

基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学及多成分定量测定的腰痹通胶囊质量评价研究

廖嘉穗^{1,2}, 付娟^{2,3}, 张日美^{1,2}, 柳芊如^{2,3}, 胡军华^{2,3}, 王振中^{2,3}, 肖伟^{1,2,3*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210000

2. 中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室, 江苏 连云港 222001

3. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 建立腰痹通胶囊 (Yaobitong Capsules, YC) 的 HPLC 指纹图谱及多成分定量测定方法, 并结合相关化学计量学评价多批次制剂的质量。方法 建立 YC 的指纹图谱, 采用层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 评价多批次制剂质量, 同时采用 Hotelling's T^2 和 DModX 方法对不同批次制剂的质量设定控制范围; HPLC 法测定多批次 YC 中绿原酸、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸 4 种有效成分的含量, 并结合聚类热图分析进行质量评价。结果 YC 指纹图谱方法学考察结果符合测定要求, 标记 17 个共有峰, 并对共有峰进行归属, 通过对照品比对认出 8 个色谱峰, 14 批样品相似度大于 0.90; HCA 和 PCA 中未见异常批次, 表明批间一致性较好, Hotelling's T^2 和 DModX 控制上限为 15.077 和 1.653; 14 批 YC 样品中芍药内酯苷、芍药苷、绿原酸、阿魏酸的质量分数分别为 1.733~2.853、4.674~8.127、1.128~2.417、0.586~1.232 mg/g, 线性关系良好 ($r \geq 0.9993$); 聚类热图分析结果表明, 14 批样品可聚为 3 类。结论 建立的 HPLC 指纹图谱方法和多成分含量测定方法准确可靠, 可用于 YC 的质量评价。多批次制剂数据结合化学计量学评价方法, 表明 YC 多批次制剂之间一致性较好。

关键词: 腰痹通胶囊; HPLC; 指纹图谱; 化学计量学; 质量评价; 层次聚类分析; 主成分分析; 绿原酸; 芍药内酯苷; 芍药苷; 阿魏酸; 聚类热图分析

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)08-2579-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.08.009

Quality evaluation of Yaobitong Capsules based on HPLC fingerprint combined with chemometrics and multi-component content determination

LIAO Jiasui^{1,2}, FU Juan^{2,3}, ZHANG Rimei^{1,2}, LIU Qianru^{2,3}, HU Junhua^{2,3}, WANG Zhenzhong^{2,3}, XIAO Wei^{1,2,3}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China

2. National Key Laboratory on Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutical Process Control and Intelligent Manufacture, Lianyungang 222001, China

3. Jangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint method and a method for the determination of multi-component content of Yaobitong Capsules (腰痹通胶囊, YC), and to evaluate the quality of multiple batches of the product by combining related chemometrics methods. **Methods** Based on the fingerprinting of lumbar paralysis capsules, hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) were used to evaluate the quality of multiple batches of samples, while Hotelling's T^2 and DModX methods were used to establish control ranges for the quality of different batches of products; The content of four active ingredients, namely chlorogenic acid, albiflorin, paeoniflorin and ferulic acid, in multiple batches of YC was determined by HPLC and the quality was evaluated by cluster heat map analysis. **Results** The results of fingerprint methodology of YC were in accordance with the requirements of the determination, 17 common peaks were labeled, and eight chromatographic peaks were identified by standard comparison, and the similarity of samples from 14 batches was more than 0.90. No abnormal batches were found in HCA and PCA,

收稿日期: 2023-11-02

基金项目: 国家中医药管理局基于重点研究室研究领域的中医药多学科研究能力提升项目——中药提取精制新技术; 连云港市揭榜挂帅项目——中药口服固体制剂智能化连续制造关键技术研究

作者简介: 廖嘉穗, 硕士研究生, 研究方向为中药学。E-mail: 546023294@qq.com

*通信作者: 肖伟, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药新药的研究与开发。E-mail: kanionlunwen@163.com

indicating good inter-batch consistency. The upper limits of Hotelling's T^2 and DModX control were 15.077 and 1.653, respectively. The contents of albiflorin, paeoniflorin, chlorogenic acid, and ferulic acid in 14 batches of YC samples ranged from 1.733 to 2.853 mg/g, 4.674 to 8.127 mg/g, 1.128 to 2.417 mg/g and 0.586 to 1.232 mg/g, respectively, with a good linearity ($r \geq 0.999$). The results of cluster heat map analysis showed that 14 batches of samples could be clustered into three categories. **Conclusion** The fingerprint method and the multi-component content determination method are accurate and reliable, which could be used for the quality evaluation of YC. The multi-batch product data combined with the chemometric method can be used for the stability control and quality evaluation of YC.

Key words: Yaobitong Capsules; HPLC; fingerprint; chemometrics; quality evaluation; hierarchical cluster analysis; principal component analysis; chlorogenic acid; albiflorin; paeoniflorin; ferulic acid; Cluster heatmap analysis

腰痹通胶囊 (Yaobitong Capsules, YC) 由三七、川芎、白芍、延胡索、独活、狗脊、熟地黄、牛膝组成, 活血化瘀、祛风除湿、行气止痛^[1], 是一种临床中常用于治疗腰椎间盘突出症的中成药, 疗效良好^[2-5]。YC 组方药味多, 成分复杂, 主要含有三萜皂苷、单萜苷、苯酞、香豆素、生物碱、有机酸等多种化学成分^[6-8], 多个体内外代谢研究表明^[6,9-11], YC 的药效物质基础可能来自多个药味中的多种活性成分。而 YC 现行质量标准及现有研究仅对胶囊中个别成分的含量进行测定^[12-15], 缺少对 YC 整体质量的有效评价方法, 有必要探索一种控制 YC 整体质量的研究方法。随着中医药现代化发展, “安全、稳定、可控” 作为中药可持续发展和国际化的关键要求^[16], 建立中药复方制剂整体质量控制方法是大势所趋。中药指纹图谱具有信息量大, 特征性强, 整体性强的特点, 能够直观地展现制剂中各药味的化学组成与分布, 对全面控制质量和深入药效研究提供了重要依据^[17-18]。化学计量学利用数学方法或统计方法处理化学体系中的定性或定量数据, 成为质量标准研究中不可缺少的判断工具。统计方法主要包括层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法 (partial least squares method, PLS) 等, 通过分析大量数据、挖掘其内在关联, 已广泛应用于中药指纹图谱质量评价研究, 客观反映中药制剂的整体质量, 确保其内在的质量均一性和稳定性^[19-23]。本实验在前期对 YC 化学成分研究的基础上^[7-8], 首先采用高效液相指纹图谱技术对 14 批样品进行相似度评价, 并进一步结合无监督的 HCA、PCA 等相关化学计量学方法分析不同批次的 YC 产品质量, 在此基础上设定了 Hotelling's T^2 和 DModX2 种统计量的控制限和警戒限。然后, 通过高效液相色谱技术测定其中 4 种有效成分的含量, 采用聚类热图分析方法直观观察其变化情况, 为 4

