异嗪皮啶(批号PS012652,质量分数99.7%),上述5个对照品购自成都普思生物科技股份有限公司;对照品绿原酸(批号5077,质量分数98.1%)、迷迭香酸(批号5828,质量分数98.3%),上述2个对照品购自上海诗丹德标准技术服务有限公司。前期收集QXC制剂共20批,其中样品S1~S13生产厂家为广州白云山敬修堂药业股份有限公司,样品S14~S20生产厂家为广东五虎山药业有限公司,具体信息见表1。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备 将QXC内容物混匀、研细,取0.25 g,精密称定,置100 mL具塞锥形瓶中,精密加入25 mL 60%甲醇,密塞,称定质量,超声45 min(功率400 W、频率40 kHz),放冷,再次称定质量,减失的质量用60%甲醇补足,摇匀,静置,取上清液,12 000 r/min离心10 min,经0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取“1.2”项下7种对照品适量,分别置于10 mL棕色量瓶中,

表1 20批QXC样品

Table 1 Twenty batches of QXC samples

编号	批号	生产日期	失效日期	编号	批号	生产日期	失效日期	编号	批号	生产日期	失效日期
S1	B10035	2020-02-13	2023-07	S8	B12076	2021-03-30	2024-08	S15	2103303	2021-03-17	2023-03-16
S2	B10036	2020-02-13	2023-07	S9	K04022	2021-11-01	2025-04	S16	2109301	2021-09-02	2023-09-01
S3	B12067	2021-01-29	2024-06	S10	B11048	2020-11-06	2024-04	S17	2203301	2022-03-28	2024-03-27
S4	B06027	2020-01-10	2023-06	S11	B10037	2020-02-14	2023-07	S18	2205302	2022-05-04	2024-05-03
S5	B10038	2020-02-14	2023-07	S12	B12058	2021-01-02	2024-06	S19	2207301	2022-07-19	2024-07-18
S6	B11049	2020-11-09	2024-04	S13	K02013	2021-09-01	2025-02	S20	2212301	2022-12-12	2024-11-30
S7	B12065	2021-01-28	2024-06	S14	2103302	2021-03-17	2023-03-16				

用纯甲醇溶解, 摇匀, 定容配制成母液; 分别精密吸取上述各母液适量制成含原儿茶酸 19.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、丹参素钠 29.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、新绿原酸 8.30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、隐绿原酸 7.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、异嗪皮啶 16.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、绿原酸 15.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、迷迭香酸 39.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Waters Acquity UPLC HSS T3 柱 (50 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~1.0 min, 2%乙腈; 1.0~4.0 min, 2%~6%乙腈; 2.0~9.0 min, 6%~16%乙腈; 9.0~13.0 min, 16%~20%乙腈; 13.0~15.0 min, 20%~25%乙腈; 15.0~16.0 min, 25%乙腈; 16.0~16.1 min, 25%~2%乙腈; 检测波长为 280 nm; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 1 μL 。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 按“2.1.1”项下方法制备 QXC 供试品溶液 (S4), 按“2.2”项下色谱条件连续 6 次进样测定, 以异嗪皮啶为参照峰, 得到 21 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.10%~0.21%和 0.22%~1.78%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取同一批 QXC 样品 (S4), 按“2.1.1”项下方法, 分别平行制备 6 份 QXC 供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 以异嗪皮啶为参照峰, 得到 21 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.12%~0.37%和 0.99%~2.02%, 结果表明样品处理方法具有良好的重复性。

2.3.3 稳定性试验 取 QXC 的供试品溶液 (S4), 按“2.2”项下色谱条件, 在 0、2、6、12、24、36、48 h 分别进样测定, 以异嗪皮啶为参照峰, 得到 21

个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.12%~0.97%和 1.26%~2.47%, 表明供试品溶液在室温下 48 h 内稳定。

2.4 UPLC 指纹图谱的建立

按“2.1.1”项下方法制备 20 批 QXC 供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 将 20 批 QXC UPLC 图谱色谱峰积分转为 AIA 格式, 利用《中药色谱指纹图谱相似度软件评价系统 (2012 版)》对数据进行处理, 以样品 S1 为参照图谱, 时间窗宽度设置为 0.1 min, 采用中位数法, 通过多点校正进行峰匹配, 建立了 20 批 QXC UPLC 指纹图谱, 在此基础上生成对照指纹图谱 (图 1), 并进行相似度评价, 结果 20 批 QXC 样品 (S1~S20) 的相似度分别为 0.991、0.983、0.993、0.993、0.986、0.992、0.999、0.997、0.995、0.994、0.979、0.996、0.954、0.998、0.976、0.993、0.972、0.999、0.971、0.998, 20 批 QXC 与其对照图谱的相似度在 0.954~0.999, 表明 2 个厂家不同批次样品一致性及稳定性良好。经过全峰匹配后确定了 21 个共有峰, 与混合对照品溶液比对, 指认了 7 个共有峰 (图 2), 根据保留时间先后顺序依次为峰 4 (原儿茶酸)、5 (丹参素钠)、9 (新绿原酸)、10 (绿原酸)、11 (隐绿原酸)、14 (异嗪皮啶)、20 (迷迭香酸), 其中, 异嗪皮啶是 QXC 原料药肿节风的特征指标成分^[4], 故选择其作为参照峰。

2.5 化学模式识别分析

2.5.1 层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA) 以 14 号峰 (异嗪皮啶) 为参照峰, 将 20 批 QXC 样品的 21 个共有峰的相对峰面积 (表 2) 导入 SIMCA 14.1 软件进行 HCA, 由结果知, 20 批 QXC 整体分为 2 类, 其中来自广东五虎山药业有限公司的 7 批样品 (S14~S20) 聚为第 1 类, 其余来

