

# 基于多波长切换 HPLC 指纹图谱结合化学计量学和多指标含量测定的脉络舒通丸质量评价研究

孙玉<sup>1,2</sup>, 许丽丽<sup>1,2,3</sup>, 高文燕<sup>3</sup>, 汪冰<sup>2</sup>, 李慧芬<sup>1</sup>, 关永霞<sup>5</sup>, 孙仟<sup>1,2</sup>, 崔伟亮<sup>1,2,5\*</sup>, 林永强<sup>1,2\*</sup> (1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东省食品药品检验研究院, 中药标准创新与质量评价工程实验室, 济南 250101; 3. 山东省创新发展研究院, 济南 271039; 4. 新泰市人民医院耳鼻喉科, 山东 泰安 271200; 5. 鲁南制药股份有限公司, 经方与现代中药融合创新全国重点实验室, 山东 临沂 276005)

**摘要:**目的 建立指纹图谱和多指标定量与化学计量学相结合的脉络舒通丸质量评价方法。方法 采用 Agilent ZORBAX SB-Aq C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 检测波长(216、230、280、248、327、280、254 nm), 流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 建立脉络舒通丸指纹图谱, 确定共有峰结合化学计量学分析, 并对 11 种指标成分进行含量测定。结果 在指纹图谱研究中, 标定了 30 个共有峰, 通过对照品比对指认了 12 个成分, 指纹图谱相似度范围均 ≥ 0.990; 通过聚类分析、主成分分析、偏最小二乘判别分析等化学计量学综合分析, 没食子酸、新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸、芍药苷、盐酸黄柏碱、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C、哈巴俄苷、盐酸小檗碱是影响脉络舒通丸质量的主要因子, 上述 11 种成分含量测定变化范围分别为 0.62 ~ 0.84、1.45 ~ 2.50、1.30 ~ 2.78、3.35 ~ 5.28、2.44 ~ 4.02、0.54 ~ 0.88、0.16 ~ 0.23、0.61 ~ 0.76、1.39 ~ 1.76、0.41 ~ 0.54、2.28 ~ 3.34 mg · g<sup>-1</sup>。经方法学验证, 线性关系良好( $r \geq 0.9996$ ), 平均加样回收率为 95.70% ~ 104.90%, 相对标准偏差(RSD)为 0.62% ~ 1.93%。结论 建立的多波长切换指纹图谱结合化学计量学分析与多指标含量测定方法稳定、可靠, 为脉络舒通丸的质量控制、综合评价提供科学依据。

**关键词:** 脉络舒通丸; 指纹图谱; 化学计量学; 含量测定; 质量评价

doi: 10.11669/cpj.2024.21.010 中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)21-2065-10

## Quality Evaluation of Mailuoshutong Pills Based On Multi-Wavelength Switching HPLC Fingerprint Combined With Chemometrics and Multi-Indicator Content Determination

SUN Yu<sup>1,2</sup>, XU Lili<sup>1,2,3</sup>, GAO Wenyan<sup>4</sup>, WANG Bing<sup>2</sup>, LI Huifen<sup>1</sup>, GUAN Yongxia<sup>5</sup>, SUN Qian<sup>1,2</sup>, CUI Weiliang<sup>1,2,5\*</sup>, LIN Yongqiang<sup>1,2\*</sup> (1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Shandong Engineering Laboratory for Standard Innovation and Quality Evaluation of TCM, Shandong Provincial Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China; 3. Shandong Academy of Innovation and Development, Jinan 271039, China; 4. Otolaryngology Department, The People's Hospital of Xintai City, Taian 271200, China; 5. National Key Laboratory of Integration and Innovation of Classic Prescriptions and Modern Traditional Chinese Medicine, Lunan Pharmaceutical Group, Linyi 276005, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a quality evaluation method for Mailuoshutong Pills by combining fingerprints and multi indicator quantification combined with chemometrics. **METHODS** Agilent ZORBAX SB-Aq C<sub>18</sub> chromatography column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used, and the column temperature was maintained at 30 °C. The mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution. Gradient elution was carried out at a flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, and the detection wavelengths were 216, 230, 280, 248, 327, 280 and 254 nm. The fingerprints of Mailuoshutong Pills (MLSTP) were established, the common peaks were determined combined with chemometric analysis, and the contents of 11 indicator components were determined. **RESULTS** A total of 30 common peaks were labeled in the fingerprints, and 12 components were identified through comparison with reference materials. The similarity of fingerprints of 16 batches of MLSTP were more than 0.990. Through cluster analysis, principal component analysis, and partial least squares discriminant analysis, it was found that gallic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, chlorogenic acid, paeoniflorin, berberine hydrochloride, calycosin-7-glucoside, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, hapargoside, and berber-

**基金项目:** 国家重点研发计划项目资助(2023YFC3504102); 山东省重点研发计划项目资助(2021CXGC010511); 泉城产业领军人才支持计划创新团队项目资助(MRJT2105); 国家药品监管科学体系建设重点项目资助(RS2024Z006); 山东中医药大学 2022 年教育教学研究课题资助(ZYY2022019)

**作者简介:** 孙玉, 女, 硕士研究生 研究方向: 药物分析学; 许丽丽, 女, 博士研究生, 副主任中药师 研究方向: 中药质量评价及标准制修订。孙玉和许丽丽为共同第一作者 \* 通讯作者: 崔伟亮, 男, 博士, 副主任药师 研究方向: 中药新产品开发及质量控制; 林永强, 男, 博士, 主任药师 研究方向: 中药质量控制及标准制修订 Tel: (0531) 81216552

ine hydrochloride were the main factors affecting the quality of MLSTP, and the variation ranges of the content determination of the 11 components mentioned above were 0.62–0.84, 1.45–2.50, 1.30–2.78, 3.35–5.28, 2.44–4.02, 0.54–0.88, 0.16–0.23, 0.61–0.76, 1.39–1.76, 0.41–0.54 and 2.28–3.34 mg·g<sup>-1</sup>, respectively. **CONCLUSION** The established multi-wavelength switching fingerprint spectrum combined with chemometric analysis and multi index content determination method is stable and reliable, which can provide scientific basis for the quality control and comprehensive evaluation of MLSTP.