种成分的含量设定合适的质量控制范围。本研究建立了较全面的 YC 质量评价方法, 为该品种后续质量标准与控制提升提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters Acquity H class 高效液相色谱仪、Waters Arc HPLC 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; Milli-Q 型超纯水制备仪, 美国 Millipore 公司; KB-500DB 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; Mettler Toledo XP6 型百万分之一电子分析天平、Mettler Toledo XSR105 型十万分之一电子分析天平、Mettler Toledo AL204 型万分之一电子分析天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; TG16MW 型台式高速离心机, 湖南赫西仪器装备有限公司。

1.2 材料

乙腈, 色谱纯, 批号 023636, 北京迈瑞达科技有限公司; 甲醇 (批号 230330892D)、磷酸 (批号 200818593E), 分析纯, 南京化学试剂股份有限公司; 超纯水, 由 Milli-Q 型超纯水制备仪自制。

对照品三七皂苷 R_1 (批号 110745-201921, 质量分数 90.4%)、人参皂苷 R_{g1} (批号 110703-202235, 质量分数 98.5%)、蛇床子素 (批号 110822-202111, 质量分数 99.7%)、藁本内酯 (批号 111737-201910, 质量分数 99.9%)、芍药苷 (批号 110736-202246, 质量分数 96.7%)、人参皂苷 R_d (批号 111818-202104, 质量分数 97.3%)、绿原酸 (批号 110753-202119, 质量分数 96.3%)、阿魏酸 (批号 110773-201915, 质量分数 99.4%), 均购自中国食品药品检定研究院; 对照品芍药内酯苷 (批号 wkq22021403, 质量分数 98.0%), 购自四川维克奇生物科技有限公司。

YC 样品共 14 批, 江苏康缘药业股份有限公司生产, 具体信息见表 1。实验所用药材及饮片购自中药材市场, 经南京中医药大学中药资源学教研室中药资源与栽培技术中心主任谷巍教授鉴定, 三七

表 1 14 批 YC 样品信息

Table 1 Sample information of 14 batches of YC sample

样品	批号	生产时间	样品	批号	生产时间
S1	220115	2022	S8	230737	2023
S2	220116	2022	S9	230801	2023
S3	220117	2022	S10	230802	2023
S4	220118	2022	S11	230803	2023
S5	220121	2022	S12	230805	2023
S6	221115	2022	S13	230806	2023
S7	230533	2023	S14	230810	2023

(批号 Y2208001) 为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎、川芎 (批号 Y2212201) 为伞形科藁本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎、独活 (批号 Y2302165) 为伞形科独活属植物独活 *Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan 的干燥根、延胡索 (批号 Y2302020) 为罂粟科紫堇属植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎、白芍 (批号 Y2302001) 为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、狗脊 (批号 Y2302121) 为蚌壳蕨科金毛狗属植物金毛狗脊 *Cibotium barometz* (L.) J. Sm. 的干燥根茎、牛膝 (批号 Y2209147) 为苋科牛膝属植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根、熟大黄 (批号 YP2306037) 为蓼科大黄属植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根和根茎的炮制品, 各药材和饮片均符合《中国药典》2020 年版相关规定。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取绿原酸、芍药内酯苷、芍药苷、三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_d、藁本内酯、蛇床子素对照品适量, 加 50% 甲醇溶液制得质量浓度分别为 26.10、48.41、122.91、109.66、381.39、101.48、25.25、38.48 μg/mL 混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取 YC 内容物, 研成细粉, 精密称定 0.5 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 超声 40 min, 放冷至室温, 补足减失的质量, 摇匀, 于 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.1.3 单味药材样品溶液的制备 取各味药材细

粉, 其余操作同“2.1.2”项下供试品溶液的制备。

2.1.4 色谱条件 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~13 min, 12%~20% 乙腈; 13~33 min, 20%~23% 乙腈; 33~43 min, 23%~30% 乙腈; 43~53 min, 30% 乙腈; 53~83 min, 30%~60% 乙腈; 83~93 min, 60%~90% 乙腈; 93~100 min, 90% 乙腈; 100~105 min, 90%~12% 乙腈; 105~115 min, 12% 乙腈; 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长 203 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。

2.1.5 精密度考察 取同一份供试品溶液 (S7), 按“2.1.4”项下色谱条件进样测定 6 次, 以人参皂苷 R_{g1} 峰为参照峰, 测得 17 个共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.033%~0.120%, 相对峰面积的 RSD 为 0.125%~2.524%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性考察 取供试品溶液 (S7), 按“2.1.2”项下色谱条件下分别于室温下放置 0、2、6、16、20、24、30 h 后进样测定, 以人参皂苷 R_{g1} 色谱峰为参照峰, 计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.068%~0.270%, 相对峰面积的 RSD 为 0.706%~3.823%, 表明供试品溶液在 30 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性考察 取同一批样品 (S7), 按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 记录色谱图, 以人参皂苷 R_{g1} 为参照峰, 计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.062%~0.336%, 相对峰面积的 RSD 为 0.384%~2.554%, 表明该方法重复性良好。