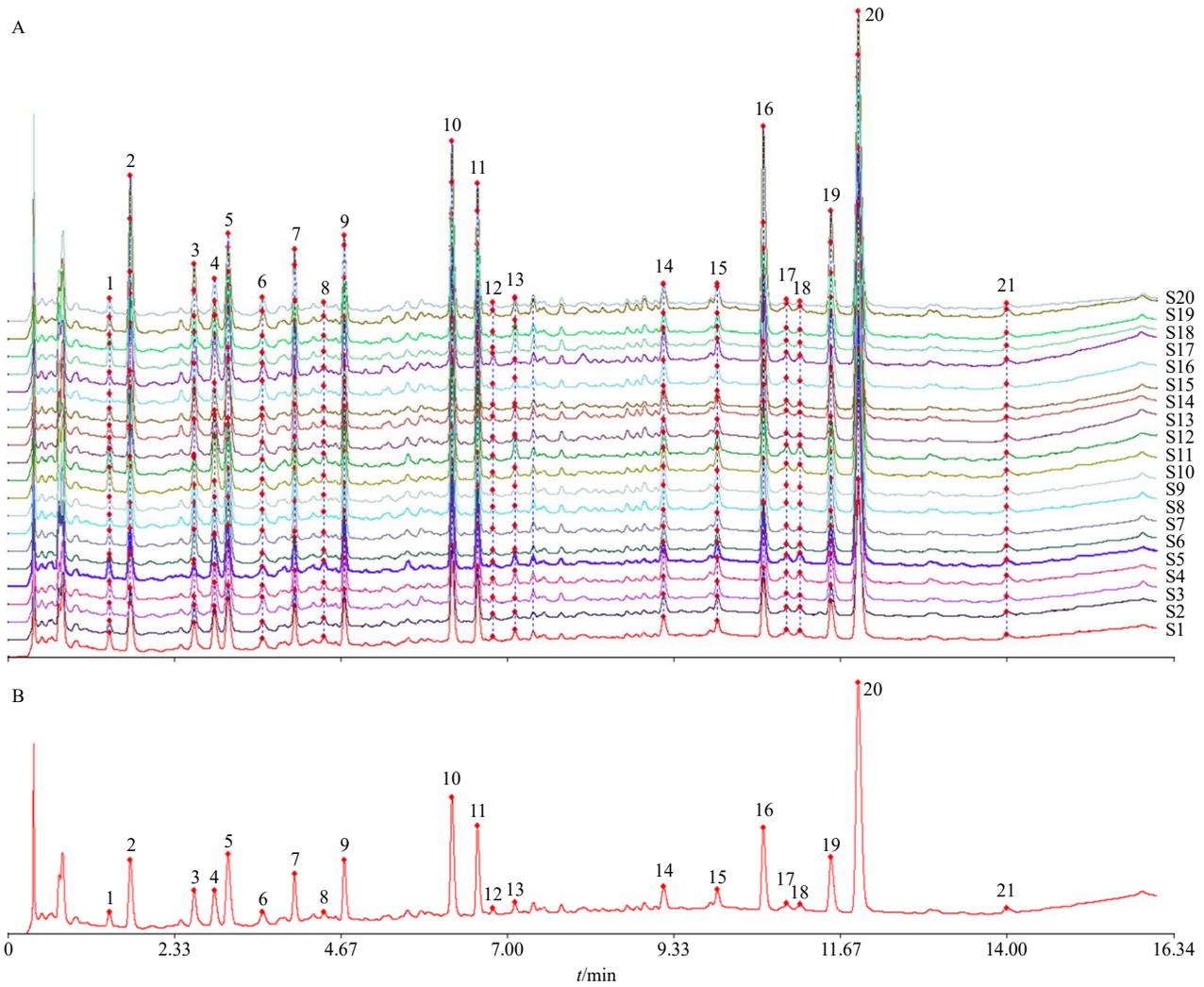
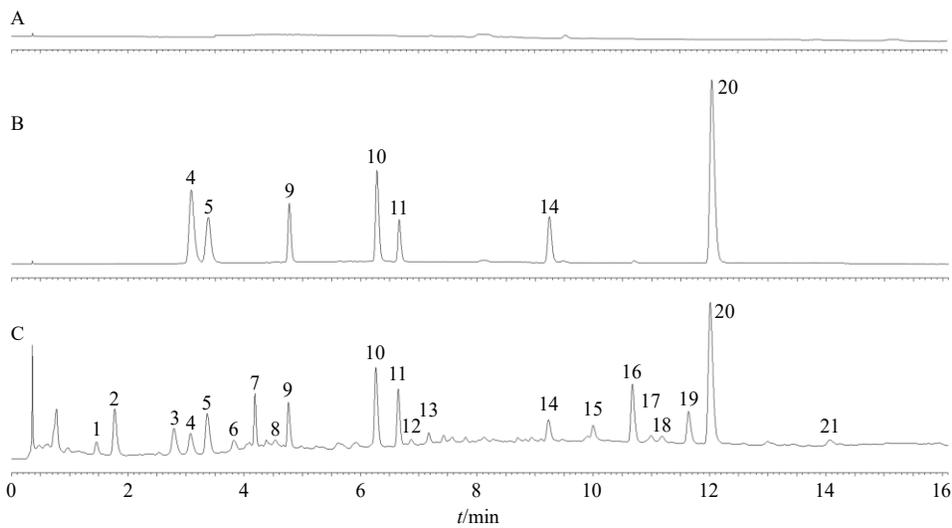


图1 20批QXC样品(S1~S20)的UPLC指纹图谱(A)和对照指纹图谱(B)

Fig. 1 UPLC fingerprint (A) of 20 batches of QXC samples (S1—S20) and reference fingerprint (B)



