

本文引用: 刘晓慧, 彭江丽, 奉艳婷, 邓美玲, 钱敏, 王适, 彭求贤. 基于 HPLC 指纹图谱和一测多评法的化瘀止痛贴膏质量评价[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(12): 2307-2315.

基于 HPLC 指纹图谱和一测多评法的化瘀止痛贴膏质量评价

刘晓慧^{1,2}, 彭江丽¹, 奉艳婷^{1,2}, 邓美玲^{1,2}, 钱敏^{1,2}, 王适^{3*}, 彭求贤^{1,2*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410208; 2. 湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室, 湖南长沙 410208;

3. 湖南中医药大学第二附属医院药剂科, 湖南长沙 410005

[摘要] **目的** 建立化瘀止痛贴膏的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并结合一测多评(QAMS)法测定其中10种成分的含量,为其质量评价提供参考。**方法** 采用 Agilent HC C₁₈ 色谱柱,以乙腈-1%甲酸、0.1%三乙胺为流动相进行梯度洗脱,柱温 30 ℃,流速 1 mL·min⁻¹,构建 HPLC 指纹图谱,进行相似度评价,并采用化学计量学方法进行化学模式识别研究。利用相对校正因子来计算各成分的含量,同时将 QAMS 法计算结果和外标法实测值进行比较,计算其他相对校正因子,测定其含量。**结果** 14 批指纹图谱共确定 10 个共有峰,相似度评价>0.9,以黄芩苷为内参物,儿茶素、羟基红花黄色素 A、黄柏碱、龙胆苦苷、木兰花碱、药根碱、小檗碱、丹皮酚和大黄素甲醚的校正因子分别为 0.922 9、1.148 7、1.171 6、1.532 7、1.113 5、0.316 8、0.200 6、0.389 4、0.594 4,与外标法计算结果无显著差异。**结论** 建立的 HPLC 指纹图谱与 QAMS 法,结果准确、方法可靠,能为化瘀止痛贴膏的质量控制与综合评价提供科学依据。

[关键词] 化瘀止痛贴膏;质量评价;指纹图谱;一测多评;相似度评价

[中图分类号]R284.1

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.12.009

Quality evaluation of Huayu Zhitong Plaster based on HPLC fingerprint and QAMS method

LIU Xiaohui^{1,2}, PENG Jiangli¹, FENG Yanting^{1,2}, DENG Meiling^{1,2}, QIAN Min^{1,2},

WANG Shi^{3*}, PENG Qiuxian^{1,2*}

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Key Research Laboratory of Germplasm Resources and Standardized Planting of Genuine Regional Medicinal Materials produced in Hunan Province, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Pharmacy Department, the Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China

[Abstract] **Objective** To establish the HPLC fingerprint of Huayu Zhitong Plaster and to determine the content of its ten components using the quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) method, so as to provide a reference for quality assessment. **Methods** The HPLC fingerprint was developed using an Agilent HC-C₁₈ column with a mobile phase of acetonitrile-1% formic acid 0.1% triethylamine under gradient elution conditions. The column temperature was maintained at 30 ℃ and the flow rate was set at 1 mL·min⁻¹. Similarity evaluation was performed on the fingerprint, and chemometric methods were applied for chemical pattern recognition. The content of the components were calculated using relative correction factors (RCFs). The results obtained by the QAMS method were compared with those determined by the external standard method, and additional RCFs were calculated accordingly for content determination. **Results** A total of ten common peaks were identified in the fingerprints of the 14 batches, with similarity evaluations exceeding 0.9. Using baicalin as the internal reference substance, the correction

[收稿日期]2025-09-19

[基金项目]湖南省中医药管理局科研项目(B2023052);湖南省自然科学基金-科药联合项目(2022JJ80087,2024JJ8175)。

[通信作者]* 王适,男,硕士,副主任药师,E-mail:2545411618@qq.com;彭求贤,男,博士,硕士研究生导师,E-mail:espqx@163.com。

factors for catechin, hydroxysafflor yellow A, phellodendrine, gentiopicroside, magnoflorine, jateorrhizine, berberine, paeonol, and physcion were determined as 0.922 9, 1.148 7, 1.171 6, 1.532 7, 1.113 5, 0.316 8, 0.200 6, 0.389 4, and 0.594 4, respectively. There was no significant difference between the results calculated by the QAMS method and those calculated by the external standard method. **Conclusion** The established HPLC fingerprint combined with the QAMS method demonstrates accuracy and reliability, thereby providing a scientific foundation for the quality control and comprehensive evaluation of Huayu Zhitong Plaster.

