

[科研报道]

正骨 3 号片 HPLC 指纹图谱建立及 5 种成分含量测定

韦玉燕， 杨慧瑜， 虞达欢， 范卫锋， 蒙玉玲， 杨 晴， 吴勇梅*
(玉林市中西医结合骨科医院，广西 玉林 537000)

摘要：目的 建立正骨 3 号片 HPLC 指纹图谱，并测定新绿原酸、马钱苷酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、川续断皂苷 VI 的含量。方法 分析采用 Shim-pack CP-ODS 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相乙腈-0.1% 磷酸，梯度洗脱；柱温 30 ℃；检测波长 212、245 nm。再进行聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘分析。结果 16 批样品指纹图谱中有 14 个共有峰，其中 5 个被指认出，相似度大于 0.9。5 种成分在各自范围内线性关系良好 ($r \geq 0.999\ 0$)，平均加样回收率 96.46%~102.08%，RSD 1.33%~3.09%。各批样品聚为 2 类，2 个主成分累积方差贡献率为 82.220%，川续断皂苷 VI、马钱苷酸、隐绿原酸为质量差异标志物。结论 该方法稳定可靠，可用于正骨 3 号片的质量控制。
关键词：正骨 3 号片；HPLC 指纹图谱；化学成分；含量测定；聚类分析；主成分分析；正交偏最小二乘分析
中图分类号：R927.2 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2025)11-3732-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.11.029

正骨 3 号片为玉林市中西医结合骨科医院院内制剂，由续断、五加皮、杜仲、牛膝、千斤拔等药材组成，具有舒筋活络、强筋壮骨功效，用于治疗跌打损伤、骨折后期，是本院用于骨折治疗的要药，被纳入广西壮族自治区医疗机构“桂制剂”目录。但该制剂现行质量标准自注册以来未进行修订，仅有性状、理化鉴别及续断 TLC 定性鉴别，缺乏含量测定，并且目前缺少相关报道，药效物质不明。

由于中药具有多组分、多靶点、多机制的特点，故指纹图谱结合化学计量学已广泛应用于其及相关制剂的质量评价，能整体评价并揭示复杂成分之间的联系^[1-3]。本实验建立正骨 3 号片 HPLC 指纹图谱，测定其主要药效成分川续断皂苷 VI、马钱苷酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、新绿原酸的含量，并进行化学计量学分析，以期为该制剂质量提升提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪 [型号 LC-20A，岛津企业管理（中国）有限公司]；超纯水机（型号 PLUS-E2-20TH，南京易普易达科技发展有限公司）；数控超声波清洗器（型号 KQ-800DE，昆山市超声仪器有限公司）；电子分析天平 [型号 GEB2055N，十万分之一，群安科学仪器（浙江）有限公司；型号 AB204-S，万分之一，瑞士梅特勒-托利多公司]。

1.2 试剂与药物 正骨 3 号片共 16 批（桂药制字 Z09060003，每片 0.3 g，批号 202207141、202208181、202303081、202303271、202305041、202305312、202307041、202309131、202309141、202311081、202311091、202301111、202402011、202402012、202404231、202401101，编号 S1~

S16），均由玉林市中西医结合骨科医院制剂室提供。

新绿原酸（批号 RP231214，纯度 99.56%）、马钱苷酸（批号 RP230613，纯度 99.50%）、隐绿原酸（批号 RP210202，纯度 99.28%）、异绿原酸 A（批号 RP220616，纯度 99.31%）、川续断皂苷 VI（批号 RP230525，纯度 98.45%）对照品均购于成都麦德生科技有限公司。乙腈（色谱纯，上海天地恩科有限公司）；磷酸（色谱纯，天津市大茂化学试剂厂）；其他试剂均为分析纯；水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、马钱苷酸、川续断皂苷 VI 对照品适量，加 50% 甲醇制成质量浓度分别为 0.205 6、0.326 6、0.211 6、1.028 0、1.505 0 mg/mL 的混合溶液，即得。