4-原儿茶酸 5-丹参素钠 9-新绿原酸 10-绿原酸 11-隐绿原酸 14-异嗪皮啉 20-迷迭香酸

4-protocatechuic acid 5-sodium danshensu 9-neochlorogenic acid 10-chlorogenic acid 11-4-dicaffeoylquinic acid 14-isofraxidin 20-rosmarinic acid

图2 空白溶液(A)、混合对照品溶液(B)和QXC样品(C)的UPLC图

Fig. 2 UPLC of blank solution (A), mixed reference substances solution (B) and QXC samples (C)

表 2 20 批 QXC 21 个共有峰的相对峰面积值
Table 2 Relative peak areas of 21 common peaks of QXC

峰号	相对峰面积																			
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20
1	0.776	0.538	0.382	0.502	0.862	0.375	0.622	0.439	0.440	0.820	0.928	0.556	1.019	0.927	0.478	0.244	0.410	0.627	0.494	0.769
2	3.002	2.211	0.552	1.660	2.389	0.409	1.920	2.157	2.950	1.394	1.758	2.362	7.257	3.639	6.215	4.693	1.900	2.734	5.659	1.972
3	1.377	1.459	0.872	1.305	0.687	1.529	2.014	1.582	2.132	1.473	2.041	2.024	1.675	0.597	2.069	1.602	1.604	1.667	2.566	1.174
4	1.941	1.394	1.564	1.153	2.304	1.140	1.591	1.028	1.013	2.264	2.299	1.425	2.547	2.511	1.082	0.708	1.463	1.671	1.100	1.964
5	2.725	2.591	3.372	1.984	2.734	2.958	3.848	3.520	3.399	2.812	5.816	3.165	4.230	2.338	4.128	4.030	2.757	4.155	3.484	4.492
6	0.820	0.764	0.964	0.589	0.820	0.648	0.901	0.797	0.778	0.680	1.082	0.820	0.854	0.773	1.063	1.040	0.753	0.899	0.928	1.043
7	1.441	1.381	1.257	1.310	1.103	0.864	1.363	1.439	1.544	1.083	1.983	1.381	2.191	0.998	2.299	2.087	1.339	1.607	2.125	1.686
8	0.334	0.269	0.215	0.237	0.432	0.220	0.194	0.216	0.185	0.456	0.152	0.465	0.553	0.504	0.254	0.503	0.324	0.258	0.389	0.215
9	1.960	1.662	1.996	1.574	2.145	1.738	2.282	2.333	2.523	2.144	3.246	2.072	3.069	2.228	2.844	2.516	1.654	2.814	2.949	2.722
10	3.821	3.352	3.809	3.045	3.749	3.384	4.398	4.668	4.922	4.186	6.489	3.872	6.037	3.755	5.791	4.973	3.405	5.417	5.871	5.277
11	2.666	2.190	2.732	2.024	2.986	2.331	3.139	3.152	3.450	2.927	4.527	2.784	4.290	3.114	4.037	3.594	2.084	3.866	4.228	3.605
12	0.213	0.261	0.195	0.207	0.235	0.208	0.194	0.213	0.194	0.221	0.258	0.222	0.122	0.193	0.187	0.188	0.316	0.207	0.183	0.147
13	0.495	0.356	0.292	0.379	0.755	0.207	0.345	0.263	0.331	0.369	0.457	0.298	1.107	0.959	0.451	0.360	0.166	0.666	0.526	0.495
14(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
15	0.559	0.576	0.527	0.504	0.698	0.587	0.605	0.598	0.575	0.712	0.606	0.547	0.651	0.720	0.475	0.468	0.499	0.699	0.682	0.602
16	2.682	2.198	2.789	2.406	2.206	1.961	3.271	3.483	4.008	2.433	4.267	3.001	4.769	2.234	4.915	4.537	2.520	4.096	6.796	3.877
17	0.459	0.348	0.314	0.333	0.508	0.307	0.356	0.361	0.374	0.422	0.390	0.398	0.447	0.581	0.315	0.365	0.365	0.398	0.380	0.340
18	0.325	0.328	0.163	0.278	0.511	0.251	0.215	0.312	0.258	0.356	0.251	0.234	0.260	0.520	0.184	0.177	0.241	0.290	0.273	0.246
19	1.964	1.562	2.293	1.530	2.042	1.870	2.896	2.577	2.738	2.298	4.414	2.283	2.993	1.913	3.429	3.304	1.839	3.526	4.446	3.468
20	10.326	7.422	13.173	7.686	15.372	10.837	14.667	11.832	12.648	13.787	19.126	12.042	15.861	16.152	11.789	12.164	8.692	16.626	14.908	15.813
21	0.380	0.321	0.379	0.376	0.503	0.425	0.426	0.384	0.414	0.393	0.493	0.347	0.373	0.447	0.269	0.255	0.263	0.442	0.484	0.418

自广州白云山敬修堂药业股份有限公司的 13 批样品 (S1~S13) 聚为第 2 类, 详见图 3, QXC 质量受到原料、提取工艺、炮制加工、生产等多方面环节的影响, 根据聚类分析结果, 考虑除了原料影响外, 不同厂家的提取工艺、生产等也是影响制剂质量的重要原因, 而对于总体聚成 2 大类的其他具体原因仍需进一步研究。

2.5.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 以 14 号峰 (异嗪皮啶) 为参照峰, 将 20 批 QXC 的 21 个共有峰的相对峰面积 (表 2) 导入 SIMCA 14.1 软件进行 PCA, PCA 特征值及方差贡献率见表 3, 结果知前 4 个主成分的特征值均大于 1, 累积贡献率达 87.5%, 可反映 QXC 指纹图谱共有峰的基本信息。由 PCA 得分图 (图 4) 知 PCA 结果与 HCA 结果基本一致, 20 批样品大致分为 2 大类, 第 1 类样品主要来自五虎山药业有限公司, 第 2 类样品主要来自广州白云山敬修堂药业股份有限公司。

