

质量分析

HPLC 指纹图谱多模式识别结合多指标成分测定的寒喘祖帕颗粒质量控制研究

魏培¹, 曹春泉², 钱淼¹, 朱瑞娟¹, 孙新堂^{1*}

(1. 山东畜牧兽医职业学院食品与药品科技系, 潍坊 261061; 2. 菏泽学院药学院, 菏泽 274000)

摘要 目的:建立寒喘祖帕颗粒 HPLC 指纹图谱及多指标成分定量分析方法, 结合化学模式识别技术对其进行质量评价。**方法:**通过优化样品前处理及色谱检测条件, 建立寒喘祖帕颗粒 HPLC 指纹图谱和含量测定条件。色谱柱为 YMC - Pack ODS - A 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 12 nm), 以乙腈 - 0.1% 磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 检测波长 220 nm, 柱温 30 °C, 体积流量 1.0 mL · min⁻¹。采用聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘 - 判别分析(OPLS - DA)对 17 批寒喘祖帕颗粒进行质量评价。**结果:**寒喘祖帕颗粒 HPLC 指纹图谱及含量测定方法学考察结果均符合测定要求, 获得 25 个共有峰, 指认了 8 个色谱峰; 17 批样品的相似度均 > 0.90, 样品间一致性及稳定性良好; 由 HCA 可知, 17 批样品可大致聚成 3 类; PCA 从 25 个共有峰中提取了 3 个主成分, 通过 OPLS - DA 筛选了 16 号峰(芦丁)、3 号峰(没食子酸)、15 号峰、23 号峰、24 号峰(甘草酸)和 7 号峰(绿原酸)6 个引起不同批次寒喘祖帕颗粒质量差异的主要标志性成分; 8 个定量成分线性关系均良好($r \geq 0.9994$), 平均加样回收率 98.0% ~ 99.1%, RSD 均 < 2.0%。**结论:**建立的寒喘祖帕颗粒 HPLC 指纹图谱结合多指标成分定量方法, 专属性强、简便、准确, 可为其整体质量控制和品质评价提供参考依据。

关键词:寒喘祖帕颗粒; 高效液相色谱指纹图谱; 化学模式识别; 定量分析; 质量控制

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)12 - 2127 - 11

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024 - 0029

Study on quality control of Hanchuan Zupa granules by HPLC fingerprint multi - pattern recognition combined with multi - index component determination

WEI Pei¹, CAO Chun - quan², QIAN Miao¹, ZHU Rui - juan¹, SUN Xin - tang^{1*}

(1. Food and Drug Technology Department of Shandong Vocational Animal Science and Veterinary College, Weifang 261061, China;

2. Pharmacy Department of Heze University, Heze 274000, China)

Abstract Objective: To establish the HPLC fingerprint and multi - component quantitative analysis of Hanchuang Zupa granules, and evaluate the quality of multiple batches of Hanchuang Zupa granules by chemical pattern recognition technology. **Methods:** The sample pretreatment conditions and chromatographic analysis conditions of Hanchuang Zupa granules were optimized, and the optimal HPLC fingerprint and multi - component quantitative analysis method were established as follows: stationary phase was YMC - Pack ODS - A column

* 通信作者 Tel: (0536)3086321; E - mail: sdmysxt@163.com

第一作者 Tel: (0536)3086430; E - mail: 108584969@qq.com

(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 12 nm) was adopted, and the mobile phase was acetonitrile – water (containing 0.1% phosphoric acid) with gradient elution, the detection wavelength was 220 nm, the column temperature was 30 °C, the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. Hierarchical cluster analysis (HCA), principal components analysis (PCA) and orthogonal partial least squares – discriminant analysis (OPLS – DA) were applied to evaluate the quality of 17 batches of Hanchuang Zupa granules. **Results:** Methodological investigation of HPLC fingerprint and content determination were well verified and met the analysis requirements. A total of 25 common peaks were obtained by full peak matching, and eight of them were identified by comparing with the retention time of mixed reference substances. The similarities of 17 batches of samples were above 0.90, which showed good consistency and stability between the samples. Seventeen samples could be classified into three clusters. Three principal components from 21 common peaks were extracted by PCA. Six quality differential compounds were presented in the fingerprints by OPLS – DA, including rutoside, gallic acid, ammonium glycyrrhizinate, chlorogenic acid and so on. The resolution and linear relationship of eight components in quantitative analysis were good. The average recovery rates were 98.0% – 99.1% with RSD ≤ 2.0%. **Conclusion:** In this study, the qualitative analysis of HPLC fingerprint and quantitative analysis of multiple index components is specific, simple and accurate, which can provide a reference for the quality control and quality evaluation of Hanchuang Zupa granules.

Keywords: Hanchuang Zupa granules; high – performance liquid chromatography fingerprints; chemical pattern recognition; quantitative analysis; quality control

寒喘祖帕颗粒由神香草、铁线蕨、甘草浸膏、小茴香、芹菜子、胡芦巴、云香草、玫瑰花、苎麻子 9 味中药经水煎煮制备而成,具有镇咳、化痰、温肺止喘的作用^[1],现行国家药品标准为 WS3 – BW – 0195 – 98 – 2021,仅选择甘草酸单一成分进行含量测定,不足以评价寒喘祖帕颗粒的整体质量情况,有必要探索其整体质量控制模式。近年来,具有整体性强、专属性高的中药指纹图谱与聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析(principal component Analysis, PCA)、正交偏最小二乘 – 判别分析(orthogonal partial least squares – discriminant analysis, OPLS – DA)等化学计量学方法联合使用是中药及中成药制剂的整体质量研究的趋势^[2-4]。为全面控制寒喘祖帕颗粒的质量,本研究选取市售 3 个厂家 17 批寒喘祖帕颗粒,建立其高效液相色谱(HPLC)法指纹图谱,进而借助化学计量学方法对不同厂家的寒喘祖帕颗粒进行质量评价,根据 OPLS – DA 筛选差异性成分,评价不同厂家不同批次寒喘祖帕颗粒的质量一致性,从而实现药物质量的综合评价。

