

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)24-0096-07
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.24.022



宫瘤清片质量标准研究

赵文艳, 朱法根, 刘雪, 王玲玲, 李超[△]

(济川药业集团有限公司, 江苏 泰州 225441)

摘要: **目的** 建立宫瘤清片的质量标准。**方法** 采用超高效液相色谱(UPLC)法, 色谱柱为 Agilent Extend C₁₈ RRHD 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为甲醇-0.4% 磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 0.3 mL/min, 检测波长为 220 nm(0~15 min)、250 nm(15~42 min), 柱温为 30 °C, 进样量为 1 μL。将 UPLC 图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)建立宫瘤清片的指纹图谱, 计算相似度; 确定共有峰并指认; 并通过聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)和偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)进行化学模式识别; 测定 6 个指标成分的含量。**结果** 21 批样品的指纹图谱有 23 个共有峰, 指认了 6 个指标成分, 分别为苦杏仁苷、芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、甘草酸铵、大黄酚; 相似度为 0.939~0.996。CA 可将样品聚为 3 类; PCA 提取了 4 个主成分, 累计方差贡献率为 92.686%; PLS-DA 筛选出 11 个差异化合物。含量测定中, 前述 6 个成分质量浓度在相应范围内与峰面积线性关系良好; 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 3.0%; 平均加样回收率为 91.24%~104.11%, RSD 为 0.35%~1.95%(n=6)。**结论** 该制剂中大黄酚为主要差异性成分; 建立的方法操作简便、结果准确可靠, 可为宫瘤清片的质量控制提供依据。

关键词: 宫瘤清片; 超高效液相色谱法; 指纹图谱; 化学模式识别; 质量控制

Study on Quality Standard for Gongliuqing Tablets

ZHAO Wenyan, ZHU Fagen, LIU Xue, WANG Lingling, LI Chao

(Jumpan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Taizhou, Jiangsu, China 225441)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Gongliuqing Tablets. **Methods** The ultra-high-performance liquid chromatography (UPLC) method was adopted; the chromatographic column was the Agilent Extend C₁₈ RRHD column (100 mm ×

第一作者: 赵文艳, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为中药新药研发, (电子信箱)zhaowenyan@jumpan.com。

[△]通信作者: 李超, 男, 在读博士, 副主任中药师, 研究方向为中药新药研发, (电子信箱)lichao@jumpan.com。

仅在部分提取介质中有检出), 检出率较高(75.00%)。表明若药用胶塞中添加有对特辛基苯酚, 在胶塞与药品长期接触下, 极有可能会迁移至药品中, 且本研究中检测结果显示, 对特辛基苯酚在碱性及高弱极性有机相介质下更易浸出。提示药品生产企业应根据药品的 pH、成分、性质、给药途径等多角度选择包装材料, 以保证其用药安全及产品质量。

3.4 方法评价

综上所述, 本研究中所建方法简单高效, 灵敏度、准确度高, 能快速检测药用胶塞中对特辛基苯酚的含量, 从而为药品包装材料与药品相容性试验中对特辛基苯酚在不同介质中浸出量的测定提供一种简便的检测方法。

参考文献

- [1] 国家药品监督管理局. 关于发布化学药品与弹性体密封件相容性研究技术指导原则(试行)的通告[A/OL]. (2018-04-16)[2023-11-07]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ypggtg/ypqgtgtg/20180426165301393.html>.
- [2] 李利根, 吴莹, 张毅兰. 药用胶塞硫化剂对叔辛基苯酚甲醚树脂中对叔辛基苯酚的测定[J]. 中国医药工业杂志, 2016, 47(5): 614-617.
- [3] 辜倩, 汪元亮, 熊马剑, 等. 高效液相色谱法测定不同硫

化体系药用胶塞中的硫化剂及促进剂[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(2): 305-313.

- [4] 赵杰. GC-MS 法测定塑料中对特辛基苯酚残留量[J]. 塑料, 2017, 46(4): 125-128.
- [5] 林谦, 郑仲龙, 黄迪慧. 基于钼镍双金属有机骨架电化学传感器检测食品包装中对特辛基苯酚[J]. 食品质量安全检测学报, 2023, 14(19): 89-106.
- [6] 朱靖涵, 薛娇, 张爱茜. 对特辛基苯酚干扰雌激素受体作用的分子基础及其对 ERβ 亚型选择性结合的理论研究[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(2): 194-200.
- [7] 吕小红, 周雅山. 塑料产品中对特辛基苯酚的测试[J]. 化学工程与装备, 2003(8): 209-210.
- [8] 成婕, 张罗红, 江燕, 等. 药用胶塞常用抗氧化剂及可提取硫含量测定方法[J]. 包装工程, 2023, 44(3): 80-86.
- [9] 国家药品监督管理局. 关于印发化学药品注射剂与塑料包装材料相容性研究技术指导原则(试行)的通知[A/OL]. (2012-09-07)[2023-11-07]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/gfwj/gzwj/gzwjyp/20120907093801278.html>.
- [10] 任清庆, 保琦蓓, 傅科杰, 等. 高效液相色谱法测定纺织品中 3 种短链对特辛基苯酚乙氧基化物[J]. 理化检验(化学分册), 2017, 53(9): 1002-1008.
- [11] GB/T 33611-2017, 纺织品 短链对特辛基苯酚乙氧基化物的测定[S].

