

紫连生肌凝胶剂 HPLC 指纹图谱建立及 6 个成分含量测定*

闫治攀, 李喜香**, 高丽霞

(甘肃省中医院, 兰州 730050)

摘要 目的: 建立紫连生肌凝胶剂指纹图谱, 并测定没食子酸、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱和左旋紫草素的含量。方法: 采用 Agilent C₁₈-WR(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.15% 磷酸水, 梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长 270、345、516 nm, 结合聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘法判别分析对紫连生肌凝胶剂的指纹图谱进行化学模式识别, 并对指定的 6 个成分进行定量分析。结果: 建立了紫连生肌凝胶剂指纹图谱, 共标定 26 个共有峰, 与对照指纹图谱的相似度为 0.828~0.997; 指认出没食子酸、表小檗碱、黄连碱、小檗碱、巴马汀和左旋紫草素 6 个色谱峰。6 个成分在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.9995$), 平均加样回收率在 98.7%~99.3%, RSD 在 1.3%~1.8%。11 批样品中 6 个成分含量分别为 827.74~1513.50 μg·g⁻¹、137.52~296.05 μg·g⁻¹、381.83~884.73 μg·g⁻¹、2023.81~4051.66 μg·g⁻¹、524.15~986.13 μg·g⁻¹ 和 47.65~549.46 μg·g⁻¹。结论: 该方法简便, 稳定可靠, 重复性好, 可用于紫连生肌凝胶剂的质量控制。
关键词: 紫连生肌凝胶剂; 没食子酸; 表小檗碱; 黄连碱; 巴马汀; 小檗碱; 左旋紫草素; 含量测定; 质量评价; 高效液相色谱指纹图谱

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2024)09-1586-11

doi: 10.16155/j.0254-1793.2023-0543

Establishment of HPLC fingerprints and determination of six components for Zilian Shengji gel*

YAN Zhi-pan, LI Xi-xiang**, GAO Li-xia

(Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

Abstract Objective: To establish the HPLC fingerprints for Zilian Shengji gel and to determine the contents of gallic acid, tableberberine, coptisine, palmatine, berberine and shikonin. **Methods:** The establishment of fingerprints was performed on a 25 °C thermostatic Agilent C₁₈-WR(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.15% phosphoric acid water at the flowing rate of 0.8 mL·min⁻¹ in a gradient elution manner, and the detection wavelength were set at 270 nm, 345 nm and 516 nm. Cluster analysis, principal component analysis(PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis(OPLS-DA) were adopted in chemical pattern recognition. The six components identified were quantitatively determined. **Results:** The HPLC fingerprint of Zilian Shengji gel was constructed with twenty-six common chromatographic peaks, eleven batches of samples with the similarities of 0.828-0.997, six chromatographic peaks of gallic

* 甘肃省中医药重点科研项目(GZKZ-2020-4)

** 通信作者 Tel:15002550389;E-mail:lixixiang929@163.com

第一作者 Tel:18193140379;E-mail:yanzhipan0403@126.com

acid, tableberberine, coptisine, palmatine, berberine and shikonin were identified by reference substance comparison. Six constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.9995$) whose average recoveries were 98.7%–99.3%, with the RSDs of 1.3%–1.8%. The content ranges of the above mentioned six components in eleven batches of samples were $827.74 - 1513.50 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $137.52 - 296.05 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $381.83 - 884.73 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $2023.81 - 4051.66 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $524.15 - 986.13 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ and $47.65 - 549.46 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. **Conclusion:** This simple, stable, reliable and reproducible method can be used for the quality control of Zilian Shengji gel.

Keywords: Zilian Shengji gel; gallic acid; tableberberine; coptisine; palmatine; berberine; shikonin; contents determination; quality evaluation; HPLC fingerprints

紫连生肌凝胶剂为甘肃省中医院院内制剂玉红油纱条(甘药制字 Z04000845)二次开发产品,处方由黄连、白及、五倍子和紫草组成,广泛用于临床外科急慢性创面,疗效显著。前期,课题组对其制备工艺进行了系统研究,并制定了稳定可行的制备工艺流程^[1],但基于医院院内制剂检验成本和质量检验方法简单易行,造成了其质量标准简单落后,只对方中的黄连进行了薄层鉴别,不能满足现代中药复方制剂的质量检验需求,本实验建立紫连生肌凝胶剂 HPLC 指纹图谱,并同时测定没食子酸、表小檗碱、黄连碱、巴马汀和左旋紫草素的含量,再采用聚类分析和主成分分析对指纹图谱数据信息进行挖掘^[2],快速筛选质量差异成分,以期为该制剂批次间稳定性和质量评价研究提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

2478 高效液相色谱仪(Waters 公司);SQP 型十万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器公司);FA1004 十万分之一电子天平(上海良平仪器仪表有限公司);溶剂过滤器(津腾服务有限公司);HH-7 型恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);KQ-300DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Labonco-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱(北京兰贝恒温技术股份有限公司);PDV 旋转粘度计(上海尼润智能科技有限公司);PHS-3CpH 计(杭州奥立龙仪器有限公司);RE-3000 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 试剂

对照品没食子酸(批号 110831-201906,纯度 99.76%)、黄连碱(批号 112026-201802,纯度 98.9%)、小檗碱(批号 110713-201814,纯度 99%)、巴马汀(批号 110732-201913,纯度 99%)、左旋紫草素(批号 110713-201814,纯度 99%)均购

