

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[△]

李林杰^{1,2*}, 谢潭芳^{1,2}, 王昱涵^{1,2}, 王志萍^{1,2#}, 黎芳^{1,2}, 王孝勋¹, 冯桥³(1.广西中医药大学药学院, 南宁 530200; 2.广西高校中药制剂共性技术研发重点实验室, 南宁 530200; 3.广西国际壮医医院皮肤科, 南宁 530200)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)04-0439-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.04.10



摘要 目的 建立壮药金母颗粒的指纹图谱并进行化学计量学分析,并测定其中3种成分的含量。方法 采用高效液相色谱(HPLC)法,以芦丁为参照,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》绘制10批金母颗粒的HPLC指纹图谱并进行相似度评价;通过与混合对照品进行比对,确定共有峰;采用SPSS 21.0软件进行聚类分析,采用SIMCA 14.1软件进行主成分分析、正交偏最小二乘-判别分析,以变量重要性投影(VIP)值>1为标准筛选影响金母颗粒质量的标志成分;采用HPLC法测定金母颗粒中落新妇苷、虎杖苷和盐酸小檗碱的含量。结果 10批金母颗粒共有22个共有峰,相似度为0.962~0.997;共指认出5个共有峰,分别为没食子酸(2号峰)、虎杖苷(9号峰)、芦丁(11号峰)、落新妇苷(13号峰)、山柰酚(20号峰)。聚类分析结果显示,10批金母颗粒可聚为3类,S1、S3~S4聚为一类,S5~S6、S9聚为一类,S2、S7~S8、S10聚为一类;主成分分析结果显示,模型解释参数为0.951,预测能力参数为0.723,分类结果与聚类分析结果基本一致。正交偏最小二乘-判别分析的分类结果也与聚类分析结果基本一致,VIP值>1的共有峰依次为7号峰、11号峰(芦丁)、17号峰、13号峰(落新妇苷)、3号峰、8号峰、6号峰、16号峰。落新妇苷、虎杖苷、盐酸小檗碱检测质量浓度的线性范围分别为0.012 6~1.225 0、0.010 8~1.052 5、0.020 0~1.562 5 mg/mL(R^2 均为0.999 9),精密密度、稳定性(24 h)、重复性试验的RSD均小于3%,平均加样回收率分别为99.48%(RSD=2.67%, $n=9$)、98.57%(RSD=1.77%, $n=9$)、100.84%(RSD=2.49%, $n=9$),含量分别为1.221 0~7.011 6、2.251 1~4.462 9、1.252 4~3.328 7 mg/g。结论 所建指纹图谱和含量测定方法准确、稳定、简便,结合化学计量学分析,可用于壮药金母颗粒的质量控制和评价。

关键词 壮药;金母颗粒;高效液相色谱法;指纹图谱;聚类分析;主成分分析;正交偏最小二乘法-判别分析;含量测定

Establishment of fingerprint, chemometric analysis and multi-component content determination of Zhuang medicine Jinmu granules

LI Linjie^{1,2}, XIE Tanfang^{1,2}, WANG Yuhan^{1,2}, WANG Zhiping^{1,2}, LI Fang^{1,2}, WANG Xiaoxun¹, FENG Qiao³(1. School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Key Laboratory of Generic Technology Research and Development of Traditional Chinese Medicine Preparations in Colleges and Universities in Guangxi, Nanning 530200, China; 3. Dept. of Dermatology, Guangxi International Zhuang Medicine Hospital, Nanning 530200, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish the fingerprint of Zhuang medicine Jinmu granules and carry out chemometric analysis, and determine the contents of three components. **METHODS** High performance liquid chromatography (HPLC) method was adopted. Using rutin as the reference, HPLC fingerprints of 10 batches of Jinmu granules were drawn and similarity evaluation was performed by *Similarity Evaluation of Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine* (2012 edition); the common peak was determined by comparing with mixed control; SPSS 21.0 software was used for cluster analysis, and SIMCA 14.1 software was used for principal component analysis and orthogonal partial least squares-discriminant analysis. The differential components affecting the quality of Jinmu granules were screened by taking the variable importance in projection (VIP) value >1 as the standard; the HPLC method was used to determine the contents of astilbin, polydatin and berberine hydrochloride in Jinmu granules. **RESULTS** There were 22 common peaks in 10 batches of Jinmu granules, and the similarities were 0.962-0.997; five common peaks were identified, namely gallic acid (peak 2), polydatin (peak 9), rutin (peak 11), astilbin (peak 13) and kaempferol (peak 20). The results of cluster analysis showed that 10 batches of Jinmu granules could be clustered into 3 categories: S1 and S3-S4 were grouped into one category; S5-S6 and S9 were grouped into one category; S2, S7-S8 and S10 were grouped into one category. The results of principal component analysis showed that the parameter of model interpretation was 0.951 and that of prediction ability was 0.723. The classification results were basically consistent with cluster analysis. The classification results of orthogonal partial least squares-discriminant analysis were also basically consistent with clus-

△ 基金项目:广西重点研发计划项目(No.2017AA10114)

* 硕士研究生。研究方向:中药、民族药新制剂与新剂型的研发。电话:0771-4953513。E-mail:504629836@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师,硕士。研究方向:中药、民族药新制剂与新剂型的研发。电话:0771-4953513。E-mail:318007460@qq.com

ter analysis. The common peaks with VIP value >1 in the order were peak 7>peak 11 (rutin)>peak 17>peak 13 (astilbin)>peak 3>peak 8>peak 6>peak 16 respectively. The linear ranges of astilbin, polydatin and berberine hydrochloride were 0.012 6-1.225 0, 0.010 8-1.052 5 and 0.020 0-1.562 5 mg/mL, respectively (all $R^2=0.999\ 9$). RSDs of precision, stability (24 h) and repeatability tests were all less than 3%. The average recoveries were 99.48% (RSD=2.67%, $n=9$), 98.57% (RSD=1.77%, $n=9$) and 100.84% (RSD=2.49%, $n=9$). The contents were 1.221 0-7.011 6, 2.251 1-4.462 9, 1.252 4-3.328 7 mg/g, respectively.