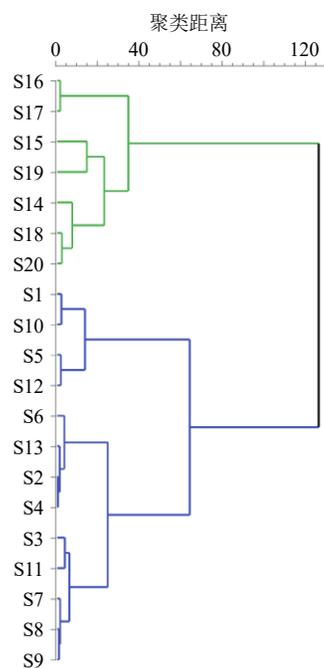


图 3 20 批 QXC 的 HCA 结果
Fig. 3 HCA result of 20 batches of of QXC

表 3 QXC 样品主成分方差贡献率和特征值

Table 3 PCA Rx^2 and eigenvalue of QXC

成分	方差贡献率/%	累积贡献率/%	特征值
1	42.50	42.50	8.50
2	28.70	71.20	5.73
3	10.90	82.10	2.18
4	5.47	87.50	1.09

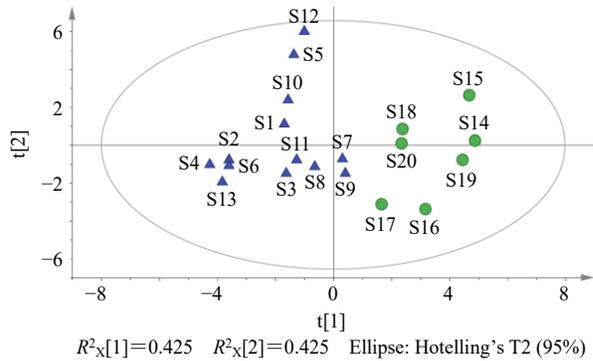


图 4 20 批 QXC 的 PCA 得分图

Fig. 4 PCA score plot of 20 batches of of QXC

2.5.3 正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 结合 HCA 和 PCA, 20 批样品大致可分为 2 组, 为进一步寻找组间的差异性原因, 采用 OPLS-DA 建立分析模型。结果表明模型稳定性 (R^2) 达到 0.853, 模型解释率 (Rx^2) 达到 0.94, 预测力 (Q^2) 达到 0.872, 表明建立的 OPLS-DA 模型稳定且预测能力较强。对 OPLS-DA 模型进行置换检验 (200 次), 得置换检验图 (图 5)。在图 5 中, R^2 在 Y 轴的截距为 0.421, Q^2 在 Y 轴的截距为 -0.871, 斜率均大于 0, 表明建立的 OPLS-DA 模型无过度拟合的现象, 能够用于 20 批样品组间差异的判别分析。OPLS-DA 模型生成的变量重要性投影 (VIP) 值见图 6, VIP 值是筛选差异性化合物的重要指标, 通常以 VIP 值大于 1 作为筛选标准, VIP 值越高, 对组间差异的影响越大。本实验以 $VIP > 1$ 为标准, 结果共找到了 8 个成分, 根据 VIP 值大小排序依次为 20 号峰 (迷迭香酸) > 16 号峰 > 2 号峰 > 10 号峰 (绿原酸) > 19 号峰 > 11 号峰 (隐绿原酸) > 5 号峰 (丹参素钠) > 9 号峰 (新绿原酸), 提示这 8 个成分是引起不同批次 QXC 差异的主要标志性成分。

2.6 多指标成分的含量测定

2.6.1 色谱条件 色谱条件同“2.2”项。

2.6.2 供试品溶液的制备 供试品溶液的制备方法同“2.1.1”项。

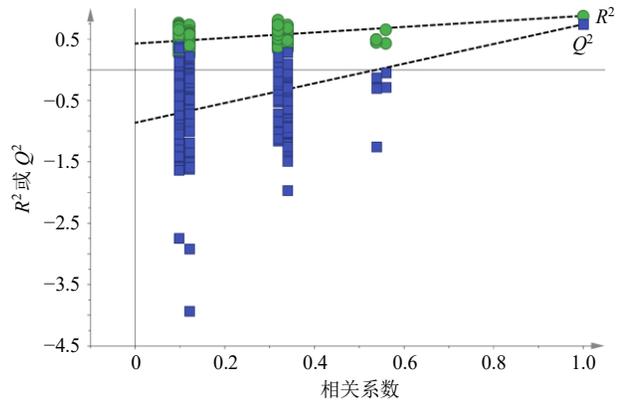


图 5 OPLS-DA 置换检验图

Fig. 5 OPLS-DA replacement test diagram

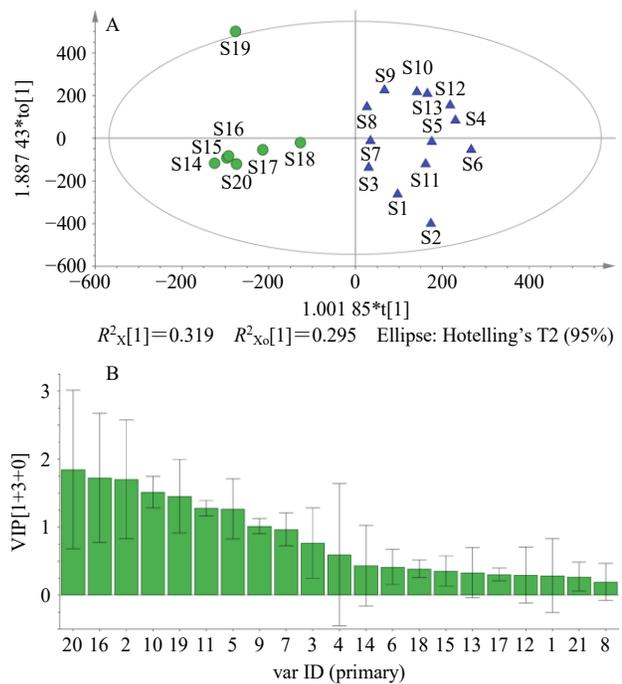


图 6 20 批 QXC 的 OPLS-DA 得分图 (A) 和 VIP 图 (B)