自中国食品药品检定研究院;表小檗碱(批号 D20108,纯度 98%)购自源叶生物技术有限公司;泊洛沙姆 407、泊洛沙姆 188、聚乙二醇 6000 均购自湖北兴银河化工有限公司;卡波姆购自山东萍聚生物科技有限公司;乙腈、甲醇、磷酸均为色谱纯,均购自天津大茂化学试剂有限公司;盐酸分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;水为超纯水。黄连(批号 191007、201102、210702、210821、220101、220301、220602、220617、220703、JZ2105022、210702,产地四川)、紫草(批号 190301、200601、200701、20170901、20180701、20211001、20220301、210602、JZ2103028、220602,产地新疆)、白及(批号 200504、2006037、210501、200701、201001、20210901、211101CP059,产地云南)和五倍子(批号 191102、210101、220101、41222001、200901,产地四川),均由甘肃省中医院提供,饮片经甘肃省药品检定研究院宋平顺主任药师鉴定,均符合 2020 年版《中华人民共和国药典》有关规定。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 样品 每味中药饮片按照处方配比(黄连、紫草、白及、五倍子)称取 11 份全方(从现有的 4 味药材批次中随机组合成 11 份,组合详见表 1),处方以 90% 乙醇温浸提取 2 次,溶媒用量分别为 11 倍和 9 倍,2 次均提取 45 min,提取温度设为 60 °C,合并 2 次提取液,回收乙醇至无醇味,浓缩至浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[3]。按制剂处方比例称取泊洛沙姆 407、泊洛沙姆 188、聚乙二醇 6000 和去离子水,将泊洛沙姆 407、泊洛沙姆 188 和聚乙二醇 6000 置于烧杯中,加入去离子水,-4 °C 溶胀 24 h^[4],取处方量的浓缩药液加入到溶胀好的空白凝胶中,摇匀,脱气制成紫连生肌凝胶剂(序号 Sz1~Sz11)。

表 1 11 批紫连生肌凝胶剂样品信息

Tab. 1 Information of 11 batches of Zilian Shengji gel samples

样品编号 (sample No.)	批号 (lot No.)			
	黄连 (<i>Coptidis Rhizoma</i>)	紫草 (<i>Arnebiae Radix</i>)	白及 (<i>Bletillae Rhizoma</i>)	五倍子 (<i>Galla Chinensis</i>)
Sz1	210702	210602	201001	210101
Sz2	210702	20211001	2006037	220101
Sz3	220602	220602	210501	41222001
Sz4	210821	JZ2103028	2006037	220101
Sz5	JZ2105022	200701	200504	41222001
Sz6	220101	210602	200701	191102
Sz7	220301	190301	210501	41222001
Sz8	220703	20180701	20210901	210101
Sz9	191007	200601	210501	200901
Sz10	201102	20220301	2006037	210101
Sz11	220617	20170901	211101CP059	191102

2.1.2 供试品溶液 称取紫连生肌凝胶剂 5 g, 加入 20% 氯化钠溶液 20 mL, 精密称定, 超声 (功率 300 W, 频率 40 kHz) 提取 30 min, 拭干锥形瓶表面水分, 放冷后用 20% 氯化钠溶液补足减失的量, 滤过, 取续滤液 10 mL, 水浴蒸干, 残渣用 90% 甲醇-盐酸 (100:2) 溶解并定容至 25 mL, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.3 药材供试品溶液 分别取五倍子、紫草和黄连药材各 1.0 g, 按“2.1.2”项下方法制备各药材供试品溶液。

2.1.4 混合对照品溶液 精密称定对照品没食子酸、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱和左旋紫草素适量, 分别置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 制成质量浓度分别为 1.644、0.256、0.564、0.932、3.136 和 0.126 mg · mL⁻¹ 的对照品溶液, 分别精密取上述对照品溶液各 0.5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 制成浓度为 82.20、12.80、28.20、46.60、156.80 和 6.30 mg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.1.5 阴性样品溶液 依据处方量称饮片, 按“2.1.1”项下方法制备不含黄连、不含紫草、不含五倍子、不含白及的阴性样品制剂, 按“2.1.2”项下方法制备各阴性样品溶液。

2.2 紫连生肌凝胶剂 HPLC 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 采用 Agilent C₁₈-WR 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈为流动相 A,

以 0.15% 磷酸水为流动相 B, 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 5% A → 12% A; 10 ~ 48 min, 12% A → 20% A; 48 ~ 60 min, 20% A → 21% A; 60 ~ 70 min, 21% A → 34% A; 70 ~ 85 min, 34% A → 80% A; 85 ~ 100 min, 80% A → 95% A)^[5], 流速 0.8 mL · min⁻¹, 进样体积 10 μL, 柱温 25 °C, 检测波长 270 nm (0 ~ 48 min)、345 nm (48 ~ 85 min)、516 nm (85 ~ 100 min), 采集时长 100 min。

2.2.2 精密度试验^[6] 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液 (Sz1), 在“2.2.1”项色谱条件下连续测定 6 次, 以 19 号峰为参照峰, 计算各共有色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 均不大于 0.87% 和 4.7%, 表明仪器精密度良好。

2.2.3 重复性试验^[6] 按“2.1.2”项下制备供试品溶液 (Sz1) 6 份, 按照“2.2.1”项下色谱条件依次进样, 以 19 号峰为参照峰, 计算各共有色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 均不大于 0.89% 和 4.6%, 表明方法重复性良好。

2.2.4 稳定性试验^[6] 按“2.1.2”项下制备供试品溶液 (Sz1), 按照“2.2.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24、48、72 h 进样, 以 19 号峰为参照峰, 计算各共有色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 均不大于 0.64% 和 4.8%, 说明样品在 72 h 内稳定。

2.2.5 紫连生肌凝胶剂指纹图谱的建立与共有峰确定 将得到的 11 批紫连生肌凝胶剂色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”, 对紫连生肌凝胶剂样品色谱图基线分析, 以时间宽度