1 仪器与试剂

e2695 型 HPLC 仪(Waters 公司)、XS205DU 型电子天平(Mettler Toledo 司,0.01 mg)、TM – D 24UV

型超纯水系统(默克密理博实验室设备有限公司)。

乙腈(HPLC 色谱级)、甲醇(HPLC 色谱级)均为色谱纯,来自 Fisher Chemical 公司;水为实验室超纯水系统制备所得。对照品没食子酸(批号 110831 – 201906,纯度 91.5%)、绿原酸(批号 110753 – 202119,纯度 96.3%)、鞣花酸(批号 111959 – 201903,纯度 88.8%)、芦丁(批号 100080 – 202012,纯度 92.2%)、甘草苷(批号 111610 – 202209,纯度 95.2%)、槲皮素(批号 100081 – 201610,纯度 99.8%)、迷迭香酸(批号 111871 – 202007,纯度 98.1%)、甘草酸铵(批号 110731 – 202122,纯度 94.4%),均购自中国食品药品检定研究院,对照品纯度均在计算过程中进行校正。共收集寒喘祖帕颗粒共 17 批(S1 ~ S17),分别购自厂家 A(批号 2201108、2201124、2201122、230165、2302150、2303161)、厂家 B(批号 210407、220112、220119、210815、210220、201046、211015、220114)和厂家 C(批号 211040、230422、230614)。各单味药(神香草、铁线蕨、芹菜子、玫瑰花药材粉末和甘草)均为市购,经潍坊市人民医院桑林涛主任药师鉴定,神香草为唇形科(*Labiatae*)神香草属(*Hyssopus* L.)硬尖神香草,铁线蕨为铁线蕨科铁线蕨属植物 *Adiantum capillusveneris* L. 的新鲜或干燥全草,芹菜子为

系伞形科旱芹属植物芹菜 (*Apium graveolens* L.) 的干燥成熟种子, 玫瑰花应为蔷薇科植物玫瑰 *Rosa rugosa* Thunb. 的干燥花蕾, 甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。甘草浸膏参考 2020 年版《中华人民共和国药典》方法制备而成。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

YMC - Pack ODS - A (250 mm × 4.6 mm, D.S - 5 μm, 12 nm) 柱, 流动相为乙腈 (A) - 0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 8 min, 8%A; 8 ~ 12 min, 8%A → 17%A; 12 ~ 35 min, 17%A → 22%A; 35 ~ 40 min, 22%A → 40%A; 40 ~ 60 min, 40%A → 60%A), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 220 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取对照品没食子酸、绿原酸、鞣花酸、芦丁、甘草苷、槲皮素、迷迭香酸、甘草酸各适量, 加甲醇超声 (250 W, 40 kHz) 处理, 使溶解, 配制成每 1 mL 含没食子酸 1 058 μg、绿原酸 215.5 μg、鞣花酸 160.3 μg、芦丁 661.3 μg、甘草苷 231.2 μg、槲皮素 119.6 μg、迷迭香酸 85.12 μg、甘草酸 801.2 μg 的混合对照品储备液。精密量取混合对照品储备液 5 mL, 置 50 mL 棕色量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 即得。

2.2.2 供试品溶液 取寒喘祖帕颗粒 5 袋, 研成细粉后混合均匀, 精密称取 2.0 g, 置于圆底烧瓶中, 精密加入 50% 甲醇水溶液 100 mL, 密塞, 称量后加热回流 40 min, 放冷后, 用 50% 甲醇水溶液补足减失的量, 过滤取续滤液, 即得。

2.2.3 单味药材溶液 按寒喘祖帕颗粒处方比例, 分别取神香草、铁线蕨、芹菜子、玫瑰花药材粉末和甘草浸膏, 精密称量, 按“2.2.2”项下方法制备得各单味药材溶液。

2.2.4 阴性供试品溶液 按寒喘祖帕颗粒的处方比例制备缺神香草、铁线蕨、芹菜子、玫瑰花药材粉末和甘草浸膏的阴性样品, 并按照“2.2.2”项下方法处理, 即得。

2.3 HPLC 指纹图谱建立及方法学考察

2.3.1 精密度试验 按“2.2.2”项下方法制备寒喘祖帕颗粒供试品溶液 (S1), 按“2.1”项下色谱条件连续 6 次进样测定, 记录色谱图, 25 个共有峰的保留时

间和峰面积的 RSD 分别为 0.87% ~ 2.0% 和 1.5% ~ 2.3%, 均 < 3.0%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取同一批寒喘祖帕颗粒 (S1), 按“2.2.2”项下方法, 平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件进样测定, 记录色谱图, 25 个共有峰的保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.95% ~ 2.0% 和 1.4% ~ 2.4%, 均 < 3.0%, 结果表明样品处理方法具有良好的重复性。

2.3.3 稳定性试验 取寒喘祖帕颗粒 (S1) 的供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 在 0、3、8、15、20、28、36 h 分别进样测定, 记录色谱图, 25 个共有峰的保留时间和峰面积的 RSD 分别为 1.4% ~ 2.5% 和 1.5% ~ 2.3%, 均 < 3.0%, 表明供试品溶液在室温下 36 h 内相对稳定。

2.3.4 HPLC 指纹图谱的建立 利用《中药色谱指纹图谱相似度软件评价系统 (2012 版)》对 17 批寒喘祖帕颗粒的 HPLC 图谱进行分析, 得到寒喘祖帕颗粒 HPLC 指纹图谱, 见图 1。最终选择分离度较好, 峰面积响应值适中的 25 个色谱峰作为寒喘祖帕颗粒的指纹图谱共有峰。以样品 S1 为参照图谱生成对照指纹图谱, 对 17 批样品相似度进行相似度评价。17 批样品的相似度分别为 0.952、0.944、0.963、0.924、0.937、0.936、0.922、0.934、0.919、0.931、0.926、0.937、0.911、0.929、0.905、0.910、0.916, 相似度均 > 0.90, 表明 3 个厂家不同批次的寒喘祖帕颗粒一致性及稳定性良好。

2.3.5 指纹图谱的归属与指认 取“2.2.3”项下各单味药材溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定。通过比较对照药材色谱图和对照指纹色谱图对共有峰进行归属, 结果显示 2、7、16、19、21 号峰来源于神香草, 1、4、5、10、23 号峰来源于铁线蕨, 6、15、17、24 号峰来源于甘草浸膏, 3、8、14、18、20、25 号峰来源于玫瑰花, 11、13、18 号峰来源于芹菜子, 色谱图见图 2。通过与混合对照品溶液色谱图保留时间比对, 初步指认了 8 个共有峰, 根据保留时间先后顺序依次为峰 3 (没食子酸)、峰 7 (绿原酸)、峰 14 (鞣花酸)、峰 16 (芦丁)、峰 17 (甘草苷)、峰 18 (槲皮素)、峰 21 (迷迭香酸)、峰 24 (甘草酸)。进一步比较光谱图, 结果供试品溶液中 8 个共有峰的光谱图与相应对照品光谱图均一致, 见图 3。光鞣花酸保留时间和峰面积均适中, 故选择其作为参照峰。