Fig. 6 OPLS-DA score plot (A) and VIP value (B) of 20 batches of of QXC

2.6.3 混合对照品溶液的制备 分别精密称取“1.2”项下 7 种对照品适量, 分别置于棕色量瓶中, 用纯甲醇溶解, 摇匀, 定容配制成母液; 分别精密吸取上述各母液适量制成含原儿茶酸 51.905 $\mu\text{g/mL}$ 、丹参素钠 216.646 $\mu\text{g/mL}$ 、新绿原酸 51.645 $\mu\text{g/mL}$ 、隐绿原酸 101.478 $\mu\text{g/mL}$ 、异嗪皮啶 85.064 $\mu\text{g/mL}$ 、绿原酸 132.984 $\mu\text{g/mL}$ 、迷迭香酸 299.186 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液 1。

2.6.4 专属性考察 分别精密吸取 60% 甲醇、混合对照品溶液及供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样, 记录色谱图 (图 2), 结果表明, 供试品中 7 个定量成分均与相邻峰的分度良好 (均大于 2.0);

空白溶剂对测定无干扰,说明方法的专属性良好。

2.6.5 线性关系及检测限、定量限考察 依次精密吸取“2.6.2”项下的混合对照品溶液1适量,分别置于2、5、10、50、100、200 mL量瓶中,加纯甲醇定容至刻度、摇匀,得7个不同质量浓度系列混合对照品溶液,分别按“2.2”项下色谱条件进样分析,并记录上述7个成分的峰面积,以峰面积为纵坐标(Y)、质量浓度为横坐标(X)进行线性回归分析,得到QXC中7个定量成分的回归方程、相关系数和线性范围分别为原儿茶酸 $Y=2\ 912.595 X+211.274$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 $0.519\sim 51.905\ \mu\text{g/mL}$; 丹参素钠 $Y=1\ 310.550 X+391.515$, $r=0.999\ 8$, 线性范围 $2.166\sim 216.646\ \mu\text{g/mL}$; 新绿原酸 $Y=2\ 946.539 X+408.317$, $r=0.999\ 8$, 线性范围 $0.516\sim 51.645\ \mu\text{g/mL}$; 绿原酸 $Y=3\ 195.288 X+623.986$, $r=0.999\ 8$, 线性范围 $1.330\sim 132.984\ \mu\text{g/mL}$; 隐绿原酸 $Y=2\ 893.893 X+673.930$, $r=0.999\ 8$, 线性范围 $1.015\sim 101.478\ \mu\text{g/mL}$; 异嗪皮啶 $Y=1\ 803.268 X+451.271$, $r=0.999\ 8$, 线性范围 $0.851\sim 85.064\ \mu\text{g/mL}$; 迷迭香酸 $Y=3\ 556.987 X+1\ 741.879$, $r=0.999\ 8$, 线性范围 $2.992\sim 299.186\ \mu\text{g/mL}$; 结果表明7个定量成分在线性范围内线性关系良好。以最低质量浓度的对照品溶液逐级稀释,以信噪比为3的质量浓度作为检测限,结果检测限分别为0.165、0.472、0.189、0.149、0.197、0.282、0.186 $\mu\text{g/mL}$; 以信噪比为10的质量浓度作为定量限,结果定量限分别为0.369、0.868、0.266、0.231、0.229、0.463、0.620 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.6.6 精密度试验 按“2.1.1”项下方法制备QXC供试品溶液(S4),按“2.2”项下色谱条件连续6次进样测定,分别记录所含原儿茶酸、丹参素钠、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异嗪皮啶、迷迭香酸的峰面积并计算其RSD,结果测得上述7个定量成分峰面积的RSD分别为1.42%、0.16%、0.39%、0.15%、0.18%、0.55%、0.22%,表明该方法仪器精密度良好。

2.6.7 重复性试验 取同一批QXC样品(S4),按“2.1.1”项下方法分别平行制备6份QXC供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样测定,分别计算QXC所含原儿茶酸、丹参素钠、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异嗪皮啶、迷迭香酸的质量分数并计算其RSD,结果测得上述7个定量成分质量分数的RSD分别为0.65%、0.32%、1.04%、1.38%、0.75%、1.94%、0.71%,表明该方法重复性良好。

2.6.8 稳定性试验 取QXC供试品溶液(S4),按“2.2”项下色谱条件,在0、2、6、12、24、36、48 h分别进样测定,记录所含原儿茶酸、丹参素钠、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异嗪皮啶、迷迭香酸的峰面积并计算其RSD,结果测得上述7个定量成分峰面积的RSD分别为1.01%、1.63%、1.02%、0.65%、0.53%、1.50%、0.81%,表明供试品溶液在48 h内稳定性良好。

2.6.9 加样回收率试验 取同一批QXC样品(S4)共6份,每份0.125 g,精密称定,分别按已知指标成分含量的100%加入原儿茶酸、丹参素钠、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异嗪皮啶、迷迭香酸混合对照品溶液,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件测定,上述7个成分的平均加样回收率分别为98.92%、99.93%、98.41%、100.45%、99.70%、98.39%、101.18%,RSD分别为1.10%、1.81%、1.25%、1.22%、1.60%、1.12%、0.92%,均不超过1.81%,表明该方法准确度良好。