(收稿日期: 2023-11-16; 修回日期: 2024-09-26)

2.1 mm, 1.8 μm), the mobile phase was methanol - 0.4% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 0.3 mL / min, the detection wavelengths were 220 nm (0 - 15 min) and 250 nm (15 - 42 min), the column temperature was 30 $^{\circ}\text{C}$, and the injection volume was 1 μL . The UPLC chromatograms were imported into the similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (version 2012) to establish the fingerprint of Gongliuqing Tablets, the similarity was calculated, the common peaks were marked and identified; the chemical pattern recognition was performed through cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA), and partial least squares - discriminant analysis (PLS - DA); and the contents of six indicator components were determined. **Results** There were 23 common peaks in the fingerprint of 21 batches of samples, and six indicator components were identified, namely amygdalin, paeoniflorin, hesperidin, baicalin, ammonium glycyrrhizinate and chrysophanol; the similarity was in the range of 0.939 to 0.996. The samples were grouped into three categories by the CA; four principal components were extracted by the PCA, with a cumulative variance contribution rate of 92.686%; 11 differential compounds were screened by the PLS - DA. In the content determination, the mass concentration of the above six components had a good linear relationship with the peak area within the corresponding range; the RSDs of precision, stability and repeatability tests were lower than 3.0%; the recovery rates of the above six components were in the range of 91.24% to 104.11%, with the RSDs of 0.35% to 1.95% ($n = 6$). **Conclusion** Chrysophanol was the main differential component in this preparation. The established method is easy, accurate and reliable, which can provide a basis for quality control of Gongliuqing Tablets.

Key words: Gongliuqing Tablets; UPLC; fingerprint; chemical pattern recognition; quality control

宫瘤清片收载于2020年版《中国药典(一部)》,其由熟大黄、土鳖虫、水蛭、桃仁、黄芩等11味中药组方,有活血逐瘀、消癥破积等功效,用于瘀血内停所致妇女癥瘕,证见小腹胀痛、经色紫黯有块、经行不爽;子宫肌瘤见上述症状者^[1]。方中君药熟大黄具有逐瘀攻下、凉血清热功效;臣药桃仁可活血祛瘀、润肠通便、止咳平喘;佐药黄芩可清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎;使药甘草能和中补益,调和诸药。该制剂质量分析方面的研究较少,相关文献^[2-3]主要集中在大黄酚、大黄素、苦杏仁苷、黄芩苷等指标成分的研究,但目前尚未见指纹图谱、多成分定量与化学模式识别相结合用于宫瘤清片质量评价的研究,而上述研究模式已广泛应用于中药及中药制剂的质量评价^[4-10]。本研究中采用超高效液相色谱(UPLC)法建立了宫瘤清片的指纹图谱,并建立了以处方中6个指标成分含量为评价指标的分析方法。通过聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)和偏最小二乘法判别分析(PLS - DA)法^[11-13],对不同批次间的差异进行分析,为宫瘤清片的质量评价提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Vanquish超高效液相色谱仪,配有二极管阵列检测器和Chromleon 7.2SR5色谱软件(赛默飞世尔科技有限公司);MCA10 - 6S - 2CCN - M型电子天平(德国Sartorius公司,精度为1 mg);电热恒温水浴锅(上海索谱仪器有限公司);Arium®Pro超纯水仪(德国Sartorius公司)等。

1.2 试药

对照品苦杏仁苷(批号为110820 - 202109,含量93.1%),芍药苷(批号为110736 - 202246,含量96.7%),橙皮苷(批号为110721 - 202220,含量97.2%),黄芩苷(批号为110715 - 202223,含量

97.2%), 大黄酚(批号为110796 - 201922,含量99.4%), 甘草酸铵(批号为110731 - 202122,含量94.4%),均购自中国食品药品检定研究院;宫瘤清片(陕西东科制药有限责任公司,样品信息见表1);甲醇为色谱纯,磷酸为优级纯,水为超纯水。

表1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	批号	编号	批号	编号	批号
S1	20210701	S8	20220101	S15	20220303
S2	20210702	S9	20220102	S16	20220304
S3	20210901	S10	20220201	S17	20220305
S4	20210902	S11	20220202	S18	20220309
S5	20211101	S12	20220203	S19	20220310
S6	20211201	S13	20220301	S20	20220311
S7	20211202	S14	20220302	S21	20220306

