

基于 HPLC 指纹图谱和多成分含量测定结合化学计量学的暖宫七味丸质量评价研究

籍学伟, 陈备尧, 白 妍, 韩 峰*

内蒙古自治区药品检验研究院 内蒙古自治区中蒙药标准研究重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010020

摘要: **目的** 建立 HPLC 指纹图谱与多成分含量测定方法, 结合化学计量学分析, 评价暖宫七味丸 (Nuangong Qiwei Pills, NQP) 的质量。 **方法** 采用 RP-HPLC 法, 色谱柱为 Grace Alltima HP C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水, 梯度洗脱; 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 220 nm。对 4 家生产企业 14 批 NQP 进行指纹图谱及 4 种指标性化学成分含量测定, 利用化学模式识别法通过 SPSS 20.0 对含量测定数据进行聚类分析和通过 SIMCA 14.1 软件对 NQP 4 种定量成分进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 并将共有峰按峰面积进行差异性分析。 **结果** 建立了 NQP 指纹图谱, 共匹配出 21 个共有峰, 分别归属沉香、丁香、肉豆蔻、豆蔻 4 味药材, 指纹图谱相似度>0.98; 对照品指认沉香四醇 (6 号峰)、丁香酚 (8 号峰)、肉豆蔻木脂素 (14 号峰)、去氢二异丁香酚 (20 号峰) 4 种化学成分, 质量分数分别为 0.120~0.416、1.574~5.018、0.103~0.205、0.093~0.139 mg/g; 当平方欧式距离为 15 时, 14 批样品通过聚类分析分成 3 类, PCA 结果与聚类分析结果一致; 通过对共有峰峰面积为变量进行正交偏最小二乘-判别分析建模分析, R^2 为 0.696, Q^2 为 0.597, 均大于 0.5, 建立的模型稳定可靠, 对照品指认的 4 种化学成分均为重要差异性标志化合物。 **结论** 指纹图谱及含量测定方法准确可靠, 可用于 NQP 质量控制及综合评价。

关键词: 暖宫七味丸; 指纹图谱; HPLC; 沉香四醇; 丁香酚; 肉豆蔻木脂素; 去氢二异丁香酚; 主成分分析; 正交偏最小二乘-判别分析; 化学计量学; 沉香; 丁香; 肉豆蔻; 豆蔻

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)02-0470-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.02.012

Quality evaluation of Nuangong Qiwei Pills by HPLC fingerprint and multi-component content determination combined with chemometrics

Ji Xuewei, CHEN Beiyao, BAI Yan, HAN Feng

Inner Mongolia Institute for Drug Control, Inner Mongolia Key Laboratory for Standard Research of Chinese and Mongolian Medicine, Hohhot 010020, China

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprint and multi-component content determination method, combined with chemometrics, to evaluate the quality of Nuangong Qiwei Pills (NQP, 暖宫七味丸). **Methods** RP-HPLC was performed on a Grace Alltima HP C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with methanol-water gradient elution as mobile phase. The volume flow rate was 1.0 mL/L, and the detection wavelength was 220 nm. A total of 14 batches of sample from four pharmaceutical enterprise were studied by fingerprint analysis and determination of four index chemical components. Cluster analysis of chromatographic data was performed with SPSS 20.0 by chemical pattern recognition method and principal component analysis was performed with SIMCA 14.1 of NQP. **Results** The fingerprint of NQP was established, and 21 common peaks were calibrated, which belonged to four traditional Chinese medicinal materials: Chenxiang (*Aquilariae Lignum Resinatum*), Dingxiang (*Caryophylli Flos*), Roudoukou (*Myristicae Semen*), Doukou (*Amomi Fructus Rotundus*), fingerprint similarity were all above 0.98, four chemical components of agarotretol (peak 4), eugenol (peak 8), myrislignan (peak 14), dehydrodiisoeugenol (peak 20) were identified by reference substances. The contents were 0.120—0.416, 1.574—5.018, 0.103—0.205, 0.093—0.139 mg/g. When the squared euclidean distance is 15, 14 batches of samples are divided into

收稿日期: 2023-07-10

基金项目: 内蒙古自治区科技计划项目 (2020GG0199); 内蒙古自治区自然科学基金项目 (2024FX13); 内蒙古自治区市场监督管理局服务业高质量发展“蒙中药标准勘误项目” ([2021] 09197)

作者简介: 籍学伟 (1982—), 男, 副主任药师, 研究方向为中蒙药质量控制及标准研究。Tel: 18698448480 E-mail: jixuewei159@163.com

*通信作者: 韩 峰 (1970—), 女, 主任药师, 研究方向为中蒙药药理及质量标准研究。Tel: 13804717039 E-mail: hf9797@126.com

three class according to the pharmaceutical company, and the results of cluster analysis and principal component analysis were consistent. Through orthogonal partial least squares-discriminant analysis modeling analysis with common peak-peak area as variable, R^2 was 0.696 and Q^2 was 0.597, both of which were greater than 0.5, the established model was stable and reliable, and the four chemical components identified by the reference were all important difference marker compounds. **Conclusion** The fingerprint and content determination method were accurate and reliable, which can be used for quality control and comprehensive evaluation of NQP.