2.1.2 供试品溶液 取本品 20 片，去除包衣，过 4 号筛，取粉末约 1.5 g，精密称定，置于 100 mL 具塞锥形瓶中，精密加入 50 mL 50% 甲醇，超声（功率 800 W，频率 40 kHz）处理 45 min，放冷，用 50% 甲醇补足减失的重量，摇匀，过滤，续滤液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.1.3 阴性样品溶液 按处方和工艺，分别制成缺续断、缺五加皮、缺续断和五加皮的阴性样品，按“2.1.2”项下方法制备，即得。

2.2 色谱条件 Shim-pack CP-ODS 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相乙腈 (A) -0.1% 磷酸 (B)，梯度洗脱 (0~20 min, 5%~12% A；20~43 min, 12%~22% A；43~65 min, 22%~30% A；65~90 min, 30%~37% A)；体积流量 1 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 245 nm (0~65

收稿日期：2025-07-17

基金项目：广西壮族自治区中医药管理局自筹经费科研课题（GXZYK20220594）；2024 年广西中药优秀人才研修项目（GZKJ2455）

作者简介：韦玉燕（1985—），女，硕士，副主任中药师，从事中药制剂质量控制及其新制剂开发研究。E-mail: ylwy698@163.com

* 通信作者：吴勇梅（1971—），女，主任药师，从事医院药学、医院制剂质量研发工作。E-mail: wym9686@163.com

min)、212 nm (65~90 min); 进样量 10 μL。

2.3 HPLC 指纹图谱建立

2.3.1 精密度试验 取供试品溶液 (S4) 适量, 在“2.2”项色谱条件下进样测定 6 次, 以 7 号峰为参照, 测得各共有峰相对保留时间 RSD 为 0.19%~0.55%, 相对峰面积 RSD 为 0.95%~2.34%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取供试品溶液 (S4) 适量, 于 0、2、4、8、16、24 h 在“2.2”项色谱条件下进样测定, 以 7 号峰为参照, 测得各共有峰相对保留时间 RSD<1.94%, 相对峰面积 RSD<2.77%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取本品 (S4) 适量, 按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.2”项色谱条件下进样测定, 以 7 号峰为参照, 测得各共有峰相对保留时间 RSD 均<0.48%, 相对峰面积 RSD 均<2.25%, 表明该方法重复性良好。

2.3.4 图谱生成及相似度评价 取 16 批样品, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2”项色谱条件下进样测定, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版) 进行分析, 选择 S4 (各成分色谱峰分离度良好) 作为参照, 通过中位数法和 0.1 min 时间窗宽度进行多点校正, 见图 1~2, 发现共有 14 个共有峰, 相似度分别为 0.993、0.955、0.970、0.992、0.992、0.990、0.991、0.988、0.929、0.994、0.972、0.973、0.979、0.969、0.972、0.984, 表明不同批次样品之间相似度较好。