[**Keywords**] Huayu Zhitong Plaster; quality evaluation; HPLC fingerprint; quantitative analysis of multi-components by single-marker; similarity evaluation

急性软组织损伤(acute soft tissue injury, ASTI)是常见的运动损伤,多由扭伤、挫伤及跌打导致,可引起肌肉、韧带、筋膜、肌腱、滑膜及周围神经、血管的损伤^[1]。闭合性损伤常由高强度外力引发,体表无创口,属钝力伤害。该损伤不仅影响人体健康和运动功能,还可能危及运动员职业生涯,因而备受关注^[2]。中医学将急性软组织损伤归为“伤筋”,病机关键为气滞血瘀、脉络不和^[3]。

化瘀止痛贴膏为湖南中医药大学第二附属医院院内制剂,由黄柏、赤芍、大黄、白芍、栀子等 14 味中药组成,功效化痰解毒、消肿止痛,主要用于瘀热证型之闭合性骨折、脱臼所致的未溃破软组织损伤与感染,临床应用效果显著。

近年来,多指标成分定量与特征图谱分析在中药及其制剂质量控制中的应用不断深入。中药特征图谱作为一种综合性、量化的质量控制手段,能够全面表征制剂的化学成分整体特征,并清晰反映不同批次间的差异性,已广泛用于中药质量评价^[4]。QAMS 则依据成分间的相对校正因子,通过测定一个易得对照成分,同步计算多个成分的含量,兼具经济性与便捷性,特别适用于成分复杂的中药复方制剂的质量控制^[5]。基于此,本研究在化瘀止痛贴膏的 HPLC 指纹图谱的基础上,采用 QAMS 法,以黄芩苷为内标物,计算化瘀止痛贴膏中的含量,以期为该制剂的质量评价提供参考。

1 仪器、试剂与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪、ZORBAX 系列色谱柱 Agilent HC C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent SB C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(美国安捷伦公司),色谱柱 LiChrospher RP-18(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(德国默克公司);ME155DU 型电子天平(d=0.01 mg)(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);XM-800UGF 型超声清洗仪(频率 50 kHz,功率 500 W)(昆山小美超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与试药

羟基红花黄色素 A(B20968)、黄柏碱(B20552)、黄芩苷(B20570)、大黄素甲醚(B20242)(上海源叶生物科技有限公司);儿茶素(AFBF2708)、龙胆苦苷(AF20081809)(成都埃法生物科技有限公司);木兰花碱(M-026-170612)、药根碱(DST201101-287)、小檗碱(DST200509-028)(成都德思特生物技术有限公司);丹皮酚(WKQ20011305)(四川维克奇生物技术有限公司);以上对照品纯度均≥98%。乙腈(AS1122-801)、甲醇(MS1922-801)(美国天地有限公司);甲酸(F112034)、三乙胺(T103287)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);以上均为色谱级别试剂。

化瘀止痛贴膏为湖南中医药大学第二附属医院自制(湘药制备字 Z20220593000)。取化瘀止痛贴膏,弃去防黏层置于皿中,并在 50 ℃鼓风干燥箱中低温烘干,取出,粉碎,过筛,混匀,即得“化瘀止痛贴膏粉末”。密封,后续实验均精密称取此粉末进行。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent HC C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-1%甲酸、0.1%三乙胺(B),梯度洗脱(0~60 min, 5%~35% A; 60~80 min, 35%~45% A; 80~90 min, 45%~90% A; 90~100 min, 90% A);体积流量 1 mL/min;柱温 30 ℃;检测波长 280 nm;进样量 10 μL。

2.2 供试品溶液制备

精确称取化瘀止痛贴膏粉末 1.0 g,置于具塞平底烧瓶中,精密加入 10 mL 70%甲醇,密塞后称重。经超声处理(250 W, 40 kHz)30 min,冷却后于 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得供试品溶液。

2.3 混合对照品溶液制备

精密称取各对照品适量,加 70%甲醇溶解并定容,制成浓度为儿茶素 0.681 2 mg/mL、羟基红花黄色素 A 0.796 7 mg/mL、黄柏碱 0.964 1 mg/mL、龙