2 方法与结果

2.1 指纹图谱建立

2.1.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Extend C₁₈ RRHD 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 甲醇(A) - 0.4% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 2.3 min 时 18%A → 25%A, 2.3 ~ 7 min 时 25%A → 36%A, 7 ~ 11 min 时 36%A, 11 ~ 15 min 时 36%A → 42%A, 15 ~ 21 min 时 42%A → 60%A, 21 ~ 30 min 时 60%A → 70%A, 30 ~ 36 min 时 70%A → 95%A, 36 ~ 42 min 时 95%A); 流速: 0.3 mL/min; 检测波长: 220 nm(0 ~ 15 min)、250 nm(15 ~ 42 min); 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 1 μL 。

2.1.2 溶液制备

分别称取苦杏仁苷、芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、甘草酸铵、大黄酚对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL 含苦杏仁苷 225 μg 、芍药苷 225 μg 、橙皮苷 125 μg 、黄

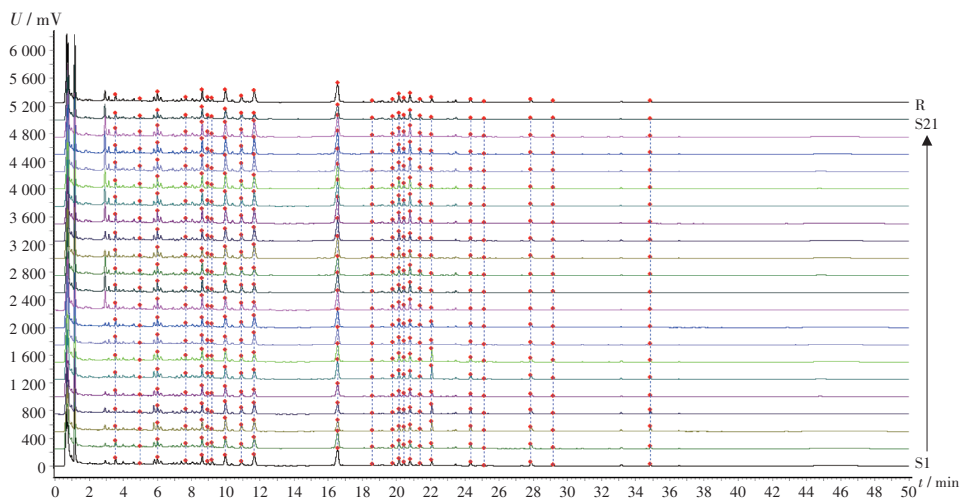


图1 21批宫瘤清片超高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig.1 UPLC chromatogram superimposed fingerprint of 21 batches of Gongliuqing Tablets

芩苢 600 μg 、甘草酸铵 70 μg 、大黄酚 5 μg 的混合对照品溶液,即得混合对照品溶液。取样品,除去包衣,研细,取约 2 g,精密称定,置 250 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 50 mL,密塞,称定质量,加热回流 20 min,放冷,再次称定质量,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.1.3 方法学考察

精密度试验:取样品(S21)适量,精密称定,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,以黄芩苷峰为参照峰(稳定性、重复性试验同),计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果的 *RSD* 分别为 0.06% ~ 0.11% 和 0.35% ~ 2.12% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

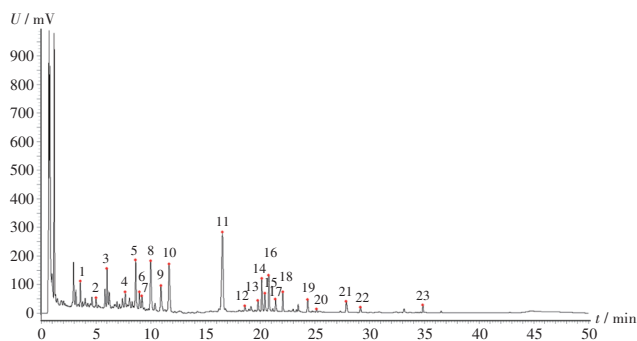
稳定性试验:取供试品(S21)溶液适量,分别于室温放置 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48 h 时按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果的 *RSD* 分别为 0.10% ~ 0.56% 和 0.42% ~ 3.96% ($n=10$),表明供试品溶液室温放置 48 h 内基本稳定。

重复性试验:取样品(S21)适量,精密称定,按 2.1.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果的 *RSD* 分别为 0.09% ~ 1.38% 和 1.05% ~ 2.27% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.1.4 指纹图谱建立及相似度评价

取 21 批样品,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)。选取 S1 样品图谱为参照图谱,时间窗宽度为 0.1 min,采用中位数法,通过多点校正,Mark 峰匹配,生成 21 批样品的 UPLC 叠加指纹图谱(见图 1)及其对照指纹图谱(见图 2)。计算 S1 - S21 指纹图谱与对照指纹图谱的相似度,结果分别为

0.993, 0.993, 0.939, 0.943, 0.990, 0.981, 0.979, 0.992, 0.996, 0.987, 0.983, 0.987, 0.990, 0.993, 0.994, 0.994, 0.996, 0.993, 0.995, 0.993, 0.980, 均大于 0.90, 表明 21 批样品相似度较高,质量较稳定。