2.1.8 建立指纹图谱及相似度评价 将 14 批供试品溶液 (S1~S14), 按“2.1.4”项下色谱条件测定, 记录色谱图并导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 年版)》软件中, 以 S7 为参照图谱, 时间窗宽度 0.1 s, 设置中位数法, 目标峰匹配, 生成对照指纹图谱 (R), 14 批 YC 样品指纹图谱叠加图及其对照指纹图谱见图 1。以相似度评价系统计算, 得到 14 批样品 (S1~S14) 与 R 的相似度结果分别为 0.965、0.982、0.982、0.981、0.978、0.965、0.973、0.984、0.981、0.986、0.970、0.991、0.982、0.986, 相似度均较高, 表明 YC 各批次间制备工艺较稳定, 质量一致性较好。

对 14 批样品指纹图谱进行色谱峰归属, 标定 17 个共有峰 (图 2), 1 号峰来自川芎和独活, 2、3 号峰来自白芍, 4、7~9、11、15、16 号峰来自独活,

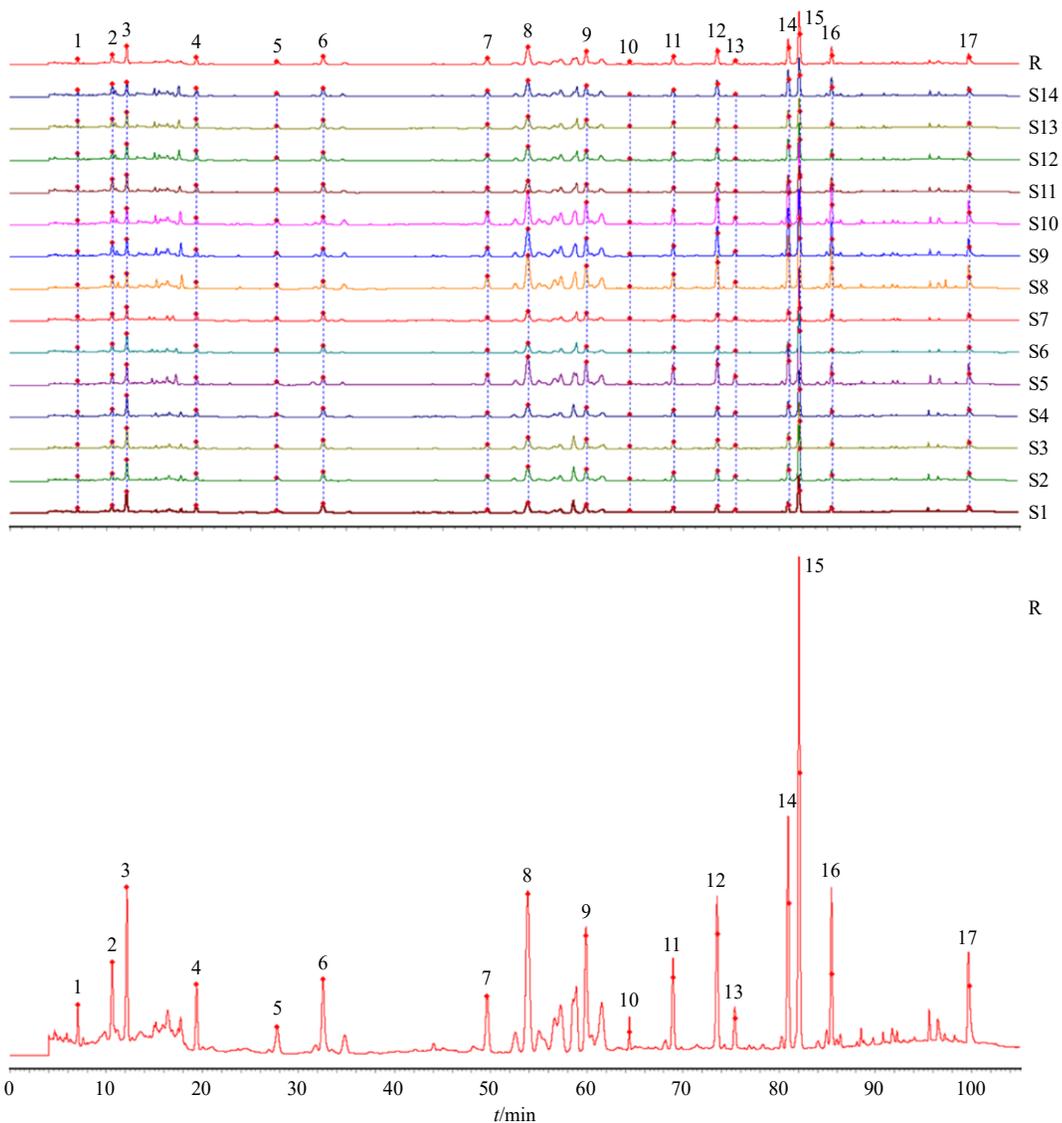


图1 14批YC样品的HPLC指纹图谱(A)和对照指纹图谱(R)

Fig. 1 HPLC fingerprint (A) of 14 batches of YC sample and reference fingerprint (R)