胆苦苷 0.505 3 mg/mL、木兰花碱 0.625 4 mg/mL、药根碱 0.101 5 mg/mL、黄芩苷 1.042 0 mg/mL、小檗碱 1.084 0 mg/mL、丹皮酚 0.176 4 mg/mL、大黄素甲醚 0.241 5 mg/mL 的混合对照品溶液, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.4 指纹图谱建立

2.4.1 精密度考察 取同一供试品溶液 (S1), 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次。以黄芩苷色谱峰 (S) 为参照, 计算 10 个特征峰与 S 峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明, 各相对值 RSD 均低于 3.0%, 表明仪器精密度符合要求。

2.4.2 重复性考察 取同一批次样品 (S1) 6 份, 按“2.2”方法分别制备供试品溶液并进样分析。以黄芩苷色谱峰 (S) 为参照, 分别计算其余 10 个色谱峰的相对保留时间与相对峰面积。结果显示, 各相对值的 RSD 均小于 3.0%, 表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性考察 取同批次样品 (S1), 按“2.2”方法制备供试品溶液, 于 0、2、4、8、12、24、48 h 分别进样分析。以黄芩苷峰 (S) 为参照, 计算其余 10 个色谱峰的相对保留时间与相对峰面积。结果显示, 各相对值的 RSD 均小于 3.0%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.4.4 指纹图谱研究 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版”对 14 批样品的色谱图进行分析。以中位数法生成对照指纹图谱 (图 1), 时间窗宽度设为 0.1, 经多点校正与峰匹配后, 筛选出 14 个分离良好、峰形稳定的色谱峰作为共有峰, 并对其中

的 10 个色谱峰进行了指认。通过与混合对照品保留时间及紫外-可见光谱比对 (图 2), 分别指认: 峰 1 (儿茶素)、峰 2 (羟基红花黄色素 A)、峰 3 (黄柏碱)、峰 4 (龙胆苦苷)、峰 5 (木兰花碱)、峰 6 (药根碱)、峰 7 (黄芩苷)、峰 8 (小檗碱)、峰 9 (丹皮酚)、峰 10 (大黄素甲醚)。14 批样品相似度介于 0.999~1.000 之间, 表明化瘀止痛贴膏整体质量稳定性良好。

2.5 化学模式识别研究

2.5.1 聚类分析 (cluster analysis, CA) 采用 SPSS 25.0 对 14 批样品中 10 个共有峰的峰面积进行系统聚类分析, 聚类方法为组间连接, 距离测度为欧式平方距离。聚类结果显示, 在欧式距离为 12 时, 样品可划分为 3 类: S1 与 S2 归为一类, S14 单独成一类, 其余样品聚为第三类, 见图 3。

2.5.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 以 10 个共有峰峰面积为变量, 采用 SIMCA 14.0 软件对 14 批样品进行 PCA 分析, 3 个主成分的累计贡献分别为 39.6%、70.9%、93.5%, 能反映样品的整体信息。以 3 个主成分建立坐标系, 得到样品的主成分得分图 4。通过 PCA 可视化对样本的自然聚类趋势进行探索, 发现形成 3 个自然簇, 其中 S14 为一簇, 作为一个离群值其特征与主体样本集差异较大。S1、S2 为一簇, S3~S11 为一簇, 与上述 CA 结果一致, 提示不同批次之间的样品存在一定的差异, 见图 4。

