

[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($r \geq 0.9990$), 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0.2056、0.3266、0.2116、1.0280、1.5050 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, 摆匀, 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: ylwyy698@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 μ L。

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。

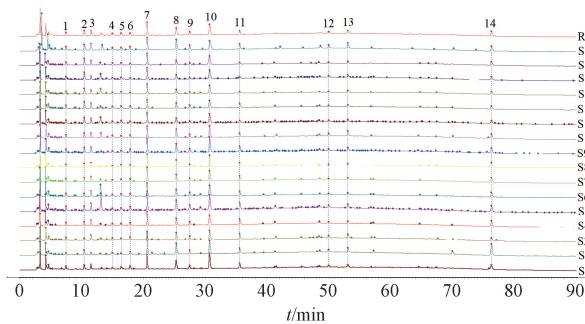


图 1 16 批正骨 3 号片 HPLC 指纹图谱

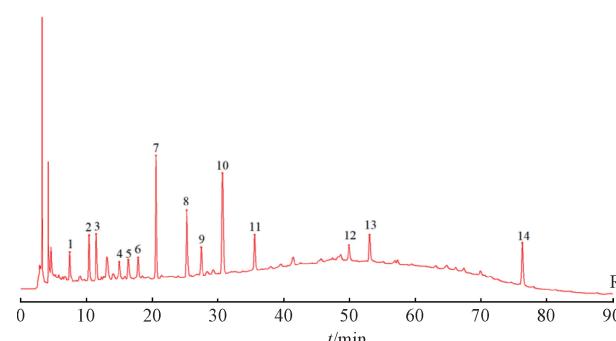
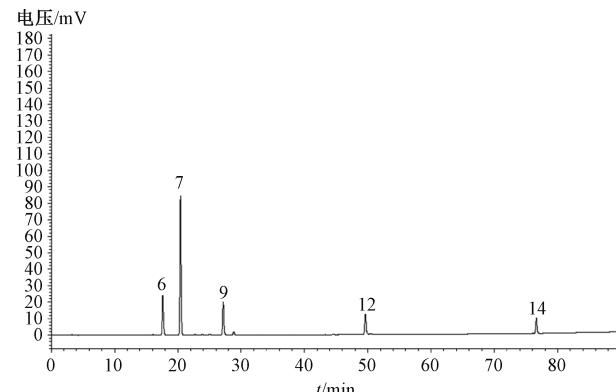


图 2 正骨 3 号片对照指纹图谱

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。

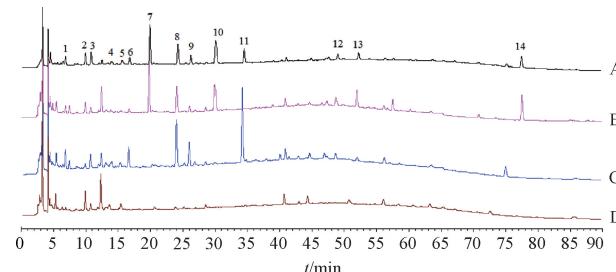


6. 新绿原酸 7. 马钱苷酸 9. 隐绿原酸 12. 异绿原酸 A
14. 川续断皂苷 VI

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	r	线性范围/(mg·mL ⁻¹)
新绿原酸	$Y=2\times10^7X-12.918$	0.9997	0.00411~0.04112
马钱苷酸	$Y=1\times10^7X-28.434$	0.9998	0.02056~0.20560
隐绿原酸	$Y=1\times10^7X-19.483$	0.9997	0.00653~0.06532
异绿原酸A	$Y=2\times10^7X-60.944$	0.9990	0.00423~0.04232
川续断皂苷VI	$Y=2\times10^6X-4.125.8$	0.9994	0.03010~0.30100

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A0.96%、川续断皂苷VI1.99%，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A1.54%、川续断皂苷VI2.04%，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	0.1430	1.1241	0.3496	0.1202	2.4725
S2	0.1192	1.1768	0.3365	0.1388	1.9917
S3	0.1409	0.6848	0.3738	0.1505	1.7854
S4	0.1299	1.2062	0.3422	0.1131	2.4068
S5	0.1635	1.3430	0.4306	0.1356	2.5828
S6	0.1603	1.1219	0.3871	0.0971	2.2824
S7	0.1240	1.1430	0.1872	0.0859	1.3492
S8	0.1259	1.0613	0.3454	0.0962	2.3689
S9	0.1414	1.1098	0.3468	0.1172	2.4495
S10	0.1134	0.9411	0.3086	0.1602	2.2694
S11	0.0750	0.8252	0.2085	0.0817	1.3269
S12	0.1105	0.7232	0.3073	0.1040	1.5444
S13	0.0875	1.1585	0.2464	0.1016	2.5970
S14	0.1176	1.0013	0.1779	0.0979	1.9301
S15	0.0841	0.9609	0.1743	0.0823	1.9414
S16	0.1551	0.9815	0.4086	0.1925	2.5269