为 0.1,采用中位数法、多点校正、Mark 峰匹配生成 11 批样品图谱(Sz1 ~ Sz11)和对照指纹图谱(R),共

标定 26 个共有峰^[7-8],结果见图 1,11 批样品与对照指纹图谱的相似度见表 2。

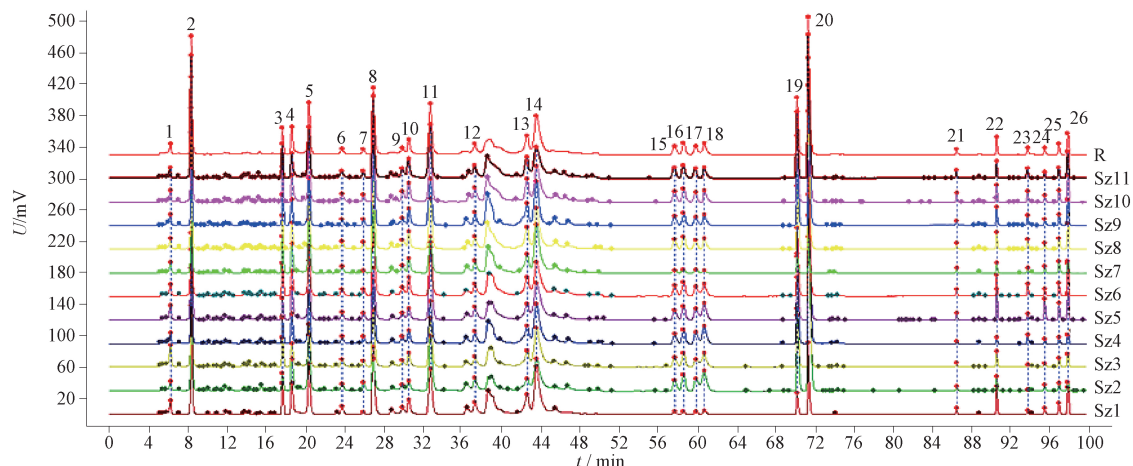


图 1 11 批紫连生肌凝胶剂样品的 HPLC 指纹图谱与对照图谱 R

Fig. 1 HPLC fingerprints of 11 batches of Zilian Shengji gel samples (Sz1 - Sz11) and reference fingerprint (R)

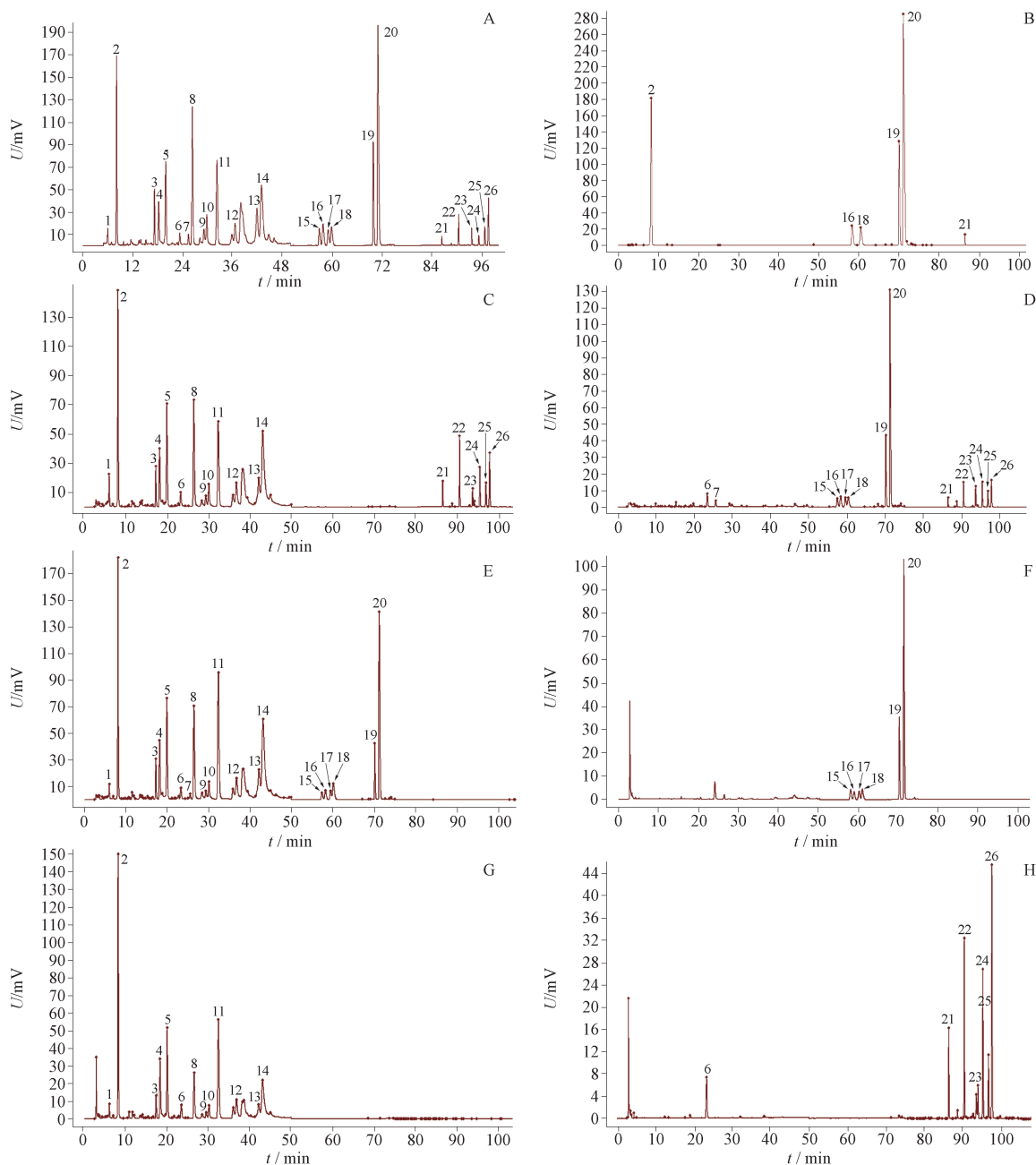
表 2 11 批紫连生肌凝胶剂样品相似度

Tab. 2 Similarities of 11 batches of zilian shengji gel samples

样品编号 (sample No.)	相关系数(correlation coefficient)										
	Sz1	Sz2	Sz3	Sz4	Sz5	Sz6	Sz7	Sz8	Sz9	Sz10	Sz11
Sz1	1	0.777	0.895	0.825	0.894	0.910	0.969	0.919	0.917	0.916	0.917
Sz2	0.777	1	0.964	0.985	0.973	0.950	0.645	0.942	0.941	0.945	0.945
Sz3	0.895	0.964	1	0.987	0.988	0.989	0.802	0.989	0.987	0.988	0.989
Sz4	0.825	0.985	0.987	1	0.975	0.975	0.713	0.971	0.971	0.972	0.972
Sz5	0.894	0.973	0.988	0.975	1	0.984	0.786	0.981	0.979	0.982	0.983
Sz6	0.910	0.950	0.989	0.975	0.984	1	0.810	0.999	0.999	0.999	0.999
Sz7	0.969	0.645	0.802	0.713	0.786	0.810	1	0.827	0.823	0.820	0.823
Sz8	0.919	0.942	0.989	0.971	0.981	0.999	0.827	1	0.999	0.999	0.999
Sz9	0.917	0.941	0.987	0.971	0.979	0.999	0.823	0.999	1	0.999	0.999
Sz10	0.916	0.945	0.988	0.972	0.982	0.999	0.820	0.999	0.999	1	0.999
Sz11	0.917	0.945	0.989	0.972	0.983	0.999	0.823	0.999	0.999	0.999	1
R	0.920	0.955	0.995	0.978	0.991	0.997	0.828	0.997	0.996	0.997	0.997