2.5.3 正交最小偏二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-

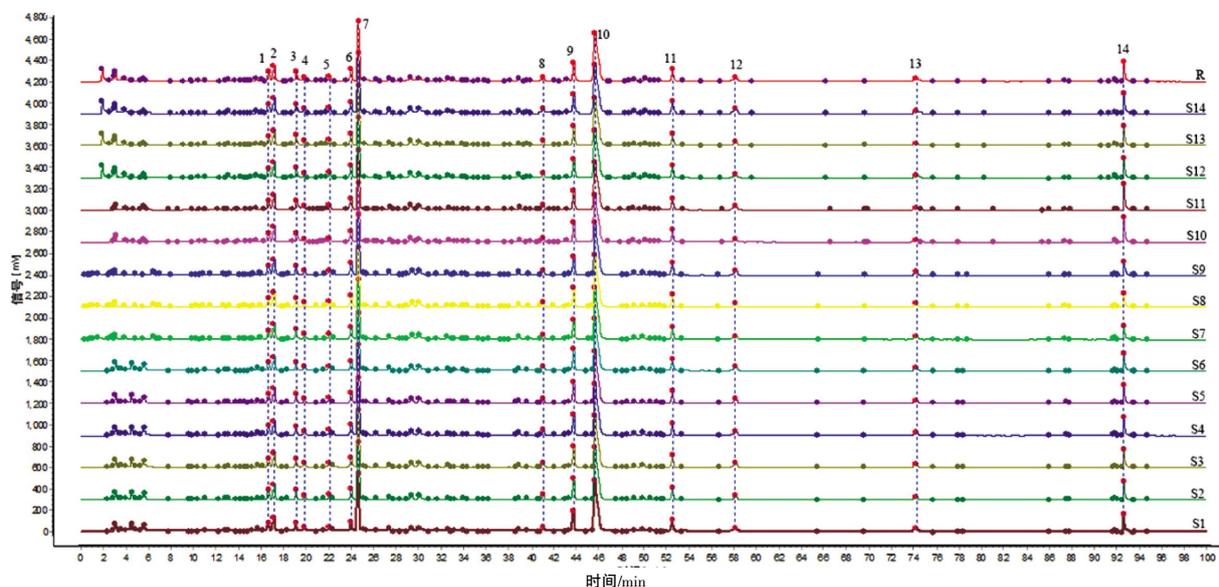
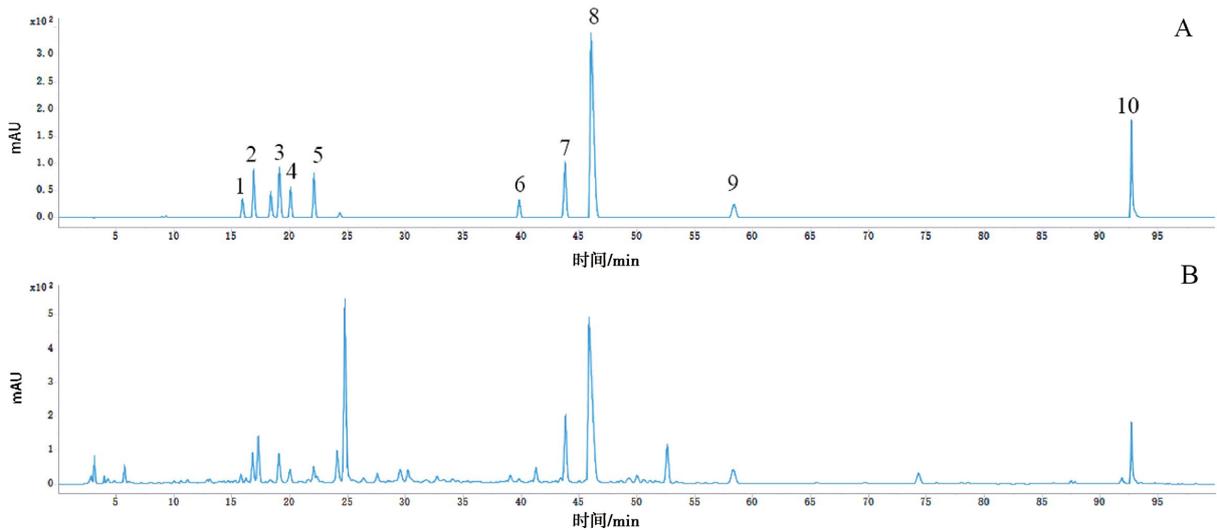


图 1 14 批化瘀止痛贴膏粉末 HPLC 指纹图谱

Fig.1 HPLC fingerprints of ten batches of Huayu Zhitong Plaster powder



1.儿茶素;2.羟基红花黄色素 A;3.黄柏碱;4.龙胆苦苷;5.木兰花碱;6.药根碱;7.黄芩苷;8.小檗碱;9.丹皮酚;10.大黄素甲醚。

图 2 混合对照品(A)和供试品(B)色谱图

Fig.2 Chromatograms of mixed reference standards (A) and the test sample (B)