Key words: Nuangong Qiwei Pills; fingerprint; HPLC; agarotetrol; eugenol; myrislignan; dehydrodiisoeugenol; principal component analysis; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; chemometrics; *Aquilariae Lignum Resinatum*; *Caryophylli Flos*; *Myristicae Semen*; *Amomi Fructus Rotundus*

暖宫七味丸 (Nuangong Qiwei Pills, NQP) 又名苏格木勒-7 味丸, 是蒙古族治疗妇科疾病经典名方, 处方出自《观者之喜》^[1]。本品由白豆蔻 (豆蔻)、天冬、手掌参、沉香、肉豆蔻、黄精、丁香七味药材组成复方制剂^[2], 具有调经止血、温暖子宫、驱寒止痛的功效, 主要用于治疗气滞腰痛、月经不调等症^[3-6]。NQP 现收载于《卫生部药品标准》蒙药分册中, 现行质量标准仅收载了性状和检查项, 尚无有效控制本品质量的定量方法。目前文献报道对 NQP 的药理活性及作用机制研究居多, 在质量控制方面研究文献报道较少, 且大都停留在对利用单一化学成分进行含量测定水平^[7-9]。

中成药的化学成分复杂, 单一指标评价模式难以全面反映制剂的整体质量, 利用指纹图谱技术结合多成分含量测定并利用化学计量学, 如聚类分析、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 及正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 等分析方法, 对复杂的数据进行整合, 可以更加直观地反映不同企业和批次间药品质量差异, 近几年已在成方制剂研究分析中广泛应用^[10-13]。本实验通过利用高效液相色谱法建立 NQP 指纹图谱, 对沉香四醇、丁香酚、肉豆蔻木脂素、去氢二异丁香酚含量进行同时检测, 利用化学计量学分析方法对 14 批 NQP 测定结果进行分析, 为本品整体质量控制提供方法依据和研究数据支持。

1 仪器与材料

1.1 仪器

岛津 LC-20A 型高效液相色谱仪, 配 SPD-20A 型二极管阵列检测器, 日本岛津公司; KQ-500DE 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; PL-203 型千分之一电子天平 (感量 1.0 mg)、XP-205 型万分之一电子天平 (感量 0.1 mg), 梅特勒-托利多仪器有限公司; ME 5 型百万分之一电子天平, 感量 0.001 mg, 赛多利斯仪器有限公司。

1.2 材料

对照品沉香四醇 (批号 111980-201904, 质量分数 98.6%)、丁香酚 (批号 110725-201917, 质量分数 99.1%)、去氢二异丁香酚 (批号 111838-201804, 质量分数 98.6%)、桉油精 (批号 110788-202108, 质量分数 99.4%)、肉豆蔻醚 (批号 190180-201701, 供鉴别用)、天麻素 (批号 110807-202010, 质量分数 95.5%)、腺苷 (批号 110879-202204, 质量分数 99.4%)、对羟基苯甲醇 (批号 111970-201702, 质量分数 99.4%)、对照药材丁香 (批号 121039-201906)、沉香 (批号 121222-202104)、肉豆蔻 (批号 120926-202109)、豆蔻 (批号 121341-201705)、天冬 (批号 121139-201906) 均购于中国食品药品检定研究院; 对照品 dactylorhin A (批号 DSTDD023301, 质量分数 98%)、肉豆蔻木脂素 (批号 MUST-19102316, 质量分数 99.4%), 均购于成都曼斯特生物科技有限公司。甲醇为色谱纯, 水为超纯水。

豆蔻、手掌参均为内蒙古蒙药股份有限公司提供, 经内蒙古自治区药品检验研究院林燕主任药师鉴定, 豆蔻为姜科豆蔻属植物白豆蔻 *Amomum kravanh* Pierre ex Gagnep. 的干燥成熟果实, 手掌参为兰科手参属植物手参 *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. 的干燥块茎。

NQP 来源与编号分别为内蒙古蒙药股份有限公司, 批号 2202015、2207024、2208015、2210010、2210011、2210022, 编号 S1~S6; 内蒙古大唐药业股份有限公司, 批号 22449001、22449002、22664002、22664003, 编号 S7~S10; 内蒙古库伦蒙药有限公司, 批号 200132, 编号 S11; 乌兰浩特中蒙制药有限公司, 批号 210535、210728、221012, 编号 S12~S14。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 取沉香四醇、丁香酚、肉豆蔻木脂素、去氢二异丁香酚对照品适量, 精密

称定, 加甲醇制成含沉香四醇 206.50 $\mu\text{g/mL}$ 、丁香酚 2011.75 $\mu\text{g/mL}$ 、肉豆蔻木脂素 52.05 $\mu\text{g/mL}$ 、去氢二异丁香酚 49.50 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品储备液, 精密量取对照品储备液 5.0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取 NQP 粉末(过三号筛)约 2.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理(功率 500 W、频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 取续滤液, 用 0.45 μm 滤头滤过, 作为供试品溶液。

2.1.3 单味药材供试品溶液的制备 按处方比例折算, 分别取处方中 7 味对照药材粉末, 分别按“2.1.2”项下供试品溶液制备方法处理, 即得。

2.1.4 阴性供试品溶液的制备 按 NQP 的制备工艺分别制备缺沉香、缺肉豆蔻、缺丁香、豆蔻、肉豆蔻的阴性样品, 按“2.1.2”项下供试品溶液制备方法处理, 即得。

2.2 色谱条件

采用 Grace Alltima HP C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 10 μL ; 检测波长 220 nm; 流动相为甲醇-水, 梯度洗脱: 0~10.00 min, 25%~38%甲醇; 10.00~12.00 min, 38%~47%甲醇; 12.00~22.00 min, 47%甲醇; 22.00~70.00 min, 47%~70%甲醇; 70.00~85.00 min, 70%~92%甲醇。