2.2.6 共有峰的归属及化学成分的确认^[9-10] 取“2.1.3”项下各药材供试品溶液、“2.1.4”项下对照品溶液和“2.1.5”项下阴性样品溶液适量,在“2.2.1”项色谱条件下进样测定,其中 15、16、17、18、19 和 20 号峰归属于黄连,1、2、3、4、5、8、9、10、11、12、13 和 14 号峰归属于五倍子,21、22、23、24、25 和 26 号峰归属于紫草;共指出 6 个化合物,分别为没食子酸(2 号峰)、表小檗碱(16 号峰)、黄连碱(18 号峰)、巴马汀(19 号峰)、小檗碱(20 号峰)和左旋紫草素(21 号峰),结果见图 2。

2.2.7 聚类分析^[11] 将 11 批样品共有峰峰面积导入 SPSS 20.0 软件,对 11 批紫连生肌凝胶剂指纹图谱进行聚类,如图 3 所示,当分类距离为 5 时,11 批样品可以分为 4 大类,Sz1、Sz3、Sz6、Sz7 为一类,Sz4、Sz5、Sz8、Sz11 为一类,Sz9、Sz10 为一类,Sz2 为一类;当分类距离大于 10 时,11 批样品可以分为两大类,Sz2、Sz9、Sz10,其余样品归为一大类,说明紫连生肌凝胶剂各批次间质量存在差异,这主要是由于饮片批次间质量差异造成的。



2. 没食子酸(gallic acid) 16. 表小檗碱(tableberberine) 18. 黄连碱(coptisine) 19. 巴马汀(palmatine) 20. 小檗碱(berberine) 21. 左旋紫草素(shikonin)

图2 供试品溶液(A)、混合对照品溶液(B)、不含黄连阴性样品溶液(C)、不含五倍子阴性样品溶液(D)、不含紫草阴性样品溶液(E)、黄连药材样品溶液(F)、五倍子药材样品溶液(G)和紫草药材样品溶液(H) HPLC 色谱图(270、345、516 nm)

Fig.2 HPLC chromatograms of test sample(A), mixed reference(B), negative reference without *Coptis chinensis* Franch(C), negative reference without *Galla chinensis* Mill. (D), negative reference without *Arnebia euchroma*(Royle) Johnst. (E), *Coptis chinensis* Franch sample(F), *Galla chinensis* Mill. sample(G) and *Arnebia euchroma*(Royle) Johnst. sample(H)

2.2.8 主成分分析^[12-15] 利用 SPSS 20.0 软件,对 11 批紫连生肌凝胶剂的 26 个共有峰进行主成分分析,破碎图见图 4。以主成分特征值 > 1 为标准,提取出 6 个主成分,第一主成分的特征值为 12.336,方

差累积贡献率为 47.446%;第二主成分的特征值为 4.432,方差累积贡献率为 64.494%;第三主成分的特征值为 3.505,方差累积贡献率为 77.976%;第四主成分的特征值为 1.852,方差累积贡献率为

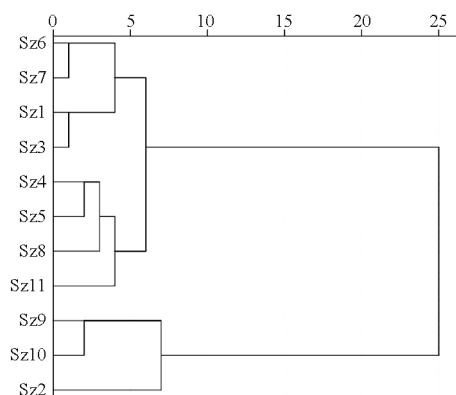


图3 聚类分析图

Fig. 3 Cluster analysis diagram

85.100%；第五主成分的特征值为 1.204，方差累积贡献率为 89.730%；第六主成分的特征值为 1.098，方差累积贡献率为 93.952%。较全面地表征紫连生肌凝胶剂样品化学成分特征，故选择对该 6 个主成分进行分析，特征值和方差贡献率见表 3。

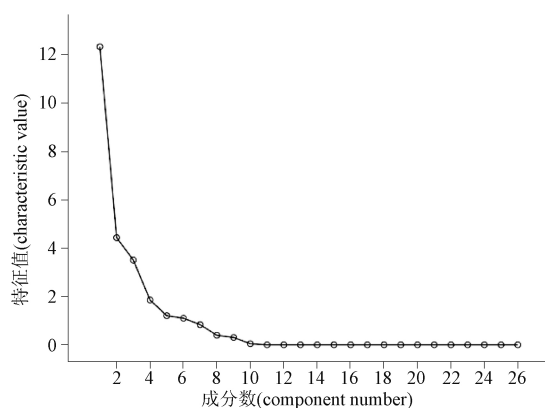


图4 主成分分析破碎图

Fig. 4 Scree plot for PCA

表3 特征值和累积方差贡献率

Tab. 3 Characteristic and cumulative variance contribution rate

主成分 (principal component)	特征值 (characteristic value)	方差贡献率 (variance contribution)/%	累积方差贡献率 (cumulative contribution rate)/%
1	12.336	47.446	47.446
2	4.432	17.048	64.494
3	3.505	13.482	77.976
4	1.852	7.123	85.100
5	1.204	4.630	89.730
6	1.098	4.221	93.952

根据主成分载荷矩阵结果可知，影响紫连生肌凝胶剂样品批次间质量差异的是多成分联合作用的结果，见表 4。共有峰 1、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20 在第一主成分上有较高载荷；共有峰 2、21、22、24、25、26 在第二主成分上有较高载荷；共有峰 2、11、17、18、20 在第三主成分上有较高载荷；共有峰 7、16、17、21、22、23、24、26 在第四主成分上有较高载荷；共有峰 11、23、26 在第五主成分上有较高载荷；共有峰 1、6、23 在第六主成分上有较高载荷；其中第一主成分、第三主成分主要反映处方中五倍子和黄连的化学成分信息，第二、五、六主成分主要反映处方中紫草和五倍子的化学成分信息，第四主成分主要反映处方中紫草和黄连的化学成分信息。