1. 苦杏仁苷 3. 芍药苷 10. 橙皮苷 11. 黄芩苷
22. 甘草酸铵 23. 大黄酚

图2 宫瘤清片超高效液相色谱对照指纹图谱

1. Amygdalin 3. Paeoniflorin 10. Hesperidin 11. Baicalin
22. Ammonium glycyrrhizinate 23. Chrysophanol

Fig.2 UPLC chromatogram reference fingerprint of Gongliuqing Tablets

2.1.5 共有峰指认

样品指纹图谱中共标定 23 个共有峰,通过与混合对照品溶液图谱(见图 3)比对,指认出 6 个色谱峰的成分,分别为苦杏仁苷(峰 1)、芍药苷(峰 3)、橙皮苷(峰 10)、黄芩苷(峰 11)、甘草酸铵(峰 22)、大黄酚(峰 23)。

2.2 化学模式识别

CA:将 21 批样品指纹图谱的 23 个共有峰峰面积导入 SPSS 25.0 软件,将数据 *Z* - Score 标准化处理后采用瓦尔德法、平方欧式距离法进行系统聚类分析,并绘制树状图(见图 4)。结果显示,当平方欧氏距离为 8 时,21 批样品可聚为 3 类,第 1 类为样品 S1 - S2、S5、S8 - S9、S13 - S14、S21,第 2 类为样品 S3 - S4、S6 - S7,第 3 类为样品 S10 - S12、S15 - S20。提示 21 批样品的化学成分

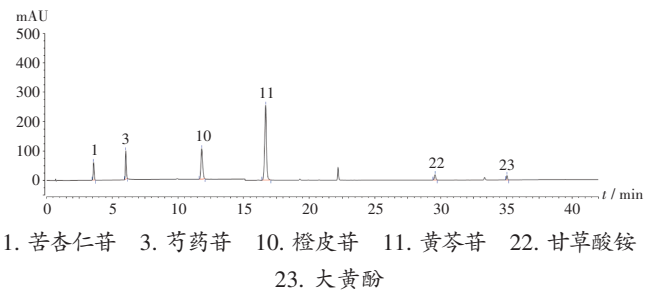


图3 混合对照品溶液超高效液相色谱图

1. Amygdalin 3. Paeoniflorin 10. Hesperidin 11. Baicalin
22. Ammonium glycyrrhizinate 23. Chrysophanol

Fig.3 UPLC chromatogram of the mixed reference solution

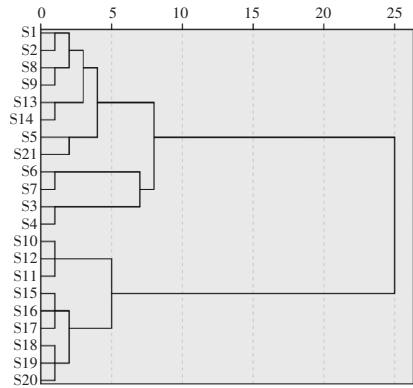


图4 聚类分析树状图

Fig.4 Dendrogram of CA

分含量存在一定差异。

PCA:以对照指纹图谱中23个共有峰的峰面积为变量,得到 21×23 阶数据矩阵,导入SPSS 25.0统计软件,对数据Z-Score标准化处理后进行PCA,以特征值 >1 为标准,提取得到4个主成分,累计方差贡献率为92.686%,详见表2。表明4个主成分可代表样品指纹图谱中23个共有峰的主要信息,且主成分1的特征值最大,涵盖信息最多。进一步采用SIMCA-14.1软件,以主成分1和主成分2为坐标轴构建PCA得分散点图,结果21批样品可被分为3类(见图5),与CA分析结果完全一致。因子载荷矩阵见表3。色谱峰1-6、8-9、11-17、22,色谱峰18-21、23,色谱峰7,色谱峰10,分别在主成分1-4中有较高载荷。表明4个主成分可代表对照指纹图谱中23个共有峰的主要信息。

PLS-DA:将对照指纹图谱中23个共有峰的峰面

表2 宫瘤清片样品PCA特征值及方差贡献率

Tab.2 Eigenvalue and variance contribution rate of the PCA for Gongliuqing Tablets

主成分	特征值	方差贡献率(%)	累计方差贡献率(%)
1	12.407	53.942	53.942
2	3.841	16.699	70.641
3	2.983	12.967	83.608
4	2.088	9.077	92.686