2.6.10 样品测定 按“2.1.1”项下方法制备20批QXC供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样测定,计算7个成分的质量分数,结果见表4。结果20批QXC中原儿茶酸、丹参素钠、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异嗪皮啶、迷迭香酸的质量分数分别为0.284~0.948、1.868~3.758、0.493~1.178、1.002~2.278、0.672~1.744、0.456~0.821、1.943~5.282 mg/g,初步提示不同批次样品中各成分质量分数存在一定的差异,7个成分质量分数上下波动范围均不超过3.3倍,其中异嗪皮啶质量分数波动范围最小。

对比2个不同生产厂家数据,7个定量成分质量分数(mg/g)均值分别如下:原儿茶酸(白云山 vs 五虎山): (0.601 vs 0.572), 丹参素钠(白云山 vs 五虎山): (2.654 vs 3.095), 新绿原酸(白云山 vs 五虎山): (0.776 vs 0.893), 绿原酸(白云山 vs 五虎山): (1.445 vs 1.696), 隐原酸(白云山 vs 五虎山): (1.073 vs 1.250), 异嗪皮啶(白云山 vs 五虎山): (0.595 vs 0.599), 迷迭香酸(白云山 vs 五虎山): (3.865 vs 4.197), 采用SPSS 26.0软件对2个厂家QXC 7个定量成分含量均值进行 t 检验,结果 P 值为0.797 (>0.05),表明2个厂家QXC多指标成分含量均值无显著性差异。为更好的展示各批次同一成分含量差异,将20批QXC中7个定量成分的含量测定结果数据导入Hiplot科研绘图平台(<https://hiplot.com.cn/>),选择“Word.D2”法,设置距离度量为“euclidean”,

表 4 20 批 QXC 中 7 个定量成分的含量测定结果

Table 4 Results of content determination of seven quantitative components of 20 batches of QXC

批次	质量分数/(mg·g ⁻¹)							批次	质量分数/(mg·g ⁻¹)						
	原儿茶酸	丹参素	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	异嗟皮啶	迷迭香酸		原儿茶酸	丹参素	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	异嗟皮啶	迷迭香酸
S1	0.636	1.984	0.589	1.114	0.825	0.520	2.736	S11	0.948	1.962	0.822	1.267	1.090	0.588	5.002
S2	0.458	1.868	0.493	1.002	0.672	0.519	1.943	S12	0.658	3.758	0.892	1.695	1.230	0.456	4.545
S3	0.562	2.747	0.695	1.248	0.955	0.591	3.982	S13	0.406	3.362	1.007	2.001	1.451	0.587	3.681
S4	0.571	2.074	0.713	1.386	0.980	0.787	3.123	S14	0.487	2.378	0.656	1.197	0.894	0.536	3.336
S5	0.796	2.050	0.684	1.161	0.975	0.543	4.301	S15	0.284	3.635	0.947	1.809	1.350	0.635	3.977
S6	0.455	2.626	0.659	1.206	0.883	0.628	3.504	S16	0.752	3.185	0.778	1.600	1.040	0.821	3.709
S7	0.546	2.908	0.744	1.398	1.027	0.549	4.227	S17	0.824	3.002	0.959	1.773	1.323	0.503	4.218
S8	0.448	3.417	0.953	1.862	1.320	0.691	4.253	S18	0.548	3.030	0.874	1.602	1.186	0.504	4.491
S9	0.426	3.214	1.002	1.909	1.402	0.660	4.412	S19	0.458	3.134	1.178	2.278	1.744	0.663	5.282
S10	0.901	2.535	0.837	1.531	1.136	0.612	4.539	S20	0.650	3.305	0.859	1.617	1.215	0.530	4.366

并选择“按行标准化”处理，绘制聚类热图，结果见图 7（图中颜色由蓝到红代表含量由低到高），结果表明 20 批样品大致可聚成 2 大类，其中 S17、S12、S18、S20、S19、S8、S9、S13、S15 批聚为

第 1 类，其余 11 批样品聚为第 2 类，第 1 类样品主要来自广东五虎山药业有限公司，第 2 类样品除 S14 和 S16 外，均来自广州白云山敬修堂药业股份有限公司，基本佐证了指纹图谱聚类分析的结果。