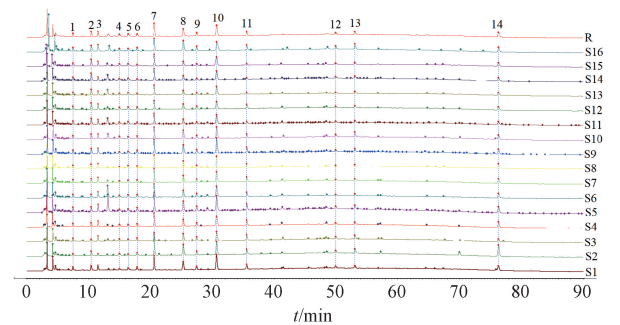


图 1 16 批正骨 3 号片 HPLC 指纹图谱

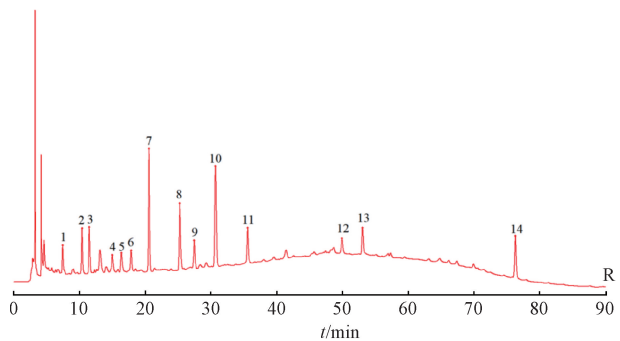
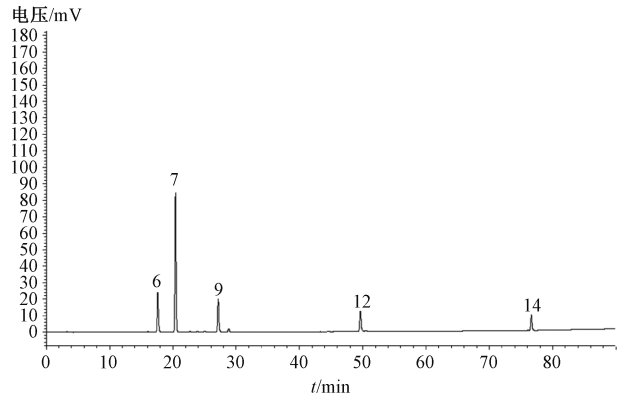


图 2 正骨 3 号片对照指纹图谱

2.3.5 共有峰指认 取“2.1.1”项下对照品溶液适量,

在“2.2”项色谱条件下进样测定, 见图 3。通过对照品比对鉴定出 5 个化合物, 分别为 6 号峰 (新绿原酸)、7 号峰 (马钱苷酸)、9 号峰 (隐绿原酸)、12 号峰 (异绿原酸 A)、14 号峰 (川续断皂苷 VI), 并选择峰面积适中、分离度良好、峰形较优的 7 号峰 (马钱苷酸) 作为参照。

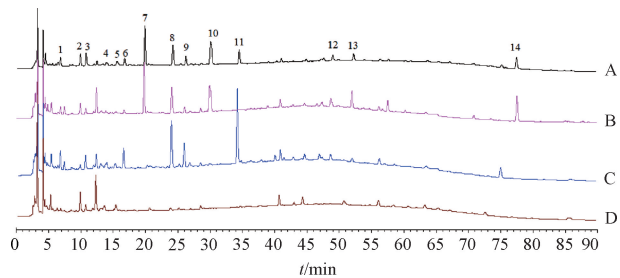


6. 新绿原酸 7. 马钱苷酸 9. 隐绿原酸 12. 异绿原酸 A
14. 川续断皂苷 VI

图 3 对照品溶液 HPLC 色谱图

2.4 含量测定

2.4.1 专属性试验 取“2.1.1”项下对照品溶液、“2.1.2”项下供试品溶液、“2.1.3”项下阴性样品溶液适量, 在“2.2”项色谱条件下进样测定, 结果见图 4。由此可知, 供试品溶液中各成分保留时间与对照品溶液中的一致, 阴性无干扰, 表明该方法专属性良好。



注: A~D 分别为供试品、缺五加皮阴性样品、缺续断阴性样品、缺五加皮和续断阴性样品。

图 4 各样品 HPLC 色谱图

2.4.2 线性关系考察 分别精密量取“2.1.1”项下对照品溶液 0.2、0.6、1.2、1.6、2.0 mL, 用 50% 甲醇定容至 10 mL, 制成系列质量浓度, 溶液在“2.2”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归, 可知各成分在各自范围线性关系良好, 见表 1。

2.4.3 精密度试验 取“2.1.1”项下对照品溶液适量, 在“2.2”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得各成分峰面积 RSD 分别为新绿原酸 0.24%、马钱苷酸 0.41%、隐绿原酸 0.28%、异绿原酸 A 2.54%、川续断皂苷 VI 0.87%, 表明仪器精密度良好。

2.4.4 重复性试验 取本品 (S4) 适量, 按“2.1.2”项

表 1 各成分线性关系

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(mg·mL ⁻¹)
新绿原酸	$Y=2\times10^7X-12\ 918$	0.999 7	0.004 11~0.041 12
马钱苷酸	$Y=1\times10^7X-28\ 434$	0.999 8	0.020 56~0.205 60
隐绿原酸	$Y=1\times10^7X-19\ 483$	0.999 7	0.006 53~0.065 32
异绿原酸 A	$Y=2\times10^7X-60\ 944$	0.999 0	0.004 23~0.042 32
川续断皂苷 VI	$Y=2\times10^6X-4\ 125.8$	0.999 4	0.030 10~0.301 00