根据主成分得分计算综合得分，综合得分越高紫连生肌凝胶剂的质量越好，综合得分以主成分的贡献率对主成分得分进行加权平均，即主成分总和得分 = (主成分 1 得分 × 47.446 + 主成分 2 得分 × 17.048 + 主成分 3 得分 × 13.482 + 主成分 4 得分 × 7.123 + 主成分 5 得分 × 4.630 + 主成分 6 得分 × 4.221) / 93.952。结果见表 5。结果表明，11 批紫连生肌凝胶剂样品质量存在差异，其中 Sz8、Sz3、Sz11、Sz6 和 Sz4 样品质量较好。

2.2.9 正交偏最小二乘法判别分析^[14-15] 为了进一步找出影响批次间质量差异的成分，采用 SIM-CA14.1 软件进行有监督模式的 OPLS-DA 分析，散点得分图见图 5，由图可知 11 批样品可分为 4 类，与聚类分析结果基本一致。再采用变量重要性投影值 (VIP 值) 筛选差异成分，以 VIP 值 > 1 为条件共筛选出 6 个成分，见图 6，按数值大小排序依次为 11 号峰 (未知)、22 号峰 (未知)、21 号峰 (左旋紫草素)、25 号峰 (未知)、20 号峰 (小檗碱)、18 号峰 (黄连碱)，均为引起样品批次间质量差异的主要成分。

2.3 含量测定

2.3.1 溶液的制备 同“2.1”项下方法。

2.3.2 色谱条件 同“2.2.1”项下方法。

2.3.3 方法专属性考察 精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液和药材样品溶液各 10 μL，按“2.2.1”条件进样测定，结果供试品色谱图中有与对照品色谱图同样对应的色谱峰，而阴性样品溶液相应位置无该峰，说明本品中其他成分对含量测定的几个成分无干扰，本方法专属性强，详见图 2。

表 4 各成分初始因子载荷矩阵

Tab.4 Component matrix

共有峰号 (common peak No.)	矩阵(matrix)					
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
1	0.604	0.062	-0.521	-0.172	0.079	0.453
2	0.289	0.653	0.525	-0.433	0.039	-0.053
3	0.815	-0.271	-0.444	-0.096	0.170	-0.080
4	0.794	0.174	0.363	-0.287	0.006	0.094
5	0.817	0.253	0.319	-0.216	0.043	0.077
6	0.651	-0.069	-0.373	-0.297	-0.124	0.549
7	0.764	-0.048	0.326	0.458	-0.037	0.111
8	0.810	-0.189	-0.468	0.075	0.184	-0.178
9	0.881	-0.092	-0.326	-0.041	0.110	-0.207
10	0.852	-0.166	-0.415	0.013	0.176	-0.183
11	-0.042	0.431	0.517	-0.465	0.513	0.087
12	0.962	0.122	0.144	-0.015	-0.032	0.164
13	0.892	-0.216	-0.360	-0.004	0.062	-0.071
14	0.921	-0.156	-0.272	-0.138	-0.046	0.040
15	0.873	0.025	0.164	0.184	0.069	-0.031
16	0.882	-0.083	0.217	0.263	-0.065	0.053
17	0.756	0.100	0.475	0.272	-0.063	-0.225
18	0.744	-0.212	0.485	0.093	-0.254	0.211
19	0.826	-0.077	0.360	0.065	-0.011	-0.308
20	0.752	-0.323	0.494	-0.137	-0.233	-0.061
21	0.186	0.825	-0.327	0.290	-0.220	-0.015
22	0.099	0.850	-0.309	0.165	-0.379	0.006
23	-0.203	-0.016	0.301	0.614	0.583	0.338
24	0.128	0.828	-0.010	0.243	-0.117	0.166
25	0.193	0.808	-0.181	-0.326	0.100	-0.247
26	0.371	0.755	-0.243	0.304	0.338	-0.071

注(note): PC. 主成分(principal component)

表 5 主成分得分和综合得分

Tab.5 Principal component score and comprehensive score

样品编号 (sample No.)	得分(score)						综合得分 (comprehensive score)
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	
Sz1	-0.606	-0.877	-0.214	-0.412	-0.262	-0.317	-0.554
Sz2	-1.621	1.163	-1.077	0.372	-1.659	-0.292	-0.829
Sz3	1.116	-0.006	1.772	0.122	-1.594	-0.119	0.742
Sz4	0.610	-0.225	-1.488	-0.464	-0.036	1.679	0.092
Sz5	0.435	-0.761	-0.152	-1.884	0.350	0.275	-0.053
Sz6	0.595	-0.848	0.286	0.674	-0.307	-0.745	0.190
Sz7	-0.029	-1.467	-0.586	1.185	-0.080	-0.115	-0.284
Sz8	0.968	1.916	0.193	-0.413	0.028	0.461	0.855
Sz9	-1.052	0.164	1.258	1.200	1.204	1.696	-0.095
Sz10	-1.372	0.125	0.832	-1.280	0.874	-1.079	-0.653
Sz11	0.956	0.816	-0.825	0.899	1.483	-1.443	0.589

注(note): PC. 主成分(mean principal component)

