

# HPLC 指纹图谱结合模式识别分析评价风湿骨痛胶囊的批间一致性

陈良妮<sup>1,2</sup>, 程雪梅<sup>1</sup>, 王琳<sup>3</sup>, 高武<sup>3</sup>, 陈勇<sup>2\*</sup>, 王长虹<sup>1\*</sup>

[1. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 上海市复方中药重点实验室, 上海中药标准化研究中心, 上海 201203; 2. 广西中医药大学药学院, 广西南宁 530000; 3. 国药集团精方(安徽)药业股份有限公司, 安徽宣城 242000]

**摘要:** 目的 建立风湿骨痛胶囊 HPLC 指纹图谱, 并对其批间一致性进行评价。方法 该药物 70% 甲醇提取液的分析采用 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.2% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 210、235、310 nm; 柱温 30 ℃, 通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版) 进行相似度分析, 通过 SIMCA13.0 软件进行偏最小二乘法、判别分析、聚类分析。结果 20 批样品指纹图谱中有 31 个共有峰, 相似度 0.957~0.985, 鉴定出原儿茶酸、盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、绿原酸、芹糖甘草苷、甘草苷、苯甲酰新乌头原碱、甘草素、异甘草苷、甘草酸。20 批样品所含成分较一致, 但共有峰峰面积存在差异。结论 该方法专属性强, 高效快速, 可为风湿骨痛胶囊的质量控制提供依据。

**关键词:** 风湿骨痛胶囊; 批间一致性; HPLC 指纹图谱; 相似度分析; 偏最小二乘法-判别分析; 聚类分析

**中图分类号:** R284.1

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2021)12-3446-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.12.035

风湿骨痛胶囊由制川乌、制草乌、甘草、麻黄、红花、木瓜、乌梅制成的中药复方制剂, 具有温经散寒、通络止痛的功效, 用于寒湿闭阻经络所致的痹病, 风湿性关节炎等<sup>[1-4]</sup>。2015 年版《中国药典》对麻黄进行了 TLC 鉴别、HPLC 含量测定; 对制川乌、制草乌进行了 TLC 限量检测及紫外分光光度法测定乌头总生物碱。相关文献利用液质联用技术对方中制川乌、制草乌的 9 个乌头类生物碱做了定量研究<sup>[5]</sup>。

指纹图谱是基于对中药及中药制剂物质质量群整体作用的认识, 通过中药化学成分的光谱或色谱图, 实现鉴别中药及中药制剂真实性, 评价质量一致性和产品稳定性<sup>[6-9]</sup>。化学模式识别技术可以对具有模糊性和整体性的中药指纹图谱实现数据降维、识别和分类, 是筛选质量差异标志物的重要数学方法, 具有较高的预测精度和较强的线性数据分析分类等优势, 如主成分分析 (principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)、判别分析 (discriminant analysis, DA)、偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 等, 已广泛应用于指纹图谱等多维数据的处理分析中<sup>[10-13]</sup>。目前, 采用指纹图谱结合化学模式识别技术评价不同批次风湿骨痛胶囊的质量稳定性研究还未见报道。本实验通过建

立指纹图谱结合化学模式识别技术分析评价风湿骨痛胶囊的质量稳定性和批次一致性。

## 1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪、Agilent G1315C DAD 检测器、Agilent Open Lab CDS 2. x 化学工作站 (美国 Agilent 公司); AE200 电子分析天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); SK1200H 超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司); Milli-Q Intergal 水纯化系统 (美国 Millipore 公司)。  
1.2 试剂与药物 磷酸、乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 公司); 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。盐酸麻黄碱 (批号 171241-201809, 纯度>98%)、盐酸伪麻黄碱 (批号 171237-201510, 纯度>98%) 对照品购于中国食品药品检定研究院; 苯甲酰新乌头原碱 (批号 DST191023-056, 纯度>98%)、芹糖甘草苷 (批号 DST191102-139, 纯度>98%) 对照品购于乐美天医药/德思特生物公司; 绿原酸 (批号 AF7070309, 纯度>98%)、甘草素 (批号 AF8052202, 纯度>98%) 对照品购于成都埃法生物科技有限公司; 甘草苷 (批号 070003-201602, 纯度>98%)、异甘草苷 (批号 250026-201511, 纯度>98%)、甘草酸单铵 (批号 070020-201508, 纯度>98%) 对照品购于上海奈启生物科技有限公司。风湿骨痛胶囊共 20 批, 由国药集团精方 (安徽) 药业股份有限公司提供, 批号分别为 180107、