**KEY WORDS:** Mailuoshutong Pills; fingerprint; chemometrics; content determination; quality evaluation

脉络舒通丸 (Mailuoshutong Pills, MLSTP) 来源于国医大师唐祖宣多年验方, 治疗湿热瘀阻脉络所致的血栓性浅静脉炎和深静脉血栓等疾病疗效确切<sup>[1-4]</sup>。该方由 12 味中药组成, 以黄芪、金银花 (清热解暑、补气脱毒利水) 为君药; 黄柏、苍术、薏苡仁 (清热祛湿), 当归、白芍、甘草 (缓急解挛止痛), 玄参 (清热凉血、泻火解毒、软坚散结) 为臣药; 水蛭、蜈蚣、全蝎 (活血消瘀、攻毒散结、通络止痛) 为佐药; 甘草 (调和诸药) 为使药; 全方共奏清热解毒、化痰通络、祛湿消肿之功效<sup>[5]</sup>。脉络舒通丸执行标准为《中国药典》2020 年版, 含量测定项下仅有黄芪甲苷和绿原酸 2 个指标成分<sup>[1]</sup>, 尚未见多波长切换指纹图谱和多组分定量测定的研究, 无法全面有效对其质量进行评价。

脉络舒通丸药味组成多, 有效成分复杂。有研究表明黄酮类化合物、酚酸类化合物、萜类化合物等是其发挥药效作用的重要物质基础<sup>[6]</sup>。獐芽菜苷、绿原酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、芍药苷、甘草苷元和 3-丁烯基苯酚、甘草素等可以作为其质量标志物<sup>[7-8]</sup>。绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸、没食子酸、芍药苷等酚酸类化合物是金银花和白芍的重要成分, 具有良好的抗炎<sup>[9]</sup>和抗癌作用<sup>[10]</sup>, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷等黄酮类化合物是黄芪的重要成分, 具有抗炎、抗氧化、保护血管内皮功能等功效<sup>[11-12]</sup>。盐酸黄柏碱、盐酸小檗碱等生物碱是黄柏的重要成分, 具有很好的抗菌、抗炎、抗病毒等作用<sup>[13]</sup>。环烯醚萜类成分哈巴俄苷是玄参中的重要成分, 具有抗炎、保护心脑血管等功效<sup>[14]</sup>。

多波长切换高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱结合化学计量学是目前最有效的中药质量控制手段, 多指标含量测定能够全面地反映中药的内在质量和疗效<sup>[15-17]</sup>。为更全面评价脉络舒通丸的质量, 提升其质量标准, 本实验以 16 个不同批次的脉络舒通丸为研究对象, 采用多波长切换 HPLC 法建立其指纹图谱, 结合多指标含量测定、聚类分析、主成分分析、偏最小二乘法分析, 完善其质量标准, 为该品种的质量评价和临床应用提供有效的参考。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

XSE205 型十万分之一电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司), Waters 2695 型高效液相色谱仪 (沃特世公司), BK-600C 型超声波清洗仪 (巴克超声设备有限公司)。

### 1.2 材料

对照品绿原酸 (批号: 110753-202119, 含量以 96.3% 计)、没食子酸 (批号: 110831-202407, 含量以 90.8% 计)、黄柏碱 (批号: 111895-201805, 含量以 94.9% 计)、芍药苷 (批号: 110736-201846, 含量以 97.4% 计)、哈巴俄苷 (批号: 111730-202110, 含量以 96.8% 计)、盐酸小檗碱 (批号: 111895-201805, 含量以 94.9% 计)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号: 111920-202308, 含量以 96.9% 计)、金银花对照药材 (批号: 121060-201608)、黄芪对照药材 (批号: 120974-201813)、黄柏对照药材 (批号: 121510-201606)、苍术对照药材 (批号: 120983-202106)、薏苡仁对照药材 (批号: 121254-201504)、当归对照药材 (批号: 120927-202118)、甘草对照药材 (批号: 120904-202021)、白芍对照药材 (批号: 120905-202011)、玄参对照药材 (批号: 121006-202110)、水蛭对照药材 (批号: 121061-202107)、全蝎对照药材 (批号: 121044-201104) (中国食品药品检定研究院); 异绿原酸 A (批号: MUST-23042610, 含量以 98.11% 计)、异绿原酸 C (批号: MUST-23042613, 含量以 99.61% 计)、新绿原酸 (批号: MUST-23042610, 含量以 98.90% 计)、隐绿原酸 (批号: MUST-23042610, 含量以 99.61% 计) (成都曼思特生物科技有限公司); 蜈蚣药材 (批号: WKQ-DZYC-02718) (四川省维克奇生物科技有限公司)。

脉络舒通丸 16 批, 鲁南厚朴制药有限公司, 批号为: 918200011 (S1)、918200021 (S2)、918200031 (S3)、918200041 (S4)、918231011 (S5)、918231021 (S6)、918231031 (S7)、918231041 (S8)、918231051 (S9)、918230921 (S10)、918230931 (S11)、918230941 (S12)、918230951 (S13)、91823061

(S14)、91823071(S15)、91823081(S16)。

甲醇、乙腈、磷酸(色谱纯),其余试剂均为分析纯,水为 Milli-Q 超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 指纹图谱的建立

**2.1.1 色谱条件** 采用 Agilent ZORBAX SB-Aq C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~7 min 2% A→7% A;7~38 min, 7% A;38~42 min, 7% A→9% A;42~52 min, 9% A;52~59 min, 9% A→12% A;59~89 min, 12% A→20% A;89~101 min, 20% A→26% A;101~106 min, 26% A→27% A;106~110 min, 27%→40% A;110~114 min, 40%→43% A;114~118 min, 43% A)。流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;进样量:10 μL;柱温:30℃。波长切换:0~38 min, 216 nm;38~58 min, 230 nm;58~85 min, 248 nm;85~91 min, 327 nm;91~108 min, 280 nm;108~118 min, 254 nm。

**2.1.2 混合对照品溶液的制备** 精密称取各对照品适量,以体积分数 50% 甲醇溶解,制成质量浓度分别为没食子酸 780.40 μg·mL<sup>-1</sup>、新绿原酸 273.32 μg·mL<sup>-1</sup>、隐绿原酸 248.12 μg·mL<sup>-1</sup>、绿原酸 710.40 μg·mL<sup>-1</sup>、芍药苷 331.16 μg·mL<sup>-1</sup>、盐酸黄柏碱 231.56 μg·mL<sup>-1</sup>、异绿原酸 A 91.92 μg·mL<sup>-1</sup>、异绿原酸 C 197.44 μg·mL<sup>-1</sup>、哈巴俄苷 206.80 μg·mL<sup>-1</sup>、盐酸小檗碱 933.32 μg·mL<sup>-1</sup> 的混合对照品母液,精密吸取 5 mL 至 20 mL 量瓶中以体积分数 50% 甲醇定容,作为混合对照品溶液。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 将脉络舒通丸样品粉碎,取细粉 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入体积分数 50% 甲醇溶液 25 mL,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)40 min,放至室温,再次称重,用体积分数 50% 甲醇补足减失的重量,滤过,取续滤液即得。

**2.1.4 对照药材溶液的制备** 分别取金银花(JYH)、黄芪(HQ)、黄柏(HB)、苍术(CZ)、薏苡仁(YZR)、玄参(XS)、甘草(GC)、当归(DG)、水蛭(SZ)、蜈蚣(WG)、全蝎(QX)对照药材粉末约 1 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇溶液 25 mL,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)40 min,取出,滤过,取续滤液,即得对照药材溶液。