CONCLUSIONS Established fingerprint and the method of content determination are accurate, stable and simple. Combined with chemometric analysis, it can be used for the quality control and evaluation of Zhuang medicine Jinmu granules.

KEYWORDS Zhuang medicine; Jinmu granules; high performance liquid chromatography; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; content determination

壮药金母颗粒由壮医坐浴方加减而来^[1],含金剛刺(又名菝葜)、火炭母、土茯苓、虎杖、苦参、大血藤、黄柏、犁头草等多味壮药,主要用于临床治疗湿热毒引起的腹痛腹胀、月经不调等慢性盆腔炎炎症性疾病。根据壮医药理论,方中金剛刺、土茯苓均为主药,主要成分均为落新妇苷,具有清热毒、通水道、除湿毒、调谷道之功效^[2-3];火炭母亦为主药,主要含有山柰酚、槲皮素和没食子酸等成分,能除湿毒、清热毒、凉血止痛,外治宫颈炎、皮炎湿疹、霉菌性阴道炎等症^[2];虎杖为帮药,指标成分为虎杖苷,具有通谷道/气道/水道、解热毒之功效^[2];苦参同为帮药,主要含有苦参碱、氧化苦参碱和芦丁,能祛风毒、通谷道、除湿毒和清热毒^[4];大血藤亦为帮药,主要含有酚类成分,具有祛风止痛、清热解毒、活血的功效^[2];黄柏为带药,主要成分为盐酸小檗碱,具有泻火除蒸、清热燥湿、解毒疗疮之功效^[4];犁头草亦为带药,主要含有黄酮类成分,具有清热解毒、散瘀消肿的功效^[5]。

目前,关于金母颗粒已有制剂工艺、药效学等研究^[6-7],但该制剂的质量标准尚未建立。指纹图谱是一种可量化的且具有高度专属性的综合鉴定手段,能较为全面地反映中药及其制剂所含化学成分间的相对关系^[8-9]。化学计量学分析主要包括主成分分析、聚类分析和正交偏最小二乘法-判别分析等,其与指纹图谱联合使用可较好地反映中药及其制剂的整体特征^[10]。为全面控制金母颗粒的质量,本研究采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法建立了壮药金母颗粒的指纹图谱,同时进行化学计量学分析,并测定其中落新妇苷、虎杖苷、盐酸小檗碱的含量,旨在为金母颗粒质量标准的建立及上市提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有 LC-2030 Plus 型 HPLC 仪及配备的紫外检测器、二极管阵列检测器、Labsolutions5.97 色谱工作站(日本 Shimadzu 公司), JM-A5002 型电子天平(诸暨市超泽衡器设备有限公司), UPH-IV-20TN 型优普系列超纯水、98-1-B 型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司), KQ3200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

盐酸小檗碱、虎杖苷、落新妇苷对照品(批号分别为 MUST-19072501、MUST-19062702、MUST-20032410,纯度分别为 98.38%、98.26%、98.14%)均购自成都曼斯特生物科技有限公司;没食子酸、芦丁、山柰酚对照品(批号分别为 110831-201906、100080-202012、110861-202013,纯度分别为 91.5%、91.7%、95.5%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

10 批金母颗粒[编号 S1~S10,批号 20191201~20201010,每包 10 g(相当于生药 36.3 g)]均由广西中医药大学制剂工程中心研制。上述颗粒所用金剛刺、土茯苓、火炭母、大血藤、虎杖、犁头草、黄柏、苦参饮片均购自广西宝正药业有限公司,经广西中医药大学药学院韦松基教授鉴定,分别为菝葜科植物菝葜 *Smilax china* L. 的干燥根状茎,百合科植物光叶菝葜 *S. glabra* Roxb. 的干燥根茎,蓼科植物硬毛火炭母 *Polygonum chinense* L. var. *hispidum* Hook. f. 或火炭母 *P. chinense* L. 的干燥全草,木通科植物大血藤 *Sargentodoxa cuneata* (Oliv.) Rehd. et Wils. 的干燥藤茎,蓼科植物虎杖 *P. cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎和根,堇菜科植物戟叶堇菜 *Viola betonicifolia* J. E. Smith.、长萼堇菜 *V. inconspica* Bl. 或心叶堇菜 *V. concordifolia* C. J. Wang. 的新鲜或干燥全草,芸香科植物黄皮树 *Phellodendron sinii* Schneid. 的干燥树皮,豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根。金剛刺、土茯苓、火炭母、大血藤、犁头草饮片均产自广西,虎杖、苦参饮片均产自陕西,黄柏饮片产自四川。各单味饮片的来源信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 金母颗粒的 HPLC 指纹图谱建立