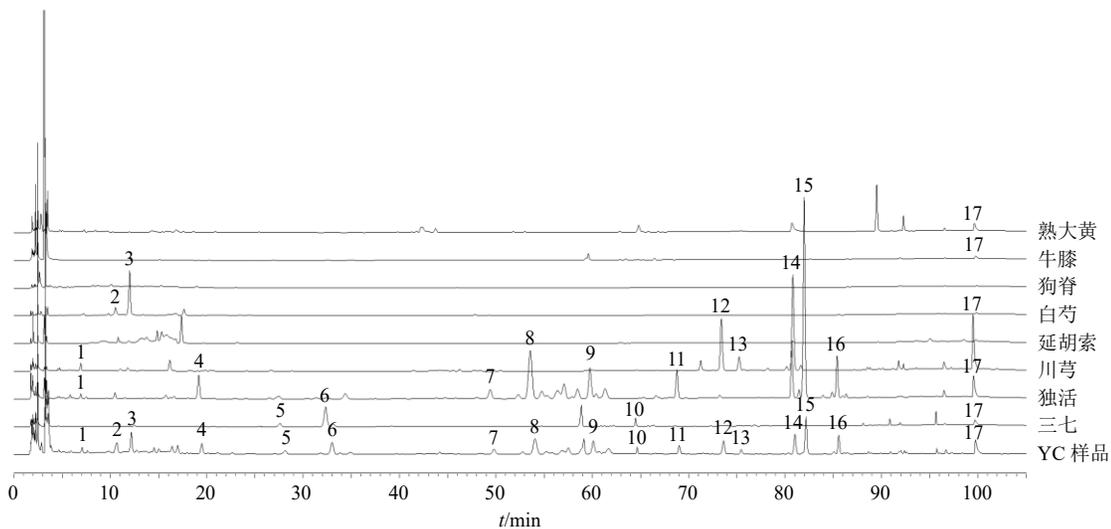
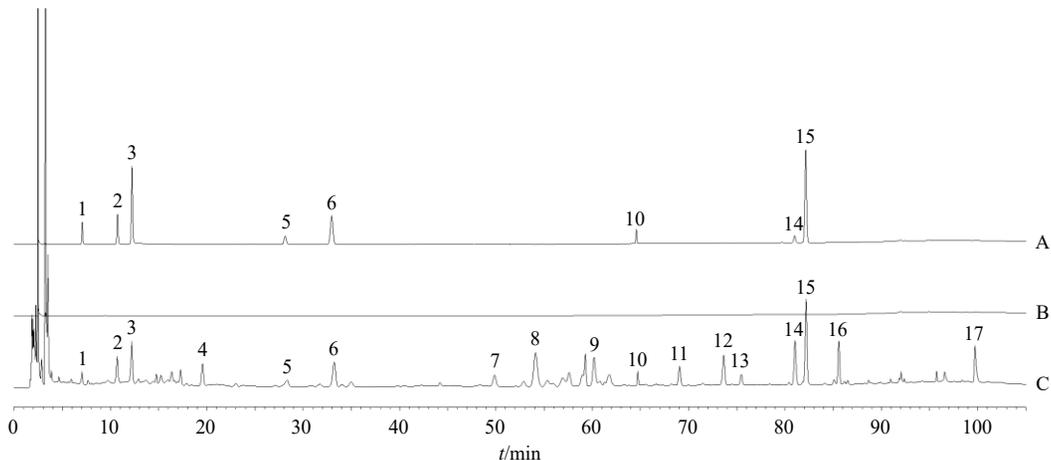


图2 YC和处方各药味的HPLC图

Fig. 2 HPLC chromatograms of YC and its relevant herbs

5、6、10号峰来自三七，12~14号峰来自川芎，17号峰来源于三七、独活、川芎、牛膝、熟大黄等多味药材。其中，6号峰在图谱中峰形与分离度良好，且保留时间与峰面积较稳定，故将其选择为参照峰(S)。取供试品溶液(S7)和混合对照品溶液，在“2.2”

项下色谱条件进样比对，1号峰为绿原酸，2号峰为芍药内酯苷，3号峰为芍药苷，5号峰为三七皂苷R₁，6号峰为人参皂苷R_{g1}，10号峰为人参皂苷R_d，14号峰为藁本内酯，15号峰为蛇床子素，色谱图见图3。



1-绿原酸; 2-芍药内酯苷; 3-芍药苷; 5-三七皂苷 R₁; 6-人参皂苷 R_{g1}; 10-人参皂苷 R_d; 14-藁本内酯; 15-蛇床子素。
1-chlorogenic acid; 2-albiflorin; 3-paeoniflorin; 5-notoginsenoside R₁; 6-ginsenoside R_{g1}; 10-ginsenoside R_d; 14-ligustilide; 15-osthoside.

图3 混合对照品溶液(A)、空白溶液(B)和YC样品溶液(C)的HPLC图

Fig. 3 HPLC of mixed reference substances solution (A), blank solution (B) and YC samples (C)

2.2 化学模式识别分析

2.2.1 HCA

HCA 是一种可使复杂的多维数据标准化的分析方法,通过使用适当的度量和连接准则,计算相异度,实现对象的归类^[24]。运用数据分析软件 SPSS 26.0,选择组间连接法,以欧氏距离为测度,以14批YC样品的17个共有峰的相对峰面积为变量进行HCA,结果如图4所示。由图可知,14批YC样品整体可分为2类,S1~S4、S6、S7、S11~S14聚为第1类,S5、S8~S10聚为第2类。

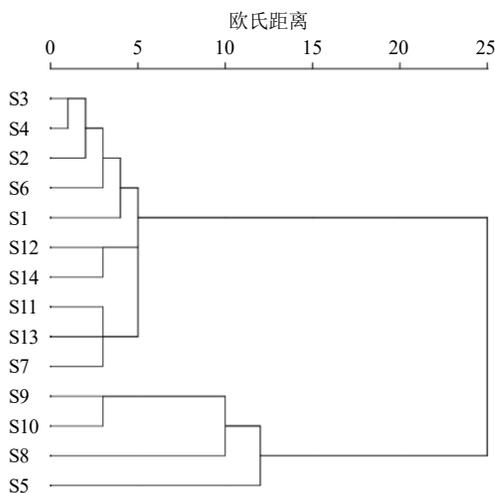


图4 14批YC样品的HCA结果

Fig. 4 HCA result of 14 batches of YC sample

2.2.2 PCA

PCA 是一种应用广泛的数据降维处理方法,能将多个相关变量通过矩阵变换成几个不相关的综合指标来反映数据的主要特征,提取结果准确,可解释性强^[25]。以6号峰人参皂苷R_{g1}为参照峰,将14批YC样品的17个共有峰的相对峰面积数据导入SIMCA 14.1软件中进行PCA。PCA特征值与方差贡献率见表2,主成分1、2的特征值均大于1,两者累积贡献率达96%,可反映指纹图谱的共有峰信息。PCA得分图将14批YC样品分为2类(图5),与HCA结果基本一致,其中Q²为0.915(>0.5),表明模型预测能力良好。由图6可知,3、8、9、12、14~16号峰距离载荷图原点距离较远,表示对样品整体质量起主要作用。

2.2.3 Hotelling's T² 和 DModX 控制限的建立

Hotelling's T² 和 DModX 控制图用于监控不同批次的产品一致性,是2个互补的多变量分析手段。Hotelling's T² 表示的是每个选定观察点与模型平面

表2 主成分特征值与方差贡献率

Table 2 Eigenvalue and variance contribution rate of PCA

主成分	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	特征值
1	89.00	89.00	12.5
2	7.42	96.40	1.04

