·中药工业·

基于HPLC-QAMS多指标成分含量测定联合化学计量学的恒古骨伤愈合剂质量控制△

冯晓川[1]，徐延昭[2]，张静[1]，张蕊[1*]

1. 北京积水潭医院 中药房，北京　100035；

2. 中国食品药品检定研究院，北京　100050

［摘要］　**目的：**建立高效液相色谱-一测多评法（HPLC-QAMS）多指标成分含量测定联合化学计量学的恒古骨伤愈合剂质量控制研究的方法。**方法：**采用 HPLC-QAMS 检测 15 批恒古骨伤愈合剂中 11 个成分的含量，并与外标法结果进行对比，采用聚类分析、主成分分析与偏最小二乘法-判别分析对 HPLC-QAMS 结果进行分析评价。**结果：**11 个成分分别在各自质量浓度范围内线性关系良好（r>0. 999 3）；平均加样回收率为 96. 81%~100. 21%（RSD<2. 0%）；HPLC-QAMS 所测结果与 ESM 差异无统计学意义；通过化学计量学分析，羟基红花黄色素 A［变量重要性投影（VIP）值=1. 446］、三七皂苷 R_1（VIP 值=1. 351）、橙皮苷（VIP 值=1. 258）、京尼平苷（VIP 值=1. 138）、人参皂苷 Rg_1（VIP 值=1. 067）可能是影响恒古骨伤愈合剂产品质量的差异性标志物。**结论：**建立的方法操作便捷、可靠稳定，可为深入研究恒古骨伤愈合剂质量控制提供参考。

［关键词］　恒古骨伤愈合剂；多指标成分；高效液相色谱-一测多评法；相对校正因子；化学计量学；综合质量评价

［中图分类号］　R286　　［文献标识码］　A　　［文章编号］　1673-4890(2022)10-1995-09

doi：10. 13313/j. issn. 1673-4890. 20220324006

Comprehensive Quality Evaluation of Henggu Gushangyu Mixture Based on HPLC-QAMS and Chemometrics

FENG Xiao-chuan[1], XU Yan-zhao[2], ZHANG Jing[1], ZHANG Rui[1*]

1. *Traditional Chinese Medicine Pharmacy*, *Beijing Jishuitan Hospital*, *Beijing* 100035, *China*;

2. *National Institutes for Food and Drug Control*, *Beijing* 100050, *China*

[**Abstract**]　**Objective**: To establish a high-performance liquid chromatography-quantitative analysis of multi-components by single marker (HPLC-QAMS) method, combined with chemometrics, and study the quality control of Henggu Gushangyu Mixture. **Methods**: Eleven components in 15 batches of Henggu Gushangyu Mixture were determined by HPLC-QAMS. The results were compared with those of external standard method (ESM), and were analyzed and evaluated by cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). **Results**: The 11 components had good linear relationship within their respective ranges (r>0.999 3). The average recoveries were 96.81%-100.21% (RSD<2.0%). There was no significant difference between HPLC-QAMS and ESM. Chemometrics revealed hydroxysafflor yellow A [variable importance in projection (VIP)=1.446], notoginsenoside R_1 (VIP=1.351), hesperidin (VIP=1.258), geniposide (VIP=1.138) and ginsenoside Rg_1 (VIP=1.067) might be the differential markers affecting the quality of Henggu Gushangyu Mixture. **Conclusion**: The established method was convenient, reliable and stable, and provided reference for further study on the quality of Henggu Gushangyu Mixture.

[**Keywords**]　Henggu Gushangyu Mixture; multi-index component; HPLC-QAMS; RCF; chemometrics; comprehensive quality evaluation

△［基金项目］　北京市中医管理局第二批中药骨干人才培养项目（京中医科字〔2018〕213号）

*［通信作者］　张蕊，副主任药师，研究方向：药物质量控制、中药临床药学、医院制剂及协定处方；Tel：010-50963553，E-mail：ceix45@163.com

恒古骨伤愈合剂由杜仲、三七、人参、红花、陈皮、黄芪、洋金花、钻地风和鳖甲加工而成，具有活血益气、补肝肾、接骨续筋、消肿止痛、促进骨折愈合的临床功效，主要用于新鲜骨折及陈旧骨折、股骨头坏死、骨关节病、腰椎间盘突出症，现收载于《中华人民共和国药典》2020 年版（一部）[1]。其中仅对陈皮所含成分橙皮苷进行了定量控制，也仅检索到对该制剂所含药味进行薄层鉴别或 1~2 个成分进行含量测定的相关报道[2-3]。中药及其复方制剂是多组分协同发挥疗效的，但现有质量控制手段不能涵盖多组分检测，更不能有效保证其疗效。近年来，高效液相色谱-一测多评法（HPLC-QAMS）越来越多地运用到中药及其复方制剂质量控制研究中，该方法通过选取质稳价廉的 1 个成分作为内参物，建立其与其他成分的相对校正因子（RCF），在一定程度上降低了检验成本，为多成分质量控制方法的应用与普及提供了便利条件[4-5]。同时，化学计量学方法通过对多批样品中多个成分含量数据进行提取和降维分析，挖掘繁杂数据间的内在关系，找出可能对质量控制有显著贡献的主要成分[6-7]。本研究选取恒古骨伤愈合剂中君药红花和三七、臣药人参和杜仲、佐药陈皮为研究对象，分析研究其所含成分，最终以红花的主要成分羟基红花黄色素 A 和红花黄色素 A，三七和人参所含主要共有成分三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1，杜仲所含主要有效成分京尼平苷酸、京尼平苷和松脂醇二葡萄糖苷，陈皮所含主要药效成分芸香柚皮苷、橙皮苷和川陈皮素为指标，同时以出峰时间居中、质量稳定的羟基红花黄色素 A 作为内参物，采用 HPLC-QAMS 对上述 11 个成分含量进行同步测定，同时通过化学计量学方法挖掘多指标成分含量数据间潜在关系，为提升恒古骨伤愈合剂的质量控制水平提供参考。