**收稿日期:** 2020-11-20

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2018YFC1707302, 2018YFC1707303)

**作者简介:** 陈良妮 (1991—), 女, 硕士生, 研究方向为中药及其制剂质量分析。Tel: 18100070904, E-mail: cln2017@126.com

\* **通信作者:** 陈勇 (1961—), 男, 教授, 研究方向为中药及其制剂质量分析。Tel: 18978947922, E-mail: cy6381@163.com

王长虹 (1964—), 男, 博士, 研究员, 研究方向为中药新制剂与体内过程。Tel: (021) 51322511, E-mail: wchcxm@163.com

180201、180408、180501、180503、180504、180602、181206、190101、190103、190105、190106、190108、190302、190303、190304、190306、190307、190310。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A) -0.2% 磷酸 (B), 梯度洗脱, 程序见表 1; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 210 nm (0~20 min)、310 nm (20~36 min)、235 nm (36~60 min); 进样量 10 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	A 乙腈/%	B 0.2% 磷酸/%
0~10	5	95
10~25	5~15	95~85
25~28	15~20	85~80
28~40	20~28	80~72
40~47	28~52	72~48
47~60	52~95	48~5

## 2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 称取各对照品适量, 70% 甲醇溶解, 即得 (质量浓度分别为盐酸麻黄碱 134.6 μg/mL、盐酸伪麻黄碱 228.7 μg/mL、绿原酸 18.30 μg/mL、苯甲酰新乌头原碱 45.30 μg/mL、芹糖甘草苷 36.40 μg/mL、甘草苷 117.9 μg/mL、异甘草苷 31.50 μg/mL、甘草素 17.80 μg/mL、甘草酸 132.3 μg/mL)。

2.2.2 供试品溶液制备 取装量差异项下胶囊内容物, 研细, 取约 0.8 g, 精密称定, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 10 mL, 称定质量, 超声 (功率 250 W、频率 40 kHz) 处理 30 min, 放冷, 70% 甲醇补足减失的质

量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

## 2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一份供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 以甘草酸峰为参照, 测得共有峰相对保留时间、相对峰面积 RSD 分别在 0~0.62%、0.12%~2.85% 范围内, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取同一批胶囊装量差异项下内容物, 研细, 平行 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 以甘草酸为参照, 测得共有峰保留时间、相对峰面积 RSD 分别在 0.01%~0.33%、0.28%~4.73% 范围内, 表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一批胶囊装量差异项下内容物, 研细, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 室温下于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 以甘草酸峰为参照, 测得共有峰相对保留时间、相对峰面积 RSD 分别在 0.01%~0.23%、0.12%~3.71% 范围内, 表明溶液在室温下 24 h 内稳定性良好。

2.3.4 相对保留时间、相对峰面积 20 批样品中共有峰相对保留时间 RSD 在 0.01%~0.49% 范围内, 表明其相对稳定; 相对峰面积 RSD 在 3.74%~71.78% 范围内, 表明其差异较大。

## 2.4 HPLC 指纹图谱建立

2.4.1 图谱生成 取 20 批样品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 将相关数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”软件, 设置时间窗宽度为 0.2 min, 采用多点校正法进行全峰匹配, 共确定 31 个共有峰, 见图 1。