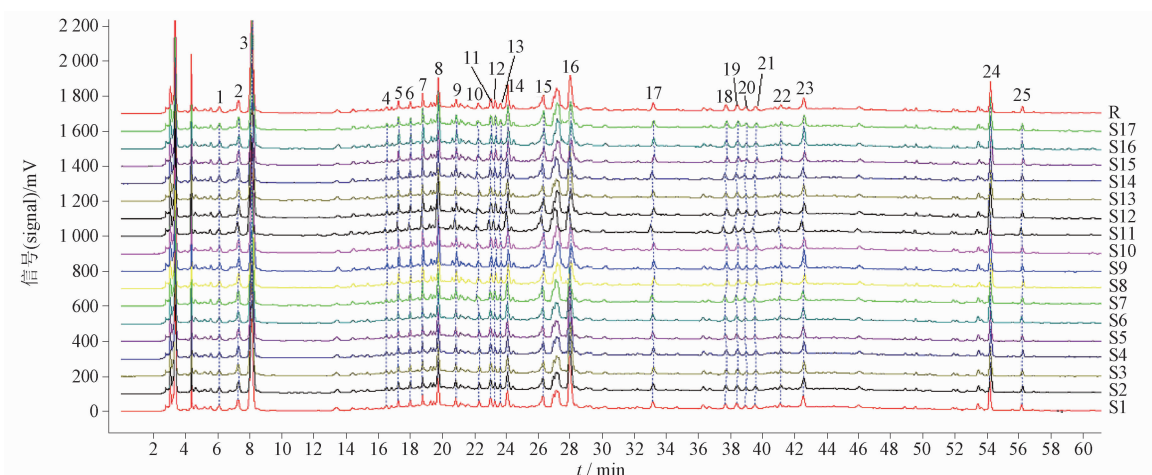


图 1 17 批寒喘祖帕颗粒的 HPLC 指纹图谱和对照指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of 17 batches of Hanchuan Zupa granules and reference fingerprint

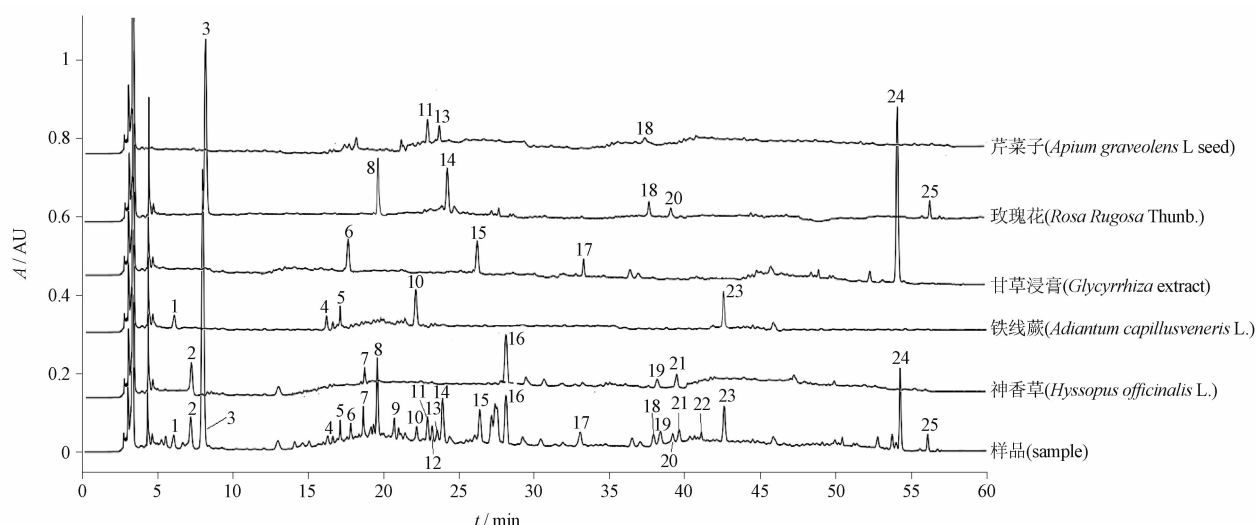


图 2 寒喘祖帕颗粒样品与处方中单味药材的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of Hanchuan Zupa granules sample and single medicinal herb