**2.1.5 阴性样品溶液的制备** 取企业提供的缺少金银花、缺少黄芪、缺少黄柏、缺少当归、缺少甘草、

缺少玄参的阴性样品粉末,按“2.1.3”项下方法,制成相应的阴性样品溶液。

**2.1.6 仪器精密度实验** 取脉络舒通丸 S4 号样品适量,按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1.1”项下色谱条件重复进样 6 次,测得各共有峰保留时间的相对标准偏差(RSD)均小于 0.35%,峰面积的 RSD 均小于 2.89%,表明仪器精密度良好。

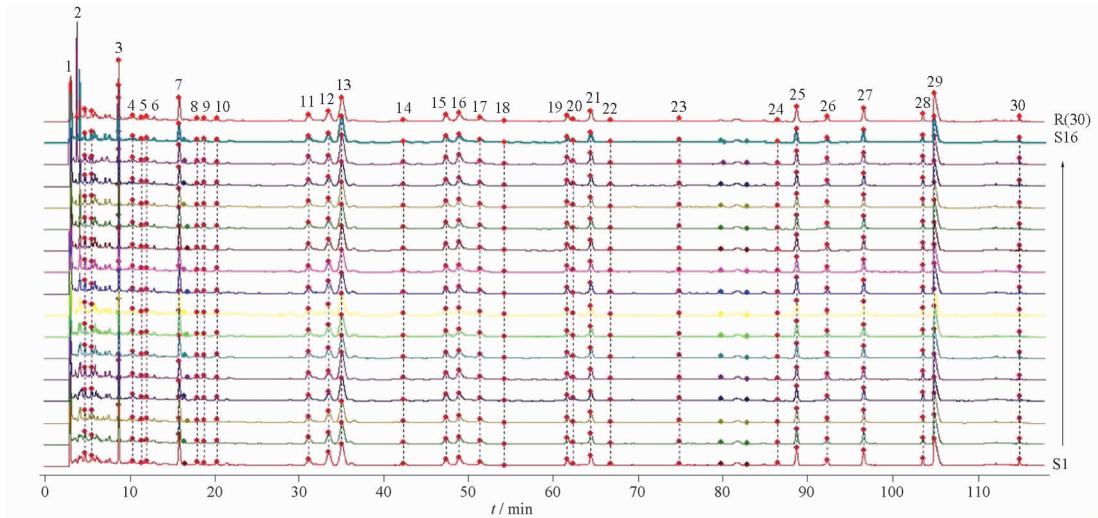
**2.1.7 样品稳定性实验** 取脉络舒通丸 S4 号样品适量,依照“2.1.3”项下方法制成供试品溶液。分别于 0、2、4、8、12、16、24 h,按照“2.1.1”项下色谱条件进样分析,测定各成分的峰面积积分值,以观察供试品溶液在检测过程中待测成分的稳定性。结果 30 个共有峰保留时间的 RSD 均小于 2.70%,峰面积的 RSD 均小于 0.41%,表明样品 24 h 内稳定性良好。

**2.1.8 方法重复性考察** 取脉络舒通丸 S4 号样品适量,依照“2.1.3”项下方法制成供试品溶液,平行制备 6 份,依法进样 10 μL。结果 30 个共有峰的保留时间和峰面积的 RSD ( $n=6$ ) 分别不超过 2.90%、0.70%,表明仪器方法重复性较好。

**2.1.9 指纹图谱的建立** 按“2.1.3”项下方法制成的 16 批供试品溶液按“2.1.1”项下色谱条件测定,记录色谱图,导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)》,以 S1 样品为参照指纹图谱(R),设置时间窗宽度为 0.5 min,采用多点校正后自动匹配,以中位数法生成对照指纹图谱,并进行相似度计算,色谱图见图 1。

16 批脉络舒通丸与对照指纹图谱的相似度  $\geq 0.990$ ,表明 16 批脉络舒通丸的质量较为稳定、化学成分一致性较好。16 批脉络舒通丸指纹图谱共标定 30 个共有峰,结合参考文献<sup>[6]</sup>和对照品吸光度、保留时间比对指出其中 12 个共有峰,依次为:没食子酸(3 号峰)、新绿原酸(7 号峰)、隐绿原酸(12 号峰)、绿原酸(13 号峰)、芍药苷(16 号峰)、盐酸黄柏碱(17 号峰)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(23 号峰)、异绿原酸 A(26 号峰)、异绿原酸 C(27 号峰)、哈巴俄苷(28 号峰)、盐酸小檗碱(29 号峰)、甘草酸铵(30 号峰)。

**2.1.10 指纹图谱共有峰的归属与指认** 取“2.1.4”项下金银花、黄芪、白芍、薏苡仁、当归、玄参、甘草、黄柏、苍术对照药材溶液,按“2.1.1”项下色谱条件测定,结果显示:1 号峰归属于当归、黄芪,28 号峰归属于玄参,4 号峰归属于金银花、黄柏、当归,5、23 号峰归属于黄芪,2、6、11、17、18、19、20、21、29 号峰主要归属于黄柏,15、24、25、26、27 号峰



峰 3、7、12 ~ 13、16 ~ 17、23、26 ~ 30 为共有峰。

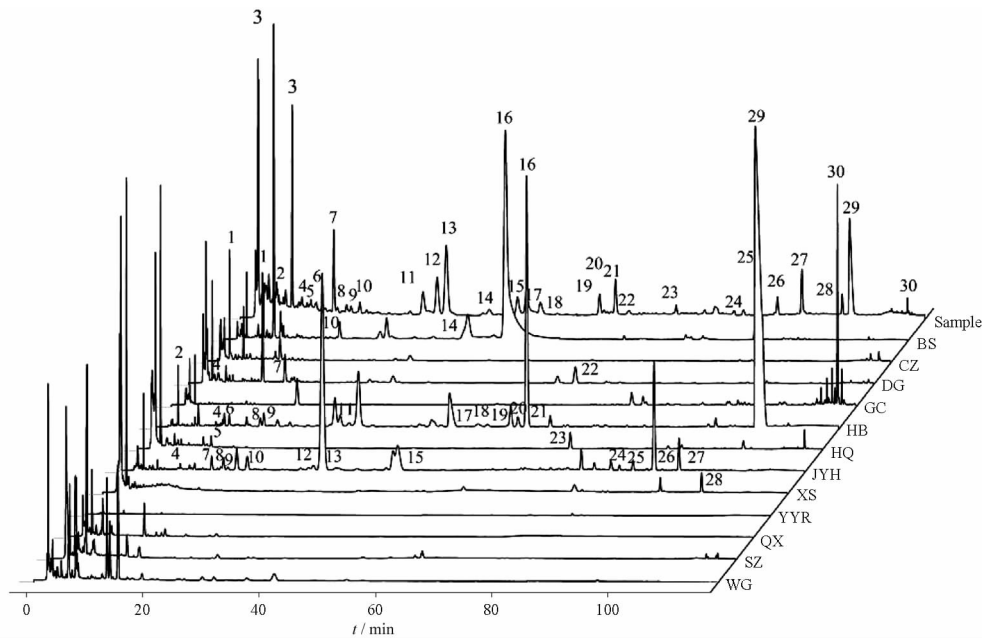
peak 3, 7, 12 ~ 13, 16 ~ 17, 23, 26 ~ 30 are common peaks.