2.1.1 混合对照品溶液的制备 精密称取没食子酸、虎杖苷、芦丁、落新妇苷、山柰酚对照品适量,加甲醇溶解并稀释,制成上述 5 种成分质量浓度分别为 0.067、0.572、0.635、0.522、0.668 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取金母颗粒,混匀,取适量,研细。取上述粉末约 2 g,精密称定,置于 150 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 60% 乙醇 100 mL,密塞,称定质量,超

表1 各单味饮片的来源信息

编号	金刚刺		土茯苓		火炭母		大血藤		犁头草		虎杖		苦参		黄柏	
	批号	采收时间	批号	采收时间	批号	采收时间	批号	采收时间	批号	采收时间	批号	采收时间	批号	采收时间	批号	采收时间
S1	Y21011301	2020年4月	Y21011302	2020年4月	Y21011304	2020年5月	Y21011304	2020年12月	Y21011308	2020年7月	Y21011309	2020年10月	Y21011307	2020年7月	Y21011306	2020年7月
S2	Y20100801	2020年4月	Y20100817	2020年4月	Y20100809	2020年5月	Y20100833	2019年12月	Y20100857	2019年7月	Y20100841	2019年10月	Y20100849	2019年10月	Y20100865	2019年7月
S3	Y20100802	2020年4月	Y20100818	2020年4月	Y20100810	2020年5月	Y20100834	2019年12月	Y20100858	2019年7月	Y20100842	2019年10月	Y20100850	2019年10月	Y20100866	2019年7月
S4	Y20100803	2020年4月	Y20100819	2020年4月	Y20100811	2020年5月	Y20100835	2019年12月	Y20100859	2019年7月	Y20100843	2019年10月	Y20100851	2019年10月	Y20100867	2019年7月
S5	Y20100804	2020年4月	Y20100820	2020年4月	Y20100812	2020年5月	Y20100836	2019年12月	Y20100860	2019年7月	Y20100844	2019年10月	Y20100852	2019年10月	Y20100868	2019年7月
S6	Y20100805	2020年4月	Y20100821	2020年4月	Y20100813	2020年5月	Y20100837	2019年12月	Y20100861	2019年7月	Y20100845	2019年10月	Y20100853	2019年10月	Y20100869	2019年7月
S7	Y20100806	2020年4月	Y20100822	2020年4月	Y20100814	2020年5月	Y20100838	2019年12月	Y20100862	2019年7月	Y20100846	2019年10月	Y20100854	2019年10月	Y20100870	2019年7月
S8	Y20100807	2020年4月	Y20100823	2020年4月	Y20100815	2020年5月	Y20100839	2019年12月	Y20100863	2019年7月	Y20100847	2019年10月	Y20100855	2019年10月	Y20100871	2019年7月
S9	Y20100808	2020年4月	Y20100824	2020年4月	Y20100816	2020年5月	Y20100840	2019年12月	Y20100864	2019年7月	Y20100848	2019年10月	Y20100856	2019年10月	Y20100872	2019年7月
S10	19040801	2019年5月	19061603	2019年4月	Y20100817	2020年5月	17042504	2018年12月	Y20100865	2019年7月	19082102	2018年12月	19040801	2019年10月	19041301	2019年3月

声(功率300 W,频率40 kHz)30 min使完全溶解,放冷,再次称定质量,用60%乙醇补足缺失的质量,混匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 各单味饮片溶液的制备 取金刚刺等各单味饮片适量,分别按“2.1.2”项下方法制备单味饮片溶液。

2.1.4 色谱条件 以Symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)为色谱柱,以乙腈(A)-0.3%磷酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~40 min,5%A→8%A;40~60 min,8%A→14%A;60~95 min,14%A→19%A;95~110 min,19%A→30%A;110~135 min,30%A→60%A;135~145 min,60%A→95%A;145~150 min,95%A→5%A);流速为1 mL/min;柱温为30 ℃;检测波长为291 nm;进样量为10 μL。

2.1.5 精密度试验 取“2.1.2”项下供试品溶液(编号S1),按“2.1.4”项下色谱条件连续进样测定6次,以芦丁(11号峰)为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,22个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.00%(n=6),表明方法精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取金母颗粒(编号S1),共6份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,以芦丁(11号峰)为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,22个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.00%(n=6),表明方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取“2.1.2”项下供试品溶液(编号S1),分别于室温下放置0、3、6、9、12、24 h时按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,以芦丁(11号峰)为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,22个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.00%(n=6),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.1.8 指纹图谱的建立 取10批金母颗粒,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》进行色谱峰匹配,以分离度好、峰面积相对较大的色谱峰为共有峰,采用中位数法,以0.1 min

为时间窗宽度,S1为参照图谱,经色谱图多点校正后自动匹配,生成对照指纹图谱(R)和10批金母颗粒的叠加指纹图谱。结果显示,10批金母颗粒共有22个共有峰。金母颗粒的HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱见图1。