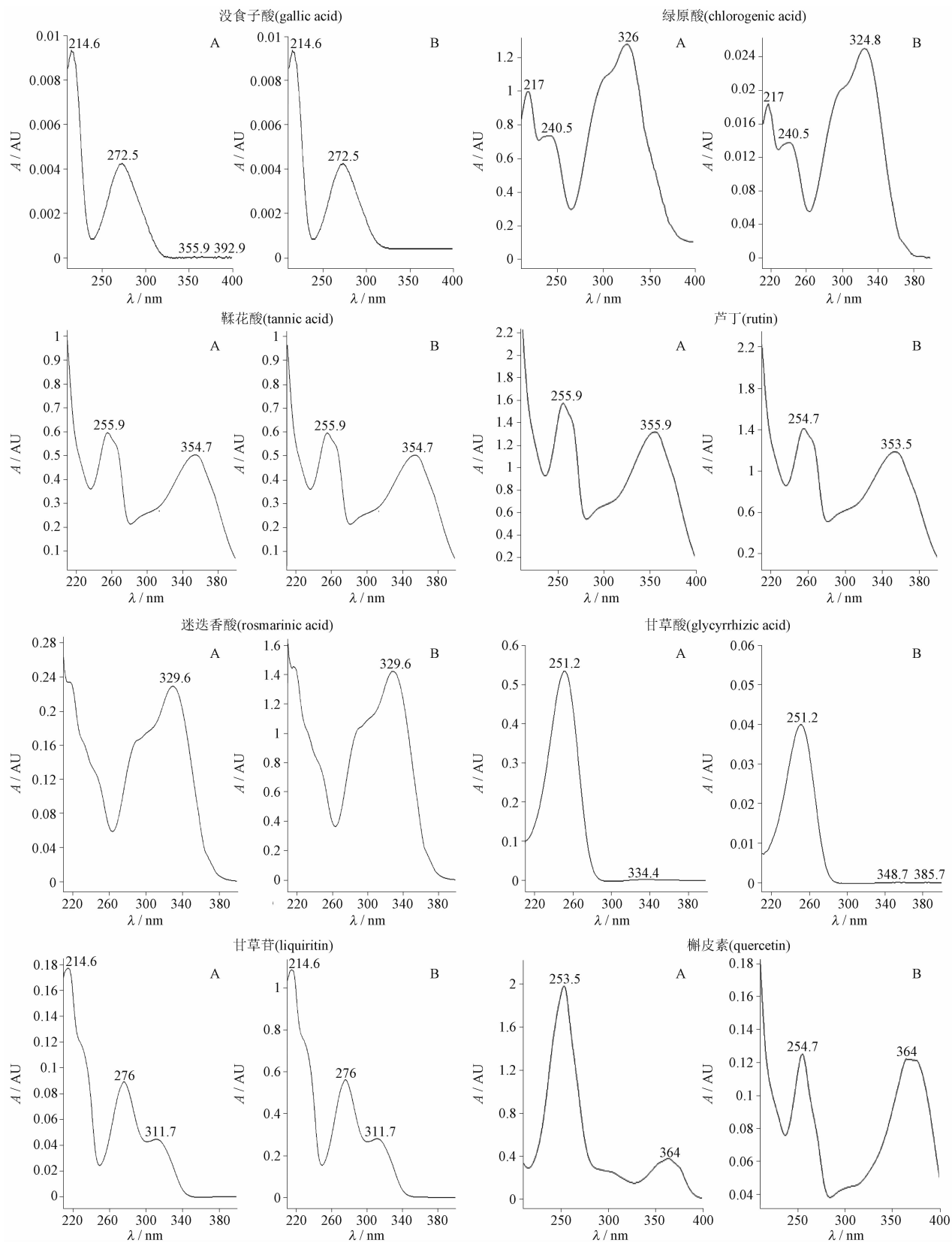
2.4 化学模式识别分析

2.4.1 HCA 将 17 批寒喘祖帕颗粒 25 个共有峰的相对峰面积导入 SPSS 22.0 软件,采用 Ward 的方法,以平方 Euclidean 距离为测度,进行 HCA。结果平方 Euclidean 距离为 15 时可大致将 17 批样品分成 3 大类:S8、S9、S7、S10、S11、S14、S13、S12 为 I 类,S4、S5、S1、S2、S3、S6 为 II 类,S16、S17、S16 为 III 类,结果见图 4。HCA 结果表明,相同厂家的寒喘祖帕颗粒聚为一大类,不同厂家原材料的使用、提取工艺、炮制加工等多方面环节的不同,导致寒喘祖帕颗粒厂家之间的差异性。

2.4.2 PCA 以 14 号峰(鞣花酸)为参照峰,将 17

批寒喘祖帕颗粒的 25 个共有峰的相对峰面积导入 SIMCA 14.1 软件进行 PCA,前 3 个主成分的特征值分别为 9.16、3.94 和 1.30,方差贡献率分别为 53.9%、23.2% 和 7.62%,累积贡献率达 84.7%,可反映寒喘祖帕颗粒指纹图谱共有峰的基本信息^[4-5]。由图 5 可知,PCA 结果与上述 HCA 结果基本一致,17 批样品大致分为 3 大类,同一生产厂家被聚为一类,相同厂家产品质量有较好的一致性。

2.4.3 OPLS-DA HCA 和 PCA 将 17 批样品大致可分为 3 类,为进一步寻找组间的差异性原因,建立 OPLS-DA 分析模型。结果模型解释率(RX^2)达到 0.885,预测力(Q^2)达到 0.658,均 > 0.5 ,表示建立



A. 样品 (sample) B. 对照品 (reference substance)

图 3 8 个成分的光谱图

Fig. 3 Spectra of 8 components

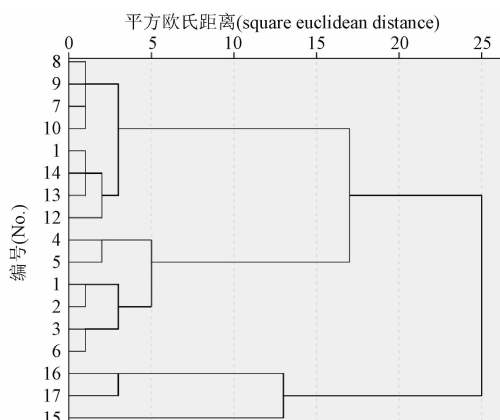


图4 17批寒喘祖帕颗粒 HCA 图

Fig. 4 HCA of 17 batches of Hanchuan Zupa granules

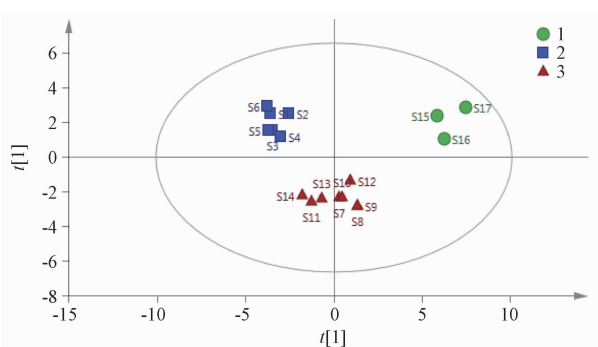


图5 17批寒喘祖帕颗粒的 PCA 得分图

Fig. 5 PCA score plot of 17 batches of Hanchuan Zupa granules

的 OPLS-DA 模型拟合结果可接受。对 OPLS-DA 模型进行置换检验(200次),得置换检验图(图6)。在图6中, R^2 在Y轴的截距为0.267, Q^2 在Y轴的截距为-0.764,斜率均 >0 ,表明建立的 OPLS-DA 模型无过度拟合的现象,能够用于17批样品组间差异的判别分析。OPLS-DA 模型生成的变量重要性投影值(VIP)是筛选差异性化合物的重要指标,通常以VIP >1 作为筛选标准,VIP越高,对组间差异的影响越大^[6-7]。本实验以VIP >1 为标准,结果共找到了6个成分,根据VIP由大到小排序依次为16号峰(芦丁)、3号峰(没食子酸)、15号峰、23号峰、24号峰(甘草酸)、7号峰(绿原酸),见图7。提示上述6个成分是引起不同批次寒喘祖帕颗粒质量差异的主要标志性成分。该结果表明生产企业在对寒喘祖帕颗粒质量控制过程中可重点关注以上6个成分对应原药材的质量,科学合理地对该产品进行质量监测。