图 1 脉络舒通丸(MLSTP)的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱(S1 ~ S16)及对照图谱(R)

Fig. 1 HPLC fingerprint (S1-S16) and control spectrum (R) of Mailuoshutong Pills(MLSTP)

主要归属于金银花,7号峰归属于金银花、当归,8、9、12、13号峰归属于金银花、黄柏,3、14、16号峰主要归属于白芍,22号峰归属于当归,10号峰主要归属于金银花、白芍,30号峰归属于甘草,指纹图谱未

体现水蛭、蜈蚣、全蝎、薏苡仁和苍术对共有峰的贡献,推测动物药中成分多为核苷、氨基酸类成分,薏苡仁、苍术中成分多为脂溶性成分,在此条件下未见对指纹图谱的贡献,见图2。



BS - 白芍; CZ - 苍术; DG - 当归; GC - 甘草; HB - 黄柏; HQ - 黄芪; JYH - 金银花; XS - 玄参; YYR - 薏苡仁; QX - 全蝎; WG - 蜈蚣; SZ - 水蛭; 3 - 没食子酸; 7 - 新绿原酸; 12 - 隐绿原酸; 13 - 绿原酸; 16 - 芍药苷; 17 - 盐酸黄柏碱; 23 - 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 26 - 异绿原酸 A; 27 - 异绿原酸 C; 28 - 哈巴俄苷; 29 - 盐酸小檗碱; 30 - 甘草酸铵。

BS - *Paeoniae Radix Alba*; CZ - *Atractylodis Rhizoma*; DG - *Angelica Sinensis Radix*; GC - *Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma*; HB - *Phellodendri Chinensis Cortex*; HQ - *Astragali Radix*; JYH - *Lonicerae Japonicae Flos*; XS - *Scrophulariae Radix*; YYR - *Coicis Semen*; QX - *Scorpio*; SZ - *Hirudo*; WG - *Scolopendra*; 3 - gallic acid; 7 - neochlorogenic acid; 12 - cryptochlorogenic acid; 13 - chlorogenic acid; 16 - paeoniflorin; 17 - berberine hydrochloride; 23 - berberine hydrochloride glucoside; 26 - isochlorogenic acid A; 27 - isochlorogenic acid C; 28 - harpagoside; 29 - berberine hydrochloride; 30 - ammonium glycyrrhethinic acid.

图 2 MLSTP 样品与组方药材的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of the MLSTP sample and its formulation herb

## 2.2 化学计量学分析

### 2.2.1 聚类分析

为直观反映不同批次质量差异,本研究以 16 个批次脉络舒通丸指纹图谱 30 个共有峰的峰面积为变量,导入 Chiplot 网站 (<https://www.chiplot.online>),进行标准化处理后,对样品峰面积进行系统聚类分析(HCA),结果见图 3,图中色块的颜色可以直观反映峰面积的大小,颜色越红表示峰面积越大,颜色越蓝表示峰面积越小。样品大致可分为 3 类,S14 为 I 类,该批次样品中 P3(没食子酸)、P13(绿原酸)、P16(芍药苷)、P16(芍药苷)峰面积相对较低,P10 峰面积相对较高;S1、S2、S3、S7、S9 为 II 类,该类样品峰面积中 P7(新绿原酸)、P12(隐绿原酸)、P29(盐酸小檗碱)峰面积相对较高,P15 峰面积相对较低;其余样品为 III 类,P13(绿原酸)、P16(芍药苷)峰面积相对较高,P27(异绿原酸 C)峰面积相对较低。各共有峰分为 3 类,P13(绿原酸)、P29(盐酸小檗碱)为 I 类,各批次样品中此 2 峰峰面积最高,P3、P7、P11、P12、P15、P16、P21、P25、P27 分为 II 类,此类峰面积居中,其余峰为 III 类峰面积较小。P3、P7、P12、P13、P11、P15、P16、P21、P27、P25、P29 是区分不同批次脉络舒通丸的主要特征峰。

表 1 MLSTP 中主成分因子特征值及方差贡献率

Tab.1 Eigenvalue and variance contribution rate of principal component factors in MLSTP

Principal component	Initial eigenvalue			Extracting the sum of squared loads		
	Characteristic value	Variance contribution rate/%	Cumulative variance contribution rate/%	Characteristic value	Variance contribution rate/%	Cumulative variance contribution rate/%
1	9.023	30.076	30.076	9.023	30.076	30.076
2	7.447	24.823	54.899	7.447	24.823	54.899
3	4.578	15.260	70.160	4.578	15.26	70.160
4	2.873	9.577	79.737	2.873	9.577	79.737
5	2.305	7.682	87.419	2.305	7.682	87.419
6	1.273	4.244	91.663	1.273	4.244	91.663
7	0.900	2.999	94.662			
8	0.744	2.479	97.140			
9	0.368	1.226	98.366			
10	0.226	0.753	99.119			
11	0.095	0.317	99.436			
12	0.087	0.290	99.726			
13	0.033	0.109	99.835			
14	0.029	0.098	99.933			
15	0.020	0.067	100.000			

将 16 个批次脉络舒通丸样品各共有峰峰面积数据导入 SIMCA 14.1 软件,分析生成得分图(图 4)。16 批样品质量均一性较好,分类结果与 HCA 结果一致,不同批次样品之间存在差异,可能由于原料药材批次不同引起,如金银花、白芍等原料药材可能存在基源、产地采收季节以及批

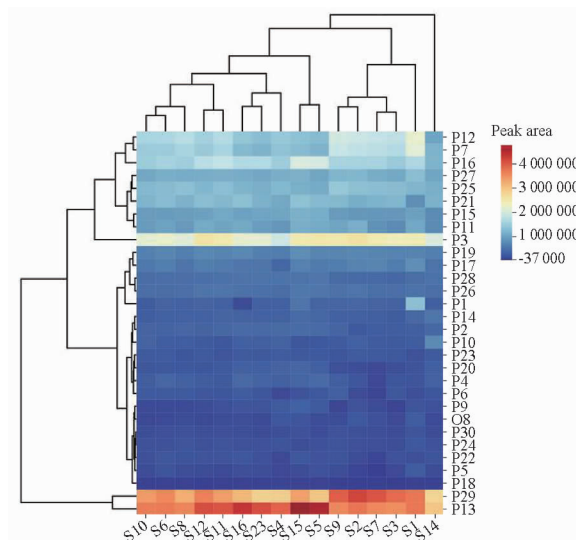


图 3 16 批 MLSTP 聚类热图

Fig.3 Clustering heat map of MLSTP

### 2.2.2 主成分分析

16 个批次脉络舒通丸样品中的 30 个共有峰的峰面积为变量进行主成分分析(PCA),以主成分特征值 >1 为提取标准,得到 6 个主成分,其累积方差贡献率为 91.63%,表明这 6 个主成分能充分代表脉络舒通丸样品的基本特征和主要信息。其特征值及累计方法贡献率等信息见表 1。