1　材料

1.1　仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪［岛津仪器（中国）有限公司］；e2695 型高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；XS205 型电子分析天平（Mettler-Toledo 公司）。

1.2　试药

对照品京尼平苷酸（批号：111828-201805，纯度：98.1%）、京尼平苷（批号：110749-201919，纯度：97.1%）、松脂醇二葡萄糖苷（批号：111537-202107，纯度：93.4%）、三七皂苷 R_1（批号：110745-201921，纯度：90.4%）、人参皂苷 Rg_1（批号：110703-202034，纯度：94.0%）、人参皂苷 Rb_1（批号：110704-202129，纯度：94.3%）、羟基红花黄色素 A（批号：111637-202111，纯度：96.8%）、橙皮苷（批号：110721-202019，纯度：95.3%）、川陈皮素（批号：112055-202102，纯度：99.7%）均购于中国食品药品检定研究院；红花黄色素 A（批号：PRF8101143，纯度：98.5%）、芸香柚皮苷（批号：PRF9062802，纯度：99.8%）均购于成都普瑞法科技开发有限公司；乙腈和磷酸为色谱纯；水为纯净水；其余试剂均为分析纯。

恒古骨伤愈合剂（规格：每瓶 25 mL）来源于赛灵药业科技集团股份有限公司，批号分别为 20210519、20210521、20210522、20210621、20210622、20210707、20210714、20210909、20210911、20210926、20211119、20211124、20211126、20211127、20211219，编号分别为 S1~S15。

2　方法与结果

2.1　混合对照品溶液的制备

精密称取对照品京尼平苷酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷、三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1、羟基红花黄色素 A、红花黄色素 A、芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素并用 50% 甲醇制成质量浓度分别为 0.178、0.192、0.234、0.950、0.378、0.336、0.442、0.270、0.418、1.310、0.116 $mg \cdot mL^{-1}$ 的混合对照品储备液，再进一步用 50% 甲醇稀释 20 倍得质量浓度分别为 8.90、9.60、11.70、47.50、18.90、16.80、22.10、13.50、20.90、65.50、5.80 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2　供试品溶液的制备

精密量取恒古骨伤愈合剂 5 mL，用 50% 甲醇定容至 25 mL，摇匀，即得恒古骨伤愈合剂供试品溶液。取按处方比例及工艺制备的缺杜仲、缺三七和人参、缺红花、缺陈皮的阴性样品，按前述方法制得阴性样品溶液。

2.3　色谱条件及专属性试验

色谱柱：Alltima C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）；

柱温为 30 ℃；以 0.1% 磷酸-乙腈（B）为流动相，梯度洗脱（0~11 min，10%B；11~21 min，10%~24%B；21~36 min，24%~30%B；36~47 min，30%~50%B；47~62 min，50%~64%B；62~70 min，64%~10%B）；流速为 1.0 mL·min^{-1}；检测波长分别为 235 nm[8-10]（0~21 min 检测京尼平苷酸、京尼平苷和松脂醇二葡萄糖苷）、203 nm[11-15]（21~36 min 检测三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1）、403 nm[16-18]（36~47 min 检测羟基红花黄色素 A 和红花黄色素 A）和 283 nm[19-22]（47~70 min 检测芸香柚皮苷、橙皮苷和川陈皮素）；进样量体积为 10 μL。在上述色谱条件下进样混合对照品溶液及供试品溶液，记录色谱图（图 1）。结果显示，恒古骨伤愈合剂供试品溶液中 11 个成分与相邻色谱峰分离良好，阴性供试品无干扰。

2.4　方法学考察

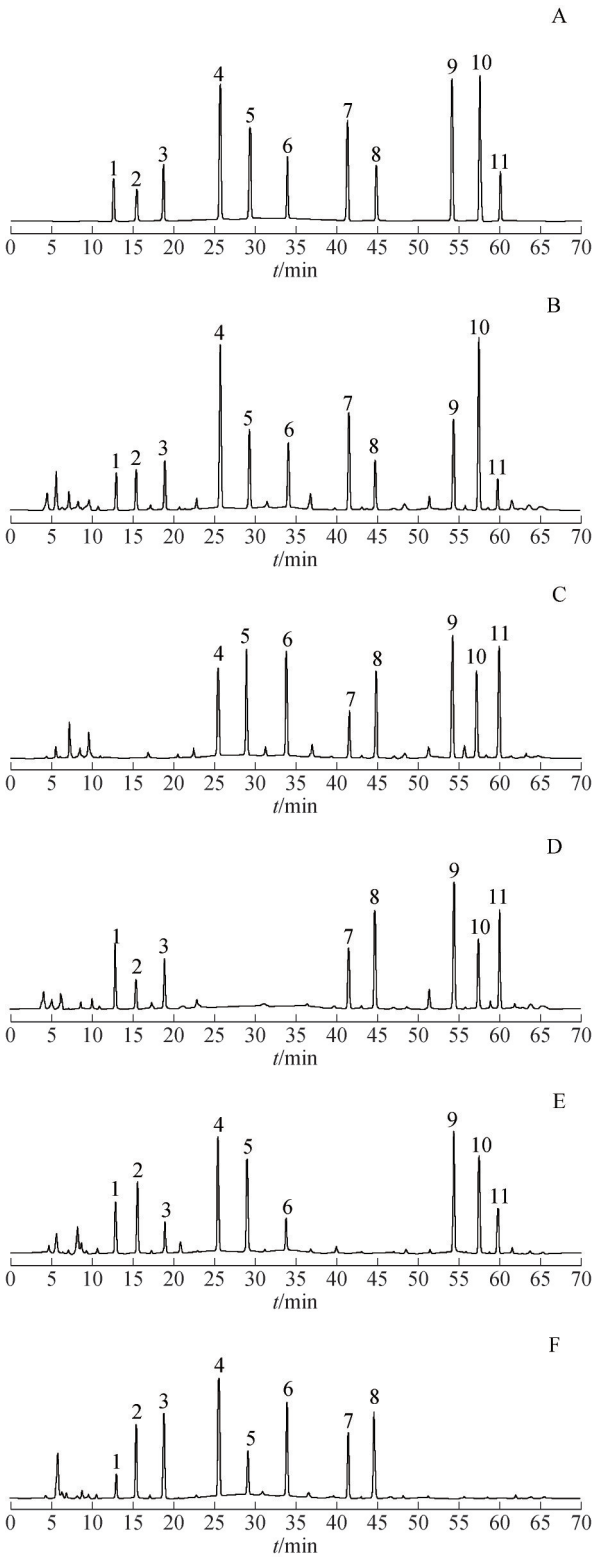
2.4.1　线性关系考察　精密吸取混合对照品储备液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mL，分别用 50% 甲醇稀释 200、100、40、20、10、4 倍，得 6 个系列质量浓度的混合对照品溶液 1~6，依次按 **2.3** 项下色谱条件进样，以峰面积为纵坐标（*Y*）、质量浓度为横坐标（*X*）进行线性回归（表 1）。结果表明，对照品在各自质量浓度范围内线性关系具有良好线性关系。