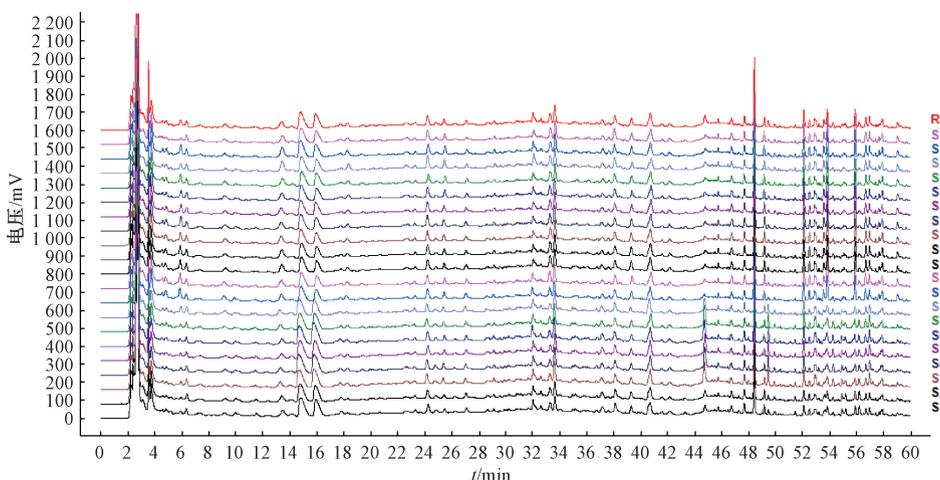
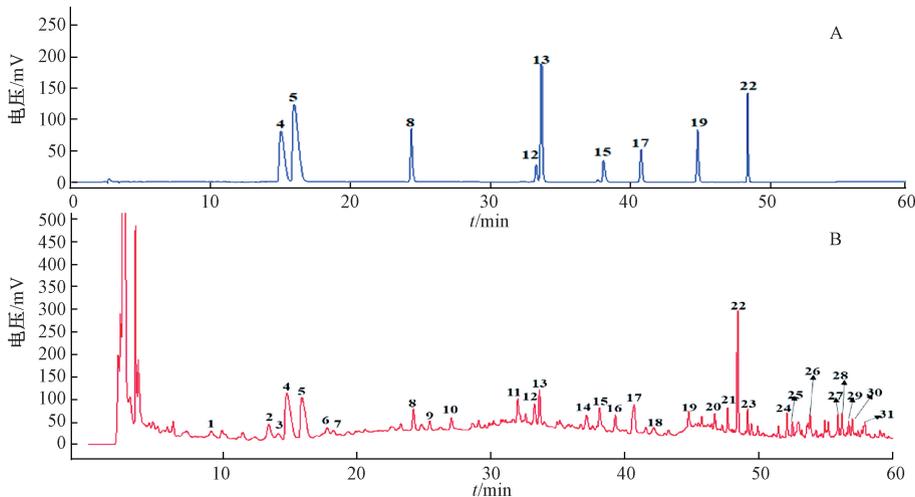


图 1 20 批样品 HPLC 指纹图谱

2.4.2 共有峰指认和参照峰选择 吸取“2.2”项下对照品、供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 结果见图 2。通过文献查阅, 指出 2 号峰为原儿茶酸; 通过 DAD 检测器紫外吸收值比对, 指认 4 号峰为盐酸麻黄碱, 5 号峰为盐酸伪麻黄碱, 8 号峰为绿原酸, 12 号峰为芹糖甘草苷, 13 号峰为甘草苷, 15 号峰为苯甲酰新乌头原碱, 17

号峰为异甘草苷, 19 号峰为甘草素, 22 号峰为甘草酸, 再选择与相邻色谱峰分离效果良好、保留时间稳定的 22 号峰 (甘草酸) 作为参照。

2.4.3 相似度分析 将 20 批样品相关数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统” (2012 版) 软件, 以对照图谱为参照<sup>[14]</sup>, 计算相似度, 结果见表 2。