次间质量等多方面差异,导致样品一致性产生偏离。

### 2.2.3 偏最小二乘判别分析

本研究基于 HCA 和 PCA 结果,建立偏最小二乘判别分析(PLS-DA)模型进行不同批次间的差异分析。将 16 批次脉络舒通丸样品中 30 个共有峰的峰面积数据导入

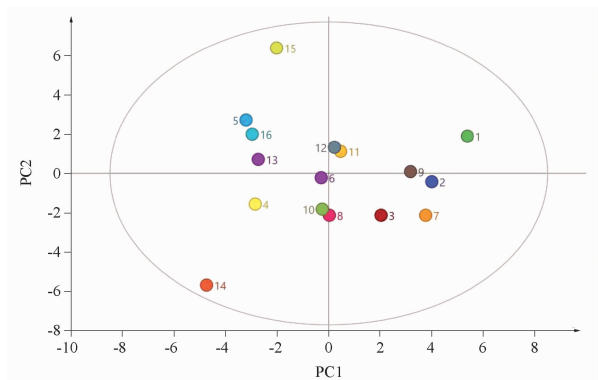


图4 16批脉络舒通丸主成分得分图

Fig. 4 PCA score plot of 16 batches of MLSTP

SIMCA 14.1 软件, 自动拟合建立 PLS-DA 模型,  $RX^2$ 、 $RY^2$  分别为 0.821 和 0.903,  $Q^2$  为 0.556, 均大于 0.5, 表明模型稳定、对不同批次脉络舒通丸样品的鉴别有较好的预测能力。置换检验(200 次)结果见图 5, 表明结果具有较好的预测能力且未出现过拟合现象, 可用于进一步的数据分析。

变量重要性投影(variable importance in projection, VIP) 值能够反映出差异性成分对各组样品的影响能力, VIP 值越大则表明该化合物对组间差异的影响越大。以 VIP 值 > 1 为阈值, 筛选出 10 个差异峰, 见图 6, 按 VIP 值的大小依次

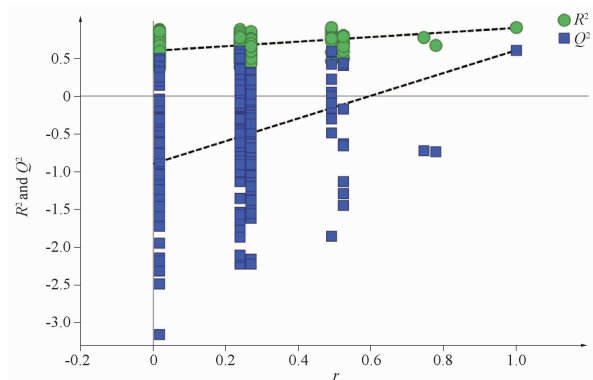
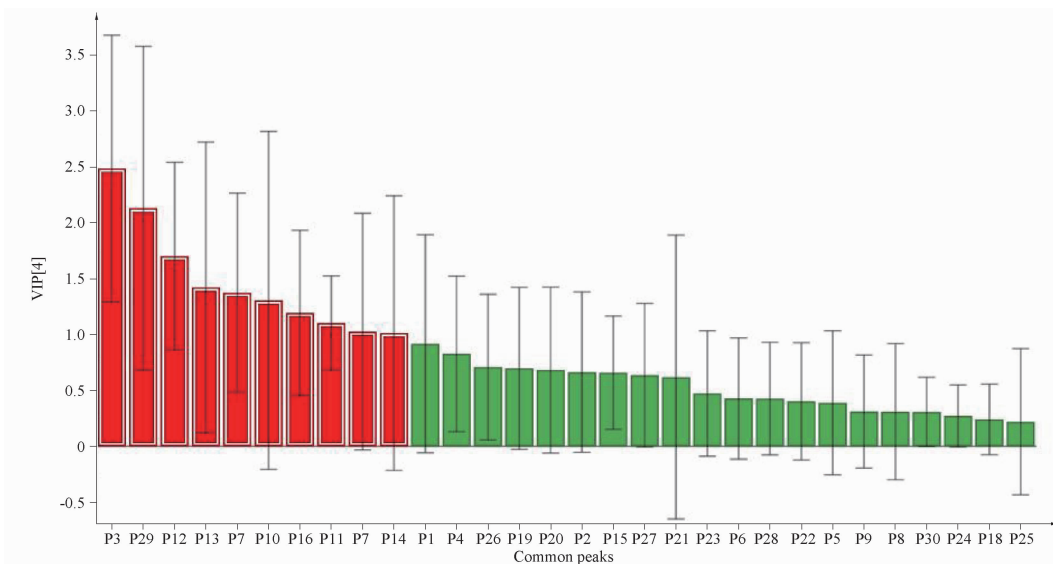


图5 PLS-DA 模型 200 次置换检测图

Fig. 5 Detection plot of PLS-DA model with 200 permutation

排序为: 峰 3(没食子酸) > 峰 29(盐酸小檗碱) > 峰 12(隐绿原酸) > 峰 13(绿原酸) > 峰 7(新绿原酸) > 峰 10 > 峰 16(芍药苷) > 峰 11 > 峰 17(盐酸黄柏碱) > 峰 14, 是引起样品差异的主要标峰, 表明白芍、黄柏、金银花等药材投料情况更能引起指纹图谱的变化。

综合对照品比对和 HCA、PLS-DA 等化学计量学的结果, 没食子酸、新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸、芍药苷、盐酸黄柏碱、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C、哈巴俄苷、盐酸小檗碱是影响脉络舒通丸质量的主要成分。



红色 - VIP 值 > 1; 绿色 - VIP 值 < 1。

Red - VIP > 1; Green - VIP < 1.