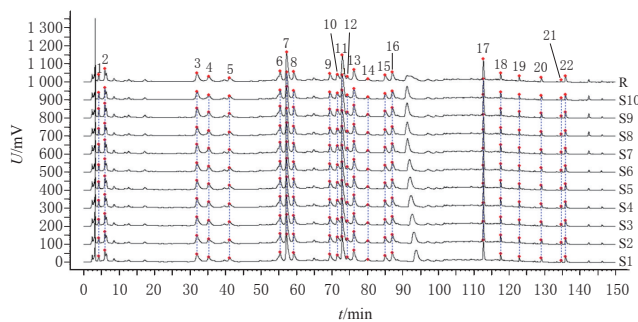


图1 10批金母颗粒的HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱

2.1.9 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》对10批金母颗粒进行相似度评价。结果显示,10批样品与对照指纹图谱的相似度分别为0.997、0.976、0.991、0.987、0.985、0.990、0.962、0.993、0.978、0.985,表明10批样品的相似度良好,金母颗粒的制备工艺稳定。

2.1.10 共有峰指认 取“2.1.1”项下混合对照品溶液,按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将供试品(编号S1)的HPLC图与混合对照品溶液的HPLC图进行比对,共指认了5个共有峰,分别为没食子酸(2号峰)、虎杖苷(9号峰)、芦丁(11号峰)、落新妇苷(13号峰)、山柰酚(20号峰)。由于芦丁的峰面积较大且分离度较好,故选择芦丁为参照峰。结果见图2。

2.1.11 共有峰与各单味饮片的相关性 取“2.1.3”项下各单味饮片溶液,按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将S1样品的HPLC图与上述各单味饮片溶液的HPLC图进行比对,初步判断各共有峰的归属情况。结果见图3、表2。

2.2 聚类分析

以10批金母颗粒中22个共有峰的相对峰面积为变量,使用SPSS 21.0软件,采用Ward连接法以平方欧氏距离为度量标准进行聚类分析。结果显示,当平方欧氏

距离为5时,10批金母颗粒可聚为3类,其中S1、S3~S4聚为一类,S5~S6、S9聚为一类,S2、S7~S8、S10聚为一类。结果见图4。

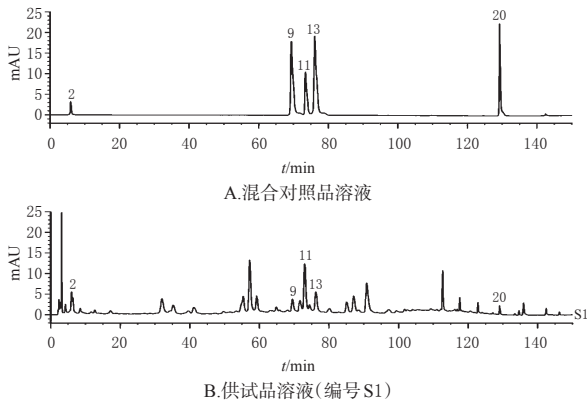


图2 没食子酸等成分的混合对照品溶液及供试品溶液的HPLC图

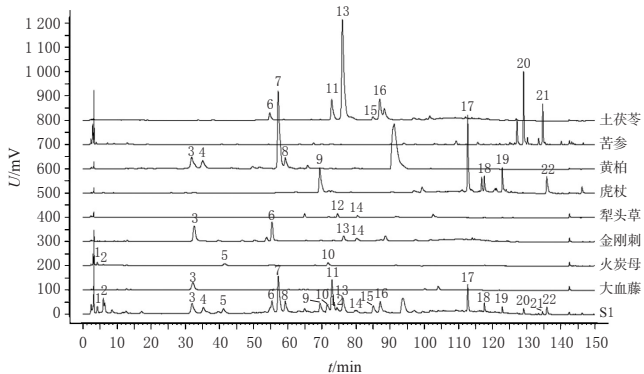


图3 金母颗粒与各单味饮片溶液的HPLC图

表2 各共有峰的归属情况

饮片	共有峰号	饮片	共有峰号
土茯苓	6, 11, 13, 15, 16	犁头草	12, 14
苦参	20, 21	金刚刺	3, 6, 13, 14
黄柏	3, 4, 7, 8	火炭母	1, 2, 5, 10
虎杖	9, 17, 18, 19, 22	大血藤	3

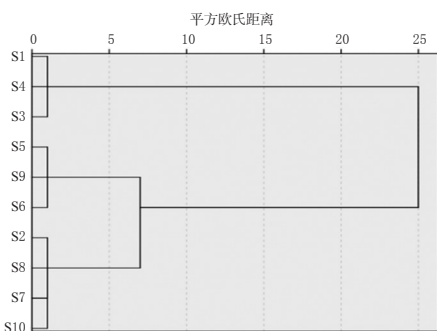


图4 10批金母颗粒的聚类分析树状图

2.3 主成分分析

以10批金母颗粒中22个共有峰的相对峰面积为变量构成22×10阶矩阵,导入SIMCA 14.1软件建立主成分分析模型,提取4个主成分,得到模型解释参数(R^2X)为0.951,表明提取的主成分可解释95.1%的原始变量;模

型预测能力参数(Q^2)为0.723,即预测模型能力为72.3%,提示该模型稳定、可靠^[11]。采用相同方法绘制主成分分析得分图,详见图5。由图5可知,10批壮药金母颗粒可分为3类,S1、S3~S4为一类,位于得分图的左侧;S5~S6、S9为一类,位于得分图的中部;S2、S7~S8、S10为一类,位于得分图的右侧。这表明不同批次金母颗粒化学成分的含量存在一定差异。