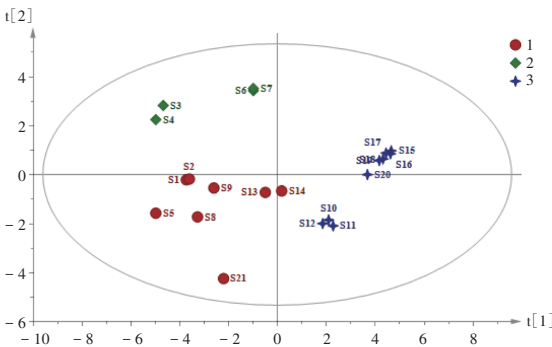


图5 主成分分析图

Fig.5 PCA diagram

表3 PCA因子载荷矩阵

Tab.3 Factor loading matrix of the PCA for Gongliuqing Tablets

峰号	主成分				峰号	主成分			
	1	2	3	4		1	2	3	4
1	0.812	-0.155	0.412	-0.341	13	0.822	-0.268	0.282	0.334
2	0.865	-0.273	-0.359	-0.059	14	0.799	0.195	0.541	-0.116
3	0.924	-0.03	0.095	-0.252	15	0.82	0.313	-0.344	0.264
4	0.829	0.355	-0.363	0.193	16	0.907	0.002	-0.303	0.186
5	0.666	-0.143	-0.342	0.530	17	0.811	-0.056	-0.264	0.326
6	0.889	0.32	0.221	-0.109	18	-0.532	0.746	0.004	0.329
7	-0.153	0.319	0.765	0.435	19	-0.636	0.737	0.048	0.014
8	0.771	0.408	-0.194	-0.396	20	0.436	0.748	-0.273	-0.085
9	0.825	0.232	-0.439	-0.139	21	-0.674	0.678	0.190	-0.007
10	0.457	0.331	0.140	-0.715	22	0.649	0.426	0.295	0.419
11	0.882	-0.026	0.436	-0.136	23	-0.461	0.682	-0.445	-0.162
12	0.713	0.288	0.549	0.164					

积导入SIMCA-14.1软件,进行PLS-DA分析,得到的模型质量参数 R^2X 为0.975, R^2Y 为0.986,预测能力参数 Q^2 为0.908(这些指标 >0.5 表示模型较可信,且越接近1说明模型的拟合效果越好,见图6)。可见,建立的模型预测效果较好。且21批样品也可分为3类,与CA和PCA分析结果一致。模型验证(经200次置换检验)结果见图7。可知, R^2 和 Q^2 截距值分别为0.445和-0.981,左侧 R^2 和 Q^2 值均低于右侧值,且 Q^2 的回归线截距小于0,说明建立的PLS-DA模型未出现过拟合现象,预测能力较好。变量重要性投影(VIP)结果见图8,以VIP >1 为标准,共得到11个贡献度较大的差异成分,依次为色谱峰18、20、23、4、15、19、9、21、1、2、16,说明这11个成分可能为引起宫瘤清片差异的主要成分。

2.3 含量测定

2.3.1 溶液制备

称取苦杏仁苷、橙皮苷、甘草酸铵、大黄酚对照品各适量,精密称定,分别用甲醇溶解,摇匀,即得混合对照品溶液I、对照品溶液II、对照品溶液III;称取黄芩苷、芍药苷对照品各适量,精密称定,分别精密移取3种对照品溶液,置同一容量瓶中,用甲醇溶解,制得含苦

杏仁苷 410.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、芍药苷 432.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、橙皮苷 246.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、黄芩苷 1224 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、甘草酸铵 107.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、大黄酚 10.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液Ⅳ。按宫瘤清片处方比例及制备工艺,分别制备缺桃仁、白芍、熟大黄、枳实、黄芩、甘草的单一阴性样品,按供试品溶液制备方法制备成单一阴性对照品溶液。