下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下进样测定，测得各成分含量 RSD 分别为新绿原酸 3.44%、马钱苷酸 0.87%、隐绿原酸 0.67%、隐绿原酸 A 0.96%、川续断皂苷 VI 1.99%，表明该方法重复性良好。

2.4.5 稳定性试验 取供试品溶液（S4）适量，于 0、2、4、8、16、24 h 在“2.2”项色谱条件下进样测定，测得各成分峰面积 RSD 分别为新绿原酸 3.28%、马钱苷酸 2.40%、隐绿原酸 2.22%、异绿原酸 A 1.54%、川续断皂苷 VI 2.04%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.6 加样回收率试验 取各成分含量已知的本品（S4）6 份，每份约 0.75 g，精密称定，按 100% 水平精密加入对

照品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，新绿原酸、隐绿原酸、马钱苷酸、异绿原酸 A、川续断皂苷 VI 平均加样回收率分别为 96.46%（RSD = 1.33%）、101.01%（RSD = 3.09%）、98.80%（RSD = 1.75%）、99.51%（RSD = 1.92%）、102.08%（RSD = 1.60%）。表明该方法准确可靠。

2.4.7 样品含量测定 取 16 批样品，按“2.1.2”项下方法平行制备 2 份供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下进样测定，计算含量，结果见表 2。

表 2 各成分含量测定结果（mg/片，*n*=2）

编号	新绿原酸	马钱苷酸	隐绿原酸	异绿原酸 A	川续断皂苷 VI
S1	0.143 0	1.124 1	0.349 6	0.120 2	2.472 5
S2	0.119 2	1.176 8	0.336 5	0.138 8	1.991 7
S3	0.140 9	0.684 8	0.373 8	0.150 5	1.785 4
S4	0.129 9	1.206 2	0.342 2	0.113 1	2.406 8
S5	0.163 5	1.343 0	0.430 6	0.135 6	2.582 8
S6	0.160 3	1.121 9	0.387 1	0.097 1	2.282 4
S7	0.124 0	1.143 0	0.187 2	0.085 9	1.349 2
S8	0.125 9	1.061 3	0.345 4	0.096 2	2.368 9
S9	0.141 4	1.109 8	0.346 8	0.117 2	2.449 5
S10	0.113 4	0.941 1	0.308 6	0.160 2	2.269 4
S11	0.075 0	0.825 2	0.208 5	0.081 7	1.326 9
S12	0.110 5	0.723 2	0.307 3	0.104 0	1.544 4
S13	0.087 5	1.158 5	0.246 4	0.101 6	2.597 0
S14	0.117 6	1.001 3	0.177 9	0.097 9	1.930 1
S15	0.084 1	0.960 9	0.174 3	0.082 3	1.941 4
S16	0.155 1	0.981 5	0.408 6	0.192 5	2.526 9

2.5 化学计量学研究

2.5.1 聚类分析 将 16 批样品中各成分含量导入 SPSS 27.0 软件中，采用组间链接法，以平方欧式距离为区间进行分析，结果见图 5。由此可知，平方欧氏距离为 10 时，各批样品聚为 2 类，Ⅰ类 S1、S2、S4~S6、S8~S10、S13~S16，Ⅱ类 S3、S7、S11、S12。

2.5.2 主成分分析（PCA） 将“2.5.1”项下数据以降维因子为指标作进一步分析，发现 KMO 值为 0.611>0.6，表明变量之间在一定相关性，适合因子分析；巴特利球形度检验显著性 *P*<0.05，拒绝变量之间无显著相关性的假设，支持该方法适用性。再提取特征值>1 的主成分，发现前 2 个累积方差贡献率达 82.22%，能充分反映样本主要变异特征，见表 3，碎石图见图 6。