图6 脉络舒通丸中 30 个共有峰的变量重要性投影(VIP)得分图。  $n = 16, \bar{x} \pm s$

Fig. 6 VIP score plot of 30 peaks in MLSTP.  $n = 16, \bar{x} \pm s$

### 2.3 多组分质量控制

**2.3.1 专属性实验** 精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液、“2.1.3”项下供试品溶液及“2.1.5”项下阴

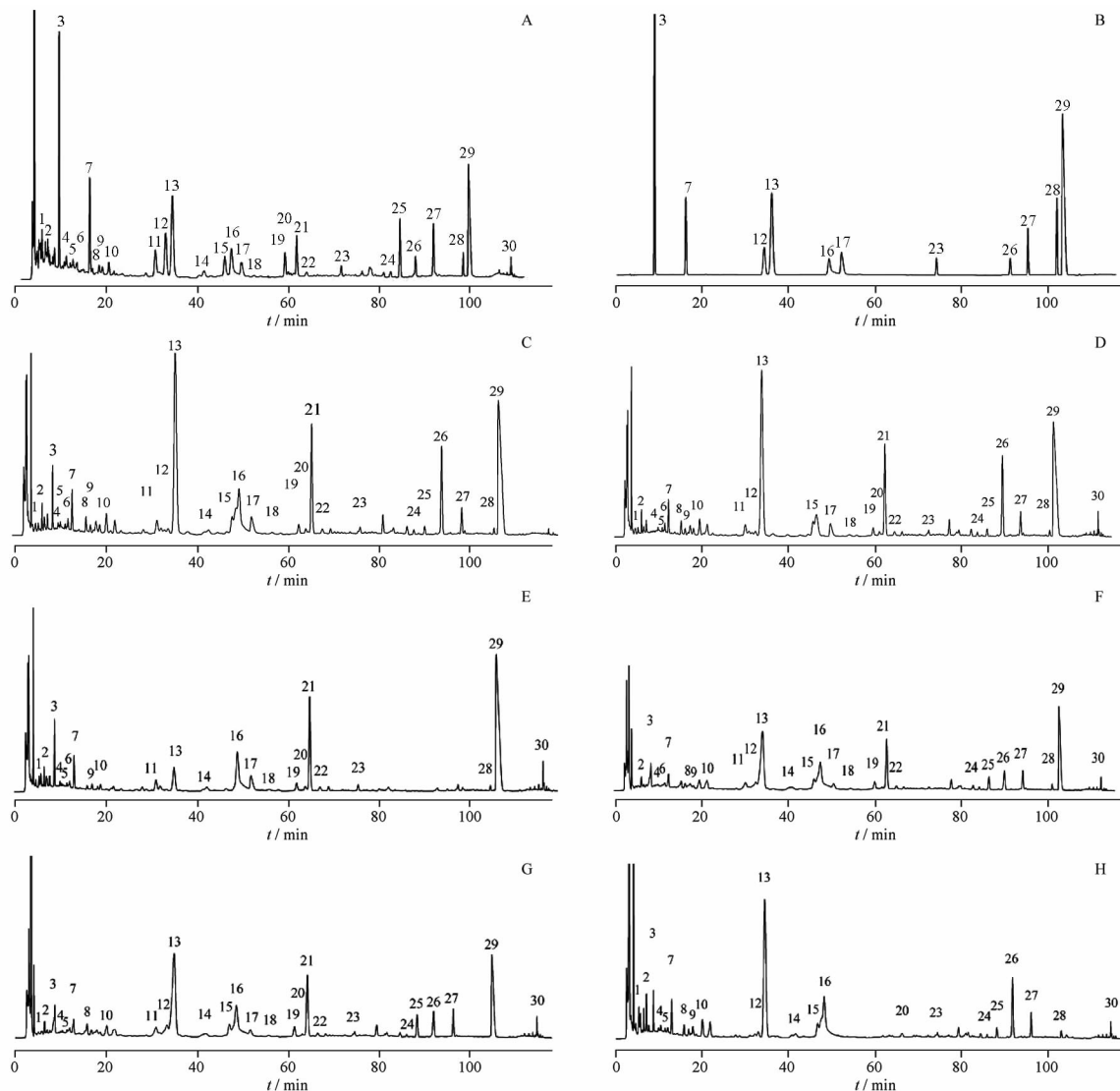
性样品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图。结果脉络舒通丸样品色谱图中 11 个指标成分与各自相邻峰均能达到有效分离, 阴性样品对脉络舒通

丸中 11 个成分的定量测定无干扰, 色谱图见图 7。

**2.3.2 对照品、供试品溶液的制备和色谱条件**  
对照品溶液的制备同“2.1.2”项, 供试品溶液的制备同“2.1.3”项, 色谱条件同“2.1.1”项。

**2.3.3 线性、检测限与定量限** 精密吸取“2.1.2”项下混合对照品母液 15、10、5、2、1、0.5 mL, 分别置于 20 mL 量瓶中, 加入体积分数 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 进样测定, 记录 11 种成分的色谱峰面积, 以 11 个成分的峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横

坐标 (X), 绘制标准曲线, 分别建立绿原酸、没食子酸、盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、芍药苷、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、哈巴俄苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷的线性方程, 计算相关系数 ( $r$ ), 各相关系数均大于 0.999 5, 表明各成分线性关系良好。精密吸取混合对照品溶液适量, 加入体积分数 50% 甲醇逐级稀释至适量, 以信噪比为 3:1 时记录检测限, 以信噪比为 10:1 时记录定量限。脉络舒通中 11 种成分的线性、检测限与定量限结果见表 2。



A - 样品; B - 混合对照; C - 缺甘草阴性; D - 缺白芍阴性; E - 缺金银花阴性; F - 缺黄芪阴性; G - 缺玄参阴性; H - 缺黄柏阴性; 3 - 没食子酸; 7 - 新绿原酸; 12 - 隐绿原酸; 13 - 绿原酸; 16 - 芍药苷; 17 - 盐酸黄柏碱; 23 - 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 26 - 异绿原酸 A; 27 - 异绿原酸 C; 28 - 哈巴俄苷; 29 - 盐酸小檗碱; 30 - 甘草酸铵。

A - sample; B - mixed control; C - negative sample without *Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma*; D - negative sample without *Paeoniae Radix Alba*; E - negative sample without *Lonicerae Japonicae Flos*; F - negative sample without *Astragali Radix*; G - negative sample without *Scrophulariae Radix*; H - deficiency of *Phellodendri Chinensis Cortex*; 3 - Gallic acid; 7 - Neochlorogenic acid; 12 - Cryptochlorogenic acid; 13 - Chlorogenic acid; 16 - Paeoniflorin; 17 - Berberine hydrochloride; 23 - Calycosin-7-glucoside; 26 - Isochlorogenic acid A; 27 - Isochlorogenic acid C; 28 - Harpagoside; 29 - Berberine hydrochloride; 30 - Ammonium glycyrrhetic acid.

图 7 脉络舒通丸阴性样品的 HPLC 图

Fig. 7 HPLC chromatograms of the negative sample of MLSTP

表2 脉络舒通丸中11种成分线性关系考察结果

Tab. 2 Results of linear relationship between 11 components of MLSTP

Component	Linear equation	<i>r</i>	Linear range/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	LOD/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	LOQ/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
Gallic acid	$Y = 89\ 871\ 127.31X - 362\ 873.12$	0.999 9	19.51 – 195.13	0.002 9	0.009 8
Cryptochlorogenic acid	$Y = 20\ 331\ 883.55X - 40\ 056.30$	1.000 0	6.20 – 186.09	0.37	1.24
Chlorogenic acid	$Y = 23\ 171\ 469.47X - 120\ 000.54$	1.000 0	17.76 – 532.80	0.39	1.18
Neochlorogenic acid	$Y = 22\ 703\ 250.59X - 44\ 482.61$	1.000 0	6.83 – 204.99	0.41	1.37
Paeoniflorin	$Y = 13\ 104\ 786.85X - 87\ 570.84$	0.999 6	8.28 – 248.37	1.00	3.33
Phellodendrine hydrochloride	$Y = 21\ 554\ 335.45X - 65\ 637.67$	0.999 9	5.79 – 173.67	0.58	1.73
Isochlorogenic acid A	$Y = 19\ 261\ 047.99X - 16\ 605.90$	1.000 0	2.30 – 68.94	0.28	0.92
Calycosin-7-glucoside	$Y = 32\ 687\ 170.50X - 150\ 081.28$	1.000 0	1.31 – 39.24	0.16	0.52
Harpagoside	$Y = 27\ 309\ 775.03X - 39\ 356.58$	1.000 0	5.17 – 155.10	0.12	0.41
Berberine hydrochloride	$Y = 32\ 958\ 543.74X - 205\ 829.27$	1.000 0	23.33 – 699.99	0.01	0.035
Isochlorogenic acid C	$Y = 19\ 018\ 375.04X - 27\ 110.92$	1.000 0	4.94 – 148.08	0.22	0.74