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，采用组间联接法，以平方欧式距离为区间进行分析，结果见图5。由此可知，平方欧式距离为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，表明变量之间存在一定相关性，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。

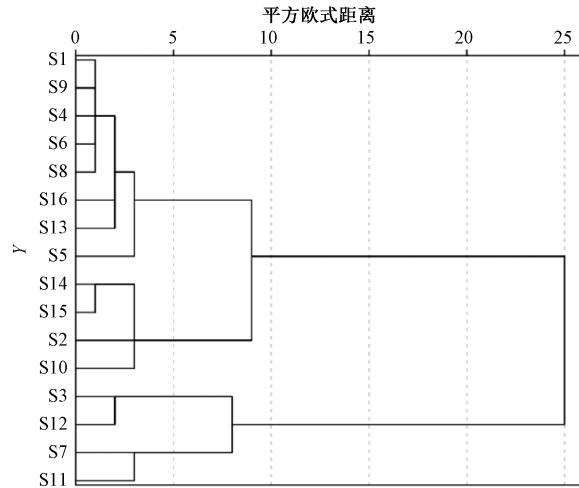


图 5 16 批正骨 3 号片聚类分析图

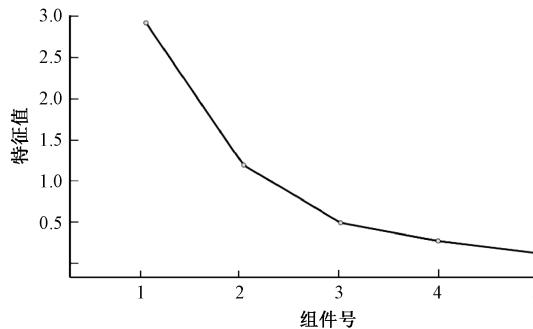


图 6 PCA 碎石图

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

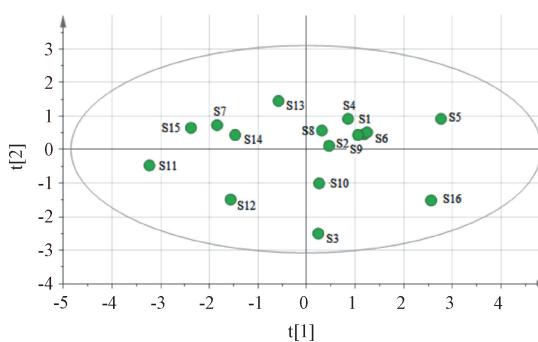


图 7 16 批正骨 3 号片 PCA 得分图

2.5.3 正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 将 10 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。

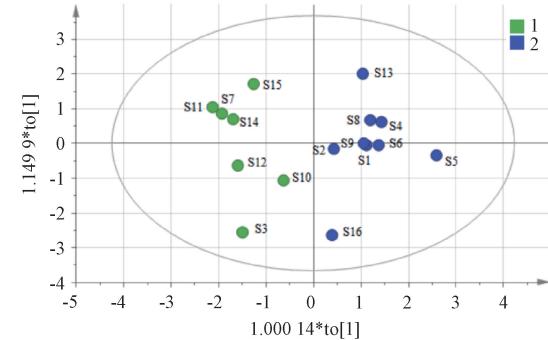


图 8 16 批正骨 3 号片 OPLS-DA 得分图

为了规避模型过拟合带来的假阳性风险, 本实验进行了 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。

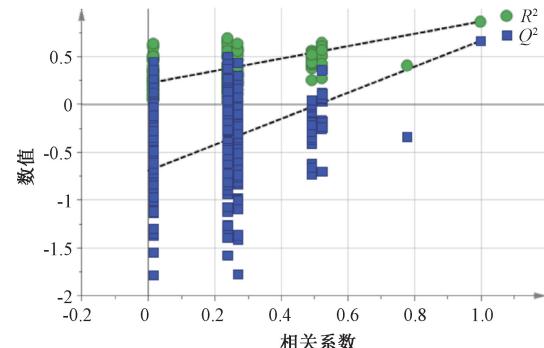


图 9 OPLS-DA 模型置换检验图

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。

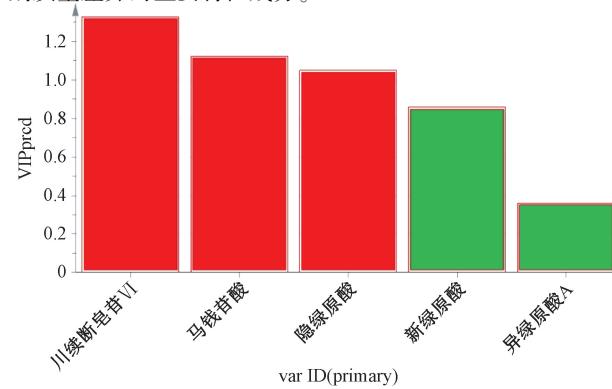


图 10 各成分 VIP 值

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.