2.5 多指标成分含量测定

2.5.1 系统适用性试验 按“2.1”项色谱条件,

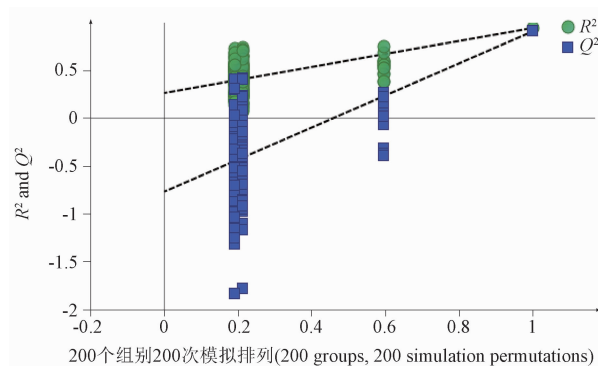


图6 OPLS-DA 置换检验图

Fig. 6 OPLS-DA replacement test diagram

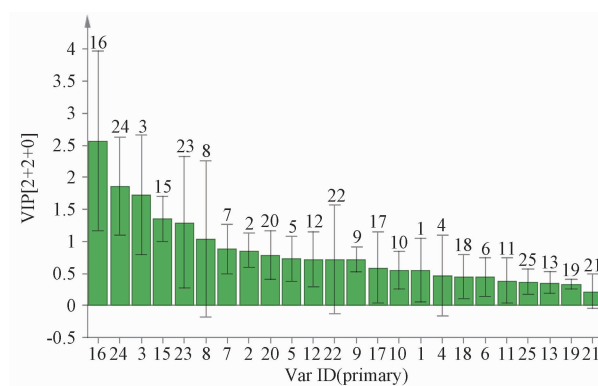


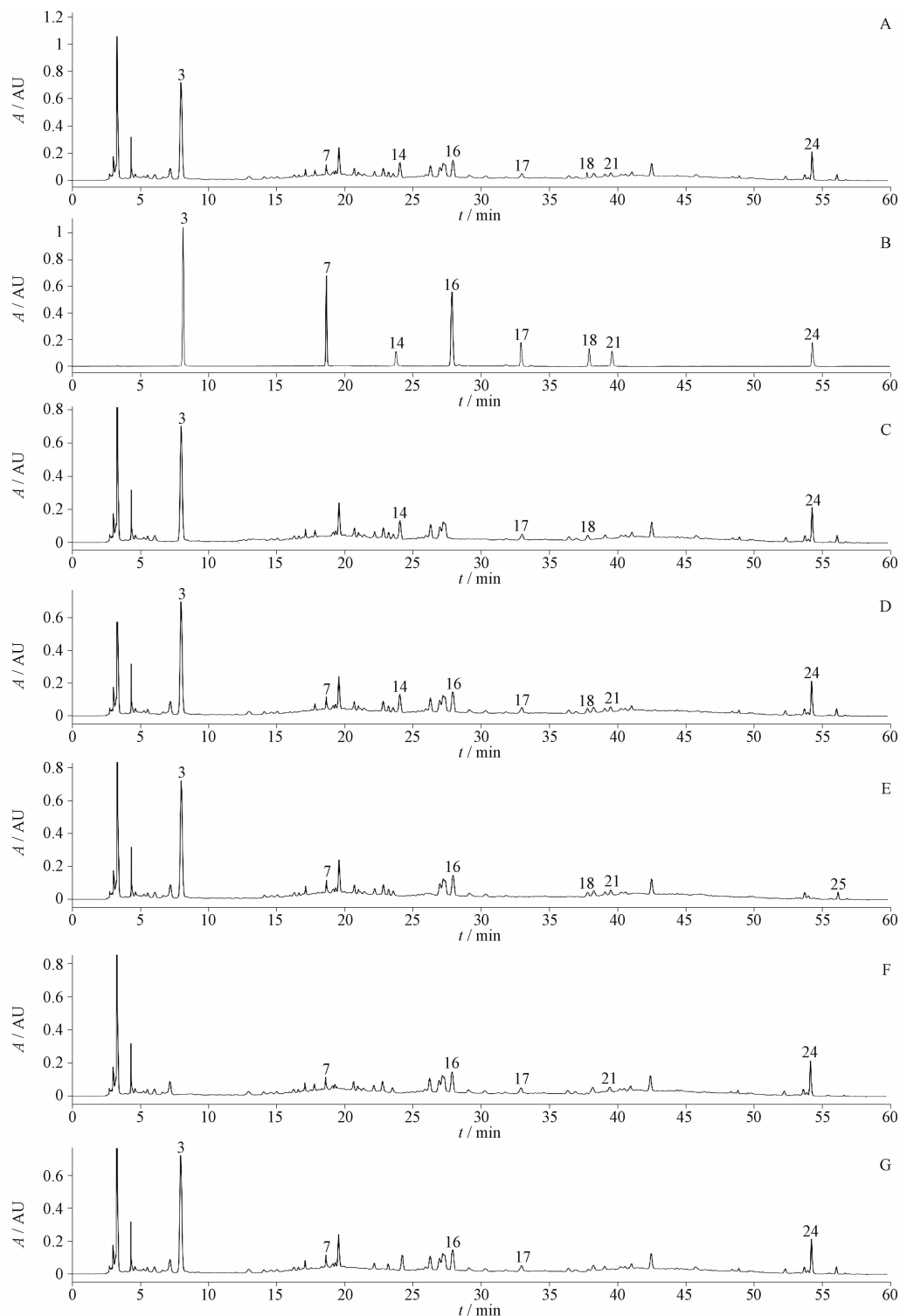
图7 17批寒喘祖帕颗粒的 VIP 图

Fig. 7 VIP plot of 17 batches of Hanchuan Zupa granules

分别精密吸取“2.2”项混合对照品溶液、供试品溶液和各阴性供试品溶液各10 μ L进样,结果各待测成分与前后峰分离度均 >1.5 ,对称因子在0.97~1.26,理论塔板数以没食子酸、绿原酸、鞣花酸、芦丁、甘草苷、槲皮素、迷迭香酸、甘草酸峰计,均 >7500 。色谱图见图8。

2.5.2 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.1”项混合对照品储备液1.0、2.0、3.0、5.0、7.0、9.0 mL,置于同一50 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得系列混合对照品溶液。精密吸取上述系列混合对照品溶液,按“2.1”项色谱条件进样分析,记录色谱图。以对照品浓度($X, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标进行线性回归,绘制各组分标准曲线,计算回归方程和相关系数。结果表明,在试验范围内呈良好的线性关系,结果见表1。

2.5.3 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项混合对照品溶液10 μ L,按“2.1”项色谱条件,连续进样6次测定,记录峰面积。结果没食子酸、绿原酸、鞣花酸、



3. 没食子酸 (gallic acid) 7. 绿原酸 (chlorogenic acid) 4. 鞣花酸 (tannic acid) 16. 芦丁 (rutin) 17. 甘草苷 (liquiritin) 18. 槲皮素 (quercetin) 21. 迷迭香酸 (rosmarinic acid) 24. 甘草酸 (glycyrrhizic acid)

A. 样品 (sample) B. 混合对照品 (mixed reference substances) C. 缺神香草阴性对照 (negative sample without *Hyssopus officinalis* L.) D. 缺铁线蕨阴性对照 (negative sample without *Adiantum capillsveneris* L.) E. 缺甘草浸膏阴性对照 (negative sample without *Glycyrrhiza* extract) F. 缺玫瑰花阴性对照 (negative sample without *Rosa Rugosa* Thunb.) G. 缺芹菜子阴性对照 (negative sample without *Apium graveolens* L. seed)