2.3 指纹图谱研究

2.3.1 精密度试验 取 NQP (S1), 按“2.1.2”项下

方法制备供试品溶液, 再按“2.2”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 以 8 号峰(丁香酚)为参照峰, 测得各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.13%~0.17%, 相对峰面积的 RSD 为 0.06%~0.19%, 结果表明方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取同 1 份 NQP (S1) 的供试品溶液, 分别于制备后的 2、4、8、12、16、24 h, 按照“2.2”项下色谱条件进样分析, 以 8 号峰(丁香酚)为参照峰, 测得各共有峰的相对保留时间的 RSD 为 0.29%~0.70%, 相对峰面积的 RSD 为 0.12%~0.79%, 结果表明, 供试品溶液在室温放置 24 h 稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取 NQP (S1), 按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 再按“2.2”项下色谱条件分别进样分析, 以 8 号峰(丁香酚)为参照峰, 测得各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.20%~0.53%, 相对峰面积的 RSD 为 0.63%~2.52%, 结果表明该方法重复性良好。

2.3.4 对照指纹图谱的建立及相似度评价 取 14 批 NQP 样品, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.2”项下色谱条件分别进样分析, 将相关色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)》进行处理, 得到 NQP HPLC 指纹图谱叠加图(图 1)。以编号为 S1 样品图谱为参考图谱, 时间窗宽度设定为 0.4 min, 采用中位数法, 进行了全谱峰匹配, 生成 NQP HPLC 对照指纹图谱(R)。共标示出 21 个共有峰, 其中 8 号峰(丁香酚)稳定性好, 色谱响应高, 保留时间适中, 故选择该色谱

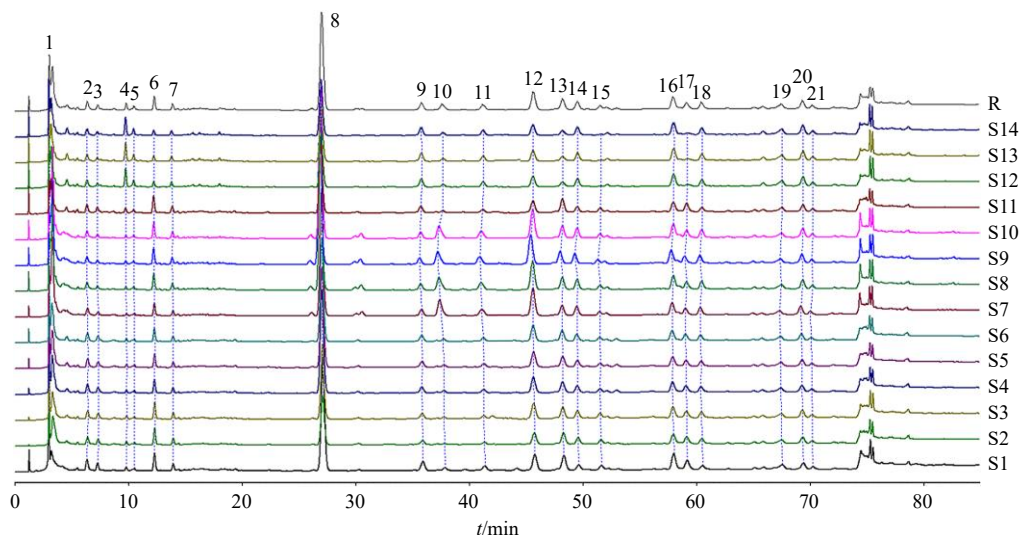


图 1 14 批 NQP (S1~S14) 和对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC fingerprint of 14 batches of NQP (S1—S14) and reference (R)

峰为参照峰 (S), 计算得 14 批 NQP (S1~S14) 指纹图谱相似度分别为 0.991、0.990、0.994、0.997、0.995、0.996、0.992、0.993、0.994、0.995、0.987、0.989、0.988、0.990, 均大于 0.98, 表明 14 批 NQP 样品批次间相似度较好。

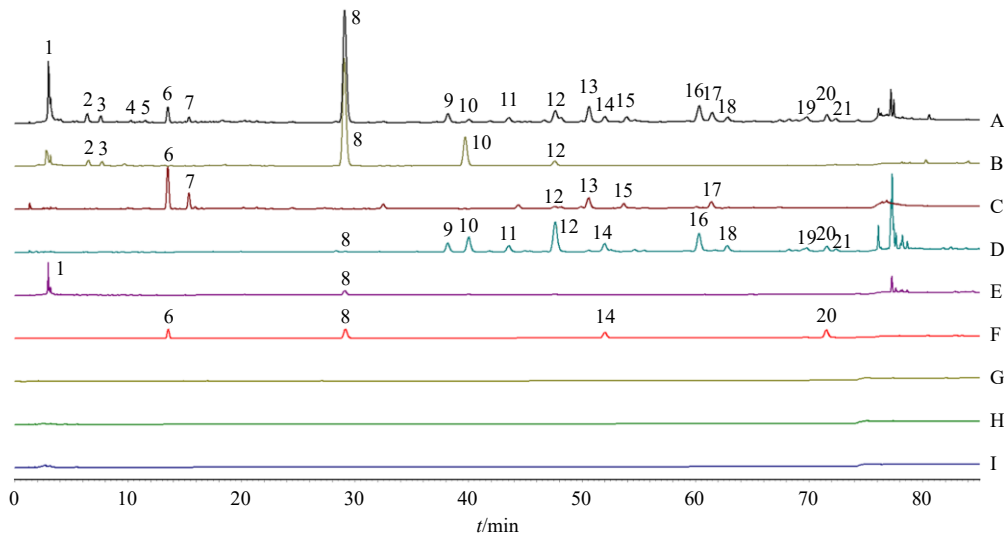
2.3.5 色谱峰药材归属及指认 精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液、供试品溶液、单味药材供试品

溶液, 再按“2.2”项色谱条件分别进样分析, 记录色谱图, 与指纹图谱共有峰进行对比。结果 21 个共有峰有 19 个色谱峰分属沉香、丁香、肉豆蔻、豆蔻 4 味药材, 其余 2 个色谱峰未成功归属 (表 1)。对照品指认 4 个色谱峰 (图 2), 分别为沉香四醇 (6 号峰)、丁香酚 (8 号峰)、肉豆蔻木脂素 (14 号峰)、去氢二异丁香酚 (20 号峰)。