2.4.2　精密度试验　按 **2.3** 项下色谱条件重复进样恒古骨伤愈合剂（S1）同一份供试品溶液 6 次，11 个成分峰面积的 RSD 为 0.76%~1.41%，表明仪器精密度良好。

2.4.3　稳定性试验　取一份恒古骨伤愈合剂（S1）供试品溶液，于 0、2、4、7、12、24、36 h 按 **2.3** 项下色谱条件进样检测，得 11 个成分峰面积的 RSD 为 0.74%~1.39%，表明恒古骨伤愈合剂供试品溶液在 36 h 内稳定。

2.4.4　重复性试验　按 **2.2** 项下方法制备 6 份恒古骨伤愈合剂（S1）供试品溶液，按 **2.3** 项下色谱条件检测分析，用外标法计算含量，得 11 个成分含量的 RSD 为 1.01%~1.89%，表明方法重复性良好。

2.4.5　加样回收率试验　精密吸取恒古骨伤愈合剂（S1）9 份，每份 2.5 mL，均分成 3 组，精密加混合对照品溶液（京尼平苷酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷、三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1、羟基红花黄色素 A、红花黄色素 A、芸香柚皮苷、橙皮



注：A. 混合对照品；B. 恒古骨伤愈合剂；C. 缺杜仲阴性样品；D. 缺三七和人参阴性样品；E. 缺红花阴性样品；F. 缺陈皮阴性样品；1. 京尼平苷酸；2. 京尼平苷；3. 松脂醇二葡萄糖苷；4. 三七皂苷 R_1；5. 人参皂苷 Rg_1；6. 人参皂苷 Rb_1；7. 羟基红花黄色素 A；8. 红花黄色素 A；9. 芸香柚皮苷；10. 橙皮苷；11. 川陈皮素。

图 1　混合对照品和恒古骨伤愈合剂供试品 HPLC 图

苷、川陈皮素质量浓度分别为0. 147、0. 178、0. 209、0. 704、 0. 326、 0. 283、 0. 395、 0. 232、 0. 351、0. 896、0. 104 mg·mL^{-1}）0. 8、1. 0、1. 2 mL，每个质量浓度3份，再按**2. 2**项下方法制备供试品溶液，依法检测，得回收率及RSD分别为96. 81%（0. 60%）、98. 33%（1. 43%）、98. 72%（1. 17%）、100. 12%（0. 77%）、98. 69%（1. 25%）、98. 47%（1. 25%）、99. 13%（0. 92%）、96. 83%（0. 78%）、97. 87%（1. 63%）、100. 21%（0. 71%）、98. 35%（1. 18%）。

2. 5　HPLC-QAMS

2. 5. 1　RCF计算　本研究以羟基红花黄色素A为内参物计算京尼平苷酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷、三七皂苷R_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rb_1、红花黄色素A、芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素的RCF。取线性关系考察中的6个对照品溶液进样，按公式（1）计算各成分RCF（表2）。

$$\mathrm{RCF} = \frac{f_k}{f_s} = \frac{W_k/A_k}{W_s/A_s} = \frac{W_k \times A_s}{W_s \times A_k} \quad (1)$$

式中f为RCF、W为质量浓度、A为峰面积、k为内参物、s为其他待测成分。

2. 5. 2　仪器与色谱柱对RCF影响的考察　本研究考察了2个品牌的色谱仪（LC-20AT型、e2695型）及3种色谱柱（Alltima C_{18}、Nucleosil C_{18}和Aquasil C_{18}，规格均为250 mm×4. 6 mm，5 μm）对RCF的影响。在**2. 3**项下色谱条件下进样混合对照品溶液，结果测得各成分RCF的RSD为0. 70%~1. 55%（表3），说明仪器与色谱柱对RCF无影响。

2. 5. 3　流速对RCF影响的考察　其他色谱条件不变，流速分别为0. 8、1. 0、1. 2 mL·min^{-1}时，进样对照品溶液，结果测得各成分RCF的RSD为0. 37%~1. 62%（表4），说明流速对RCF无影响。

2. 5. 4　柱温对RCF影响的考察　其他色谱条件不变，采用柱温为25、30、35 ℃条件下，进样对照品溶液，结果测得各成分RCF的RSD在0. 37%~1. 69%（表5），说明柱温对RCF无影响。

2. 5. 5　色谱峰定位的考察　本研究为对待测成分色谱峰进行定位，考察了色谱仪（LC-20AT型、e2695型）及色谱柱（Alltima C_{18}、Nucleosil C_{18}和Aquasil C_{18}）对相对保留时间值（RRT）的影响。在**2. 3**项下色谱条件下，进样对照品溶液，结果测得京尼平苷酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷、三七皂苷R_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rb_1、