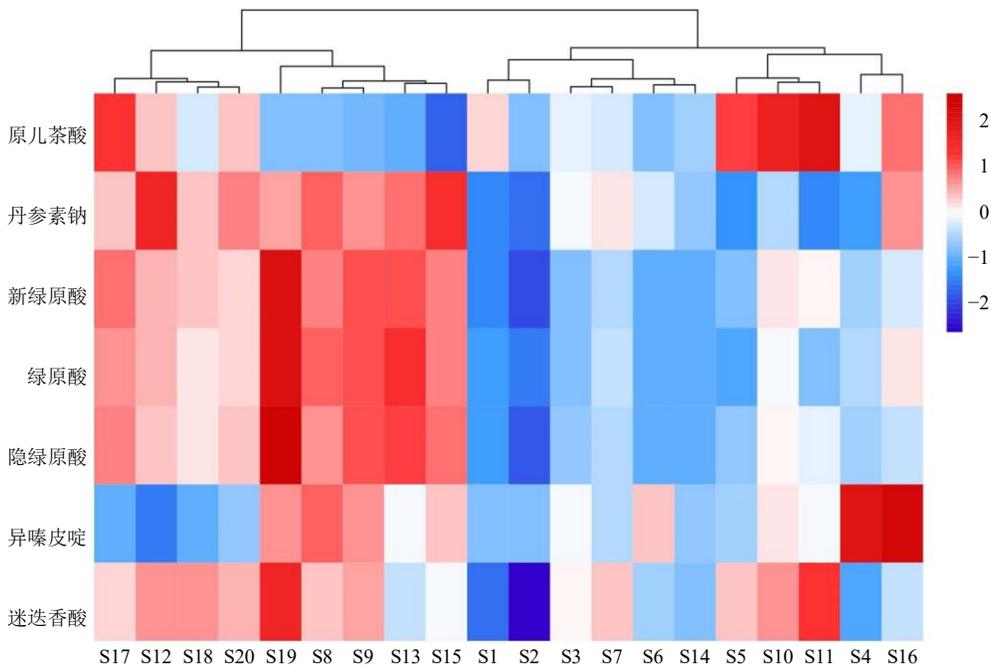


图 7 26 批 QXC 7 个定量成分含量的聚类热图分析

Fig. 7 Cluster heatmap analysis of seven components of 26 batches of QXC

另外，由聚类热图结果知来自第 1 类的样品丹参素钠、新绿原酸，绿原酸，隐绿原酸等 4 个成分的含量相对较高，来自第 2 类的样品丹参素钠、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸的含量相对较低，提示这 4 个成分对样品间分组有显著影响，而这 4 个成

分均来自指纹图谱 OPLS-DA 筛选的差异性成分，二者相互吻合。

3 讨论

3.1 样品前处理考察

本实验前期通过比较水、60%甲醇、甲醇、70%

乙醇和乙醇作为提取溶剂的 UPLC 图谱,发现以 60%甲醇作为提取溶剂色谱峰信息较为丰富且峰面积相对较大,故选用 60%甲醇作为提取溶剂。通过比较超声提取,加热回流提取和冷浸提取 3 种不同提取方式的 UPLC 图谱,发现冷浸提取效果较超声提取和加热回流提取差,而超声提取和加热回流提取差别不大,考虑实验操作的简便性和可行性,故选择超声提取法。通过比较不同提取时间下的 UPLC 图谱,发现各色谱峰峰面积都随着提取时间的增加而增加,但是 45、60 min 变化不大,为保证样品提取完全且操作简化性、节能等原则,故选择超声 45 min。

3.2 色谱条件优化

实验前期对不同的色谱柱 [HSS T₃ 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm)、BEH C₁₈ 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 和 Cortecs C₁₈ (100 mm×3.0 mm, 2.7 μm)] 进行了考察,结果 BEH C₁₈ 色谱柱前端 3 min 前分离较好,但 3 min 后色谱峰的分度没有 HSS T₃ 柱好, Cortecs C₁₈ 柱整体分离度没有 HSS T₃ 柱好,因此选择 HSS T₃ 柱。分别考察比较甲醇-水系统、甲醇-水 (含 0.1%甲酸) 系统、甲醇-水 (含 0.1%冰乙酸) 系统、乙腈-水系统、乙腈-水 (含 0.1%甲酸) 系统、乙腈-水 (各含 0.1%甲酸) 系统、乙腈-水 (含 0.1%冰乙酸) 系统,结果乙腈-水 (含 0.1%甲酸) 色谱峰信号丰富且分离度相对较好,故选择乙腈-水 (含 0.1%甲酸) 作为 QXC 指纹图谱的流动相梯度洗脱系统。通过 PDA 检测器在 190~400 nm 全波长扫描,结果 280 nm 色谱峰最多、基线噪音较低,各成分的分度情况相对较好,故选择 280 nm 作为检测波长。

3.3 参照峰的选择

异嗪皮啶为 QXC 原料药肿节风的特征指标成分,且出峰时间和峰面积适中,峰型较好,故选择其作为参照峰,结合 20 批样品的测定结果知异嗪皮啶质量分数波动范围最小,含量较为稳定,提示选择异嗪皮啶作为参照峰可减小因数据大幅度波动对实验结果的影响。

3.4 含量测定成分确定

本研究通过 OPLS-DA 分析找到了影响 QXC 质量的 8 个差异性较大的化合物,提示这些成分对样品分组有显著影响,并指认了其中 5 个,分别为迷迭香酸、丹参素钠、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸,初步将上述 5 个成分作为定量候选化合物。另外,

结合课题组前期对 QXC 大鼠体内药代动力学研究结果显示原儿茶酸、异嗪皮啶、迷迭香酸均为入血原型成分^[13],提示可能为 QXC 药效物质基础,其中原儿茶酸具有抗炎^[15]、抗菌^[16]等药理活性,异嗪皮啶为原料药肿节风的特征指标成分,迷迭香酸与其他 3 个差异性化合物新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸均属咖啡酰类衍生物,有文献报道该类化合物具有免疫调节、抗炎、抗肿瘤、抗病毒等药理作用^[17-20],故将原儿茶酸、异嗪皮啶同时纳入定量分析,建立同时涵盖药理活性及特征成分的多成分含量测定方法。

3.5 质量控制策略

QXC 现行质量标准及质量控制方法较为低下,目前尚未见开展指纹图谱的研究报道,不同以往文献报道研究仅选取单一指标异嗪皮啶或迷迭香酸进行质量控制,考虑中药制剂成分复杂,药理活性多样化,本实验采取“色谱指纹图谱+多指标成分定量”的模式,并紧密结合化学模式识别技术进行分析评价。

本实验在运用中药指纹图谱表征 QXC 整体概貌的基础上,选择与临床疗效相关性强、以特征指标成分、药理活性成分、质量差异性成分作为定量评价指标,这样不仅丰富了 QXC 质量鉴别的检测方法,还可准确地标示与限定其成分种类、含量与配比等,克服了中药指纹图谱模糊性特点,保留其整体性特点,提供了一种多变量整体、精确评价 QXC 质量控制模式。