表 1 指纹图谱共有峰药材归属

Table 1 Fingerprints of common peaks of medicinal materials attributed

序号	t _R /min	归属药材	化合物	序号	t _R /min	归属药材	化合物	序号	t _R /min	归属药材	化合物
1	3.003	豆蔻	未知	8	29.060	丁香、豆蔻、肉豆蔻	丁香酚	15	53.865	沉香	未知
2	6.437	丁香	未知	9	38.120	肉豆蔻	未知	16	60.287	肉豆蔻	未知
3	7.601	丁香	未知	10	39.726	肉豆蔻、丁香	未知	17	61.388	沉香	未知
4	9.761	未知	未知	11	43.099	肉豆蔻	未知	18	62.729	肉豆蔻	未知
5	10.468	未知	未知	12	47.598	肉豆蔻、丁香、沉香	未知	19	69.694	肉豆蔻	未知
6	13.514	沉香	沉香四醇	13	50.559	沉香	未知	20	71.502	肉豆蔻	去氢二异丁香酚
7	15.374	沉香	未知	14	51.934	肉豆蔻	肉豆蔻木脂素	21	72.321	肉豆蔻	未知



6-沉香四醇; 8-丁香酚; 14-肉豆蔻木脂素; 20-去氢二异丁香酚; A-样品; B-丁香对照药材; C-沉香对照药材; D-肉豆蔻对照药材; E-豆蔻对照药材; F-混合对照品; G-手掌参对照药材; H-黄精对照药材; I-天冬对照药材。
6-agarotetrol; 8-eugenol; 14-myrsignan; 20-dehydrodiisoeugenol; A-sample; B-Caryophylli Flos reference medicinal materials; C-Aquilariae Lignum Resinatum reference medicinal materials; D-Myristicae Semen reference medicinal materials; E-Amomi Fructus Rotundus reference medicinal materials; F-mixed reference substances; G-Gymnadeniae Rhizoma reference medicinal materials; H-Polygonati Rhizoma reference medicinal materials; I-Asparagi Radix reference medicinal materials.

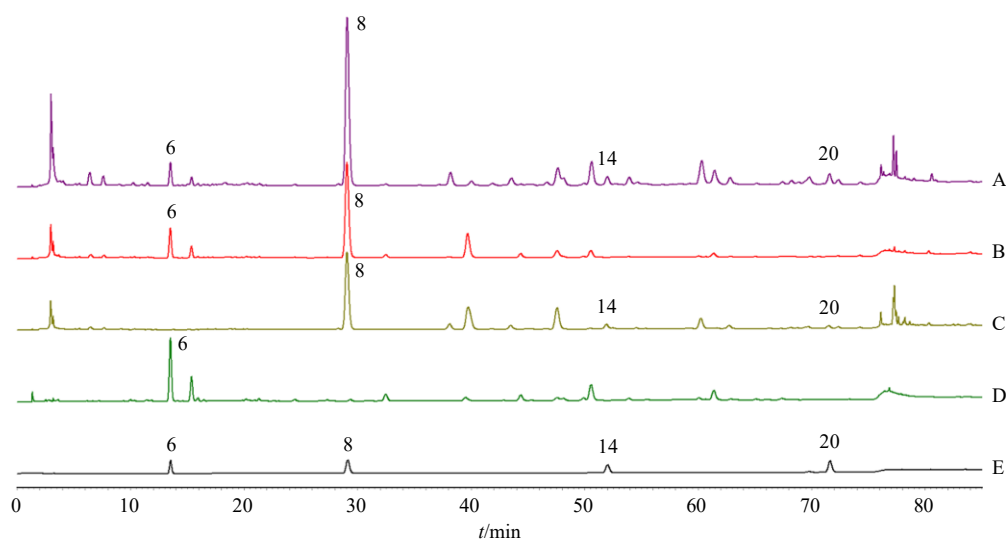
图 2 指纹图谱色谱峰归属图

Fig. 2 Chromatographic peak attribution of fingerprints

2.4 多指标成分含量测定

2.4.1 专属性考察 分别精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液、供试品溶液及阴性供试品溶液各 10 μL, 按“2.2”项下色谱条件进样分析并记录色谱图 (图 3)。可见供试品呈现与对照品保留时间相同的色谱峰, 阴性对照在相应位置无色谱峰。

2.4.2 线性关系考察 分别精密量取“2.1.1”项下混合对照品储备溶液 1.0、2.0、3.0、5.0、10.0、15.0 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀。按“2.2”项下色谱条件测定峰面积, 以峰面积为纵坐标 (Y), 对照品质量浓度为横坐标 (X), 进行回归分析, 绘制各组分的标准曲线, 计算回归



6-沉香四醇; 8-丁香酚; 14-肉豆蔻木脂素; 20-去氢二异丁香酚; A-样品; B-缺肉豆蔻阴性对照; C-缺沉香阴性对照; D-缺丁香、肉豆蔻、豆蔻阴性对照; E-混合对照品。

6-agarotetrol; 8-eugenol; 14-myristlgan; 20-dehydrodiisoeugenol; A-sample; B-negative control sample without *Myristicae Semen*; C-negative control sample without *Aquilariae Lignum Resinatum*; D-negative control sample without *Caryophylli Flos*, *Myristicae Semen* and *Amomi Fructus Rotundus*; E-mixed reference substances.