表1　恒古骨伤愈合剂中11个成分的线性关系

成分	回归方程	线性范围/μg·mL^{-1}	r
京尼平苷酸	Y=1.269 0×10^6X+849.4	0.89~44.50	0.999 7
京尼平苷	Y=1.446 2×10^6X－623.3	0.96~48.00	0.999 3
松脂醇二葡萄糖苷	Y=1.771 8×10^6X+939.9	1.17~58.50	0.999 5
三七皂苷R_1	Y=4.086 9×10^6X－1 598.4	4.75~237.50	0.999 4
人参皂苷Rg_1	Y=3.162 6×10^6X－1 090.3	1.89~94.50	0.999 6
人参皂苷Rb_1	Y=2.674 0×10^6X+595.5	1.68~84.00	0.999 3
羟基红花黄色素A	Y=3.384 2×10^6X+1 139.3	2.21~110.50	0.999 4
红花黄色素A	Y=2.258 5×10^6X－355.7	1.35~67.50	0.999 6
芸香柚皮苷	Y=3.454 0×10^6X+695.2	2.09~104.50	0.999 3
橙皮苷	Y=3.739 3×10^6X－741.9	6.55~327.50	0.999 5
川陈皮素	Y=6.885 6×10^5X－1 264.3	0.58~29.00	0.999 3

表2　恒古骨伤愈合剂中各成分的RCF

混合对照品溶液	京尼平苷酸	京尼平苷	松脂醇二葡萄糖苷	三七皂苷R_1	人参皂苷Rg_1	人参皂苷Rb_1	红花黄色素A	柚皮芸香苷	橙皮苷	川陈皮素
1	2.710 6	2.319 3	1.918 9	0.828 6	1.082 5	1.251 9	1.543 1	0.979 4	0.909 8	4.778 7
2	2.702 5	2.314 1	1.891 7	0.828 1	1.082 2	1.255 0	1.498 4	0.965 3	0.909 2	4.955 6
3	2.645 8	2.315 1	1.941 2	0.829 7	1.079 7	1.251 2	1.506 9	0.964 2	0.910 1	4.908 1
4	2.703 3	2.333 5	1.911 8	0.824 7	1.081 2	1.263 5	1.506 9	0.977 1	0.905 4	4.928 6
5	2.631 0	2.367 1	1.897 2	0.830 6	1.056 2	1.276 4	1.485 2	0.990 7	0.902 2	4.979 2
6	2.670 3	2.337 1	1.911 5	0.827 9	1.071 7	1.264 2	1.500 1	0.978 5	0.905 4	4.910 5
平均值	2.677 2	2.331 0	1.912 1	0.828 3	1.075 6	1.260 4	1.506 8	0.975 8	0.907 0	4.910 1
RSD/%	1.25	0.86	0.92	0.24	0.96	0.76	1.29	1.01	0.35	1.43

表 3　不同 HPLC 仪及色谱柱对恒古骨伤愈合剂各成分 RCF 的影响

仪器	色谱柱	京尼平苷酸	京尼平苷	松脂醇二葡萄糖苷	三七皂苷 R_1	人参皂苷 Rg_1	人参皂苷 Rb_1	红花黄色素 A	芸香柚皮苷	橙皮苷	川陈皮素
LC-20AT	Alltima C_{18}	2.678 1	2.335 9	1.913 6	0.829 5	1.076 3	1.261 9	1.507 5	0.976 9	0.908 4	4.911 6
	Nucleosil C_{18}	2.630 6	2.362 6	1.937 2	0.836 6	1.086 1	1.280 3	1.530 4	0.993 3	0.910 3	4.999 9
	Aquasil C_{18}	2.714 7	2.301 8	1.885 1	0.818 3	1.061 2	1.247 7	1.471 6	0.960 7	0.897 6	4.780 3
e2695	Alltima C_{18}	2.680 2	2.354 9	1.922 6	0.835 7	1.082 4	1.272 5	1.514 2	0.980 2	0.911 7	4.946 4
	Nucleosil C_{18}	2.654 1	2.342 2	1.927 3	0.826 2	1.089 2	1.273 1	1.523 7	0.987 5	0.915 1	4.952 6
	Aquasil C_{18}	2.681 8	2.320 7	1.900 7	0.826 9	1.070 9	1.262 3	1.509 2	0.971 6	0.902 8	4.879 2
平均值		2.673 3	2.336 4	1.914 4	0.828 9	1.077 7	1.266 3	1.509 4	0.978 4	0.907 6	4.911 7
RSD/%		1.06	0.96	0.99	0.82	0.97	0.91	1.36	1.18	0.70	1.55

表 4　流速对恒古骨伤愈合剂各成分 RCF 的影响

流速/ $mL\cdot min^{-1}$	京尼平苷酸	京尼平苷	松脂醇二葡萄糖苷	三七皂苷 R_1	人参皂苷 Rg_1	人参皂苷 Rb_1	红花黄色素 A	芸香柚皮苷	橙皮苷	川陈皮素
0.8	2.635 9	2.314 6	1.897 3	0.826 9	1.061 4	1.250 8	1.487 6	0.965 9	0.902 5	4.893 1
1.0	2.676 9	2.330 7	1.912 4	0.828 7	1.075 7	1.260 9	1.507 2	0.976 3	0.907 9	4.910 5
1.2	2.712 6	2.359 4	1.936 7	0.833 4	1.083 6	1.269 2	1.531 9	0.989 6	0.908 7	5.038 9
平均值	2.675 1	2.334 9	1.915 5	0.829 7	1.073 6	1.260 3	1.508 9	0.977 3	0.906 4	4.947 8
RSD/%	1.43	0.97	1.04	0.40	1.05	0.73	1.47	1.22	0.37	1.62

表 5　柱温对恒古骨伤愈合剂 RCF 的影响

柱温/℃	京尼平苷酸	京尼平苷	松脂醇二葡萄糖苷	三七皂苷 R_1	人参皂苷 Rg_1	人参皂苷 Rb_1	红花黄色素 A	柚皮芸香苷	橙皮苷	川陈皮素
25	2.641 9	2.308 1	1.899 3	0.823 9	1.066 3	1.247 2	1.482 3	0.961 3	0.901 6	4.799 1
30	2.677 6	2.331 5	1.912 7	0.828 4	1.075 8	1.260 5	1.506 4	0.975 7	0.907 2	4.910 8
35	2.699 3	2.352 7	1.936 4	0.829 7	1.088 6	1.271 3	1.529 6	0.983 4	0.909 1	4.960 7
平均值	2.672 9	2.330 8	1.916 1	0.827 3	1.076 9	1.259 7	1.506 1	0.973 5	0.906 0	4.890 2
RSD/%	1.08	0.96	0.98	0.37	1.04	0.96	1.57	1.15	0.43	1.69