**2.3.4 精密度实验** 精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液,按“2.1.1”项条件下连续进样6次,记录没食子酸、新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸、芍药苷、盐酸黄柏碱、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、异绿原酸A、异绿原酸C、哈巴俄苷、盐酸小檗碱的峰面积积分值,计算RSD分别为1.71%、1.40%、1.39%、1.38%、2.47%、2.67%、1.54%、1.54%、1.38%、1.32%、1.50%,表明仪器精密度良好。

**2.3.5 重复性实验** 精密称取脉络舒通丸样品粉末(S4)6份,按“2.1.3”制备供试品,按“2.1.1”项条件下进样测定,计算没食子酸、新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸、芍药苷、盐酸黄柏碱、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、异绿原酸A、异绿原酸C、哈巴俄苷、盐酸小檗碱平均质量分数分别为0.631 9、1.655 9、1.799 9、4.356 5、3.015 9、0.538 2、0.228 5、0.612 4、1.502 3、0.512 8、2.336 4  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,RSD分别为0.19%、0.32%、1.52%、0.88%、1.61%、0.75%、1.88%、1.07%、2.77%、0.37%、0.68%,表明该方法重复性良好。

**2.3.6 加样回收率实验** 精密称取已知成分含量的脉络舒通丸粉末6份(S4),每份0.5 g,置具塞锥形瓶中,精密加入根据样品含有量另行配制的混合对照品溶液(没食子酸0.033  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、新绿原酸0.079  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、隐绿原酸0.093  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、绿原酸0.219  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、芍药苷0.148  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、盐酸黄柏碱0.036  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、异绿原酸C 0.075  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、异绿原酸A 0.030  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、哈巴俄苷0.028  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、盐酸小檗碱0.120  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )10 mL,再精密加入体积分数50%甲醇15 mL,按“2.1.3”制备供试品,进样测定,计算加样回收率。结果显示,11个指标的平均加样回收率分别为104.81%、104.89%、

102.72%、104.84%、102.80%、96.49%、97.18%、102.59%、95.70%、103.54%、103.86%,RSD分别为0.75%、1.70%、1.25%、0.62%、1.57%、1.51%、1.47%、1.93%、1.36%、1.74%、0.77%,表明该方法准确度良好。

**2.3.7 样品含量测定** 取16批次脉络舒通丸样品(S1~S16),按“2.1.3”项下方法每批次平行制备两份,按“2.1.1”项条件下进样分析,测定11个成分峰面积,代入“2.3.5”项下线性回归方程,计算各成分的含量(表3)。11个定量成分在脉络舒通丸指纹图谱中峰面积较大、对照品易得,与化学计量学推测引起不同批次样品间差异的主要色谱峰结果一致。没食子酸、新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸、芍药苷、盐酸黄柏碱、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、异绿原酸A、异绿原酸C、哈巴俄苷、盐酸小檗碱在16个批次脉络舒通丸中含量测定变化范围分别为0.62~0.84、1.45~2.50、1.30~2.78、3.35~5.28、2.44~4.02、0.54~0.88、0.16~0.23、0.61~0.76、1.39~1.76、0.41~0.54、2.28~3.34  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,含量差异为1.2~1.7倍,表明11个定量指标的选取能较好地反映不同批次脉络舒通丸的质量差异。

**2.3.8 稳定性实验** 取脉络舒通丸样品(S4),按“2.1.3”制备供试品,按“2.1.1”项下色谱条件,分别于制备后的0、2、4、8、12、16、24 h进样分析,记录没食子酸、新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸、芍药苷、盐酸黄柏碱、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、异绿原酸A、异绿原酸C、哈巴俄苷、盐酸小檗碱的峰面积积分值,计算RSD分别为0.49%、0.45%、0.68%、0.57%、2.49%、1.59%、0.86%、0.33%、1.24%、0.62%、0.53%,表明样品溶液在24 h内稳定性良好。

表3 MLSTP 中 11 种成分含量测定结果。mg · g<sup>-1</sup>

Tab. 3 Results of determination of 11 components in MLSTP. mg · g<sup>-1</sup>

No.	Gallic acid	Neochlorogenic acid	Cryptochlorogenic acid	Chlorogenic acid	Paeoniflorin	Phellodendrine hydrochloride	Calycosin-7-glucoside	Isochlorogenic acid A	Isochlorogenic acid C	Harpagoside	Berberine hydrochloride
S1	0.79	2.50	2.78	4.15	3.31	0.72	0.16	0.70	1.76	0.45	2.99
S2	0.84	2.12	2.38	4.17	3.18	0.87	0.22	0.72	1.64	0.42	3.34
S3	0.82	2.13	2.37	4.15	3.12	0.85	0.21	0.67	1.51	0.42	3.26
S4	0.63	1.56	1.77	4.31	3.04	0.72	0.23	0.61	1.50	0.51	2.34
S5	0.81	1.45	1.62	5.06	3.93	0.76	0.21	0.73	1.39	0.54	2.42
S6	0.72	1.78	2.04	4.11	3.18	0.82	0.22	0.61	1.52	0.46	2.86
S7	0.80	2.09	2.28	3.97	3.19	0.88	0.21	0.64	1.49	0.41	3.22
S8	0.68	1.92	2.18	4.00	3.04	0.69	0.18	0.64	1.49	0.46	2.59
S9	0.81	2.21	2.46	3.97	3.19	0.80	0.19	0.68	1.64	0.43	3.16
S10	0.70	1.78	2.01	4.09	2.99	0.74	0.21	0.63	1.42	0.45	2.72
S11	0.80	1.92	2.13	4.49	3.63	0.76	0.18	0.71	1.52	0.49	2.70
S12	0.82	1.74	1.94	4.54	3.48	0.81	0.21	0.72	1.49	0.48	2.91
S13	0.70	1.46	1.64	4.55	3.37	0.70	0.21	0.66	1.41	0.51	2.33
S14	0.66	1.46	1.30	3.35	2.44	0.68	0.21	0.63	1.39	0.50	2.28
S15	0.80	1.57	1.71	5.28	4.02	0.85	0.21	0.76	1.56	0.51	2.70
S16	0.71	1.55	1.78	4.81	3.33	0.70	0.21	0.67	1.48	0.51	2.52