表 3 主成分特征值和方差贡献率

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	2.920	58.405	58.405
2	1.191	23.815	82.220
3	0.491	9.826	92.046
4	0.272	5.439	97.485
5	0.126	2.515	100.000

载荷矩阵可直观反映各变量对主成分的综合贡献，其绝对值越大，对主成分的贡献越大，见表 4，可知隐绿原酸、新绿原酸、川续断皂苷 VI、异绿原酸 A 对主成分 1 贡献较大，而马钱苷酸对主成分 2 贡献较大。

通过 SIMCA 14.1 软件对 16 批样品中各成分含量进行建模，生成得分图，见图 7。由此可知，各批样品均落在

95% 置信区间内，其中 S1、S2、S4、S6、S8、S9 分布集中，表明其所含成分的含量具有高度一致性，质量差异较小；其余批次样品散落在原点周围，表明其质量差异较大。

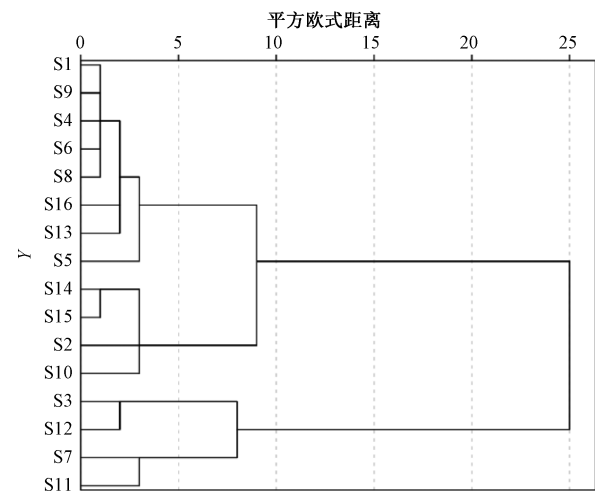


图 5 16 批正骨 3 号片聚类分析图

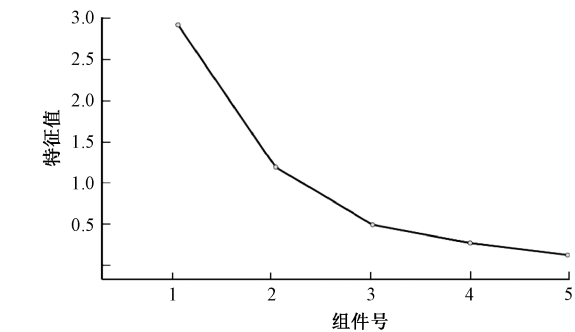


图 6 PCA 碎石图

表 4 主成分载荷矩阵

成分	载荷	
	主成分 1	主成分 2
新绿原酸	0.860	-0.091
马钱苷酸	0.491	0.822
隐绿原酸	0.904	-0.250
异绿原酸 A	0.694	-0.560
川续断皂苷 VI	0.800	0.361

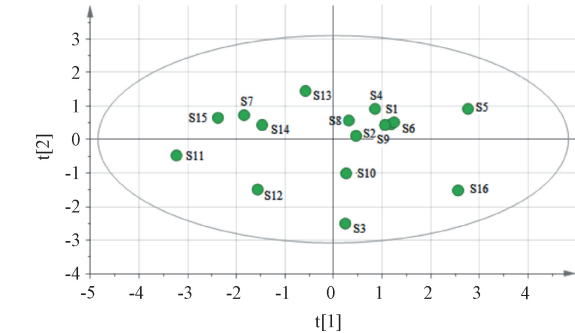


图 7 16 批正骨 3 号片 PCA 得分图

2.5.3 正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 将 16 批样品中各成分含量导入 SIMCA 14.1 软件中建立模型，参

数 Rx^2 (0.948)、 Ry^2 (0.860)、 Q^2 (0.658) 均大于 0.5，表明模型拟合良好，预测能力可靠。得分图见图 8，可知 S1、S2、S4、S6、S8、S9 分布紧密，其余批次样品分布较分散，与 PCA 一致，进一步证实各批样品中所含成分的含量存在差异。