红花黄色素 A、芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素和羟基红花黄色素相对保留时间的 RSD 为 0.57%~1.61%（表 6），表明该法可以对待测成分色谱峰进行准确定位。

2.6　2 种方法测定含量的对比

取 15 批恒古骨伤愈合剂（S1~S15），根据 **2.2** 项下方法制备恒古骨伤愈合剂供试品溶液，按 **2.3** 项下色谱条件下进样分析，分别运用 ESM 和 HPLC-QAMS 计算恒古骨伤愈合剂中 11 个成分的含量。结果说明 2 种方法差异无统计学意义（表 7），表明 HPLC-QAMS 可用于恒古骨伤愈合剂中 11 个成分的含量测定。

表 6　仪器及色谱柱对恒古骨伤愈合剂各成分 RRT 的影响

仪器	色谱柱	京尼平苷酸	京尼平苷	松脂醇二葡萄糖苷	三七皂苷 R_1	人参皂苷 Rg_1	人参皂苷 Rb_1	红花黄色素 A	芸香柚皮苷	橙皮苷	川陈皮素
LC-20AT	Alltima C_{18}	0.304 1	0.373 7	0.453 9	0.621 8	0.709 5	0.821 5	1.084 7	1.310 1	1.393 3	1.453 9
	Nucleosil C_{18}	0.305 5	0.375 9	0.458 2	0.633 0	0.718 3	0.837 9	1.110 4	1.322 6	1.414 7	1.478 0
	Aquasil C_{18}	0.300 2	0.371 1	0.450 7	0.617 5	0.700 1	0.814 2	1.062 0	1.289 5	1.375 2	1.430 6
e2695	Alltima C_{18}	0.305 8	0.375 0	0.455 3	0.624 4	0.714 7	0.826 1	1.093 5	1.324 5	1.404 9	1.465 2
	Nucleosil C_{18}	0.306 0	0.377 2	0.460 8	0.635 9	0.722 6	0.839 7	1.097 1	1.338 1	1.418 6	1.469 3
	Aquasil C_{18}	0.302 6	0.373 4	0.452 5	0.623 6	0.706 9	0.820 3	1.072 8	1.297 8	1.383 8	1.447 1
平均值		0.304 0	0.374 4	0.455 2	0.626 0	0.712 0	0.826 6	1.086 8	1.313 8	1.398 4	1.457 4
RSD/%		0.75	0.57	0.82	1.12	1.15	1.23	1.61	1.38	1.24	1.17

表 7　QAMS 与 ESM 对恒古骨伤愈合剂中 11 个成分含量的测定结果（n=3）

mg·g^{-1}

样品编号	羟基红花黄色素A	京尼平苷酸		京尼平苷		松脂醇二葡萄糖苷		三七皂苷 R_1		人参皂苷 Rg_1		人参皂苷 Rb_1		红花黄色素A		芸香柚皮苷		橙皮苷		川陈皮素	
	ESM	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS
S1	0.157	0.057	0.058	0.072	0.073	0.085	0.084	0.278	0.272	0.129	0.130	0.112	0.113	0.094	0.095	0.143	0.146	0.361	0.367	0.042	0.043
S2	0.181	0.065	0.064	0.095	0.094	0.077	0.076	0.321	0.326	0.135	0.138	0.108	0.107	0.111	0.110	0.156	0.158	0.389	0.396	0.049	0.048
S3	0.202	0.062	0.063	0.103	0.104	0.090	0.089	0.333	0.337	0.144	0.147	0.077	0.076	0.075	0.074	0.155	0.154	0.448	0.459	0.068	0.067
S4	0.179	0.057	0.056	0.085	0.084	0.081	0.080	0.275	0.271	0.176	0.172	0.089	0.088	0.091	0.090	0.176	0.174	0.427	0.422	0.057	0.058
S5	0.193	0.060	0.059	0.091	0.090	0.083	0.082	0.303	0.299	0.157	0.154	0.100	0.101	0.106	0.105	0.163	0.162	0.402	0.409	0.056	0.055
S6	0.197	0.055	0.054	0.087	0.088	0.085	0.086	0.324	0.317	0.168	0.164	0.086	0.085	0.086	0.085	0.165	0.167	0.459	0.446	0.060	0.061
S7	0.175	0.051	0.052	0.079	0.078	0.079	0.078	0.296	0.291	0.185	0.181	0.083	0.082	0.079	0.080	0.193	0.191	0.438	0.434	0.063	0.064
S8	0.112	0.050	0.049	0.060	0.059	0.072	0.071	0.281	0.285	0.102	0.101	0.066	0.065	0.052	0.051	0.134	0.133	0.345	0.342	0.071	0.070
S9	0.121	0.047	0.046	0.047	0.046	0.070	0.069	0.269	0.265	0.084	0.083	0.058	0.059	0.048	0.049	0.136	0.137	0.336	0.330	0.072	0.071
S10	0.093	0.049	0.048	0.043	0.042	0.067	0.066	0.253	0.259	0.092	0.091	0.069	0.068	0.045	0.044	0.125	0.127	0.319	0.317	0.063	0.062
S11	0.172	0.073	0.074	0.068	0.067	0.105	0.106	0.250	0.253	0.229	0.225	0.129	0.127	0.147	0.145	0.189	0.187	0.497	0.510	0.041	0.042
S12	0.132	0.078	0.079	0.082	0.081	0.112	0.111	0.251	0.247	0.236	0.233	0.135	0.134	0.143	0.142	0.236	0.233	0.490	0.498	0.037	0.036
S13	0.184	0.072	0.071	0.058	0.057	0.105	0.104	0.242	0.238	0.221	0.216	0.143	0.140	0.134	0.135	0.201	0.197	0.538	0.544	0.053	0.052
S14	0.101	0.077	0.076	0.056	0.055	0.107	0.108	0.226	0.221	0.213	0.208	0.148	0.146	0.159	0.158	0.215	0.210	0.476	0.473	0.034	0.035
S15	0.167	0.072	0.073	0.063	0.062	0.102	0.101	0.218	0.215	0.188	0.186	0.121	0.120	0.126	0.129	0.209	0.203	0.499	0.486	0.045	0.046
P值		0.960		0.929		0.913		0.904		0.911		0.935		0.984		0.924		0.981		0.988	