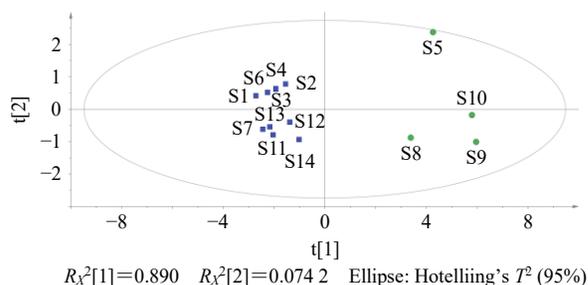


图 5 14 批 YC 样品的 PCA 得分图

Fig. 5 PCA score plot of 14 batches of YC sample

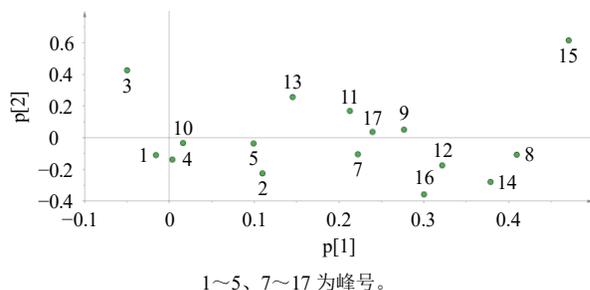


图 6 14 批 YC 样品的主成分载荷图 (6 号峰为参照峰)

Fig. 6 Loading plot of 14 batches of YC sample (peak 6 is reference peak)

中原点的距离, 为模型的内部变化度量, 代表样品中信息与主成分模型中其他样品差异; DModX 表示数据在变量 X 空间到主成分模型的距离, 为模型外部的数据变化度量, 代表样品中未被模型解释的变化。通常认为在控制限度以下的产品为正常批次产品, 超出控制限的为异常批次样品。Hotelling's T^2 和 DModX 统计量作为批间差异性评价指标, 两者具有不同的监控作用, 互为补充, 当发现某个超出或控制限的异常批次时, 在贡献图上可以分析批次过程的异常波动受哪些变量的影响^[26]。Hotelling's T^2 和 DModX 控制图见图 7、8, 图中 T_{crit}^2 (99%) 和 D_{crit} (0.05) 为控制限, 其上限分别为 15.077 和 1.653; T_{crit}^2 (95%) 为警戒限, 上限为 8.418。控制图显示, 14 批 YC 样品均在 Hotelling's T^2 和 DModX 的控制

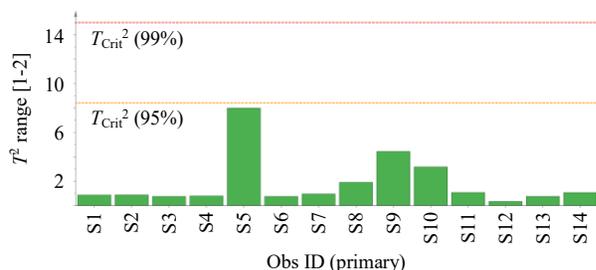


图 7 14 批 YC 样品的 Hotelling's T^2 控制图

Fig. 7 Hotelling's T^2 control chart of 14 batches of YC sample

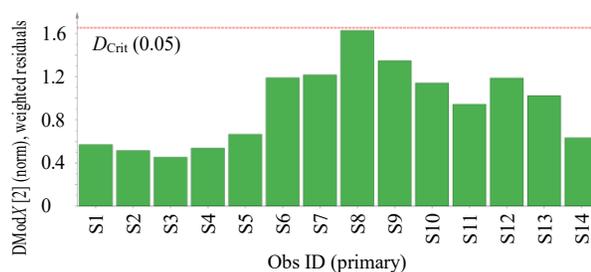


图 8 14 批 YC 样品 DModX 控制图

Fig. 8 DModX control chart of 14 batches of YC sample

限内, 为正常批次产品, 表明批间一致性良好, 所建立的 PCA 模型能较好地表征样品的正常波动。

2.3 多成分含量测定

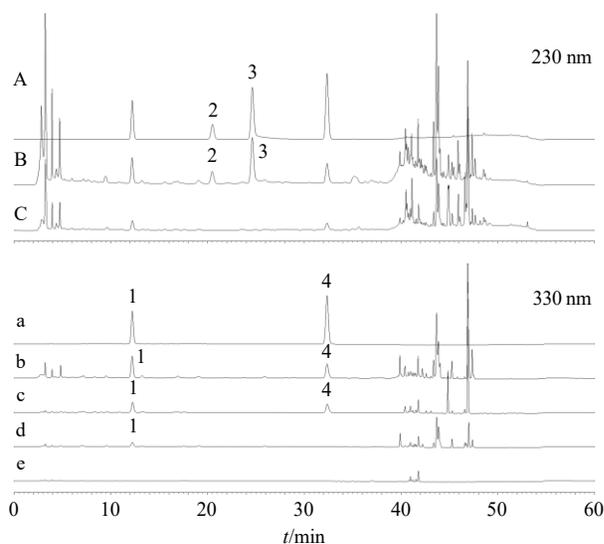
2.3.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取芍药内酯苷、芍药苷、绿原酸、阿魏酸对照品适量, 置于同一 25 mL 棕色量瓶中, 用 50% 甲醇溶解, 摇匀, 制成含芍药内酯苷 196.27 $\mu\text{g/mL}$ 、芍药苷 401.46 $\mu\text{g/mL}$ 、绿原酸 127.46 $\mu\text{g/mL}$ 、阿魏酸 93.08 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品母液。

2.3.2 供试品溶液的制备 取 YC 内容物, 研成细粉, 精密称定 0.5 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 称定质量, 超声 40 min, 放冷至室温, 补足减失的质量, 摇匀, 于 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。按 YC 制备工艺分别制备缺白芍、缺川芍、缺独活、缺川芍和独活的阴性样品, 再按前述供试品溶液制备方法制得阴性样品溶液。

2.3.3 色谱条件 色谱柱为 Agilent 5TC-C₁₈(2) 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~15 min, 12% 乙腈; 15~35 min, 12%~20% 乙腈; 35~45 min, 20%~90% 乙腈; 45~50 min, 90% 乙腈; 50~51 min, 90%~12% 乙腈; 51~60 min, 12% 乙腈; 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长 230、330 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 10 μL 。

2.3.4 系统适用性及专属性考察 分别吸取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液及空白溶剂, 在“2.3.3”项下色谱条件进样检测, 记录色谱图 (图 9)。结果表明, 供试品溶液中各色谱峰分离度良好 (分离度 > 1.5), 阴性样品溶液及空白溶剂对 YC 中 4 种成分测定无干扰, 方法专属性良好。

2.3.5 线性关系考察 精密吸取“2.5.1”项下混合对照品母液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mL, 用 50% 甲醇稀释至 10 mL, 配制成 6 种不同质量浓度的对



1-绿原酸; 2-芍药内酯苷; 3-芍药苷; 4-阿魏酸。
1-chlorogenic acid; 2-albiflorin; 3-paeoniflorin; 4-ferulic acid.