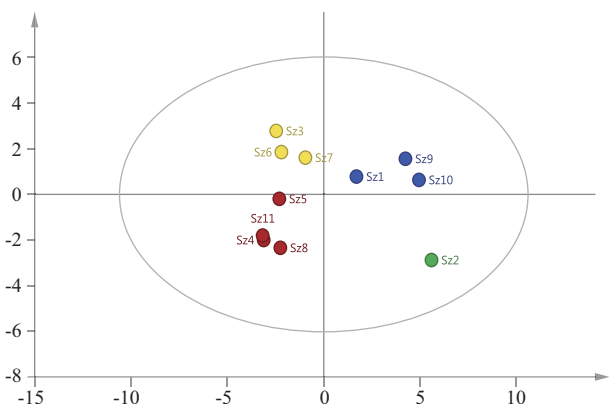


图5 正交偏最小二乘判别分析得分图

Fig. 5 Score plot for OPLS-DA

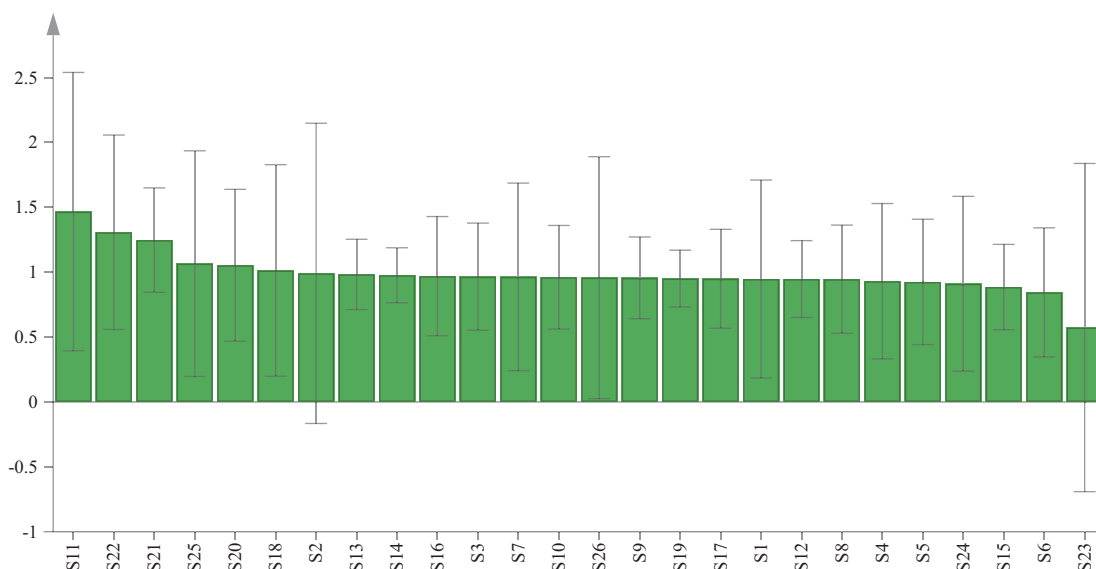


图6 正交偏最小二乘判别分析VIP图

Fig. 6 VIP value for OPLS-DA

2.3.4 线性范围考察 分别精密吸取 40、80、120、160、180、200、240 μL 混合对照品溶液,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,配制成不同浓度梯度的混合对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录每个成分不同进样量的峰面积,以混合对照品溶液的质量浓度 X 为横坐标,以峰面积 Y 为纵坐标,进行线性回归,回归方程见表 6。

2.3.5 精密性试验 取上述混合对照品溶液按“2.3.2”项下色谱条件连续进样 6 次,记录每个成分的峰面积,得出没食子酸、表小檗碱、黄连碱、小檗碱、巴马汀和左旋紫草素峰面积的 RSD 分别为 1.7%、1.5%、1.8%、1.5%、1.3%、1.5%,表明仪器精密性良好。

表 6 各成分线性关系

Tab. 6 Linear relationships of various components

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
没食子酸 (gallic acid)	$Y = 5.223 \times 10^4 X - 3.216 \times 10^5$	0.999 5	0.328 8 ~ 1.972 8
表小檗碱 (tableberberine)	$Y = 7.234 \times 10^4 X - 9.211 \times 10^4$	0.999 9	0.051 2 ~ 0.307 2
黄连碱 (coptisine)	$Y = 3.354 \times 10^4 X - 8.801 \times 10^4$	0.999 9	0.112 8 ~ 0.676 8
巴马汀 (palmatine)	$Y = 6.099 \times 10^4 X - 2.186 \times 10^5$	0.999 8	0.186 4 ~ 1.118 4
小檗碱 (berberine)	$Y = 6.322 \times 10^4 X - 1.000 \times 10^6$	0.999 8	0.627 2 ~ 3.763 2
左旋紫草素 (shikonin)	$Y = 2.487 \times 10^4 X - 1.481 \times 10^4$	0.999 9	0.025 2 ~ 0.151 2

2.3.6 重复性试验 取同一样品,按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.3.2”项下色谱条件测定,记录每个成分的峰面积,得出没食子酸、

表小檗碱、黄连碱、小檗碱、巴马汀和左旋紫草素的平均含量分别为 1 253.82、248.27、511.87、2 766.08、888.48、496.48 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为

1.7%、1.8%、1.6%、1.4%、1.2%、1.5%，表明该方法重复性良好。

2.3.7 稳定性试验 取供试品溶液，分别于0、4、8、12、24、48、72 h按“2.2.1”项下色谱条件下测定，记录每个成分的峰面积，得出没食子酸、表小檗碱、黄连碱、小檗碱、巴马汀和左旋紫草素的峰面积的RSD分别为1.7%、1.9%、1.6%、1.4%、1.7%、1.4%，表明供试品溶液在72 h内稳定。

2.3.8 加样回收率试验 取已知含量的样品，称取9份，加入20%氯化钠溶液20 mL，超声提取30 min，滤过，滤液水浴蒸干，即得供试品残渣；另取没食子酸、表小檗碱、黄连碱、小檗碱、巴马汀和左旋紫草素对照品适量，加甲醇制得质量浓度分别为0.502、0.472、0.509、0.494、0.473、0.513 mg·mL⁻¹的对照品溶液，分别按照含量50%、100%和150%的比例用移液枪吸取1.2、2.4、3.6 mL没食子酸对照品溶液，

230、460、690 μL表小檗碱对照品溶液，0.6、1.2、1.8 mL黄连碱对照品溶液，3.0、6.0和9.0 mL小檗碱对照品溶液，0.8、1.6、2.4 mL巴马汀对照品溶液，240、480、720 μL左旋紫草素对照品溶液，分别加入到供试品残渣中溶解，并用90%甲醇-盐酸(100:2)定容至25 mL，最后用0.22 μm微孔滤膜滤过，即得加样回收试验供试品溶液。按“2.2.1”项下色谱条件下测定，计算得没食子酸、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱和左旋紫草素的平均加样回收率分别为98.7%、99.3%、99.2%、98.7%、98.7%、98.7%，RSD分别为1.3%、1.8%、1.3%、1.3%、1.8%、1.7%。