2.3.2 方法学考察

专属性考察:取2.1.2项下供试品溶液及2.3.1项下混合对照品溶液Ⅳ、单一阴性对照品溶液各适量,分别按

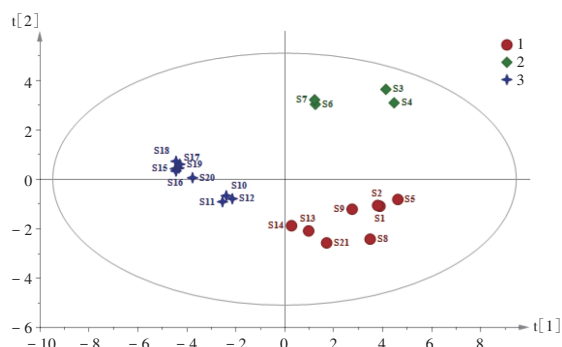


图6 21批宫瘤清片样品PLS-DA得分图

Fig. 6 PLS-DA scoring plot of 21 batches of Gongliuqing Tablets

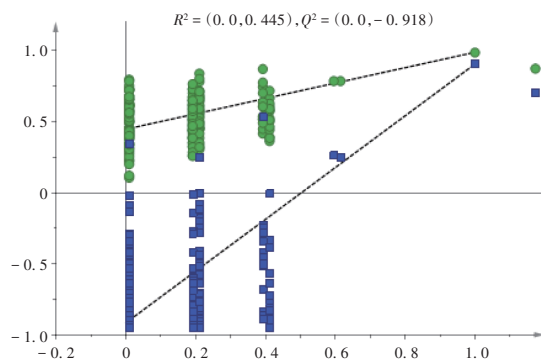
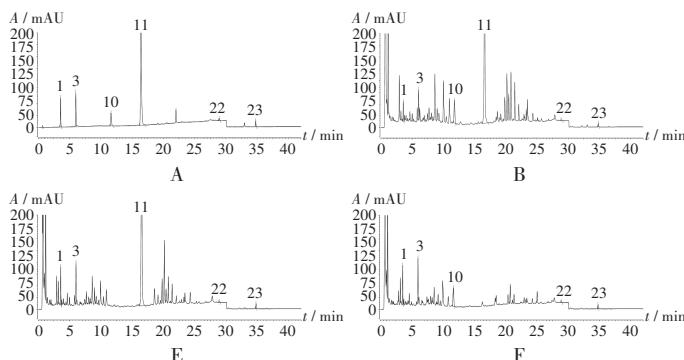


图7 PLS-DA模型验证

Fig. 7 Verification of PLS-DA model



1. 苦杏仁苷 3. 芍药苷 10. 橙皮苷 11. 黄芩苷 22. 甘草酸铵 23. 大黄酚

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C-H. 阴性对照品溶液(分别缺桃仁、白芍、枳实、黄芩、甘草、熟大黄)

图9 超高效液相色谱图

1. Amygdalin 3. Paeoniflorin 10. Hesperidin 11. Baicalin 22. Ammonium glycyrrhizinate 23. Chrysophanol

A. Mixed reference solution B. Test solution C-H. Negative reference solution (lacking Persicae Semen, Paeoniae Radix Alba, Aurantii Fructus Immaturus, Scutellariae Radix, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, Prepared Rhei Radix et Rhizoma respectively)

Fig. 9 UPLC chromatograms

2.1.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,结果阴性对照无干扰,表明专属性良好。详见图9。

线性关系考察:精密吸取2.3.1项下混合对照品溶液Ⅳ,逐级稀释,得系列质量浓度混合对照品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样,记录色谱图。以各待测成分质量浓度($X, \mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表4。

精密度试验:分别精密吸取同一混合对照品溶液1 μL ,按2.1.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果苦杏仁苷、芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、甘草酸铵、大黄酚峰面积的RSD分别为0.42%,0.43%,0.34%,0.23%,0.50%,0.62%($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:称取供试品(S21)溶液,分别于室温放置0,2,4,6,8,12,24,36,48 h按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果苦杏仁苷、芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、甘草酸铵、大黄酚峰面积的RSD分别为0.46%,2.58%,1.06%,0.68%,0.55%,0.65%($n=9$),表明供试品溶液室温放置48 h内基本稳定。

重复性试验:称取同一批(S21)样品6份,精密称定,按2.1.2项下方法平行制备6份供试品溶液,按

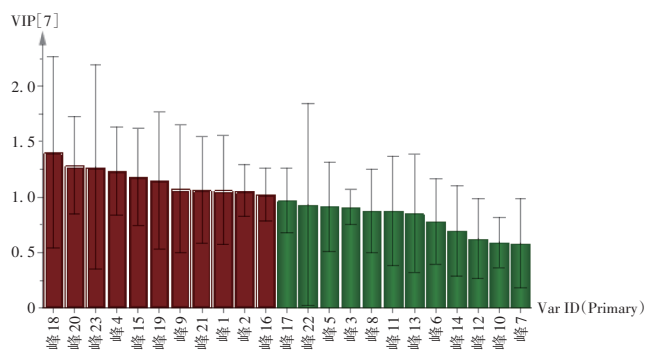


图8 样品PLS-DA的VIP值图

Fig. 8 VIP plot of the PLS-DA of samples

表 4 线性关系考察结果

Tab. 4 Results of the linear relation test

待测成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围(μg/mL)
苦杏仁苷	$Y_1 = 0.0258X_1 + 0.028$	0.9998	82.10~410.5
芍药苷	$Y_2 = 0.0442X_2 + 0.0661$	0.9997	86.51~432.6
橙皮苷	$Y_3 = 0.1337X_3 + 0.067$	0.9998	49.27~246.3
黄芩苷	$Y_4 = 0.0692X_4 - 0.0762$	0.9997	244.9~1224
甘草酸铵	$Y_5 = 0.0432X_5 + 0.0383$	0.9997	21.48~107.4
大黄酚	$Y_6 = 0.2428X_6 - 0.0156$	0.9996	2.062~10.31

2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以外标法计算6个成分的含量。结果苦杏仁苷、芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、甘草酸铵、大黄酚的平均含量分别为7.38, 5.61, 3.31, 16.17, 1.44, 0.14 mg/g, RSD 分别为0.72%、2.17%、0.85%、0.82%、0.99%、0.73%(*n* = 6),表明方法重复性良好。

加样回收试验:称取同一批样品(S21)9份,每份约1 g,精密称定,分别精密加入苦杏仁苷、芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、甘草酸铵、大黄酚对照品适量,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算回收率。结果见表5。