图3 含量测定专属HPLC色谱图

Fig. 3 Specific HPLC chromatogram for content determination

方程和相关系数,结果分别为沉香四醇 $Y=31\,350.5X+3\,597.89$, $r=0.999\,2$, 线性范围 $8.26\sim 123.90\,\mu\text{g/mL}$; 丁香酚 $Y=24\,258.8X+35\,126.2$, $r=0.999\,5$, 线性范围 $80.47\sim 1\,207.05\,\mu\text{g/mL}$; 肉豆蔻木脂素 $Y=35\,095.5X+1\,984.49$, $r=0.999\,0$, 线性范围 $2.08\sim 31.23\,\mu\text{g/mL}$; 去氢二异丁香酚 $Y=67\,465.5X+3\,187.37$, $r=0.999\,4$, 线性范围 $1.98\sim 29.70\,\mu\text{g/mL}$; 结果表明,各成分在各自质量浓度范围内,相关系数均 $\geq 0.999\,0$,线性关系良好。

2.4.3 精密度试验 精密吸取“2.1.1”项下对照品溶液 $10\,\mu\text{L}$,按“2.2”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积,结果显示,沉香四醇、丁香酚、肉豆蔻木脂素、去氢二异丁香酚峰面积的RSD分别为0.13%、0.24%、0.16%、0.19%,结果表明仪器的精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一NQP供试品溶液(S1),分别于制备后室温下放置2、4、8、12、16、24 h,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,结果显示,沉香四醇、丁香酚、肉豆蔻木脂素、去氢二异丁香酚峰面积的RSD分别为0.97%、1.51%、0.68%、1.32%,结果表明供试品溶液在室温下放置24 h稳定。

2.4.5 重复性试验 取同一批NQP样品(S1),按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,按“2.2”

项下色谱条件分别进样测定,记录色谱图,计算样品中沉香四醇、丁香酚、肉豆蔻木脂素、去氢二异丁香酚质量分数的平均值分别为0.394、4.005、0.103、0.099 mg/g, RSD分别为1.40%、0.60%、1.03%、1.98%,结果表明该方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 取同一批NQP样品(S1)细粉1.25 g,置具塞锥形瓶中,共9份,分为3组,分别加混合对照品溶液5、10、15 mL(沉香四醇、丁香酚、肉豆蔻木脂素、去氢二异丁香酚峰的质量浓度分别为48.91、504.72、12.92、13.07 $\mu\text{g/mL}$),再分别加甲醇20、15、10 mL,按“2.1.2”项下方法制备加样回收率溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,计算各成分的加样回收率,结果沉香四醇、丁香酚、肉豆蔻木脂素、去氢二异丁香酚峰的平均加样回收率分别为99.2%、101.4%、101.0%、96.4%, RSD分别为0.94%、0.98%、1.28%、0.33%。

2.4.7 样品测定 取14批NQP样品(S1~S14),各约2.5 g,精密称定,按“2.1.2”项下方法平行制备2份供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,按外标法计算上述4种成分的含量,测定结果见表2。

2.5 化学计量学分析

2.5.1 聚类分析 用SPSS 20.0软件,以14批NQP

表 2 不同批次 4 种指标性成分含量测定结果 (n = 2)
Table 2 Determination results of four index components in different batches (n = 2)

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	沉香四醇	丁香酚	肉豆蔻木脂素	去氢二异丁香酚
S1	0.394	4.005	0.103	0.099
S2	0.356	1.574	0.126	0.093
S3	0.338	2.392	0.150	0.112
S4	0.277	3.402	0.128	0.097
S5	0.281	2.838	0.135	0.010
S6	0.399	2.588	0.131	0.096
S7	0.269	4.055	0.174	0.126
S8	0.317	4.204	0.181	0.126
S9	0.379	5.018	0.205	0.134
S10	0.416	4.984	0.200	0.132
S11	0.380	2.293	0.104	0.103
S12	0.130	1.923	0.168	0.139
S13	0.120	1.956	0.159	0.139
S14	0.131	2.069	0.205	0.134

的 4 个指标成分含量测定结果为变量，以平方欧式 (Euclidean) 距离为区间，采用 Word 连结法对 14 批次 NQP 进行聚类分析，结果如图 4 所示，可以看出当平方欧式距离为 15 时，14 批 NQP 样品可聚为 3 类，内蒙古蒙药股份有限公司的 6 批 NQP 样品 (S1~S6) 和内蒙古库伦蒙药有限公司的 1 批 NQP 样品 (S11) 聚为一类；内蒙古大唐药业股份有限公司的 4 批 NQP 样品 (S7~S10) 聚为一类；乌兰浩特中蒙制药有限公司的 3 批 NQP 样品 (S12~S14)

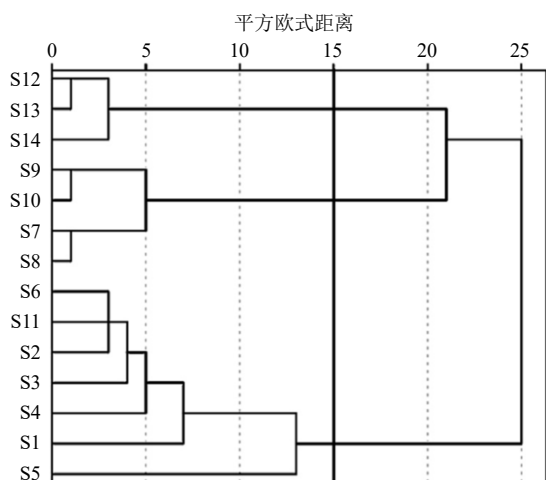


图 4 14 批 NQP 样品系统聚类分析
Fig. 4 Systematic cluster analysis of 14 batches of NQP samples