2.3.9 紫连生肌凝胶剂中各成分含量测定 取11批样品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.3.2”项下色谱条件下测定，计算样品中6个成分的含量，结果见表7。

表7 11批紫连生肌凝胶剂样品中6个定量成分的含量测定结果

Tab.7 Results of content determination of six quantitative components of 11 batches of Zilian Shengji gel samples

样品编号 (sample No.)	含量(content)/(μg·g ⁻¹)					
	没食子酸 (gallic acid)	表小檗碱 (tableberberine)	黄连碱 (coptisine)	小檗碱 (berberine)	巴马汀 (palmatine)	左旋紫草素 (shikonin)
Sz1	1 112.87	178.05	476.96	2 854.52	754.65	87.29
Sz2	1 113.23	137.52	381.83	2 023.81	524.15	549.46
Sz3	1 452.17	296.05	884.73	4 051.66	986.13	288.70
Sz4	1 080.27	244.89	572.98	2 796.09	736.04	316.83
Sz5	1 281.95	190.72	679.48	3 393.53	712.44	61.36
Sz6	1 065.64	237.40	725.43	3 563.18	842.29	154.35
Sz7	827.74	230.01	646.82	2 978.81	746.95	64.08
Sz8	1 513.50	232.16	682.77	3 135.61	817.98	465.03
Sz9	1 196.11	192.09	594.96	2 565.54	636.00	190.84
Sz10	1 328.21	165.86	404.59	2 599.77	713.38	47.65
Sz11	1 261.31	248.15	512.05	2 754.77	883.02	498.38

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

紫连生肌凝胶剂处方由黄连、五倍子、紫草和白及组成，为复方制剂，且各位药材化学成分理化性质差异较大，在对比其他色谱柱，发现使用Agilent C₁₈-WR色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)分离效果、峰型、基线平稳的均较好；流动相分别考察比较了甲醇-水系统、甲醇-0.1%甲酸水系统、甲醇-0.15%磷酸水系统、乙腈-水系统、乙

腈-0.1%甲酸水系统和乙腈-0.15%磷酸水系统，发现乙腈-0.15%磷酸水系统的色谱峰信号丰富，同时各峰之间的分离度较好，故选择乙腈-0.15%磷酸水系统进行梯度洗脱；在190~400 nm范围内通过全波长扫描发现在270、345、516 nm 3个波长同时检测的条件下能够全面的检测出处方的色谱峰，同时基线的噪音低和各峰之间的分离度较好，因此选择270、345、516 nm进行多波长检测。

3.2 供试品溶液制备方法的选择

紫连生肌凝胶剂经处方化学成分分析,主要含有有机酸、生物碱和萘醌衍生物等成分,极性及溶解度差异较大,前期为提高处方中生物碱等有效成分的溶解性,先用20%氯化钠溶液进行超声提取,再分别考察甲醇、甲醇-水系统、甲醇-甲酸系统和甲醇-盐酸系统对其成分的提取效果,结果发现90%甲醇-盐酸(100:2)系统对处方中成分的提取范围广,能够较为全面地反映出处方的化学成分,因此选用90%甲醇-盐酸(100:2)作为供试品溶液制备的溶媒。

3.3 参照峰的选择^[16]

19号峰巴马汀为处方中黄连的指标性成分,出峰时间为70.22 min。各批次样品色谱图显示,19号峰的出峰时间比较稳定,峰面积适中,与相邻峰之间的分离度较好,峰型好,故选择19号峰作为参照峰。

3.4 共有峰的确认

按照中药处方组成原则,对君臣药黄连、紫草和五倍子的共有峰进行了确认,结果显示共有峰个数(24个)占总共有峰的92.31%,足以定性表征紫连生肌凝胶剂质量。其中关于峰6、峰7的归属,有可能是白及(佐药)的成分,也有可能是处方产生的新成分,有待在后续研究中进一步确认。

4 结论

医院中药制剂多为复方制剂,其化学成分复杂,质量控制较为单一,难以符合现代中药制剂的质量控制需求,成为制约其发展的主要因素之一^[17-19]。因此本实验从定性结合定量的模式采用HPLC指纹图谱对紫连生肌凝胶剂进行定性表征和对没食子酸等多指标定量测定对其质量进行全面的控制。

实验结果表明,11批样品HPLC指纹图谱的相似度在0.828~0.997,虽在一定程度上表征产品质量的一致性,但也说明产品批次间存在差异,经过全过程分析,初步判断为不同批次原料药材质量差异所致;通过聚类分析和主成分分析2种化学模式识别技术进行综合分析:11批样品可以分为三大类,并筛选出了6个主要成分;通过化学对照品对比鉴定出6个成分,分别为没食子酸、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱和左旋紫草素,并对其进行了含量的测定。

本实验采用同一的色谱条件实现了紫连生肌凝

胶剂指纹图谱定性和6个成分定量分析,再采用化学模式分析筛选出不同批次样品之间的差异成分,经方法学考察,所建立的方法专属性强,重复性好,准确可靠,可用于该制剂的质量评价。