3　恒古骨伤愈合剂的化学计量学质量分析

3.1　聚类分析（CA）

将 15 批恒古骨伤愈合剂中 11 个成分 QAMS 所得数据导入 SPSS 26.0 统计软件进行 CA（欧氏距离的组间联接），见图 2。结果显示，当间距为 15 时，15 批样品聚为 3 类，S4、S7、S2、S5、S3、S6、S1 共 7 批样品聚为一类，S8~S10 共 3 批样品聚为一类，S11~S15 共 5 批样品聚为一类。

3.2　主成分分析（PCA）

运用 SPSS 26.0 统计软件对 **2.6** 项下 QAMS 测定结果进行 PCA，得各主成分特征值、方差贡献率和累积方差贡献率（表 8）及成分矩阵（表 9）。由表 8 可知，特征值>1 的有 2 个主成分对应方差的贡献率分别为 66.169%、22.223%，累积方差贡献率为 88.393%，表明选取 2 个主成分即可代表恒古骨伤愈合剂中 11 个成分 88.393% 的信息，具有较好的代表性。表 9 可以看出，第一主成分的信息来于京尼平苷酸、松脂醇二葡萄糖苷、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1、红花黄色素 A、芸香柚皮苷、橙皮苷和川陈皮素的综合，第二主成分的信息来于京尼平苷、三七皂苷 R_1 和羟基红花黄色素 A 的综合。同时应用统计软件 SIMCA 14.1 建立 PCA 模型，得 15 批恒古骨伤愈合剂样品 PCA 得分图（图 3），共提取出 2 个主成分，模型对 X 变量可解释率（R^2X）为 0.884，超过 0.5，所建立的模型稳定性较高。从图 3 可以看出，S1~S7、S8~S10 及 S11~S15 分别呈现一定关联性。

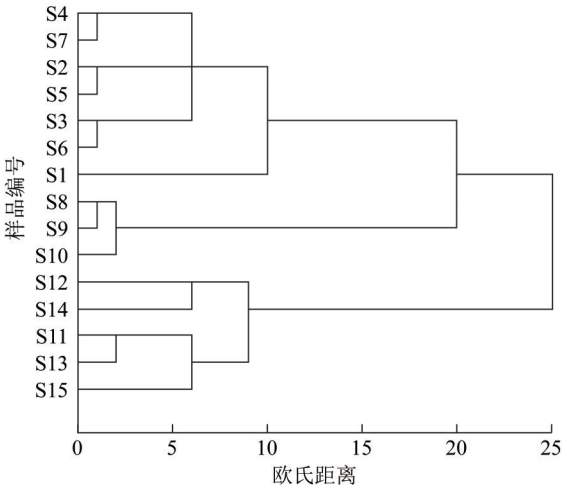


图 2　15 批恒古骨伤愈合剂样品聚类树状图

表 8　恒古骨伤愈合剂中特征值、方差贡献率和累积方差贡献率

主成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	7.279	66.169	66.169	7.279	66.169	66.169
2	2.445	22.223	88.393	2.445	22.223	88.393
3	0.606	5.506	93.899			
4	0.288	2.619	96.517			
5	0.181	1.643	98.160			
6	0.087	0.791	98.951			
7	0.050	0.450	99.401			
8	0.027	0.243	99.644			
9	0.019	0.175	99.819			
10	0.018	0.160	99.979			
11	0.002	0.021	100.000			

表 9　恒古骨伤愈合剂中 11 个成分的成分矩阵

成分	主成分	
	1	2
京尼平苷酸	0.958	0.015
京尼平苷	0.088	0.940
松脂醇二葡萄糖苷	0.965	－0.007
三七皂苷 R_1	－0.541	0.777
人参皂苷 Rg_1	0.942	0.165
人参皂苷 Rb_1	0.949	－0.100
羟基红花黄色素 A	0.172	0.902
红花黄色素 A	0.975	0.007
芸香柚皮苷	0.916	0.016
橙皮苷	0.892	0.273
川陈皮素	－0.852	0.176

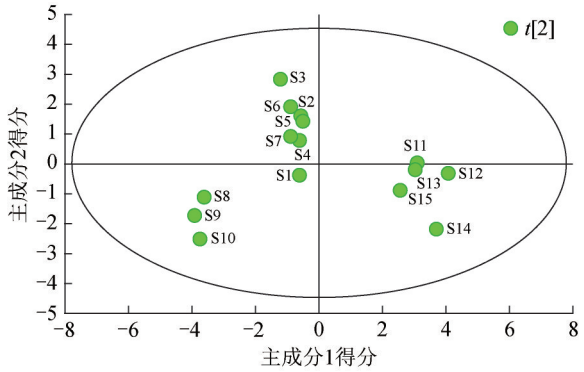


图 3　15 批恒古骨伤愈合剂样品 PCA 得分

3.3　PLS-DA

PLS-DA 通过对数据的分析能够查找出引起产品质量差异的特征成分，SIMCA 14.1 统计软件对 **2.6** 项下 QAMS 含量数据运行 PLS-DA 程序，见图 4。结果 R^2X 为 0.896，模型对 Y 变量可解释率（R^2Y）为 0.843，预测能力参数（Q^2）为 0.784，理论上 R^2Y、Q^2 数值越接近 1，说明模型越好，通常两者超过 50% 时所建立的模型稳定可靠、预测能力强。由图 4 可以看出，15 批恒古骨伤愈合剂的含量数据点均落在 95% 置信区间内，根据分布可分为 3 类，与 CA 和 PCA 结果一致。