结果表明,20 批 QXC 指纹图谱相似度较高,表明其质量在整体水平上具有较好的一致性,但不足以辨别差异性与质量优劣,进而借助 CA、PCA、OPLS-DA 等化学模式识别技术进行综合分析,20 批样品大致分为 2 类,并筛选了 8 个质量差异性成分,指认了其中 5 个成分,以上 3 种方法结果互为验证,相互补充。

在此基础上,对 OPLS-DA 分析筛选并指认的 5 个质量差异性成分及原儿茶酸、异嗪皮啶等 7 个成分进行定量分析并进行聚类热图分析,20 批样品大致聚为 2 类,结果可见基于指纹图谱和基于含量测定的 20 批次样品间分类基本一致,基于含量测定的聚类热图分析寻找组间差异性成分和指纹图谱 OPLS-DA 筛选的差异性成分基本吻合,提示本实验定量成分选择具有一定的合理性和可行性。

另外,因目前市面销售 QXC 多为广州白云山

敬修堂药业股份有限公司产品, 广东五虎山药业有限公司产品批次更新较慢, 本次收集的2个厂家样品数目可能存在差异, 尽管指纹图谱中HCA和PCA结果提示2个厂家的样品可能存在差异, 但相似度结果显示2个厂家样品相似度均较高; 定量分析方面, 本实验同时纳入各厂家各定量成分质量分数均值指标, 进一步减少组间样品数量对结果的影响, 结果表明2个厂家QXC多指标成分含量均值无显著性差异。综合定性定量分析结果表明, 2个厂家的多批次样品整体质量较为接近。

综上, 本实验采用统一的色谱条件实现了指纹图谱定性和多成分定量的同时分析, 建立的方法专属性强, 可快速、准确地评价不同厂家不同批次QXC的质量差异和重点成分, 从而为全面控制和整体评价该制剂质量提供科学依据及为其质量标准制定的规范化提供重要借鉴。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 《中华人民共和国卫生部药品标准》中药成方制剂(第九册)[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部药典委员会, 1994: 191.
- [2] Li X, Zhang Y F, Zeng X, *et al.* Chemical profiling of bioactive constituents in *Sarcandra glabra* and its preparations using ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with LTQ Orbitrap mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25(17): 2439-2447.
- [3] 韦卓纯, 林绘, 彭颖, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS技术的清热消炎宁胶囊化学成分分析 [J]. 今日药学, 2021, 31(10): 741-747.
- [4] 骆维康, 黄湘穗, 刘文坚. RP-HPLC法测定清热消炎宁胶囊中异秦皮啶的含量 [J]. 中药材, 2003, 26(6): 439-440.
- [5] 黎雄, 杨柳, 曾星, 等. HPLC测定清热消炎宁胶囊中异秦皮啶与迷迭香酸含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11): 53-55.
- [6] 姚令文, 刘燕, 郑笑为, 等. 指纹图谱、特征图谱技术在中药材和中成药中的应用 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(8): 934-939.
- [7] 李佳涵, 王慧, 刘佳星, 等. 整合指纹图谱与多成分含量测定的酸枣仁汤质量评价研究 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4698-4708.
- [8] 王东晗, 梁宇飞, 张欣欣, 等. 不同产地刺五加UPLC指纹图谱 [J]. 中成药, 2019, 41(6): 1343-1348.
- [9] Li H, Gong X Q, Wang Z C, *et al.* Multiple fingerprint profiles and chemometrics analysis of polysaccharides from *Sarcandra glabra* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 123: 957-967.
- [10] 吴学峰, 周熙, 黄晓兰, 等. 基于UPLC-Q-TOF MS的广佛手指纹图谱建立及炮制前后成分差异分析 [J]. 分析测试学报, 2022, 41(3): 299-308.
- [11] 张涛, 张青, 易海燕, 等. 基于指纹图谱结合化学计量法对何首乌不同炮制品多指标成分分析 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4653-4662.
- [12] 李硕, 俱蓉, 杨秀娟, 等. 红芪精准煮散饮片HPLC指纹图谱建立及3种指标成分测定 [J]. 中草药, 2022, 53(16): 5020-5025.
- [13] Lin P, Dai Y, Yao Z H, *et al.* Metabolic profiles and pharmacokinetics of Qingre Xiaoyanning Capsule, a traditional Chinese medicine prescription of *Sarcandrae Herba*, in rats by UHPLC coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2019, 42(4): 784-796.
- [14] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 223-224.
- [15] Min S W, Ryu S N, Kim D H. Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-O-beta-D-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid [J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(8): 959-966.
- [16] 林卫佳, 张亚平, 李峰, 等. 原儿茶酸抑制结核分枝杆菌Rv1654诱导肺泡巨噬细胞凋亡的机制研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(15): 1747-1751.
- [17] 林彤, 彭立生. 基于网络药理学和分子对接探讨肿节风的活性成分及药效机制 [J]. 中医药导报, 2020, 26(11): 106-111.
- [18] Liu J X, Zhang Y, Hu Q P, *et al.* Anti-inflammatory effects of rosmarinic acid-4-O-beta-D-glucoside in reducing acute lung injury in mice infected with influenza virus [J]. *Antiviral Res*, 2017, 144: 34-43.
- [19] 李婉婷, 韦立群, 李清, 等. 迷迭香酸类似物-11通过EGFR-JNK通路抑制人胃癌MGC-803细胞增殖和迁移 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(4): 504-509.
- [20] 潘力, 马秀丽, 黄中利, 等. 绿原酸体外抗新型鸭呼肠孤病毒作用的研究 [J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(4): 754-760.

[责任编辑 郑礼胜]