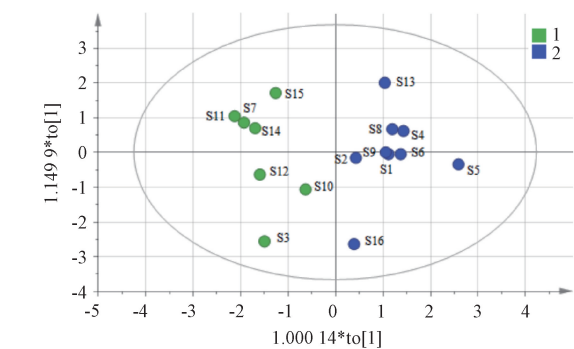


图 8 16 批正骨 3 号片 OPLS-DA 得分图

为了规避模型过拟合带来的假阳性风险，本实验进行 200 次 Y 矩阵变量的随机排列置换检验，结果见图 9。由此可知，最右侧的 R^2 、 Q^2 值均高于最左侧的，而且两者回归线在 Y 轴中的截距分别为 0.216、-0.698，表明模型未出现过拟合，适用于判别不同批次样品组间差异。

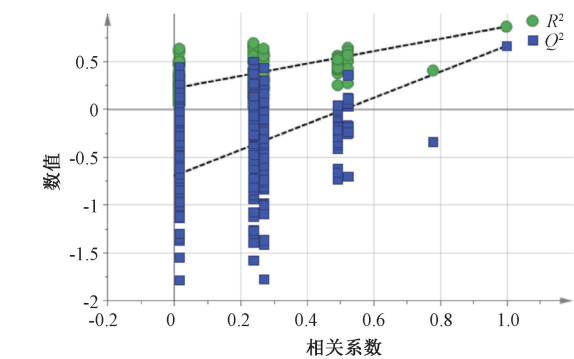


图 9 OPLS-DA 模型置换检验图

变量权重值 (VIP 值) 可用于筛选组间差异成分，本实验以 VIP 值>1 为关键因素，结果见图 10。由此可知，川续断皂苷 VI、马钱苷酸、隐绿原酸 VIP 值分别为 1.327 48、1.123 16、1.052 06，均大于 1.0，表明三者可能是引起制剂质量差异的主要特征成分。

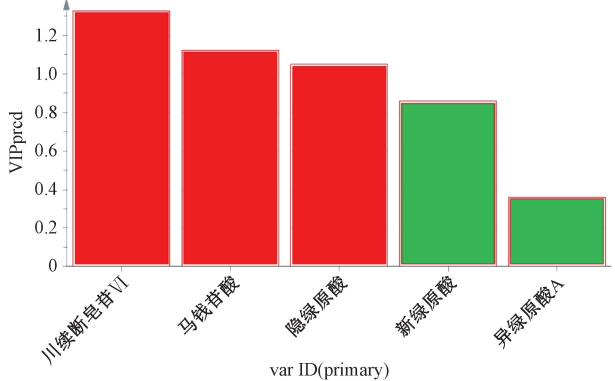


图 10 各成分 VIP 值

3 讨论与结论

本实验考察不同检测波长（212、230、245、280、330 nm）下的色谱峰，最终确定为 245 nm（0~65 min）、212 nm（65~90 min），有效解决了单一波长下部分成分色谱峰不明显的问题。再分别考察了流动相甲醇-0.1% 磷酸、乙腈-0.1% 磷酸、乙腈-水^[4-10]，最终确定为乙腈-0.1% 磷酸。然后，分别考察了不同体积分数（30%、50%、75%、100%）甲醇、提取方式（回流、超声）、提取时间（30、45、60 min），最终确定为 50% 甲醇超声提取 45 min。