聚为一类。
2.5.2 PCA PCA 是以降维为核心思想，是在尽可能保持原有数据信息前提下的一种数据分析方法。采用 SIMICA 14.1 软件，以 14 批 NQP 样品中 4 个指标成分含量测定结果为变量进行 PCA，结果见图 5。有 2 个主成分的累积贡献率为 98.7%，超过 85%。按照 PCA 结果可将 14 批 NQP 划分为 3 类：S1~S6、S11 为第 I 类，S7~S10 为第 II 类，S12~S14 为第 III 类。PCA 结果与聚类分析结果一致。

为进一步分析 4 组分对于 PCA 模型的贡献能力，研究其载荷散点图可以发现，丁香酚对第 1 主成分的贡献最大，沉香四醇对第 2 主成分的贡献度最大，结果见图 6。

2.5.3 OPLS-DA 为了进一步比较 4 家企业 14 批 NQP 样品化学成分的差异和寻找各批次含量之间的差异性标志化合物，将 14 批次 NQP 样品 21 个共有峰峰面积为变量进行了 OPLS-DA 建模分析。OPLS-DA 模型中， R^2_X 为 0.696， Q^2 为 0.597，均大于 0.5，说明所建立的模型稳定可靠。由 OPLS-DA 得分图，结果见图 7。14 批 NQP 样品明显分为 3 类，与前述 2 种分析方法结果一致。通过变量重要

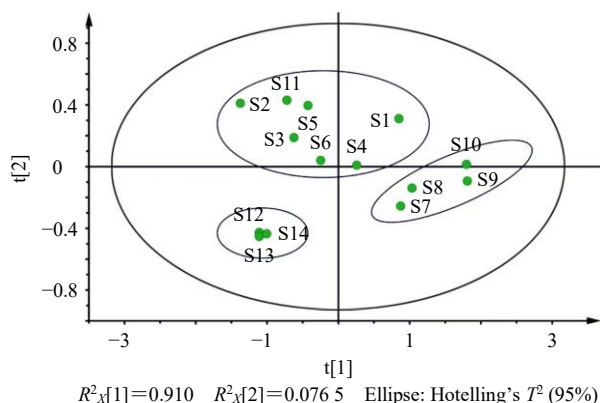


图 5 14 批 NQP 样品 PCA 得分图
Fig. 5 PCA score chart of 14 batches of NQP samples

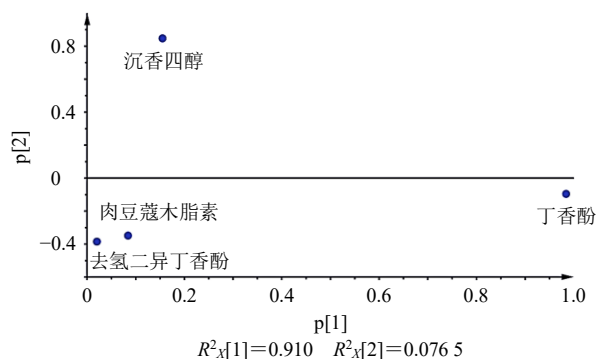


图 6 14 批 NQP 样品 PCA 散点图
Fig. 6 PCA scatter plot of 14 batches of NQP samples

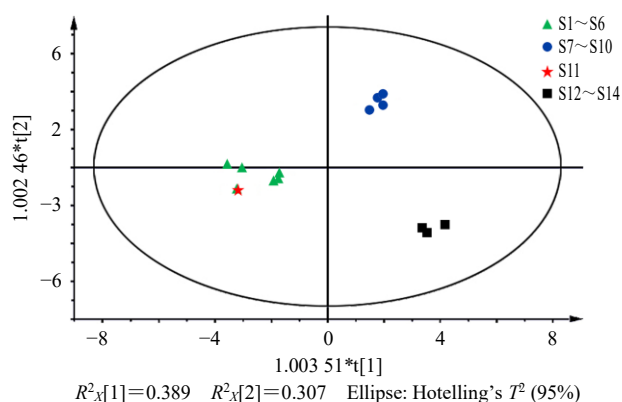


图 7 14 批 NQP 样品 21 个指纹峰的 OPLS-DA 得分图
Fig. 7 OPLS-DA score chart of 14 batches of NQP samples with 21 fingerprint peaks

性投影值 (variable importance for the projection, VIP) 筛选出化学成分差异的主要标志性成分, 结果见图 8, 横坐标为指纹峰号。以 VIP 值大于 1 作为标准筛选, 贡献依次由大到小的 VIP 变量为指纹峰 10、4、17、15、18、6、14、13、20、12、5、8、21。通过对照品指认出 4 个成分, 分别为峰 6 沉香四醇, 峰 8 丁香酚, 峰 14 肉豆蔻木脂素, 峰 20 去氢二异丁香酚。对差异性的贡献顺序为沉香四醇 > 肉豆蔻木脂素 > 去氢二异丁香酚 > 丁香酚, 但 4 者均为重要差异性标志化合物, 因此可作为指标定量的化合物。

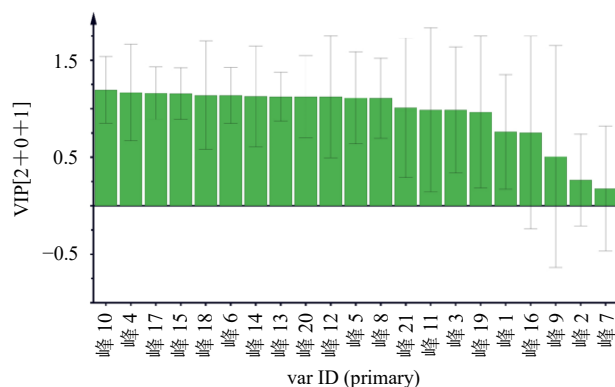


图 8 14 批 NQP 样品 21 个指纹峰的 VIP 值分析图
Fig. 8 VIP value analysis of 21 fingerprint peaks in 14 batches of NQP samples