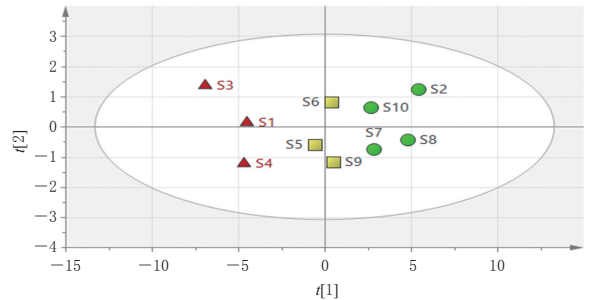


图5 10批金母颗粒的主成分分析得分图

2.4 正交偏最小二乘-判别分析

为进一步寻找导致金母颗粒质量差异的标志成分,本研究将10批金母颗粒中22个共有峰的相对峰面积导入SIMCA 14.1软件,以Pareto算法进行特征缩放,获得正交偏最小二乘-判别分析模型。结果显示,模型解释参数(R^2X 、 R^2Y)分别为0.920、0.678,表明模型对 X 变量的可解释率为92.0%,对 Y 变量的可解释率为67.8%; Q^2 为0.493,表明模型的预测能力为49.3%。采用SIMCA 14.1绘制得分矩阵图,详见图6。由图6可知,10批金母颗粒可分为3类,S1、S3~S4为一类,位于得分图的右下侧;S5~S6、S9为一类,位于得分图的中上方;S2、S7~S8、S10为一类,位于得分图的左侧。

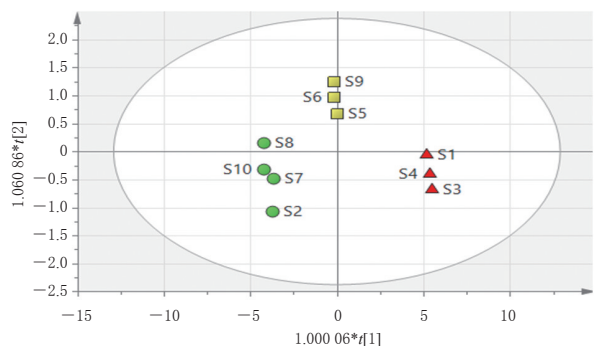


图6 10批金母颗粒的正交偏最小二乘-判别分析得分矩阵图

采用SIMCA 14.1软件,以置换检验($n=200$)对当前正交偏最小二乘-判别分析模型进行验证,详见图7。由图7可知,模型验证参数(R^2 、 Q^2)分别为(0, 0.333)、(0, -0.446), Q^2 点的回归线与垂直轴(左侧)相交于0以下,表明所建正交偏最小二乘-判别分析模型拟合良好^[12],可用于分析金母颗粒的质量差异成分。

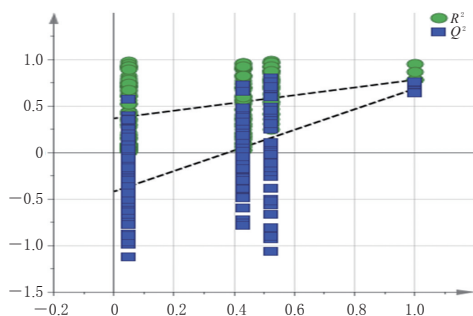


图7 正交偏最小二乘-判别分析模型的置换检验结果

变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)值是筛选差异性化合物的重要指标, VIP值越高, 表示对应化合物对组间质量差异的影响越大^[12]。采用SIMCA 14.1软件, 以VIP值>1为标准筛选影响金母颗粒质量的标志成分^[13]。结果显示, VIP值>1的共有峰依次为7号峰、11号峰(芦丁)、17号峰、13号峰(落新妇苷)、3号峰、8号峰、6号峰、16号峰, 表明这8个共有峰对应的成分可能是造成金母颗粒质量差异的标志成分。结果见图8。