图9 混合对照品 (A, a)、YC 样品 (B, b) 及缺白芍阴性样品 (C)、缺独活阴性样品 (c)、缺川芎阴性样品 (d) 和缺独活、川芎双阴性样品 (e) 的 HPLC 图

Fig. 9 HPLC of mixed reference substances (A, a), YC sample (B, b), and negative sample without *Paeoniae Radix Alba* (C), negative sample without *Angelicae Pubescentis Radix* (c), negative sample without *Chuanxiong Rhizoma* (d) and double negative sample without *Angelicae Pubescentis Radix* and *Chuanxiong Rhizoma* (e)

照品溶液, 按“2.3.3”项下色谱条件进样检测, 以峰面积为纵坐标 (Y), 以对照品质量浓度为横坐标 (X) 绘制标准曲线, 得回归方程分别为芍药内酯苷 $Y=10\ 327 X-6\ 563$, $r=0.999\ 7$, 线性范围 $1.96\sim 196.27\ \mu\text{g/mL}$; 芍药苷 $Y=15\ 273 X-77\ 045$, $r=0.999\ 3$, 线性范围 $4.01\sim 401.46\ \mu\text{g/mL}$; 绿原酸 $Y=31\ 829 X-10\ 841$, $r=0.999\ 7$, 线性范围 $1.27\sim 127.46\ \mu\text{g/mL}$; 阿魏酸 $Y=51\ 537 X-12\ 483$, $r=0.999\ 7$, 线性范围 $0.93\sim 93.08\ \mu\text{g/mL}$; 结果表明 4 种成分在线性范围内线性关系良好。

2.3.6 精密度试验 取“2.5.1”项下混合对照品溶液, 按“2.3.3”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 分别计算芍药内酯苷、芍药苷、绿原酸、阿魏酸 4 种成分的峰面积 RSD 值, 结果依次为 0.37%、1.14%、0.23%、0.32%, 均在 2% 内, 表明仪器精密度良好。

2.3.7 稳定性试验 取 YC 样品 (S7), 按“2.3.2”项下方法制备同一份供试品溶液, 分别于室温下 0、3、6、9、16、24 h 进样检测, 计算芍药内酯苷、芍药苷、绿原酸、阿魏酸 4 个定量成分的峰面积 RSD, 结果依次为 1.26%、1.35%、1.39%、2.06%, 峰面积

的 RSD 均 $< 3\%$, 表明 24 h 内供试品溶液在室温条件下稳定。

2.3.8 重复性试验 取同一批 YC 样品 (S7), 按“2.3.2”项下方法平行制备 6 份, 进样测定, 分别计算 YC 中所含芍药内酯苷、芍药苷、绿原酸、阿魏酸的质量分数及其 RSD 值, 结果测得上述成分含量的 RSD 分别为 0.80%、0.71%、0.79%、1.44%, 表明方法重复性良好。

2.3.9 加样回收率试验 将 9 份已知待测成分含量的样品 (S7) 分为低、中、高 3 组, 每份 0.25 g, 精密称定, 3 种水平组分别加入混合对照品溶液 (含芍药内酯苷 $17.127\ \mu\text{g/mL}$ 、芍药苷 $44.059\ \mu\text{g/mL}$ 、绿原酸 $13.304\ \mu\text{g/mL}$ 、阿魏酸 $6.569\ \mu\text{g/mL}$) 0.5、1.0、1.5 mL, 再按“2.3.2”项下供试品制备方法得加样供试品溶液, 进样检测, 计算加样回收率, 得芍药内酯苷、芍药苷、绿原酸、阿魏酸的平均加样回收率分别为 103.53%、100.35%、105.11%、105.25%, RSD 分别为 1.77%、1.93%、1.71%、1.49%, 表明该方法加样回收率良好。

2.3.10 样品含量测定及评价 取 14 批 YC 样品 (S1~S14) 制备供试品溶液, 按照“2.3.3”项下色谱条件精密吸取 $10\ \mu\text{L}$ 进样检测, 计算样品中各成分的含量。14 批 YC 样品中芍药内酯苷、芍药苷、绿原酸、阿魏酸的质量分数分别为 $1.733\sim 2.853\ \text{mg/g}$ 、 $4.674\sim 8.127\ \text{mg/g}$ 、 $1.128\sim 2.417\ \text{mg/g}$ 、 $0.586\sim 1.232\ \text{mg/g}$, 提示不同批次产品中各成分的含量有所差异。为更直观体现多批次样品间定量成分含量的差异, 将 14 批 YC 样品含量测定数据导入科研绘图平台 Hiplot (<https://hiplot.com.cn/>), 选择 ward 法, 以欧氏距离为量度, 绘制含量聚类热图。14 批样品可聚为 3 类, S1~S4、S6 和 S11 聚为一类, 这 6 批样品中芍药内酯苷、芍药苷含量相对较高, 绿原酸、阿魏酸含量相对较低; S5、S8~S10 聚为一类, 这 4 批样品中阿魏酸含量相对较高; S7 和 S12~S14 聚为一类, S12~S14 这 3 批样品中绿原酸含量相对较高, 其他成分含量相对较低, 结果见图 10。批次间成分含量的差异是由于原料药材的批次不同引起。