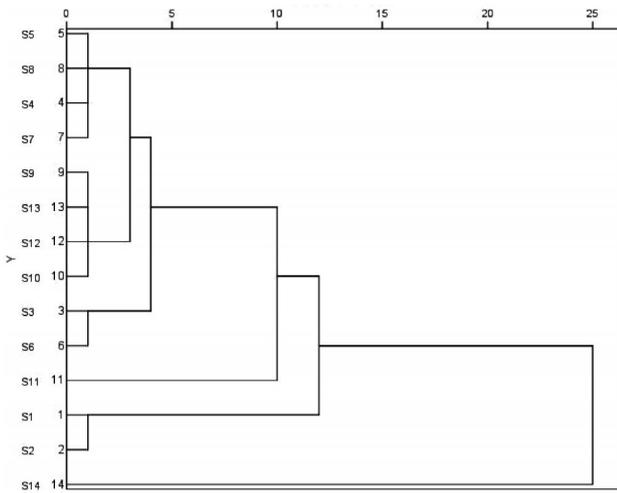


图 3 14 批化痰止痛贴膏粉末聚类树状图

Fig.3 Cluster analysis dendrogram of 14 batches of Huayu Zhitong Plaster powder

模型参数分别为 $R^2X=0.703, R^2Y=0.939, Q^2=0.899$, 均大于 0.5, 表明模型构建较好; 基于当前数据, 观察到 A 组和 B 组的样本点主要沿着 t_1 轴预测成分轴分布, 且两组分离效果较好, 这提示两组之间的整体模式存在差异。同时, 同一组内的样本点在 t_2 轴正交成分轴上分布相对集中, 说明组内变异较小, 见图 5。

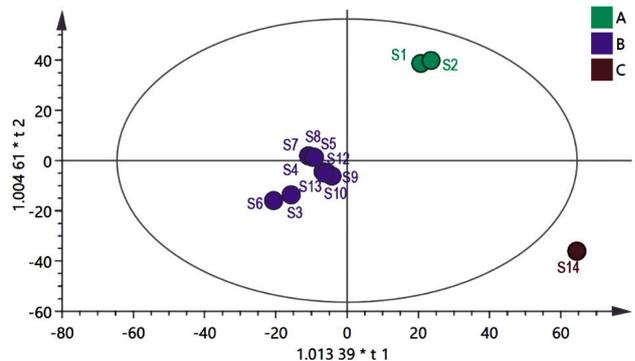


图 5 OPLS-DA 得分图

Fig.5 OPLS-DA score plot

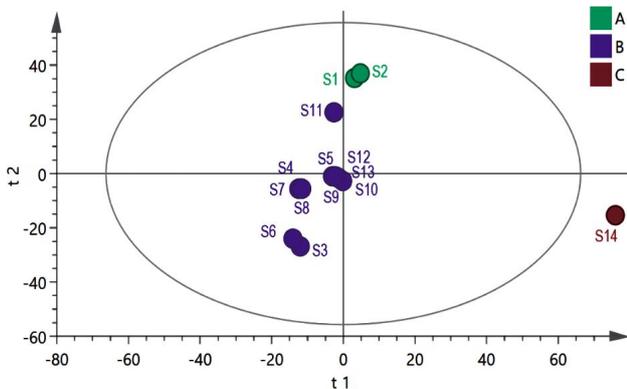


图 4 PCA 得分图

Fig.4 PCA score plot

DA) 采用 SIMCA 14.1 软件对 14 批样品指纹图谱中 10 个共有峰的峰面积进行 OPLS-DA 分析。所得

2.6 含量测定方法学考察

2.6.1 线性关系考察 精密吸取“2.3”项下混合对照品溶液 2、4、8、12、16、20 μL , 分别用 70% 甲醇定容置 1 mL 容量瓶中, 制备成一系列不同质量浓度的溶液, 以固定体积注入 HPLC 仪; 以质量浓度为横坐标 (x), 峰面积为纵坐标 (y), 计算回归方程。结果见表 1, 表明 10 个成分在拟定范围内线性关系良好。

2.6.2 精密度实验 取同一批供试品 (S1) 的溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 结果儿茶素、羟基红花黄色素 A、黄柏碱、龙胆苦苷、木兰花碱、药

表 1 各成分线性关系

Table 1 Linear relationships of each component

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
儿茶素	$y=76.000x-9.858$	0.999 9	2.72~227.10
羟基红花黄色素 A	$y=52.559x-31.314$	0.999 0	2.50~265.60
黄柏碱	$y=55.640x+17.876$	0.999 3	3.84~321.40
龙胆苦苷	$y=171.920x-3.037$	0.999 9	2.02~168.40
木兰花碱	$y=69.340x+15.127$	0.999 3	2.50~208.50
药根碱	$y=216.100x-0.577$	0.999 9	0.41~33.83
黄芩苷	$y=66.555x-11.005$	0.999 9	4.16~347.30
小檗碱	$y=323.320x+11.806$	0.999 9	4.32~361.30
丹皮酚	$y=171.580x+1.635$	0.999 9	0.68~58.80
大黄素甲醚	$y=98.615x+119.430$	0.999 2	1.92~80.50