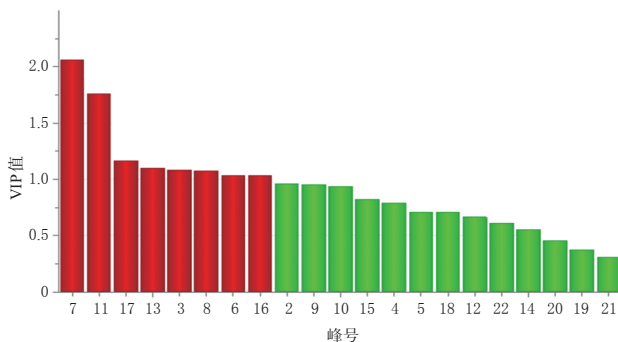


图8 10批金母颗粒22个共有峰的VIP值

2.5 金母颗粒中虎杖苷、落新妇苷的含量测定

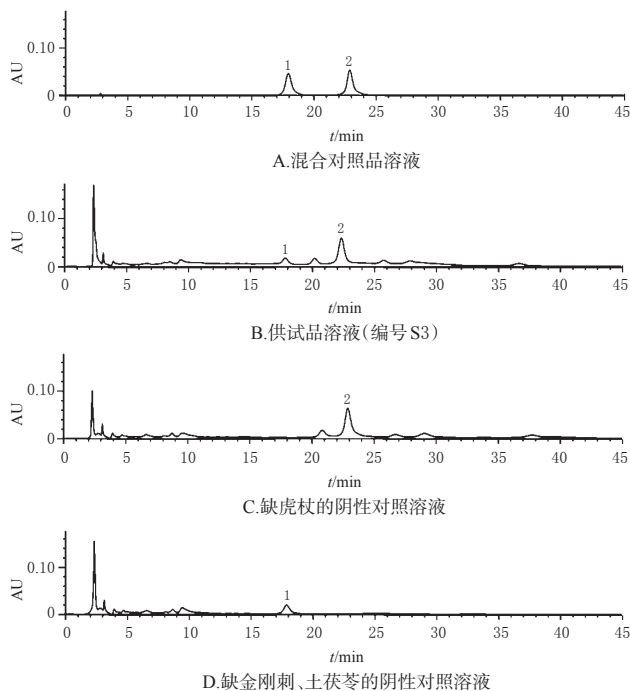
2.5.1 混合对照品溶液的制备 取虎杖苷、落新妇苷对照品适量, 精密称定, 加入60%乙醇溶解并稀释, 制成上述2种成分质量浓度分别为0.413、0.496 mg/mL的混合对照品溶液。

2.5.2 供试品溶液的制备 同“2.1.2”项。

2.5.3 阴性对照溶液的制备 按金母颗粒的制备工艺分别制备缺金刚刺、土茯苓、虎杖的阴性颗粒, 再按“2.5.2”项下方法制备缺虎杖和缺金刚刺、土茯苓的阴性对照溶液。

2.5.4 色谱条件 以Shim-pack GIST C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱, 以乙腈-0.1%磷酸溶液(15:85, V/V)为流动相; 流速为1 mL/min; 柱温为30 ℃; 检测波长为291 nm; 进样量为10 μL。

2.5.5 专属性试验 取上述混合对照品溶液、供试品溶液及各阴性对照溶液, 按“2.5.4”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 详见图9。由图9可知, 各色谱峰的分度均大于1.5, 理论板数按虎杖苷峰计不低于3 000, 阴性对照无干扰。



1: 虎杖苷; 2: 落新妇苷

图9 虎杖苷等混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液的HPLC图

2.5.6 线性关系考察 取各对照品适量, 按“2.5.1”项下方法制备虎杖苷质量浓度分别为0.010 8、0.027 0、0.067 4、0.168 4、0.421 0、1.052 5 mg/mL, 落新妇苷0.012 6、0.031 4、0.078 4、0.196 0、0.490 0、1.225 0 mg/mL的系列线性工作溶液, 按“2.5.4”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以待测成分的质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 得虎杖苷的回归方程为 $Y=3.5397 \times 10^7 X - 115346.6227$ ($R^2=0.9999$), 落新妇苷的回归方程为 $Y=2.2098 \times 10^7 X - 104101.0317$ ($R^2=0.9999$), 表明虎杖苷、落新妇苷检测质量浓度的线性范围分别为0.010 8~1.052 5、0.012 6~1.225 0 mg/mL。

2.5.7 精密度的试验 取“2.5.1”项下混合对照品溶液, 按“2.5.4”项下色谱条件连续进样测定6次, 记录峰面积。结果显示, 虎杖苷、落新妇苷峰面积的RSD分别为0.20%、0.03% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.5.8 稳定性试验 取“2.5.2”项下供试品溶液(编号S3), 分别于室温下放置0、4、8、12、16、20、24 h时按“2.5.4”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果显示, 虎杖苷、落新妇苷峰面积的RSD分别为1.53%、2.27% ($n=7$), 表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.5.9 重复性试验 取金母颗粒(编号S3)约2 g, 共6份, 精密称定, 按“2.5.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.5.4”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并按外标法计算样品含量。结果显示, 虎杖苷、落新妇苷含量的RSD分别为2.34%、2.44% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

2.5.10 加样回收率试验 取已知含量的金母颗粒(编

号S3)约1 g,精密称定,共9份,精密加入各单一对照品适量,按“2.5.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.5.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果见表3。

表3 虎杖苷等成分的加样回收率试验结果(n=9)

待测成分	样品量/ g	已知量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	加样回收率/ %	平均加样回收率/ %	RSD/ %
虎杖苷	0.998 4	3.146 7	2.187 3	5.304 9	98.67	98.57	1.77
	1.000 7	3.153 9	2.187 3	5.381 2	101.83		
	1.010 2	3.183 8	2.187 3	5.354 4	99.24		
	1.005 6	3.169 3	3.920 6	6.916 4	95.57		
	0.999 7	3.150 8	3.920 6	6.938 9	96.62		
	1.001 5	3.156 4	3.920 6	7.037 1	98.98		
	1.002 0	3.158 0	5.695 1	8.758 4	98.34		
	0.999 2	3.149 2	5.695 1	8.790 4	99.05		
	1.010 3	3.184 2	5.695 1	8.814 6	98.86		
落新妇苷	0.998 4	5.647 9	2.973 6	8.524 5	96.73	99.48	2.67
	1.000 7	5.661 0	2.973 6	8.626 7	99.74		
	1.010 2	5.714 7	2.973 6	8.545 4	95.19		
	1.005 6	5.688 7	5.699 5	11.230 1	97.23		
	0.999 7	5.655 3	5.699 5	11.344 7	99.82		
	1.001 5	5.665 5	5.699 5	11.336 3	99.50		
	1.002 0	5.668 3	8.425 3	14.275 8	102.16		
	0.999 2	5.652 5	8.425 3	14.244 4	101.98		
	1.010 3	5.715 3	8.425 3	14.388 4	102.94		