3 讨论

3.1 指纹图谱及化学模式识别分析

本实验建立了 YC 样品的 HPLC 指纹图谱, 14 批 YC 样品确定了 17 个共有峰, 指认了 8 个成分, 14 批 YC 样品的指纹图谱与对照图谱相似度 ≥ 0.90 ,

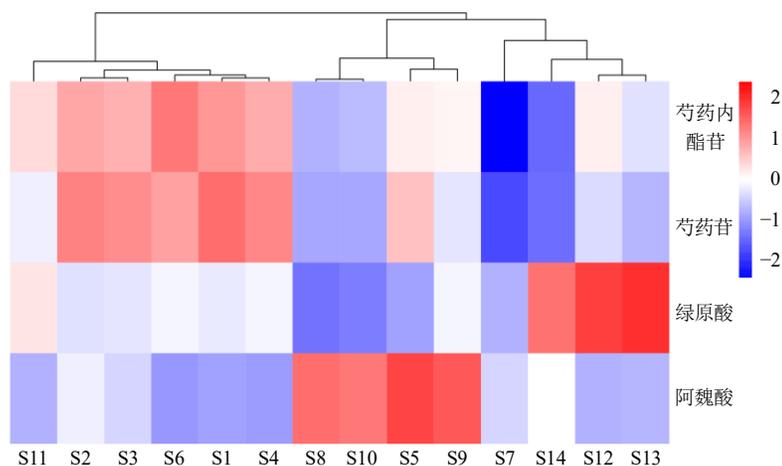


图 10 14 批 YC 样品 4 个定量成分含量的聚类热图分析

Fig. 10 Cluster heatmap analysis of four components of 14 batches of YC sample

表明各批样品一致性良好。指纹图谱实验设计对供试品制备方法进行考察, 包括提取方式(超声提取和加热回流提取), 提取溶剂(水、不同浓度的甲醇溶液和不同浓度的乙醇溶液)和提取时间(20、30、40、50 min), 根据峰数、峰形、分离度等确定最优条件为甲醇超声 40 min。指纹图谱通过结合 HCA、PCA 等指化学计量学方法分析, 14 批 YC 样品大致分为 2 类, 可能是由于不同批次的生产时间差异或不同批次间的原料药材不同造成。在 PCA 模型基础上设定 Hotelling's T^2 和 DModX 控制限, 实现批次间质量差异的监控, 提高了质控效率。几种化学计量学分析方法相互验证, 多角度、多方位挖掘指纹图谱中的信息, 寻找出共性中的差异, 探寻出内在的联系, 有利于建立更加科学全面的质量评价方法。为保证产品批间稳定性、一致性, 本课题组后续还将关注原料药材及中间工艺过程的质量控制方面。

3.2 含量测定及分析评价

本研究根据指纹图谱共有峰指认及归属情况, 选择 YC 中峰形良好的成分以及对指纹图谱共有峰贡献较大的药味, 将白芍中的芍药内酯苷、芍药苷, 川芎中的阿魏酸及川芎和独活中共有的绿原酸成分作为定量评价对象。白芍柔筋止痛, 川芎活血止痛, 独活抗炎止痛。其中选取的芍药内酯苷、芍药苷为白芍的特征性指标成分, 具有镇痛抗炎的药理作用^[27-29]; 多研究表明, 阿魏酸通常在组方中发挥抗血栓、抗炎的药理作用^[30-31], 且阿魏酸为《中国药典》药材项下规定的指标成分; 绿原酸广泛存在多种药材中, 因显著的抗炎、抗氧化活性而广为人知^[32-34], 可通过影响如 MAPK 信号通路等抑制炎症

反应。结合课题组前期的 YC 大鼠体内药物代谢动力学研究结果, 大鼠尿液中可检测到阿魏酸硫酸酯化产物, 胆汁代谢中芍药内酯苷、芍药苷为原型成分^[35], 表明该方法定量成分选择有一定合理性和可行性。含量测定实验在供试品制备方法中对提取方式(超声提取和加热回流提取), 提取溶剂(水、甲醇、75%甲醇、50%甲醇、乙醇、75%乙醇、50%乙醇)和提取时间(20、30、40、50 min)进行单因素考察, 根据峰形、分离度等选择最优条件为 50%甲醇超声 40 min。聚类热图是一种在聚合大量试验数据的基础上, 以一种渐进的蓝红色带直观的将结果展现出来的分析图, 横向对样品聚类, 聚为 3 类, 不同批次间 YC 存在含量差异, 差异的原因可能与原料药材的产地、采收年限和采收期的不同有关, 但总体差异较小。为进一步提高制剂质量, 建议对药材的相关性指标成分含量加强检测。