4. 盐酸麻黄碱 5. 盐酸伪麻黄碱 8. 绿原酸 12. 芹糖甘草苷 13. 甘草苷 15. 苯甲酰新乌头原碱 17. 异甘草苷 19. 甘草素 22. 甘草酸

图2 对照品 (A)、供试品 (B) HPLC 色谱图

表2 20批样品相似度

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.973	S11	0.981
S2	0.975	S12	0.981
S3	0.967	S13	0.973
S4	0.962	S14	0.983
S5	0.978	S15	0.986
S6	0.957	S16	0.985
S7	0.968	S17	0.985
S8	0.978	S18	0.976
S9	0.983	S19	0.983
S10	0.971	S20	0.982

### 2.5 化学模式识别分析

2.5.1 主成分分析 (PCA) 将共有峰数据导入SIMICA13.0软件,进行无监督的PCA分析<sup>[15]</sup>,结果见图3。由此可知,20批样品可分为2类,区分度较为明显。

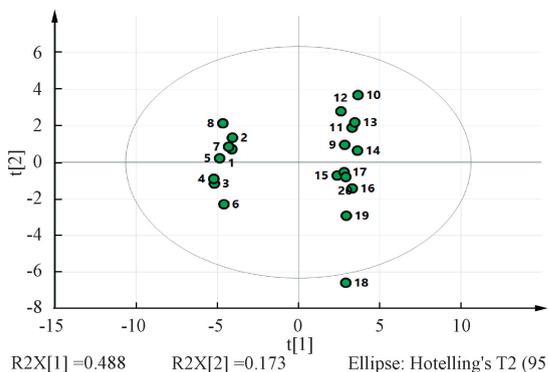


图3 20批样品PCA得分图

2.5.2 偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 将共有峰数据导入SIMICA13.0软件,在PCA分析的基础上建立有监督的PLS-DA判别分析,获得PLS-DA得分图、VIP图、聚类分析图,分别见图4~6。由图4可知,20批样品可分为2个区域。由图5可知,5号峰为伪麻黄碱,19号峰为甘草

素,14号峰为麻黄碱,22号峰为甘草酸,15号峰为苯甲酰新乌头原碱,13号峰为甘草苷,2号峰为原儿茶酸,贡献值均大于1;11号峰是制川乌、制草乌、红花、乌梅的共有峰,7号峰是木瓜、乌梅的共有峰,27、30号峰来自甘草,3号峰是制川乌、制草乌共有峰,6号峰来自红花,均对分类有显著影响,即为主要成分的质量标志物。由图6可知,20批样品可聚为2大类,与图4一致。

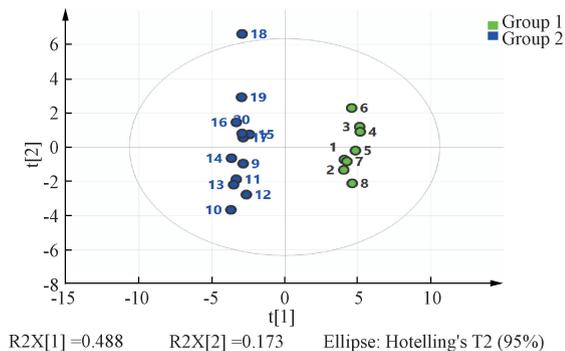


图4 共有峰PLS-DA得分图

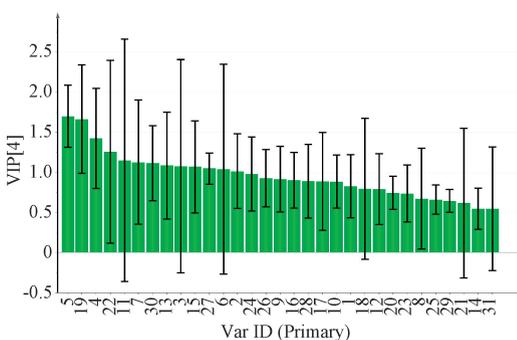


图5 共有峰VIP图

### 3 讨论

本实验对样品处理方法进行考察,确定以70%甲醇超声提取30min制备供试品溶液。再对检测波长进行考察,发现210nm(0~20min)、310nm(20~36min)、235nm