3 讨论

3.1 处方中部分药材未纳入指纹图谱研究原因分析

通过查阅文献发现, 处方中天冬主含甾体皂苷类化学成分^[14], 目前, 这类成分主要采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器 (HPLC-ELSD) 或高效液相色谱-电雾式检测器 (HPLC-CAD) 建立含量测定方法^[15-16]。

黄精多糖是黄精的主要化学成分^[17], 目前多以硫酸-蒽酮为显色剂, 通过紫外分光光度法测定多糖含量^[18-19], 虽有文献报道采用高效液相色谱-紫外检测器 (HPLC-DAD) 对黄精中黄酮类化合物进行含量测定^[20], 但通过实验证明, 本品中含量较低, 色谱峰较小, 无法纳入指纹图谱研究。相对处方中其他药味, 针对手掌参的研究资料较少, 有研究证明手掌参中含多糖、卟啉糖苷及天麻素等化学成分^[21], 本实验前期以卟啉糖苷类化学成分 dactylorhin A 及天麻素为对照品进行实验^[22], 发现 NQP 中 2 种成分含量较低, 色谱峰过小, 本研究也尝试参照文献方法^[23]以腺苷、对羟基苯甲醇为对照品进行试验, 结果上述 3 种成分最大吸收波长为 270 nm, 在此波长处, 指纹图谱色谱峰数量明显变少, 且部分色谱峰无法有效分离, 故未将其纳入指纹图谱研究。

3.2 色谱峰归属及对照品指认

液相色谱指纹图谱共出现 21 个共有峰, 以相应的对照药材制备供试品溶液依法测定, 通过保留时间对色谱峰进行归属。结果 2、3 号色谱峰为丁香专属, 化学成分未知, 8 号色谱峰为丁香、肉豆蔻、豆蔻共有, 以丁香为主, 经对照品指认, 该色谱峰化学成分为丁香酚。6、7、13、15、17 号色谱峰为沉香专属, 12 号峰为沉香、肉豆蔻共有, 《中国药典》2020 年版一部“沉香”项下收录了特征图谱鉴别项, 规定有 6 个特征峰^[24], 本指纹图谱研究只获得沉香四醇对照品, 经对照品定位 6 号色谱峰为沉香四醇。本指纹图谱研究归属肉豆蔻药材色谱峰较多, 分别为 9、14、16、18~21 号色谱峰, 经过对文献资料的梳理, 肉豆蔻主含挥发油、木脂素类化学成分^[25-26], 本研究以肉豆蔻木脂素、去氢二异丁香酚、肉豆蔻醚为对照品进行色谱峰指认, 结果 14 号色谱峰为肉豆蔻木脂素、20 号色谱峰为去氢二异丁香酚, 未成功定位肉豆蔻醚色谱峰, 分析原因可能是该成分在原药材中含量较低, 加之其为挥发性成分, 在制剂过程中有损失导致。豆蔻主含挥发油, 其中以桉油精为主, 含量占比超 70%^[27], 本指纹图谱 1 号色谱峰为豆蔻药材专属, 参照文献方法以桉油精为对照进行色谱峰定位^[28], 结果桉油精在该色谱条件下, 未出现色谱峰, 分析原因, 可能因为样品用甲醇提取, 桉油精不易溶于甲醇, 提取效率不高导致。21 个共有峰中 19 个色谱峰进行归属, 但 4、5 号色谱峰不属于上述 7 味药材, 怀疑可能是在制剂过程中新生成的化学成分。

3.3 指标性成分的选择

本研究通过对指纹图谱共有峰进行 OPLS-DA 及对含量测定结果聚类分析、PCA 后发现对照品指认的 4 种成分可以作为表征本品质量差异性的化合物。结合含量测定方法学研究, 4 种成分在同一色谱条件下, 色谱峰与相邻色谱峰分离度均大于 1.5, 通过二极管阵列器检测, 未发现不纯物, 理论塔板数均大于 8 000。故选择此 4 种成分作为指标性成分。查阅文献发现肉豆蔻、豆蔻中也含有丁香酚^[29-30], 试验过程中也进一步验证这一结果, 虽然以丁香酚作为丁香指标性化学成分在专属性方面存在缺陷, 但考虑到肉豆蔻、豆蔻中丁香酚含量较低, 一定程度上也可反映丁香药材的质量。在法标基础上, 本研究建立了肉豆蔻专属性化学成分肉豆蔻木脂素的含量测定方法, 为肉豆蔻质量控制提供新的依据。

3.4 色谱条件的优化

本研究在条件摸索过程中, 利用二极管阵列检测器 (DAD) 在波长 200~370 nm 进行全扫描, 以 10 nm 为增量导出色谱图进行比对, 结果在 220 nm 波长处, 色谱峰数量较多, 分离度较好, 且能兼顾指标性成分的含量测定, 所以指纹图谱的检测波长为 220 nm。

流动相体系考察方面, 先后考察了乙腈-水、乙腈-水 (含 0.1% 磷酸)、甲醇-水等流动相体系, 从混合对照品和样品中被测成分的分离情况、基线的稳定性以及分析时间因素等综合考量, 最终选择以甲醇-水为流动相按“2.2”项下方法进行梯度洗脱较为合适。对供试品提取方法进行考察, 兼顾提取溶剂选择及提取效率 2 方面因素, 最终确定提取以甲醇为提取溶剂, 超声提取 (500 W、40 kHz) 30 min 为提取方法。