综上, YC 现行质量标准及质量控制方法较为低下, 本实验不同于单一指标成分的质量控制方法, 采用高效液相色谱指纹图谱定性及多成分定量的方法控制 YC 质量, 并紧密结合化学计量学对多批次产品质量评价分析, 设定控制限和警戒限以更好监测不同批次产品质量。纹图谱反映制剂整体特点, 且多成分含量测定方法可准确测定 YC 中主要成分含量, 两者结合有利于整体质量控制。此外, 中固体制剂的整体质量控制研究并不止步于指纹图谱研究和指标成分含量测定, 如溶出度也是质量控制的关键属性之一, 其在一致性评价、生物等效性等方面逐渐应用广泛^[36-37]。后续为全面提升 YC 整体质量, 课题组将开展更多相关研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 1085.
- [2] 葛敏迪, 何文全. 腰痹通胶囊联合泰普生片对腰椎终板骨软骨炎患者的临床疗效 [J]. 中成药, 2019, 41(9): 2269-2271.
- [3] 郑应, 顾里庆. 腰痹通胶囊治疗腰椎间盘突出症 60 例的临床疗效观察 [J]. 中医临床研究, 2017, 9(33): 78-79.
- [4] 隋晓辉. 腰痹通胶囊治疗腰椎间盘突出症患者的临床疗效 [J]. 中国药物经济学, 2020, 15(12): 62-65.
- [5] 葛敏迪, 何文全. 腰痹通胶囊治疗椎间盘源性腰痛临床研究 [J]. 新中医, 2019, 51(6): 190-192.
- [6] Bai S R, Li X H, Wang Z Z, *et al.* The systematic characterization of multiple components and metabolic profiling of bioactive constituents in Yaobitong capsule by UHPLC/Q-TOF-MS/MS [J]. *Anal Methods*, 2021, 13(46): 5589-5607.
- [7] 王雪晶, 宋亚玲, 罗鑫, 等. 腰痹通胶囊化学成分研究 (I) [J]. 中草药, 2018, 49(2): 288-292.
- [8] 刘瑞, 宋亚玲, 刘莉娜, 等. 腰痹通胶囊化学成分研究 (II) [J]. 中草药, 2018, 49(3): 549-553.
- [9] Shi W, Deng Y J, Zhao C Y, *et al.* Integrative serum metabolomic analysis for preventive effects of Yaobitong Capsule in adjuvant-induced rheumatoid arthritis rat based on RP/HILIC-UHPLC-Q-TOF MS [J]. *Anal Biochem*, 2022, 637: 114474.
- [10] Deng Y J, Gao X, Feng T T, *et al.* Systematically characterized mechanism of treatment for lumbar disc herniation based on Yaobitong capsule ingredient analysis in rat plasma and its network pharmacology strategy by UPLC-MS/MS [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 260: 113097.
- [11] Deng Y J, Li X H, Xiao W, *et al.* UPLC-MS/MS simultaneous determination of seven active ingredients of Yaobitong capsule in rat plasma and its integrated pharmacokinetic application [J]. *Biomed Chromatogr*, 2020, 34(9): e4866.
- [12] 代百东, 孙莉琼, 李艳静, 等. “一测多评”法测定腰痹通胶囊中 5 种皂苷类成分的含量 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(10): 2227-2232.
- [13] 斯乐婷, 倪鸿飞, 李倩, 等. HPLC-CAD 法同时测定腰痹通胶囊中 5 种皂苷含量 [J]. 药学学报, 2020, 55(10): 2449-2453.
- [14] 柳献云, 吴颖, 王琦, 等. HPLC 测定腰痹通胶囊中盐酸川芎嗪的含量 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(2): 425-427.
- [15] 陈珊珊. HPLC 法测定腰痹通胶囊中芍药苷的含量 [J]. 海峡药学, 2009, 21(7): 111-112.
- [16] 赵娟, 谢世静, 赵兴华, 等. 中药指纹图谱质控方法研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2020, 41(1): 82-86.
- [17] 余一鸣, 胡永慧, 韩立云, 等. 中药质量控制的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2557-2563.
- [18] 李强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [19] 黄博, 姚力, 林燕翔, 等. 基于指纹图谱及多指标成分定量分析的肿节风配方颗粒质量标准研究 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3058-3064.
- [20] 孙莹莹, 孙巍, 王萍, 等. 基于 UPLC 指纹图谱的逍遥片批次一致性评价研究 [J]. 中草药, 2020, 51(20): 5154-5165.
- [21] Yang L, Li Y, Hou Y F, *et al.* Multicomponent analysis of Liuwei Dihuang Pills by a single marker quantification method and chemometric discrimination of fingerprints [J]. *J Anal Methods Chem*, 2023, 2023: 6648668.
- [22] Lu P F, Chen Y, Tan M L, *et al.* Chemical profiling by LC-MS/MS and HPLC fingerprint combined with chemometrics and simultaneous determination of 16 characteristic ingredients for the quality consistency evaluation of Shaoyao-Gancao Decoction [J]. *Biomed Chromatogr*, 2019, 33(2): e4401.
- [23] 郭正红, 陈山, 何琪, 等. HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别法评价黔钩藤质量 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(3): 583-591.
- [24] 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.
- [25] 孙立丽, 王萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345.
- [26] 侯一哲, 黎翩, 肖红敏, 等. 血塞通滴丸皂苷类成分含量测定及批次一致性评价研究 [J]. 中草药, 2019, 50(11): 2552-2559.
- [27] Zhai W J, Ma Z H, Wang W J, *et al.* Paeoniflorin inhibits Rho kinase activation in joint synovial tissues of rats with collagen-induced rheumatoid arthritis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 255-259.
- [28] Chen P, Zhou J, Ruan A M, *et al.* Paeoniflorin, the main monomer component of *Paeonia lactiflora*, exhibits anti-inflammatory properties in osteoarthritis synovial inflammation [J]. *Chin J Integr Med*, 2023: 1-10.
- [29] 吴丽, 王丽丽, 侯燕, 等. 芍药苷、芍药内酯苷对原发性痛经模型小鼠的解痉镇痛作用 [J]. 环球中医药, 2018, 11(11): 1670-1674.
- [30] Choi J H, Park J K, Kim K M, *et al.* *In vitro* and *in vivo* antithrombotic and cytotoxicity effects of ferulic acid [J].

- J Biochem Mol Toxicol*, 2018, 32(1): 1-9.
- [31] Zhang D, Jing B, Chen Z N, *et al.* Ferulic acid alleviates sciatica by inhibiting peripheral sensitization through the RhoA/p38MAPK signalling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2022, 106: 154420.
- [32] Fu X H, Lyu X L, Liu H, *et al.* Chlorogenic acid inhibits BAFF expression in collagen-induced arthritis and human synovioocyte MH7A cells by modulating the activation of the NF- κ B signaling pathway [J]. *J Immunol Res*, 2019, 2019: 8042097.
- [33] Gao W Y, Wang C H, Yu L, *et al.* Chlorogenic acid attenuates dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in mice through MAPK/ERK/JNK pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 6769789.
- [34] Huang J H, Xie M X, He L, *et al.* Chlorogenic acid: A review on its mechanisms of anti-inflammation, disease treatment, and related delivery systems [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1218015.
- [35] 高霞, 耿婷, 曹雨虹, 等. 腰痹通胶囊在大鼠尿液和胆汁中主要代谢产物的鉴定 [J]. *中草药*, 2017, 48(21): 4403-4412.
- [36] 张沁怡, 孙国祥. 中药一致性评价关键问题-中药固体制剂溶出度测定方法与评价 [J]. *药学研究*, 2021, 40(5): 281-288.
- [37] 李文栋, 朱卫丰, 李哲, 等. 中药固体制剂多成分溶出研究方法进展 [J]. *中成药*, 2020, 42(7): 1842-1847.

[责任编辑 郑礼胜]