### 3 讨论

本实验对供试品溶液制备考察,以脉络舒通丸供试品色谱图中色谱峰数量、分离效果以及提取效率为指标,依次对提取溶剂(体积分数 50% 甲醇、50% 乙醇、10% 甲醇、20% 甲醇、70% 甲醇)和提取时间(超声 50、30、40 min)进行了比较,结果显示,体积分数 50% 甲醇超声 40 min 提取特征峰较多,色谱峰分离效果较佳,定量测定的 11 个目标成分提取效率最佳。

近年来,指纹图谱已成为控制中药质量最常用的手段,是评价中药质量优劣和确保其质量一致性的有效方法<sup>[18]</sup>,多波长切换技术的应用能够有效增强指纹图谱色谱峰的信号强度,减少背景干扰,提高分析的灵敏度<sup>[19]</sup>。脉络舒通丸成分繁多,单一波长指纹图谱无法全面反映脉络舒通丸质量,故本实验采用二极管阵列检测器(DAD)在波长 190~400 nm 进行全扫描,主要成分最大吸收波长分别为:没食子酸 215.4 nm,新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸 216.6 nm,芍药苷 230.8 nm,盐酸黄柏碱 228.4 nm,毛蕊异黄酮葡萄糖苷 248.5 nm,盐酸小檗碱 263.9 nm,哈巴俄苷 280.5 nm,异绿原酸 A、异绿原酸 C 327.3 nm,甘草酸铵 250.8 nm。为提高待测峰检出的灵敏度以及保证指标成分含量测定的准确性,本实验共进行了 6 次波长的切换(216、230、280、248、327、280、254 nm),结果显示,通过多波长切换各指标成分

分离度、拖尾因子符合方法学验证要求,阴性无干扰,效果优于《中国药典》2020 年版方法和已有文献方法。

化学计量学分析通过处理和解析化学测量数据,旨在从复杂数据中提取更多信息,与中药指纹图谱的结合,为中药的质量评价提供了更为科学的依据<sup>[20]</sup>。本实验采用 PCA、HCA 和 PLS-DA 综合分析,结果发现,不同批次脉络舒通丸存在成分差异,差异的原因可能与原料药材的产地、采收年限等因素有关,应进一步建立规范化的原料种植、采收、加工规范,从源头上保证脉络舒通丸质量的可控性和一致性。

综上所述,本实验采用多波长切换 HPLC 指纹图谱结合化学计量学和多指标含量测定技术,建立了脉络舒通丸质量评价方法,经精密度、重复性、稳定性等方法学验证,该方法准确、灵敏,可以实现脉络舒通丸的质量控制和定量分析。

### REFERENCES

- [1] *Ch. P*(2020) Vol I (中国药典 2020 年版.一部) [S]. 2020: 1364.
- [2] LI Y N, LIU X Y, SONG Z H, *et al.* The combinative therapeutic effects of Mailuo Shutong Granules and synthetic medications on patients with superficial thrombophlebitis [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2018, 40(6): 1266-1270.
- [3] XU B H, TANG Z X. [J]. *J Sichuan Tradit Chin Med*(四川中医), 2009, 27(9): 9-11.
- [4] CAO N N, LI S R, WANG Q G, *et al.* Mechanism of Mailuo Shutong Pills in treatment of superficial thrombophlebitis based on network pharmacology and experimental verification *in vivo* [J].

- Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2023, 54(6): 1860-1869.
- [ 5 ] WU Y Y. Study on Antithrombotic Effect and Mechanism of Mailuo Shutong Pill based on NF- $\kappa$ B [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2020.
- [ 6 ] ZHANG X Y, CHU Y J, WANG M L, *et al.* Rapid and comprehensive identification of chemical constituents in Mai-Luo-Shu-Tong pill by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS combined with a data mining strategy [J]. *Anal Methods*, 2022, 14 (47): 4990-5000.
- [ 7 ] CHU Y J, WANG M L, WANG X B, *et al.* Identifying quality markers of Mailuoshutong pill against thromboangiitis obliterans based on chinmedomics strategy [J]. *Phytomedicine*. 2022, 104 (2022): 154313.
- [ 8 ] WANG M L, ZHANG X Y, CHU Y J, *et al.* Discovery of quality markers for Mailuoshutong Pill based on “spider web” mode of “Content-Pharmacokinetics-Pharmacology” network [J]. *Arab J Chem*, 2022, 15(12): 114277.
- [ 9 ] SONG Y L, WANG H M, NI F Y, *et al.* Study on anti-inflammatory activities of phenolic acids from Lonicerae Japonicae Flos [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2015, 46(4): 490-495.
- [ 10 ] BAO S J, ZHANG D, ZHANG H, *et al.* Apoptosis of human gastric cancer cell line BGC-823 induced by liposome of total glucosides from paeonia [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2016, 51(24): 2109-2113.
- [ 11 ] BAI L, LI H, QIN Q, *et al.* Research progress of regulatory effect and mechanism of flavonoids on vascular endothelial cell injury [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2020, 26(12): 203-211.
- [ 12 ] ZHANG X H, XU X X, WANG N Q. Progress of Studies on Protective Mechanism of Radix Astragali in Vascular Endothelial Cells [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2013, 48(18): 1526-1530.
- [ 13 ] QUE H Y, LUO Q L, WANG N Q, *et al.* Research progress on processing historical evolution and mechanism of salt-processed Phellodendri Chinensis Cortex and predictive analysis on its quality marker (Q-Marker) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2022, 53(22): 7242-7253.
- [ 14 ] LI L X, CHEN D L, ZHOU X J. Research progress on the analgesic effects and mechanisms of white peony formula and total glycosides of white peony [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2020, 42(9): 2417-2426.
- [ 15 ] CAO G Y, NING B, YU C J, *et al.* Quality evaluation of Lonicerae Japonicae Caulis dispensing granules by combination of fingerprint, quantitative analysis of multi-components by single marker and chemical pattern recognition analysis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2024, 55(4): 1202-1214.
- [ 16 ] XU L L, WANG B, REN R X, *et al.* Quality evaluation of honey-stir-baked Polygalae Radix based on combinative methods of fingerprint and quantitative analysis of multi-components [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2023, 54(19): 6461-6468.
- [ 17 ] LUAN Y F, XIE Y Y, ZHOU G T, *et al.* Multi-component content determination and chemometrics analysis of Renshen Jianpi Pills [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2023, 54(21): 7044-7054.
- [ 18 ] YU X L, WANG X, YAN L, *et al.* Chemometric analysis of HPLC fingerprint of triterpenoids in different ganoderma preparations based on reference drug [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2020, 55(4): 298-304.
- [ 19 ] YOU C X, ZHANG Z Q, LI F, *et al.* Determination and fingerprint analysis of eight constituents in Puerariae Radix by HPLC wavelength switching [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2013, 44(5): 616-621.
- [ 20 ] LIU J, CHEN X F, ZOU Y F. Research progress on chemical pattern recognition based on multidimensional information of traditional Chinese medicine fingerprint [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2012, 37(8): 1081-1088.

(收稿日期:2024-05-24)