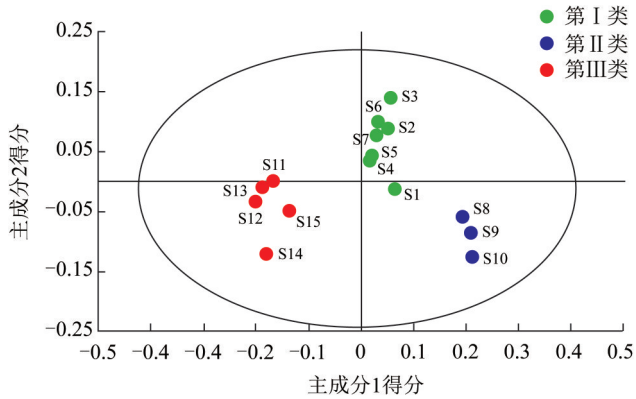


图 4　15 批恒古骨伤愈合剂样品的 PLS-DA 模型得分图

对建立的 PLS-DA 模型进行 200 次置换检验（图 5），结果显示，累积方差值（R^2）拟合直线 Y 轴截距为 0.092<0.3；Q^2 拟合直线 Y 轴截距为 －0.274，Q^2 为负数，且最右边的 R^2 和 Q^2 值均高于左侧，表明所构建的 PLS-DA 模型不存在过度拟合，预测能力好，可有效判别分析 15 批恒古骨伤愈合剂的质量差异。根据变量重要性投影（VIP）值筛选影响药物炮制前后组方恒古骨伤愈合剂化学成分差异的标志性成分（图 6），结果 VIP 值>1 的有 5 个成分，即成分 7（羟基红花黄色素 A，VIP 值=1.446）、成分 4（三七皂苷 R_1，VIP 值=1.351）、成分 10（橙皮苷，VIP 值=1.258）、成分 2（京尼平苷，VIP 值=1.138）、成分 5

（人参皂苷 Rg_1，VIP 值=1.067）对恒古骨伤愈合剂样品质量的影响较大，可能是影响恒古骨伤愈合剂产品质量的主要潜在标志物。

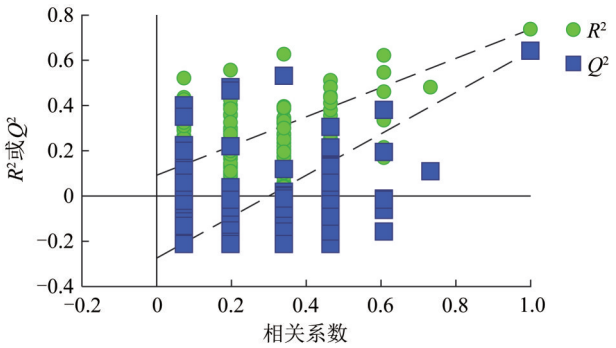


图 5　15 批恒古骨伤愈合剂 PLS-DA 模型置换检测结果

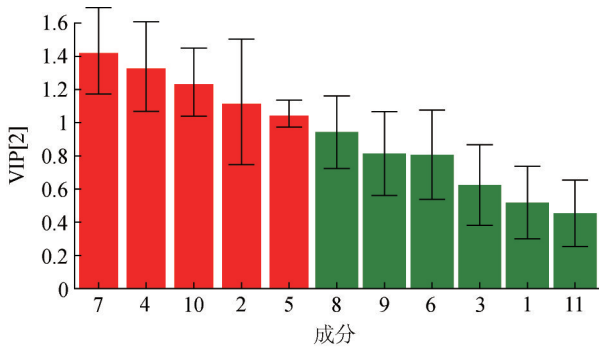


图 6　15 批恒古骨伤愈合剂样品中 11 个成分的 VIP

（$\bar{x}\pm s$, n=15）

4　讨论

4.1　检测指标性成分的选择

恒古骨伤愈合剂配方中君药包括红花和三七，有活血化瘀的功效；人参、黄芪益气健脾，杜仲、鳖甲补肝肾、强筋骨，4 味药合为臣药；陈皮理气和中，钻地风舒筋活络，洋金花止痛，三者为佐药。诸药合用，共奏活血益气、益肝肾、接骨续筋、消肿止痛之功效。本研究综合考虑，以君药红花和三七，臣药人参和杜仲，佐使药陈皮为考察对象，分析其所含成分，选取主要成分、特征性成分或主要药效成分为检测指标。最终本研究确定以京尼平苷酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷、三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1、羟基红花黄色素 A、红花黄色素 A、芸香柚皮苷、橙皮苷和川陈皮素为检测指标。

4.2　供试品溶液制备

本研究在制备供试品溶液时，考虑到该制剂在制备时已进行了提取浓缩，且该制剂为液体制剂，参考相关文献，首先对提取溶剂进行了筛选[9,12-14,16-17,19-22]：甲醇、70% 甲醇、60% 甲醇、50% 甲醇和 25% 甲醇，并采用直接稀释法。结果发现 50% 甲醇提取时，所测 11 个成分的提取率较高。进而采取超声和加热回流提取方式进行了对比，结果发现 50% 甲醇超声提取和直接稀释时 11 个成分的提取率相当。综合考虑，最终确定以 50% 甲醇直接稀释为恒古骨伤愈合剂供试品溶液最佳制备方式。