2.5.11 样品含量测定 取10批金母颗粒样品,按“2.5.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.5.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算样品含量。每样品平行测定3次,取平均值。结果显示,10批样品中虎杖苷、落新妇苷的含量分别为2.251 1~4.462 9、1.221 0~7.011 6 mg/g,平均含量分别为3.022 7、2.958 9 mg/g。结果见表4。

表4 金母颗粒中虎杖苷、落新妇苷的含量测定结果(n=3, mg/g)

编号	虎杖苷	落新妇苷	编号	虎杖苷	落新妇苷
S1	4.462 9	7.011 6	S6	2.783 9	2.839 5
S2	3.531 1	4.595 4	S7	2.540 8	1.293 3
S3	3.387 8	5.124 7	S8	2.757 0	1.289 3
S4	2.881 4	2.276 2	S9	2.424 8	1.310 9
S5	3.206 2	2.626 6	S10	2.251 1	1.221 0

2.6 金母颗粒中盐酸小檗碱的含量测定

2.6.1 对照品溶液的制备 取盐酸小檗碱对照品适量,精密称定,加入60%乙醇溶解并稀释,制成盐酸小檗碱质量浓度为0.050 0 mg/mL的对照品溶液。

2.6.2 供试品溶液的制备 同“2.1.2”项。

2.6.3 阴性对照溶液的制备 按金母颗粒制备工艺制备缺黄柏的阴性颗粒,再按“2.6.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.6.4 色谱条件 以Agilent ZORBAX C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,以乙腈-0.3%磷酸溶液(每100 mL磷酸溶液中加入十二烷基硫酸钠0.08 g)(50:50, V/V)为流动相;流速为1 mL/min;柱温为30 ℃;检测波长为

345 nm;进样量为10 μL。

2.6.5 专属性试验 取上述对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液,按“2.6.4”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图10。由图10可知,盐酸小檗碱色谱峰与相邻色谱峰的分离度均大于1.5,理论板数大于4 000,阴性对照无干扰。

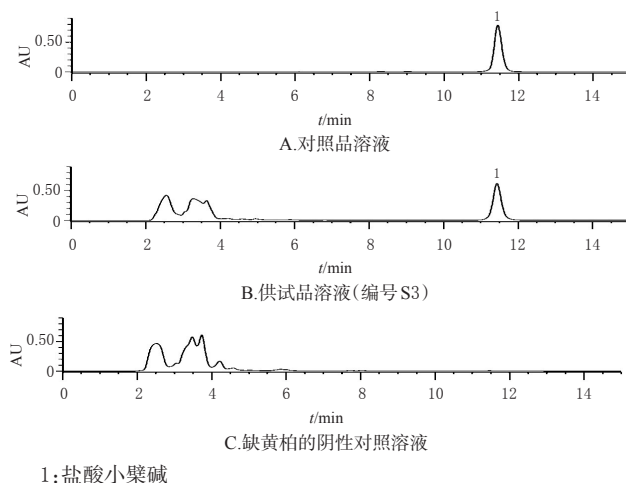


图10 盐酸小檗碱对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液的HPLC图

2.6.6 线性关系考察 取盐酸小檗碱对照品适量,用60%乙醇稀释制成质量浓度分别为0.020 0、0.050 0、0.125 0、0.312 5、0.781 2、1.562 5 mg/mL的系列线性工作溶液,按“2.6.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分的质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得盐酸小檗碱的回归方程为 $Y=4.349 1 \times 10^7 X - 218 508.214 8 (R^2=0.999 9)$,表明盐酸小檗碱检测质量浓度的线性范围为0.020 0~1.562 5 mg/mL。

2.6.7 精密度试验 取“2.6.1”项下对照品溶液,按“2.6.4”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,盐酸小檗碱峰面积的RSD为0.26%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.6.8 稳定性试验 取“2.6.2”项下供试品溶液(编号S3),分别于室温下放置0、4、8、12、16、20、24 h时按“2.6.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,盐酸小檗碱峰面积的RSD为0.12%(n=7),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.6.9 重复性试验 取金母颗粒(编号S3)约2 g,共6份,精密称定,按“2.6.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.6.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果显示,盐酸小檗碱的平均含量为1.645 8 mg/g, RSD为2.63%(n=6),表明方法重复性良好。

2.6.10 加样回收率试验 取已知含量的金母颗粒(编号S3)约1 g,精密称定,共9份,精密加入“2.6.1”项下对照品溶液,按“2.6.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.6.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样

回收率。结果见表5。

表5 盐酸小檗碱的加样回收率试验结果($n=9$)

样品量/g	已知量/mg	加入量/mg	测得量/mg	加样回收率/%	平均加样回收率/%	RSD/%
1.000 9	1.647 3	0.895 3	2.548 0	100.61	100.84	2.49
1.011 4	1.664 6	0.895 3	2.577 9	102.02		
1.008 2	1.659 3	0.895 3	2.583 1	103.19		
0.998 6	1.643 5	1.694 1	3.399 5	103.65		
1.016 5	1.673 0	1.694 1	3.412 4	102.67		
1.006 3	1.656 2	1.694 1	3.358 1	100.46		
0.998 1	1.642 7	2.148 6	3.693 9	95.47		
1.011 6	1.664 9	2.148 6	3.794 8	99.13		
0.999 5	1.645 0	2.148 6	3.801 0	100.34		