参考文献

- [1] 张永萍, 迮薇薇, 徐剑. α -细辛脑原位凝胶初步稳定性的研究[J]. 贵阳中医学院学报, 2015, 37(4): 12
ZHANG YP, ZE WW, XU J. The preliminary stability study of α -phenylethanone in situ gel[J]. J Guiyang Coll Tradit Chin Med, 2015, 37(4): 12
- [2] 林秀莲, 宋粉云, 李华, 等. 补肾强身片UPLC指纹图谱[J]. 中成药, 2017, 39(3): 551
LIN XL, SONG FY, LI H, et al. UPLC fingerprints of Bushen Qiangshen tablets[J]. Chin Tradit Patent Med, 2017, 39(3): 551
- [3] 王瑾. 痛立舒巴布膏的药学研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2009
WANG J. Pharmaceutical Research of Tonglishu Catapasm[D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2009
- [4] 周巧云. 复方莪术油的泊洛沙姆温敏凝胶研制[D]. 镇江: 江苏大学, 2011
ZHOU QY. Study on Poloxamer-Based Thermosensitive in Situ Gel for Traditional Chinese Compound Zedoary Turmeric Oil[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2011
- [5] 陈绍文, 刘贞, 喻小明. 何首乌生品及炮制品的大鼠血药指纹图谱比较研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2016, 18(1): 36
CHEN SW, LIU Z, YU XM. Comparative observation of blood fingerprints in rats after treatment of crude and processed Radix-polygoni Multiflori[J]. J Hubei Univ Chin Med, 2016, 18(1): 36
- [6] 黄宽, 付鹏, 张蕾, 等. 国医大师张震疏调气机汤HPLC指纹图谱建立及7种成分含量测定[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(6): 3423
HUANG K, FU P, ZHANG L, et al. Establishment of HPLC fingerprint of Shutiao Qiji decoction of Traditional Chinese Medical master ZHANG Zhen and determination of seven components[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(6): 3423
- [7] 王绅. 中药桑白皮性味拆分工艺研究[D]. 郑州: 河南中医学院, 2014
WANG S. The Chemi-Characteristic Research on the Nature and Flavor Detached Composition of Cortex Mori[D]. Zhengzhou: Henan College of Traditional Chinese Medicine, 2014
- [8] 刘妍妍, 张慧文, 白云霞, 等. 蒙药三子散HPLC指纹图谱结合化学模式识别研究[J]. 中国药房, 2022, 33(3): 319
LIU YY, ZHANG HW, BAI YX, et al. Study on HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of Mongolian medicine Sanzisan[J]. China Pharm, 2022, 33(3): 319

- [9] 胡珀, 吴旭, 王蓓蓓, 等. UPLC-MSMS 法测定大黄碳酸氢钠片和复方龙胆碳酸氢钠片中土大黄苷的含量[J]. 中国药物评价, 2020, 37(5): 362
HU P, WU X, WANG BB, *et al.* Quantitative determination of Rhaponticin in Rhubarb sodium bicarbonate tablets, compound gentian and sodium bicarbonate tablets by UPLC-MS/MS[J]. *Chin J Drug Eval*, 2020, 37(5): 362
- [10] 凌霄, 张辉, 李伟霞, 等. 祛风消癥合剂 UHPLC 指纹图谱的建立[J]. 中成药, 2020, 42(11): 2857
LING X, ZHANG H, LI WX, *et al.* Establishment of UHPLC fingerprints for Qufeng Xiaodian mixture[J]. *Chin Tradit Patent Med*, 2020, 42(11): 2857
- [11] 荣晓惠, 刘艳, 王秋茹, 等. 不同产区掌叶大黄酒蒸前后指纹图谱的建立及 3 种差异性成分的含量测定[J]. 中国药房, 2022, 33(3): 280
RONG XH, LIU Y, WANG QR, *et al.* Establishment of fingerprint and content determination of 3 differential components in *Rheum palmatum* before and after steaming with wine derived from different producing areas[J]. *China Pharm*, 2022, 33(3): 280
- [12] 曹斯琼, 罗宇琴, 吴文平, 等. 基于主成分分析及聚类分析的王不留行 UPLC 指纹图谱研究[J]. 广东药科大学学报, 2019, 35(6): 735
CAO SQ, LUO YQ, WU WP, *et al.* Study on fingerprint of *Vaccariae Semen* based on principal component analysis coupled with cluster analysis[J]. *J Guangdong Pharm Univ*, 2019, 35(6): 735
- [13] 唐清, 匡艳辉, 李雯珊, 等. 基于指纹图谱和一测多评(QAMS)法的丹红化瘀口服液质量评价研究[J]. 中草药, 2022, 53(6): 1663
TANG Q, KUANG YH, LI WS, *et al.* Quality evaluation of Danhong Huayu oral solution based on fingerprint combined with quantitative analysis of multi-components by single marker[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(6): 1663
- [14] 李莹莹, 纪亮, 雷敬卫, 等. HPLC 指纹图谱结合多成分含量测定评价香附质量[J/OL]. 中华中医药学刊 [2023-08-21]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=6RlcORkFSJRMn_RFeyBgZlO5YonrX69SZkzegm8BGW0icu17wiBXAazHO5R8529GEUMB_jFe5E4mc2eUXrWwVedOU8CO6FrUise_cINu4YuwY4SHYN9ZZVg9EEGqgDSuevJsvQY8FaSE8foS-MA0w=&uniplatform=NZKPT&language=CHS
- [15] 王凤丽, 针涛, 魏岚, 等. 羚羊清肺丸 HPLC 指纹图谱建立及 6 个成分测定[J]. 中成药, 2023, 45(6): 1781
WANG FL, ZHEN T, WEI L, *et al.* Establishment of HPLC fingerprints and determination of six constituents for Lingyang Qingfei pills[J]. *Chin Tradit Patent Med*, 2023, 45(6): 1781
- [16] 陆丹, 池玉梅, 高秋芳, 等. 虎掌南星 HPLC 指纹图谱建立[J]. 中成药, 2020, 42(10): 2788
LU D, CHI YM, GAO QF, *et al.* Establishment of UHPLC fingerprints for *Pinellia pedatisecta* Schott[J]. *Chin Tradit Patent Med*, 2020, 42(10): 2788
- [17] 曹舒兴, 宋永周, 王进. 肾衰宁片的 HPLC 特征图谱及 9 个成分的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(7): 1172
CHA SX, SONG YZ, WANG J. HPLC characteristic chromatograms and determination of nine constituents of Shenshuaining tablets[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(7): 1172
- [18] 李维业, 刘学良, 刘安平, 等. 藏药抱茎獐牙菜 HPLC 指纹图谱及 10 个成分含量测定研究[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(2): 209
LI WY, LIU XL, LIU AP, *et al.* Study on the chromatographic fingerprint and 10 components of Tibetan medicine *Swertia franchetiana* H. Smith by HPLC[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(2): 209
- [19] 陈芳园, 张云静, 赵冰, 等. 华佗救心丸 GC-MS 特征图谱及 3 个成分的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(11): 1917
CHEN FY, ZHANG YJ, ZHAO B, *et al.* GC-MS characteristic chromatogram and assay of three components for Huatuo Jiuxin pills[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2022, 42(11): 1917

(本文于 2024 年 6 月 12 日修改回)