化学计量学研究结果表明，正骨 3 号片质量差异标志物为川续断皂苷 VI、马钱苷酸和隐绿原酸，其中川续断皂苷 VI 可修复、愈合骨损伤并抑制炎症因子^[11-17]，马钱苷酸可促进骨组织再生^[18-19]，隐绿原酸可通过抗炎、抗氧化来协同增效^[20-21]，三者功效均与正骨 3 号片舒筋活络、强筋壮骨作用一致，体现了刘昌孝院士“成分-药效-标准”三位一体的理念^[22]。另外，不同批次正骨 3 号片中各成分含量存在差异，可能与原料、工艺、贮存条件等因素有关，后续将优化生产工艺，建立“原料-生产-贮存”全流程质控体系，控制有效成分含量范围，从而确保产品质量稳定。

参考文献：

[1] Kamboj A, Kaur I, Kaur N. Recent advances in standardization of herbal drugs[J]. *Curr Tradit Med*, 2020, 6(4): 278-299.

[2] Noviana E, Indrayanto G, Rohman A. Advances in fingerprint analysis for standardization and quality control of herbal medicines[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 853023.

[3] 翟红伟, 赵玉婷, 林 露, 等. 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别法评价清肺达原颗粒质量[J]. *亚太传统医药*, 2024, 20(8): 43-48.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[5] 唐晓琴, 张丽艳, 马四补, 等. 续断盐炙前后指纹图谱及成分含量差异研究[J]. *中药材*, 2023, 46(9): 2178-2184.

[6] 杨昌贵, 龚安慧, 张成刚, 等. HPLC 法同时测定续断药材中 7 个成分的含量[J]. *中国药房*, 2022, 33(6): 680-684.

[7] 王婷格, 罗陆遥, 薛 瑞, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和多

成分含量测定结合化学计量学的盐杜仲质量评价研究[J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(1): 141-150.

[8] 梁德勤, 程 钢, 唐 艳, 等. HPLC 波长切换法同时测定舒筋强骨丸中 4 种成分的含量[J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(19): 2343-2346.

[9] 王力弘, 钱怡云, 韦 敏, 等. 基于多波长切换 HPLC 同时测定五加皮中 10 个成分研究[J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(4): 558-563.

[10] 王 莉. HPLC-DAD 法测定参桂鹿茸丸中 7 个成分的含量和转移率研究[J]. *海峡药学*, 2022, 34(11): 68-72.

[11] 黄蒙蒙, 周广涛, 张 霞, 等. 续断化学成分及药理作用研究进展[J]. *药学研究*, 2023, 42(10): 837-840.

[12] 刘 丽, 杨 征, 傅若秋, 等. 续断化学成分、药理作用及炮制对其质量的影响研究[J]. *中国药业*, 2023, 32(13): 126-133.

[13] 李贤让. 续断总皂苷治疗骨关节炎及其机制的实验研究[D]. 济南: 山东大学, 2017.

[14] Liu K F, Liu Y, Xu Y T, *et al.* Asperosaponin VI protects against bone destructions in collagen-induced arthritis by inhibiting osteoclastogenesis[J]. *Phytomedicine*, 2019, 63: 153006.

[15] Gu M B, Jin J, Ren C H, *et al.* Akebia saponin D suppresses inflammation in chondrocytes *via* the NRF2/HO-1/NF-κB axis and ameliorates osteoarthritis in mice[J]. *Food Funct*, 2020, 11(12): 10852-10863.

[16] Gong L L, Yang S, Liu H, *et al.* Anti-nociceptive and anti-inflammatory potentials of akebia saponin D[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 845: 85-90.

[17] 杨延平, 杨 勇. 续断抗骨质疏松活性部位的筛选[J]. *今日药学*, 2012, 22(6): 342-344.

[18] 匡海学. 中药化学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 189.

[19] 何雪心, 裘 军. 续断提取物对小鼠 D-半乳糖拟痴呆模型的抗氧化作用[J]. *中国药师*, 2005, 8(3): 185-187.

[20] 宋亚玲, 王红梅, 倪付勇, 等. 金银花中酚酸类成分及其抗炎活性研究[J]. *中草药*, 2015, 46(4): 490-495.

[21] 张 囡, 杜丽丽, 王 冬, 等. 中药酚酸类成分的研究进展[J]. *中国现代中药*, 2006, 7(2): 25-28.

[22] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. *中草药*, 2016, 47(9): 1443-1457.