图 8 高效液相色谱图

Fig. 8 High performance liquid chromatograms

表 1 8 个成分线性关系

Tab. 1 Linear relationship of 8 components

成分(component)	回归方程(regression equation)	<i>r</i>	线性范围(linear range)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
没食子酸(gallic acid)	$Y = 551.56X + 236.84$	0.999 5	21.16 ~ 190.4
绿原酸(chlorogenic acid)	$Y = 1\,256.27X + 362.45$	0.999 3	4.310 ~ 38.79
鞣花酸(tannic acid)	$Y = 1\,469.87X + 714.56$	0.999 4	3.206 ~ 28.86
芦丁(rutin)	$Y = 657.84X + 542.36$	0.999 7	13.23 ~ 119.0
甘草苷(liquiritin)	$Y = 1\,245.57X + 362.14$	0.999 8	4.623 ~ 41.61
槲皮素(querceetin)	$Y = 1\,652.14X + 634.15$	0.999 6	2.392 ~ 21.53
迷迭香酸(rosmarinic acid)	$Y = 1\,547.12X + 536.21$	0.999 3	1.702 ~ 15.32
甘草酸(glycyrrhizic acid)	$Y = 487.69X + 714.25$	0.999 4	16.02 ~ 144.2

芦丁、甘草苷、槲皮素、迷迭香酸、甘草酸峰面积($n = 6$)的 RSD 分别 0.98%、1.2%、0.69%、1.3%、0.67%、1.4%、1.6%、1.4%，表明仪器精密度良好。

2.5.4 稳定性试验 取寒喘祖帕颗粒(S1)，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别于制备后 0、3、8、15、20、28、36 h，按“2.1”项色谱条件进样，记录峰面积。结果没食子酸、绿原酸、鞣花酸、芦丁、甘草苷、槲皮素、迷迭香酸、甘草酸峰面积($n = 6$)的 RSD 分别为 0.85%、1.7%、0.74%、1.1%、0.95%、1.9%、0.66%、1.7%，表明供试品溶液 36 h 内稳定性良好。

2.5.5 重复性试验 取寒喘祖帕颗粒(S1)，按“2.2.2”项方法，平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项色谱条件进样分析，记录色谱图，代入“2.5.2”项下

回归方程计算寒喘祖帕颗粒中上述 8 个成分的含量及其 RSD。结果没食子酸、绿原酸、鞣花酸、芦丁、甘草苷、槲皮素、迷迭香酸、甘草酸含量($n = 6$)的平均值分别为 5.309、0.860、0.773、3.394、1.137、0.556、0.371、3.930 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，RSD 分别 1.2%、1.7%、0.87%、1.8%、0.98%、1.7%、1.3%、1.7%，表明方法重复性良好。

2.5.6 加样回收率试验 取寒喘祖帕颗粒(S1)研成细粉，精密称取 6 份各 1.0 g，分别置 6 个具塞锥形瓶中，各加入“2.2.1”项混合对照品储备液 5.0 mL，按“2.2.2”项方法制备供试溶液，再按“2.1”项色谱条件进样测定，记录色谱图，计算各成分加样回收率及其 RSD，结果见表 2。

表 2 8 个成分的加样回收率试验结果($n = 6$)

Tab. 2 Recovery results of 8 components

成分 (component)	取样量 (sample content)/g	含量 (content)/mg	加入量 (added)/mg	测定量 (detected)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
没食子酸 (gallic acid)	1.021	5.420	5.290	10.63	98.6	99.1	0.61
	0.996 0	5.288	5.290	10.57	99.8		
	1.014	5.383	5.290	10.64	99.4		
	1.005	5.336	5.290	10.53	98.3		
	1.032	5.479	5.290	10.72	99.2		
	1.026	5.447	5.290	10.72	99.6		
绿原酸 (chlorogenic acid)	1.021	0.879 1	1.078	1.924	98.1	98.5	1.3
	0.996 0	0.857 6	1.078	1.932	100.6		
	1.014	0.873 1	1.078	1.895	96.6		
	1.005	0.865 3	1.078	1.912	98.4		
	1.032	0.888 6	1.078	1.956	98.1		
	1.026	0.883 4	1.078	1.935	99.2		
鞣花酸 (chlorogenic acid)	1.021	0.787 2	0.801 5	1.596	100.9	98.4	1.6
	0.996 0	0.767 9	0.801 5	1.564	99.3		
	1.014	0.781 8	0.801 5	1.559	97.0		
	1.005	0.774 9	0.801 5	1.566	98.7		

表 2(续)

成分 (component)	取样量 (sample weight)/g	样品中含量 (content)/mg	加入量 (added)/mg	测定量 (detected)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
芦丁(rutin)	1.032	0.795 7	0.801 5	1.574	97.1	98.0	1.3
	1.026	0.791 0	0.801 5	1.569	97.1		
	1.021	3.467	3.306	6.717	98.3		
	0.996	3.382	3.306	6.685	99.9		
	1.014	3.444	3.306	6.671	97.6		
	1.005	3.413	3.306	6.684	98.9		
	1.032	3.505	3.306	6.695	96.5		
甘草苷(liquiritin)	1.026	3.484	3.306	6.688	96.9	98.0	1.4
	1.021	1.158	1.156	2.301	98.9		
	0.996 0	1.129	1.156	2.285	100.0		
	1.014	1.150	1.156	2.269	96.8		
	1.005	1.140	1.156	2.258	96.7		
	1.032	1.170	1.156	2.291	97.0		
	1.026	1.163	1.156	2.301	98.4		
槲皮素(quercetin)	1.021	0.564 6	0.598 0	1.145	97.1	98.8	2.0
	0.996 0	0.550 8	0.598 0	1.152	100.5		
	1.014	0.560 7	0.598 0	1.139	96.7		
	1.005	0.555 8	0.598 0	1.162	101.4		
	1.032	0.570 7	0.598 0	1.155	97.7		
	1.026	0.567 4	0.598 0	1.162	99.4		
	1.021	0.378 8	0.425 6	0.804 1	99.9		
(rosmarinic acid)	0.996 0	0.369 5	0.425 6	0.798 5	100.8		
1.014	0.376 2	0.425 6	0.788 5	96.9			
1.005	0.372 9	0.425 6	0.786 7	97.2			
1.032	0.382 9	0.425 6	0.792 4	96.2			
1.026	0.380 6	0.425 6	0.795 8	97.6			
1.021	4.009	4.006	8.001	99.6	98.1	1.1	
(glycyrrhizic acid)	0.996 0	3.911	4.006	7.856			98.5
1.014	3.982	4.006	7.954	99.2			
1.005	3.947	4.006	7.847	97.4			
1.032	4.053	4.006	7.963	97.6			
1.026	4.029	4.006	7.914	97.0			