4.3　化学计量学分析结果评价

化学计量学运用数学、统计学、计算机科学等学科理论和方法，通过解析化学检测数据，发掘多变量复杂数据中存在的关联关系，CA、PCA、非线性映射等无监督统计方法和 PLS、PLS-DA、正交偏最小二乘法-判别分析（OPLS-DA）等有监督统计方法近年来广泛应用于中药及其制剂的研究中。CA 利用同类样品彼此相似，在多维空间中彼此距离较小的原理，达到对未知样本进行分类的目的。本研究对 QAMS 测定结果进行 CA，15 批恒古骨伤愈合剂聚为 3 类，即 S4、S7、S2、S5、S3、S6 和 S1 聚为一类，S8~S10 聚为一类，S12~S15 聚为一类，表明恒古骨伤愈合剂具有明显分类趋势。PCA 将具有一定相关性的变量通过数据降维，排除众多化学信息共存中相互重叠的信息，在保存大量信息的同时降低了变量个数，对成分复杂的中药及其制剂研究具有重要意义。本研究 PCA 结果显示，选取 2 个主成分即可代表恒古骨伤愈合剂中 11 个成分 88.393% 的信息，具有较好的代表性，同时 15 批样品分类与 CA 结果一致。PLS-DA 通过模式识别发掘引起产品质量差异的特征成分。本研究对 11 个成分含量检测结果进行 PLS-DA，将 PLS-DA 模型进行 200 次置换检验，结果显示，所构建的 PLS-DA 模型不存在过度拟合，预测能力好，可有效判别分析 15 批恒古骨伤愈合剂的质量差异，筛选出羟基红花黄色素 A、三七皂苷 R_1、橙皮苷、京尼平苷和人参皂苷 Rg_1 为影响产品质量差异的标志性化学成分，为不断提升恒古骨伤愈合剂的质量控制标准提供参考。

本研究采用 HPLC-QAMS 建立了恒古骨伤愈合剂 11 个指标成分定量质量控制模式，对市场流通的

15批样品进行检测，通过方法学验证及2种方法的对比，结果显示2种方法差异无统计学意义；又通过化学计量学识别模式对多指标成分含量检测结果进行提取、降维分析，发现羟基红花黄色素A、三七皂苷R_1、橙皮苷、京尼平苷和人参皂苷Rg_1可能是影响产品质量差异性的主要物质性成分，提示药企在生产该制剂时要关注相关药材的质量，全面保证制剂临床疗效，为提高恒古骨伤愈合剂质量控制水平提供参考。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[M]. 北京：中国医药科技出版社，2020：1356-1357.

[2] 罗标. 恒古骨伤愈颗粒薄层鉴别方法研究[J]. 河北中医，2010，32(8)：1226.

[3] 姜彦青，王弘，李俊平，等. 恒古骨伤愈颗粒质量标准研究[J]. 齐鲁药事，2010，29(2)：83-86.

[4] 肖芳，翟丽杰，柴劲. 一测多评法测定复方黄柏液涂剂中8种活性成分[J]. 中国药师，2019，22(5)：955-959.

[5] 黄乐，姚彩云，梁莹，等. 一测多评法测定山豆根中3个非生物碱成分含量[J]. 中国现代中药，2020，22(12)：2015-2020.

[6] 李林杰，谢谭芳，王昱涵，等. 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[J]. 中国药房，2022，33(4)：439-445.

[7] 杨扬宇，陈林，唐雪阳，等. 基于多成分含量测定及HPLC指纹图谱结合化学计量学方法评价百合质量[J]. 中国现代中药，2021，23(3)：470-474.

[8] 李黎丽，何胜利. HPLC波长切换法同时测定杜仲双降袋泡剂中7种成分的含量[J]. 实用药物与临床，2020，23(1)：69-73.

[9] 刘慧，张盛，刘仲华. HPLC法同时测定杜仲皮中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷和松脂醇二葡萄糖苷[J]. 中草药，2012，43(8)：1547-1549.

[10] 陈玉甫，张学俊，王明力，等. 不同方法提取杜仲中桃叶珊瑚苷等4种高活性成分的比较研究[J]. 天然产物研究与开发，2019，31(1)：10-15.

[11] 李瑞婷，娄灯吉，姚星宇，等. HPLC法同时测定8种三七样品中5种皂苷成分的含量[J]. 安徽农业科学，2020，48(16)：184-187.

[12] 武双，郭从亮，崔秀明，等. HPLC法同时测定生三七和蒸制三七中10种皂苷类成分的含量[J]. 中药材，2015，38(8)：1622-1625.

[13] 黄永亮，余志杰，黎江华，等. 熟三七饮片HPLC指纹图谱的建立及多成分定量测定[J]. 中草药，2018，49(3)：589-595.

[14] 逄世峰，李亚丽，许世泉，等. 人参不同部位人参皂苷类成分研究[J]. 人参研究，2015，27(1)：5-8.

[15] 王晶，张勇，毕萌菲，等. RP-HPLC法分析测定人参、西洋参、三七中的皂苷类化合物[J]. 食品研究与开发，2020，41(7)：172-176.

[16] 范胜莲，刘光兴. 不同干燥方法对红花中羟基红花黄色素A、山奈素及红花黄色素A含量的影响[J]. 中国药师，2020，23(6)：1198-1200.

[17] 王睿，郭文全，张春礼，等. 跌打红药片中红花主要成分的含量测定及提取条件优化[J]. 现代中药研究与实践，2021，35(1)：57-61.

[18] 虞立，万海同，何昱，等. 基于两种分析方法优化红花中羟基红花黄色素A提取工艺[J]. 中药材，2018，41(11)：2627-2631.

[19] 高喜梅，王晓凤，周冰倩，等. HPLC多波长条件下陈皮指纹图谱及“一测多评”法的建立[J]. 中药材，2019，42(11)：2598-2602.

[20] 宋玉鹏，陈海芳，谭舒舒，等. 不同陈皮来源药材中橙皮苷、川陈皮素、橘皮素和辛弗林的含量比较[J]. 时珍国医国药，2017，28(9)：2061-2064.

[21] 张婷婷，梁燕，彭灿. 不同方法提取陈皮中黄酮类有效成分含量比较[J]. 中国药业，2021，30(13)：40-43.

[22] 叶晓岚，宋粉云，范国荣，等. 高效液相色谱法同时测定广陈皮药材中的11种化学成分[J]. 色谱，2015，33(4)：423-427.

（收稿日期：2022-03-24 编辑：王笑辉）