2.3.3 样品含量测定结果

取21批样品,精密称定,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以外标法分别计算6个成分含量,结果见表6。可见,6个成分不同批次样品含量有差异。将含量测定结果依据PLS-DA分组情况导入SPSS 25.0统计学软件进行分组含量测定与分析,结果见表7。可见,不同批次样品中大黄酚、芍药苷、黄芩苷含量存在差异。结合PLS-DA模型中VIP筛选的差异成分,最终确定大黄酚为不同批次样品的主要差异性成分。

3 讨论

宫瘤清片化学成分复杂,前期研究中先采用高效液相色谱(HPLC)法建立指纹图谱,分别考察了色谱条件(包括不同仪器品牌、色谱柱、流动相体系、梯度洗脱比例)及供试品溶液制备方法(包括不同提取溶剂、提取方式、提取时间),虽然确定检测条件,但分析时间过长。鉴于UPLC分离度高、检测时间短^[14],将HPLC方法转换成UPLC,并分别考察了色谱柱、不同品牌仪器、梯度洗脱比例,通过方法学验证确定了UPLC指纹图谱方法;对指认的6个成分进行方法学验证,最终建立了在短时间内实现指纹图谱和多成分定量检测的方法。

相似度评价结果表明,不同批次样品间的成分差异较小,质量较稳定;化学模式识别分析结果显示,CA、PCA和PLS-DA均可将21批样品分为3类;CA结果显示,4个主成分累计方差贡献率>90%,可综合反映宫瘤清片的质量;PLS-DA找出11个贡献度较大的差异

表 5 加样回收试验结果(*n* = 6)

Tab. 5 Results of the recovery test (*n* = 6)

待测成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
苦杏仁苷	3.866	3.433	7.098	94.15	96.05	1.81
	3.844	3.448	7.097	94.34		
	3.813	3.370	7.119	98.10		
	3.942	3.401	7.279	98.12		
	3.942	3.414	7.212	95.78		
	3.941	3.406	7.204	95.80		
芍药苷	2.939	2.611	5.412	94.71	93.57	1.95
	2.922	2.686	5.383	91.62		
	2.899	2.700	5.394	92.41		
	2.997	2.573	5.484	96.66		
	2.997	2.597	5.407	92.80		
	2.996	2.611	5.430	93.22		
橙皮苷	1.734	1.579	3.351	102.41	103.41	1.05
	1.724	1.579	3.351	103.04		
	1.710	1.579	3.365	104.81		
	1.768	1.579	3.422	104.75		
	1.768	1.579	3.390	102.72		
	1.768	1.579	3.390	102.72		
黄芩苷	8.471	8.009	16.635	101.94	102.82	0.51
	8.421	8.001	16.664	103.02		
	8.355	8.042	16.676	103.47		
	8.638	7.894	16.771	103.03		
	8.638	7.883	16.722	102.55		
	8.635	7.956	16.824	102.93		
甘草酸铵	0.754	0.677	1.456	103.69	104.11	0.35
	0.750	0.677	1.456	104.28		
	0.744	0.677	1.453	104.73		
	0.769	0.677	1.472	103.84		
	0.769	0.677	1.474	104.14		
	0.769	0.677	1.473	103.99		
大黄酚	0.073	0.078	0.144	91.03	91.24	1.64
	0.073	0.078	0.145	92.31		
	0.072	0.078	0.141	88.46		
	0.075	0.078	0.146	91.03		
	0.075	0.078	0.147	92.31		
	0.075	0.078	0.147	92.31		

成分;根据样品分批、分组含量测定结果,结合VIP筛选结果,确定大黄酚为不同批次间样品的主要差异性成分。

中药材质量差异通过制剂生产过程中量质传递过程传递至处方药味、中间体及成品^[15-16],而大黄酚为制剂处方中熟大黄的指标成分,可通过控制熟大黄饮片质量,降低制剂批间质量差异性,从而确保临床疗效。

表 6 21 批样品含量测定结果(mg / g)

Tab. 6 Results of the content determination of six components in 21 batches of samples (mg / g)

批号	苦杏仁苷	芍药苷	橙皮苷	黄芩苷	甘草酸铵	大黄酚	批号	苦杏仁苷	芍药苷	橙皮苷	黄芩苷	甘草酸铵	大黄酚
20210701	6.08	3.72	4.32	13.33	1.40	0.25	20220203	6.13	5.16	2.99	14.62	0.68	0.12
20210702	6.10	3.74	4.30	13.19	1.39	0.25	20220301	12.48	5.76	8.90	17.04	1.28	0.16
20210901	7.12	4.16	7.62	7.93	1.03	0.57	20220302	12.56	5.92	8.80	17.87	1.27	0.16
20210902	7.05	4.15	6.90	7.86	1.01	0.55	20220303	13.44	6.31	8.60	20.78	1.33	0.19
20211101	4.87	3.38	2.68	9.15	0.98	0.18	20220304	13.36	6.29	8.58	20.56	1.32	0.19
20211201	9.53	4.61	5.89	14.41	1.59	0.25	20220305	13.43	6.23	9.06	20.64	1.33	0.21
20211202	13.72	4.28	3.35	13.72	1.40	0.25	20220309	13.28	5.97	11.12	17.80	1.33	0.19
20220101	11.43	5.11	8.00	14.12	1.07	0.11	20220310	13.26	5.99	10.35	17.83	1.32	0.19
20220102	6.58	4.71	4.64	13.98	0.83	0.15	20220311	13.18	6.04	11.01	17.75	1.31	0.17
20220201	6.24	5.27	3.02	14.80	0.68	0.12	20220306	6.92	5.88	3.08	16.97	1.34	0.14
20220202	10.91	5.90	4.87	15.68	1.29	0.11							