2.5.7 样品测定 取寒喘祖帕颗粒 17 批,按照“2.2.2”项方法,平行制备供试品溶液 3 份,按“2.1”项色谱条件进样测定,记录没食子酸、绿原酸、鞣花酸、芦丁、甘草苷、槲皮素、迷迭香酸、甘草酸的峰面积,计算寒喘祖帕颗粒中上述 8 个成分的含量。结果见表 3。

3 讨论

3.1 质控指标的选择

本研究通过 OPLS-DA 找到了影响寒喘祖帕颗粒质量的 6 个差异性较大的化合物,提示这些成分对样品分组有显著影响,并指认了其中 4 个,分别为芦丁、没食子酸、甘草酸和绿原酸,初步将上述 4 个成分

作为定量候选化合物。另外,方中维吾尔药神香草 *Hyssopus officinalis* L. 具有祛痰、止咳、平喘、抗炎、镇痛等药理作用^[8-9],其有效成分为黄酮类成分芦丁和酚酸类成分迷迭香酸^[10-11];铁线蕨具有清热解毒、利尿通淋的功效,具有良好的抗菌、抗癌、抗氧化等药理作用^[12],其主要活性成分为绿原酸;玫瑰花为蔷薇科植物玫瑰 *Rosa rugosa* Thunb. 的干燥花蕾,没食子酸、鞣花酸和槲皮素^[13]为其特征指标成分;甘草浸膏中甘草酸和甘草苷分别为甘草中三萜皂苷类活性成分和黄酮类活性成分^[14],具有止咳平喘、清热解毒之功效^[15-16]。故最终选择没食子酸、绿原酸、鞣花酸、

表 3 8 个成分含量的结果 ($n=3$)

Tab. 3 Results of content determination of 8 constituents

编号 (number)	含量(content)/(mg · g ⁻¹)							
	没食子酸 (gallic acid)	绿原酸 (chlorogenic acid)	鞣花酸 (chlorogenic acid)	芦丁 (rutin)	甘草苷 (liquiritin)	槲皮素 (quercetin)	迷迭香酸 (rosmarinic acid)	甘草酸 (glycyrrhizic acid)
S1	5.309	0.861	0.771	3.396	1.134	0.553	0.371	3.927
S2	5.295	0.918	0.775	3.312	1.025	0.563	0.386	4.215
S3	4.965	0.823	0.780	3.194	0.962	0.531	0.339	3.618
S4	5.578	0.897	0.786	2.476	1.035	0.565	0.309	3.661
S5	5.263	0.986	0.769	2.567	0.996	0.474	0.389	3.530
S6	4.825	0.920	0.776	3.119	1.113	0.570	0.431	4.476
S7	5.673	1.443	0.877	1.497	0.996	0.556	0.348	3.045
S8	5.536	1.422	0.884	1.429	1.014	0.591	0.335	2.995
S9	5.536	1.439	0.761	1.433	1.051	0.584	0.324	2.859
S10	5.673	1.443	0.931	1.497	0.996	0.610	0.348	3.045
S11	5.123	1.094	0.958	1.463	0.799	0.621	0.363	3.175
S12	5.507	1.182	0.931	1.511	0.953	0.707	0.420	3.366
S13	5.172	1.383	0.775	1.470	0.850	0.626	0.373	3.167
S14	5.172	1.037	0.877	1.462	0.842	0.633	0.384	3.177
S15	6.324	1.781	0.884	3.419	1.025	0.707	0.431	3.903
S16	6.496	1.871	0.761	1.789	1.193	0.701	0.372	3.707
S17	6.792	1.739	0.931	2.082	1.283	0.761	0.415	3.796

芦丁、甘草苷、槲皮素、迷迭香酸、甘草酸 8 个成分作为该制剂含量测定的指标成分。

3.2 提取方式和色谱条件的选择

以没食子酸、绿原酸、鞣花酸、芦丁、甘草苷、槲皮素、迷迭香酸和甘草酸 8 个组分的质量分数(提取率)为考察指标,优化样品提取方式。试验分别考察加热回流提取、超声提取和浸泡过夜 3 种提取方式,对样品提取率的影响,结果浸泡过夜中 8 个组分的提取率均较低;超声提取没食子酸、绿原酸、甘草苷和甘草酸的提取率较浸泡过夜高,但是较加热回流低,加热回流提取鞣花酸、芦丁、槲皮素和迷迭香酸 4 个组分提取率最高,故最终选择加热回流提取样品。进一步考察提取时间和甲醇体积分数对提取率的影响,最终确定最佳提取条件为称取样品均匀粉末 2.0 g,精密加入 50% 甲醇水溶液 50 mL,加热回流 40 min。分别考察比较甲醇-水、甲醇-0.1% 甲酸和甲醇-0.1% 磷酸,乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸和乙腈-0.1% 磷酸流动相系统的色谱图,结果乙腈-0.1% 磷酸系统色谱峰信号丰富且分离度均满足要求,最终作为寒喘祖帕颗粒指纹图谱的流动相洗脱系统。采用 DAD 检测器在 200~400 nm 波长处扫描,结果显示在 220 nm 波长处,色谱峰数目较多,且各峰峰面积响应值适中,所测定 8 个指标成

分峰形和分离度均能满足要求。

3.3 化学模式识别分析结果

本次实验收集市场流通环节的 3 个生产企业的 17 批样品进行了测定,收集的样品具有一定的代表性。指纹图谱相似度评价结果显示,不同厂家寒喘祖帕颗粒 17 批样品指纹图谱相似度在 0.90 以上,表明不同厂家的寒喘祖帕颗粒质量整体一致性及稳定性较好;进一步借助 HCA、PCA 和 OPLS-DA 等化学模式识别技术对 17 批样品进行综合分析,结果不同厂家寒喘祖帕颗粒各自聚为一类,且筛选了 16 号峰(芦丁)、3 号峰(没食子酸)、15 号峰、23 号峰、24 号峰(甘草酸)和 7 号峰(绿原酸)6 个质量差异标志性成分,指认芦丁、没食子酸、甘草酸和绿原酸 4 个成分。李柯翱等^[17]研究表明甘草酸、没食子酸、甘草苷对寒喘祖帕颗粒的质量控制起着关键作用,与其结果基本一致。实验进一步对 6 个质量差异标志性成分进行了归属,确定 16 号峰和 7 号峰归属于神香草,3 号峰归属于玫瑰花、15 号峰和 24 号峰归属于甘草浸膏,23 号峰归属于铁线蕨,为厂家在药材源头控制此制剂的质量提供了参考依据。