3.5 指纹图谱相似度及含量测定化学计量学分析结果

本研究采用 HPLC 法建立了 14 批 NQP 样品的指纹图谱, 确定了 21 个共有峰, 指认 4 个化学成分。指纹图谱相似度结果表明, 不同厂家及批号的样品指纹图谱相似度良好。说明企业按处方要求对丁香、肉豆蔻、豆蔻、沉香进行投料。化学计量学分析结果将 NQP 样品按不同生产企业分为 3 类, 说明不同企业间从生产工艺到原药材质量均存在明显差别。含量测定结果表明, 乌兰浩特中蒙制药有限公司沉香四醇含量明显低于其他 3 家生产企业, 说明该公司沉香原药材质量较差, 后期需要关注。

本次研究成功建立了 NQP 样品 HPLC 指纹图谱及沉香四醇、丁香酚、去氢二异丁香酚、肉豆蔻木脂素的含量测定方法。该方法操作简便, 结果稳定, 重现性好, 可用于 NQP 质量控制。生产企业可参照该方法严格生产过程控制, 从而保证药品质量稳定, 疗效可靠。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 高文德编著. 中国少数民族史大辞典 [M]. 长春: 吉林教育出版社, 1995: 2344.
- [2] 中华人民共和国卫生部药品标准·蒙药分册 [S]. 1998: 192.
- [3] 白清云. 中国百科全书·蒙医学 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1992: 274.
- [4] 奥·乌力吉, 布和巴特尔. 传统蒙药与方剂 [M]. 赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 2013: 301.
- [5] 张晨晨, 张东旭, 张玉凤, 等. 基于“化学物质组-血中移行成分-药理学”的蒙药暖宫七味丸质量标志物研究 [J]. 中草药, 2023, 54(18): 5855-5866.
- [6] 张东旭, 李偲, 刘羽康, 等. 基于网络药理学的蒙药暖宫七味丸治疗原发性痛经作用机制及实验验证研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(8): 1531-1539.
- [7] 侯峰, 施法, 田金苗, 等. 暖宫七味丸的质量标准研究 [J]. 中国药事, 2012, 26(10): 1119-1121.
- [8] 张妍, 李树庆. 暖宫七味丸质量标准研究 [J]. 中国民族医药杂志, 2009, 15(6): 52-53.
- [9] 巴根那, 王青虎, 宝音朝格拉. 蒙成药苏格木勒-7 味丸的质量标准研究 [J]. 中药材, 2008, 31(1): 137-139.
- [10] 刘慧, 肖金超, 张庆捷, 等. 金骨莲胶囊 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4185-4192.
- [11] 王彦帅, 丁浩强, 郑鑫杰, 等. 经典名方泻白散物质基准 HPLC 指纹图谱的建立及 3 种指标成分含量测定 [J]. 中草药, 2020, 51(11): 2946-2953.
- [12] 梁军, 刘彩凤, 刘冬涵, 等. 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 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 356-363.
- [13] 高博闻, 任浩蕊, 李博艺, 等. 基于指标性成分含量测定及指纹图谱对蒙药质量控制的研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2022, 57(13): 1049-1056.
- [14] 高琳. 天冬中甾体皂苷的分离鉴定 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2020.
- [15] 王贝, 高琳, 王杰, 等. 中药天冬中甾体皂苷 25-epi-officinalisnin II 的液相色谱含量测定方法的建立 [J]. 国际药学研究杂志, 2018, 45(10): 799-803.
- [16] 靳如娜, 郝丽霞, 王涛, 等. 天冬饮片与标准汤剂的质量评价方法探索 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020,

- 26(17): 111-118.
- [17] 刘爽, 胡舒婷, 贾巧君, 等. 黄精的化学组成及药理作用的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(10): 1783-1796.
- [18] 朱新焰, 孙信梅, 杜春华, 等. 滇黄精与轮叶黄精多糖的组织化学及含量测定研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(1): 61-64.
- [19] 楚冬海, 张振秋. 响应面分析法优化黄精多糖提取工艺及含量测定 [J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(2): 162-165.
- [20] 左雅敏, 李琛, 彭兴春, 等. HPLC-一测多评法测定黄精及其饮片中 6 种成分的含量 [J]. 中国药房, 2019, 30(13): 1748-1754.
- [21] 武文君. 手掌参中重要生物活性物质及其提取工艺研究 [D]. 武汉: 武汉理工大学, 2020.
- [22] 姚晶, 林鹏程. RP-HPLC 法同时测定藏药手掌参中 3 种抗 AD 活性成分的含量 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(13): 3865-3867.
- [23] 张海先, 王爽, 王长生, 等. RP-HPLC 同时测定藏药手掌参中 4 种活性成分的含量及气候因子相关分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4): 65-69.
- [24] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 192.
- [25] 李力, 潘倩雯, 郭偲, 等. 不同方法提取肉豆蔻挥发油成分的气相色谱-质谱法分析 [J]. 医药导报, 2019, 38(12): 1630-1634.
- [26] 童应成, 张佳迁, 陈业高, 等. 肉豆蔻科植物中木脂素类化合物及其药理活性研究进展 [J]. 海南师范大学学报: 自然科学版, 2022, 35(3): 235-244.
- [27] 曾志, 符林, 叶雪宁, 等. 白豆蔻、红豆蔻、草豆蔻和肉豆蔻挥发油成分的比较 [J]. 应用化学, 2012, 29(11): 1316-1323.
- [28] 梁欣雨, 杨世艳, 何兵. HPLC 法同时测定月桂油中 3 种成分的含量 [J]. 西南医科大学学报, 2020, 43(4): 344-348.
- [29] 赵祥升, 黄立标, 杨海建, 等. GC 法同时测定肉豆蔻中丁香酚、异丁香酚、肉豆蔻醚和榄香脂素的含量 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1569-1573.
- [30] 冯旭, 梁臣艳, 牛晋英, 等. 不同产地白豆蔻挥发油成分的 GC-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 107-110.

[责任编辑 郑礼胜]