表 7 3 组样品含量测定结果($\bar{X} \pm s$, mg / g)

Tab. 7 Results of the content determination of six components in three groups of samples ($\bar{X} \pm s$, mg / g)

组别	苦杏仁苷	大黄酚	芍药苷	橙皮苷	黄芩苷	甘草酸铵
1	8.377 5 ± 3.201 9	0.175 0 ± 0.050 4**	4.777 5 ± 1.052 1	5.590 0 ± 2.563 9	14.456 2 ± 2.828 8	1.195 0 ± 0.210 1
2	9.355 0 ± 3.130 1	0.405 0 ± 0.179 2	4.300 0 ± 0.214 9	5.940 0 ± 1.866 8	10.980 0 ± 3.573 5	1.257 5 ± 0.285 1
3	11.470 0 ± 3.100 0	0.165 6 ± 0.038 1**	5.906 7 ± 0.419 2***	7.733 3 ± 3.263 3	17.828 9 ± 2.453 7***	1.176 7 ± 0.281 9

注:与第 2 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与第 1 组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

Note:Compared with those in the group two,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$. Compared with those in the group one,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$.

本研究中建立了宫瘤清片 UPLC 指纹图谱和同时测定 6 个指标成分含量的 UPLC 法,该方法科学准确,简便可行,能同时定性、定量,为该制剂的质量控制和研究奠定了基础;同时,结合化学模式识别分析检测数据,筛选出大黄酚是影响宫瘤清片的主要差异性成分。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2020:1408-1409.

[2] 王鼎峰,胡冰. HPLC 法测定宫瘤清片中苦杏仁苷、黄芩苷的含量[J]. 海峡药学,2014,26(5):40-43.

[3] 戴希希. 采用 HPLC 法同时测定宫瘤清颗粒中大黄素、大黄酚的含量[J]. 当代医学,2016,22(6):153-155.

[4] 赵晨曦. 中药复方制剂指纹图谱质量评价研究进展[J]. 临床医药文献电子杂志,2019,6(A2):194.

[5] 尹燕,王森,阳志强,等. 化学模式识别在中药炮制中的应用[J]. 中草药,2021,52(17):9.

[6] 于密密,范妙璇,李铮,等. 高效液相色谱法指纹图谱结合化学模式识别的小金制剂质量研究[J]. 世界中医药,2023,18(18):2565-2570.

[7] 刘天亮,杨林林,董诚明,等. 基于化学模式识别的不同产地金银花 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药,2022,53(15):4833-4843.

[8] 闫凯莉,尹程程,刘梦瑶,等. 芩连润肺汤的 HPLC 指纹图谱建立、含量测定及多元统计分析[J]. 中国药房,2021,32(16):1956-1963.

[9] 李林杰,谢谭芳,王昱涵,等. 壮药金母颗粒的指纹图谱建立,化学计量学分析及多组分含量测定[J]. 中国药房,2022,33(4):439-445.

[10] 汤良杰,罗伟,袁建丹,等. 野鸦椿与圆齿野鸦椿 HPLC 指纹图谱比较研究[J]. 中药材,2022,45(6):1394-1399.

[11] WU Q, GU HW, YIN XL, et al. Development of an HPLC - DAD method combined with chemometrics for differentiating geographical origins of Chinese red wines on the basis of phenolic compounds[J]. Food Analytical Methods, 2021, 14: 1895-1907.

[12] PENG TQ, YIN XL, GU HW, et al. HPLC - DAD fingerprints combined with chemometric techniques for the authentication of plucking seasons of Laoshan green tea[J]. Food Chemistry, 2021, 347:128959.

[13] LONG WJ, WU HL, WANG T, et al. Fast identification of the geographical origin of Gastrodia elata using excitation - emission matrix fluorescence and chemometric methods[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2021, 258:119798.

[14] 咎丹娅. 超高效液相色谱法在药物分析中的应用进展[J]. 临床医药文献电子杂志,2019,6(38):187-188.

[15] 屠鹏飞,姜勇,何轶,等. 中药材和饮片质量控制与质量标准体系的构建[J]. 中国食品药品监管,2022(10):12.

[16] 刘思燧,蔡毅,于江泳,等. 论中药质量控制的传承与创新[J]. 中国食品药品监管,2021(9):3-9.

(收稿日期:2023-12-16;修回日期:2024-09-21)