本实验采用同一色谱条件建立寒喘祖帕颗粒指纹图谱定性和多成分定量同时分析,建立的方法专

属性强,准确度高,可用于评价不同厂家不同批次寒喘祖帕颗粒的质量差异,并监测重点成分的变化,从而为整体评价该制剂质量提供科学依据,为其质量标准制定的规范化提供重要借鉴。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 国家食品药品监督管理局国家药品标准. WS3-BW-0195-98-2021[S]. 2021
Chinese Pharmacopoeia Commission. State Drug Standards of China Food and Drug Administration. WS3-BW-0195-98-2021[S]. 2021
- [2] 韦卓纯, 林绘, 彭颖, 等. UPLC 指纹图谱多模式识别结合多指标成分测定的清热消炎宁胶囊质量控制研究[J]. 中草药, 2023, 54(15): 4856
WEI ZC, LIN H, PENG Y, et al. Quality control of Qingre Xiaoyanning capsules based on multi-pattern recognition method of UPLC fingerprint and multi-index composition determination[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(15): 4856
- [3] 李佳涵, 王慧, 刘佳星, 等. 整合指纹图谱与多成分含量测定的酸枣仁汤质量评价研究[J]. 中草药, 2022, 53(15): 4698
LI JH, WANG H, LIU JX, et al. Quality evaluation of Suanzaoren decoction by integrating fingerprint and quantitative analysis of multi-component[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(15): 4698
- [4] 沈丹萍, 姜鹏, 詹常森. 基于 UPLC 指纹图谱和多成分测定的天王补心丸质量控制研究[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(5): 1240
SHEN DP, JIANG P, ZHAN CS. Quality control of Tianwang Buxin pills based on UPLC fingerprint and multi-component quantification[J]. China J Chin Mater Med, 2024, 49(5): 1240
- [5] 杨宇, 刘卜语, 王葳, 等. 基于聚类分析和主成分分析的中药马兰高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 化学世界, 2024, 65(5): 290
YANG Y, LIU BY, WANG W, et al. Studies on high performance liquid chromatography fingerprint of *Kalimeris indica* (L.) Sch-Bip based on cluster and principal component analysis[J]. Chem World, 2024, 65(5): 290
- [6] 李沁, 张聪, 陈亮, 等. 基于超高效液相色谱指纹图谱、多指标成分定量及化学计量学的小儿感冒颗粒质量评价[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(9): 1612
LI Q, ZHANG C, CHEN L, et al. Quality evaluation of Xiao'er Ganmao granules based on UPLC fingerprint, multi-component determination, and chemometric analysis[J]. Chin J Pharm Anal, 2023, 43(9): 1612
- [7] 吴学峰, 周熙, 黄晓兰, 等. 基于 UPLC-Q-TOF MS 的广佛手指纹图谱建立及炮制前后成分差异分析[J]. 分析测试学报, 2022, 41(3): 299
WU XF, ZHOU X, HUANG XL, et al. Construction of UPLC-Q-TOF MS fingerprints for Fingered Citron and its ingredient differences analysis before and after processing[J]. J Instrum Anal, 2022, 41(3): 299
- [8] 张亚杰, 康雨彤, 贺金华, 等. 硬尖神香草三萜类化学成分研究[J]. 中药材, 2020, 43(2): 347
ZHANG YJ, KANG YT, HE JH, et al. Triterpenoids constituents of *Hyssopus cuspidatus*[J]. J Chin Med Mater, 2020, 43(2): 347
- [9] 刘丹, 朱小涛, 向槿, 等. 神香草倍半萜类化学成分研究[J]. 中草药, 2019, 50(5): 1049
LIU D, ZHU XJ, XIANG J, et al. Sesquiterpenes from aerial parts of *Hyssopus cuspidatus*[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(5): 1049
- [10] 王莹, 姜君君, 兰卫, 等. HPLC 法测定维药硬尖神香草中芦丁含量[J]. 化学与生物工程, 2022, 39(9): 64
WANG Y, JIANG JJ, LAN W, et al. Determination of rutin in Uygur medicine *Hyssopus cuspidatus* Boriss. by HPLC[J]. Chem Bioeng, 2022, 39(9): 64
- [11] 刘桂花, 何承辉, 刘宣麟, 等. 神香草中迷迭香酸和总多糖含量测定方法研究[J]. 中国药房, 2015, 26(36): 5133
LIU GH, HE CH, LIU XL, et al. Study of the methods of determination of rosmarinic acid and total polysaccharide in *Hyssopus officinalis*[J]. China Pharm, 2015, 26(36): 5133
- [12] 肖丹, 范东生, 刘星, 等. 不同产地铁线蕨药材指纹图谱的建立、分析及差异成分的含量测定[J]. 中国药房, 2021, 32(17): 2085
XIAO D, FAN DS, LIU X, et al. Establishment and analysis of the fingerprints of *Adiantum capillsveneris* from different producing areas and content determination of its differential components[J]. China Pharm, 2021, 32(17): 2085
- [13] 符映均, 姜晓燕, 张硕, 等. 玫瑰花 HPLC 指纹图谱及质量评价研究[J]. 现代中药研究与实践, 2022, 36(6): 49
FU YJ, JIANG XY, ZHANG S, et al. Study on HPLC fingerprints and quality evaluation of *Rosae Rugosae Flos*[J]. Res Pract Chin Med, 2022, 36(6): 49
- [14] 关皎, 王强, 孙宇慧, 等. UFLC 法同时测定甘草及其炮制品中 2 种活性成分的含量[J]. 吉林医药学院学报, 2018, 39(4): 241
GUAN J, WANG Q, SUN YH, et al. Simultaneous determination of two active components in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. and its processed products by UFLC[J]. J Jilin Med Univ, 2018, 39(4): 241
- [15] 于霞, 吴娟, 姜雪, 等. HPLC 法同时测定消乳散中甘草苷、橙皮苷和甘草酸铵的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2017, 34(5): 369
YU X, WU J, JIANG X, et al. Simultaneous determination of glycyrrhizic acid, hesperidin, and ammonium glycyrrhetic acid in Xiaoru powder by HPLC[J]. J Shenyang Pharm Univ, 2017, 34(5): 369
- [16] 刘亚萍, 曹雨诞. HPLC 法测定炙甘草中主要化学成分含量的研究[J]. 安徽医药, 2015, 19(7): 1272
LIU YP, CAO YD. Study on the determination of the main chemical components in roasted licorice by HPLC[J]. J Anhui Med Pharm, 2015, 19(7): 1272
- [17] 李柯翹, 米尔扎提·麦麦提, 张明惠, 等. 基于统计学分析的寒喘祖帕颗粒 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国现代中药, 2022, 24(8): 1555
LI KA, Mi-Er-Zha-Ti-Mai-Mai-Ti, ZHANG MH, et al. HPLC fingerprint of Hanchuan Zupa granules based on statistical analysis[J]. Mod Chin Med, 2022, 24(8): 1555

(本文于 2024 年 1 月 15 日收到)