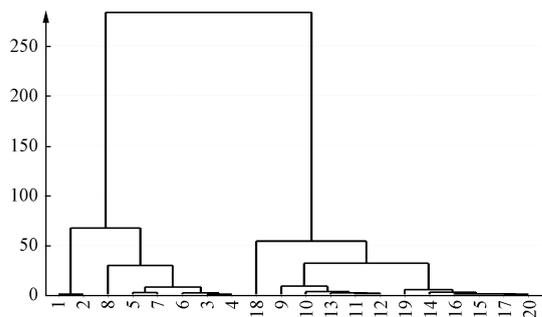


图6 20批样品聚类分析图

(36~60 min)的分段程序检测效果最佳。

20批风湿骨痛胶囊的HPLC指纹图谱中确定31个共有峰, 指认出麻黄碱、甘草苷、苯甲酰新乌头原碱等10种成分。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)软件分析, 结果相似度均大于0.95, 说明风湿骨痛胶囊质量稳定。但PCA、聚类分析和PLS-DA均将20批样品明显分成2类, 结合化学模式识别方法结果, 说明不同批次样品共有峰存在一定的差异。调取生产批记录分析发现, 20批样品中编号为1~8的采用不同批次的原料药材, 而编号为9~20的采用同一批次的原料药材, 指纹特征也具有更高的相似性, 即该产品的制备工艺具有较高的稳定性, 与实验结果完全吻合, 说明原料差异对成品的影响是重要因素之一。为了保证生产过程批次间的一致性, 应加强对原料药材进行质量控制, 并且对质量合格的多个批次原料药材进行校兑后再投入生产也是可供选择的策略之一。

参考文献:

[1] 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: 725.  
[2] 国家基本药物临床应用指南和处方集编委会. 国家基本药物临床应用指南(中成药)[M]. 北京: 人民卫生出版社,

2012: 144-146.  
[3] 田瑜, 黎云燕. 风湿骨痛胶囊对炎症反应的影响[J]. 中国现代中药, 2016, 18(4): 431-434; 443.  
[4] Gao Y X, Yu H H, He C, et al. Fengshi Gutong Capsule attenuates osteoarthritis by inhibiting MAPK, NF- $\kappa$ B, AP-1, and Akt pathways[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 910.  
[5] 张小龙, 吴先富, 王昆, 等. HPLC-QTOF-MS法测定风湿骨痛胶囊中9个乌头类生物碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(3): 414-419.  
[6] 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.  
[7] 顾英, 冯怡, 李玉敏. 指纹图谱在中药物质基础研究中的应用[J]. 中成药, 2007, 29(7): 1048-1051.  
[8] 刘文, 蒋世云. 中药指纹图谱研究与应用进展[J]. 中国药房, 2011, 22(19): 1819-1822.  
[9] 孙国祥, 胡玥珊, 张春玲, 等. 构建中药数字化指纹图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(1): 160-169.  
[10] 孙岩, 吴晨光, 韩群, 等. HPLC指纹图谱结合化学模式识别评价祖师麻注射液的整体质量[J]. 中草药, 2020, 51(8): 2170-2176.  
[11] 刘江, 陈兴福, 邹元锋. 基于中药指纹图谱多维信息的化学模式识别研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(8): 1081-1088.  
[12] 韩晴雯, 周斌, 李玉平, 等. HPLC指纹图谱技术结合模式识别分析评价参莲胶囊的质量[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(7): 1300-1308.  
[13] 朱晓勤, 尹莲. 化学模式识别在中药分类和质量评价中的应用[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(10): 2111-2114.  
[14] 谷瑞敏, 涂洪谊, 孙鹤. 中药色谱指纹图谱相似度计算方法的探讨[J]. 中成药, 2009, 31(7): 988-990.  
[15] 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.