2.6.11 样品含量测定 取10批金母颗粒,按“2.6.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.6.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算样品含量。每样品平行测定3次,取平均值。结果显示,10批样品中,盐酸小檗碱的含量分别为1.324 3、1.840 8、1.644 2、2.642 4、3.089 7、3.328 7、1.355 1、1.843 6、3.317 8、1.252 4 mg/g,平均含量为2.163 9 mg/g。

3 讨论

3.1 供试品制备与色谱条件优化

本课题组前期预实验结果显示,在制备供试品溶液时,若样品取样量为1 g,加入60%乙醇50 mL,所得样品中待测成分的含量波动较大。为使检测结果稳定,本研究将取样量及溶剂均增加了1倍,结果显示,所得样品中待测成分的含量较为稳定。同时,本课题组前期还对指纹图谱所用流动相体系进行了比较,包括乙腈-水、乙腈-磷酸溶液、甲醇-水、甲醇-磷酸溶液等。结果发现,当以甲醇为有机相时,各色谱峰分离度不佳且出峰时间较晚;当以水为水相时,所得色谱图的色谱信息较少、峰形较差;当以乙腈-0.3%磷酸溶液为流动相时,所得色谱图的色谱信息丰富,色谱峰保留时间适中且峰形及分离度均较好。此外,本课题组前期将供试品溶液于190~600 nm波长范围内进行了全波长扫描,结果发现供试品溶液于265、291、306、345 nm波长处均有较大吸收。因此,在预实验时,本课题组分别对上述波长下的色谱图进行了比较,结果显示,在265 nm波长下,色谱图中的色谱信息较少;在345 nm波长下,各色谱峰分离度较差;在306 nm波长下,色谱图的基线发生漂移;而在291 nm波长下,各色谱峰分离度良好,色谱信息丰富且特征性较强。综合考虑,本研究最终选择“2.1.4”项下色谱条件。

3.2 指纹图谱与化学计量学分析

指纹图谱结果显示,10批金母颗粒样品共有22个共有峰,相似度均大于0.960。共指认了5个共有峰,分别为没食子酸(2号峰)、虎杖苷(9号峰)、芦丁(11号峰)、落新妇苷(13号峰)、山柰酚(20号峰)。聚类分析结果显示,10批样品可聚为3类,其中S1、S3~S4聚为一类,S5~S6、S9聚为一类,S2、S7~S8、S10聚为一类;主

成分分析结果、正交偏最小二乘-判别分析结果与上述聚类分析结果基本一致;得到VIP值>1的共有峰依次为7号峰、11号峰(芦丁)、17号峰、13号峰(落新妇苷)、3号峰、8号峰、6号峰、16号峰,表明这8个共有峰对应成分可能是造成金母颗粒质量差异的成分,可作为评价其质量的标志成分。

3.3 指标成分选择与含量测定结果分析

有研究指出,落新妇苷为金刚刺、土茯苓共有的指标成分,具有抑菌、抗炎的作用^[14-15],用于盆腔炎的疗效显著^[16];虎杖苷为虎杖的指标成分,可用于治疗盆腔炎、子宫粘连等妇科疾病^[17-18];盐酸小檗碱为黄柏的活性成分,可用于临床治疗慢性盆腔炎、皮肤过敏等^[19]。因此,本研究选择这3种成分作为金母颗粒的指标成分。含量测定结果显示,10批金母颗粒中,落新妇苷、虎杖苷、盐酸小檗碱含量分别为1.221 0~7.011 6、2.251 1~4.462 9、1.252 4~3.328 7 mg/g。每批含量测定结果均有差异,其原因可能与各批次药材的采收时间、地点等不同有关。

综上所述,所建指纹图谱和含量测定方法准确、稳定、简便,结合化学计量学分析,可用于壮药金母颗粒的质量控制和评价。

参考文献

- [1] 冯桥,韦金香,李莉,等.壮医坐浴方治疗念珠菌性阴道炎的临床研究[J].中国民族民间医药,2012,21(14):2.
- [2] 广西壮族自治区食品药品监督管理局.《广西壮族自治区壮药质量标准第一卷:2008年版》注释[M].南宁:广西科学技术出版社,2008:25,32,69,134-135.
- [3] 广西壮族自治区食品药品监督管理局.《广西壮族自治区壮药质量标准第二卷:2011年版》注释[M].南宁:广西科学技术出版社,2011:186.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:20-21,211-212,318-319.
- [5] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准:2003版[S].贵阳:贵州科技出版社,2003:343.
- [6] 李晓霞,王志萍,蒋雅娴,等.金母颗粒提取工艺的优化[J].中成药,2020,42(10):2561-2565.
- [7] 梁草,王志萍,黎芳,等.白金颗粒对盆腔炎症性疾病后遗症模型大鼠的药效学[J].中成药,2017,39(7):1329-1335.
- [8] 夏珊,李林,骆铃,等.茵芪肝复颗粒的高效液相色谱指纹图谱研究[J].中药新药与临床药理,2021,32(9):1359-1364.
- [9] 林林,于凤蕊,徐丽华,等.女金丸HPLC指纹图谱建立及聚类分析和主成分分析[J].中国药房,2019,30(10):1339-1343.
- [10] 石海培,包贝华,黄胜良,等.川芎饮片的HPLC指纹图谱建立、聚类分析及偏最小二乘判别分析[J].中国药房,2019,30(8):1066-1071.

(下转第464页)