根碱、黄芩苷、小檗碱、丹皮酚和大黄素甲醚的峰面积 RSD 分别为 2.92%、3.40%、4.15%、3.10%、3.39%、2.96%、2.10%、2.23%、3.49%、3.98%。

2.6.3 稳定性实验 取同一批供试品(S1)的溶液,按“2.2”项下色谱条件,于 0、2、4、8、16、24、36、48 h 分别进样 1 次,结果 10 个成分的峰面积 RSD 分别为 1.91%、1.40%、1.15%、2.10%、2.31%、1.96%、1.89%、2.23%、2.49%、1.98%。

2.6.4 重复性实验 取同一供试品(S1),按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,连续进样 6 次,结果 10 个成分的峰面积 RSD

分别为 0.92%、1.11%、0.95%、1.13%、1.49%、0.96%、1.29%、1.23%、1.49%、1.08%。

2.6.5 加样回收试验 取已用外标法(ESM)测知含量的 S1 号样品粉末约 0.5 g,精确称量 6 份,按照 1:1 的比例加入各对照品;按“2.2”项下方法制备供试品溶液并进样分析,结果显示,儿茶素、羟基红花黄色素 A、黄柏碱、龙胆苦苷、木兰花碱、药根碱、黄芩苷、小檗碱、丹皮酚和大黄素甲醚的平均加样回收率分别为 100.92%、100.62%、99.45%、98.26%、99.89%、99.48%、100.18%、100.97%、99.35%、101.88%,详见表 2。

2.6.6 相对校正因子 取“2.3”项下混合对照品溶

表 2 10 个成分的加样回收结果

Table 2 Recovery results of the ten components from spiked samples

成分	序号	取样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	RSD/%	平均回收率/%
儿茶素	1	0.490 8	0.591	0.550	1.138	99.41	2.87	100.92
	2	0.502 1	0.581	0.575	1.153	99.41		
	3	0.499 8	0.544	0.559	1.141	106.78		
	4	0.500 7	0.589	0.550	1.136	99.44		
	5	0.510 2	0.543	0.577	1.121	100.07		
	6	0.501 1	0.544	0.571	1.118	100.41		
羟基红花黄色素 A	1	0.489 8	1.295	1.380	2.664	99.20	2.51	100.62
	2	0.500 9	1.366	1.354	2.761	103.06		
	3	0.501 0	1.357	1.341	2.708	100.73		
	4	0.511 2	1.310	1.344	2.697	103.19		
	5	0.499 9	1.310	1.338	2.601	96.47		
	6	0.498 8	1.357	1.324	2.695	101.09		
黄柏碱	1	0.501 5	0.899	0.875	1.752	97.50	2.34	99.45
	2	0.500 2	0.900	0.927	1.858	103.28		
	3	0.501 3	0.989	0.917	1.878	96.95		
	4	0.511 4	0.943	0.925	1.865	99.67		
	5	0.499 7	0.852	0.894	1.752	100.69		
	6	0.497 8	0.859	0.846	1.693	98.61		

表 2(续)

成分	序号	取样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	RSD/%	平均回收率/%
龙胆苦苷	1	0.500 4	0.168	0.157	0.323	98.88	1.25	98.26
	2	0.501 4	0.171	0.160	0.332	100.42		
	3	0.500 9	0.164	0.164	0.325	97.94		
	4	0.501 0	0.168	0.155	0.319	97.41		
	5	0.498 9	0.171	0.160	0.328	97.86		
	6	0.501 3	0.172	0.165	0.332	97.03		
木兰花碱	1	0.500 1	0.395	0.402	0.791	98.43	1.92	99.89
	2	0.498 8	0.440	0.406	0.835	97.38		
	3	0.500 4	0.427	0.432	0.869	102.51		
	4	0.501 2	0.435	0.410	0.845	100.01		
	5	0.499 0	0.440	0.410	0.847	99.41		
	6	0.501 0	0.411	0.408	0.826	101.61		
药根碱	1	0.500 8	0.124	0.120	0.246	101.19	1.57	99.48
	2	0.501 1	0.131	0.123	0.256	101.35		
	3	0.500 5	0.129	0.123	0.249	97.64		
	4	0.499 9	0.129	0.118	0.245	98.49		
	5	0.500 5	0.129	0.122	0.249	98.37		
	6	0.501 7	0.132	0.120	0.252	99.84		
黄芩苷	1	0.501 1	1.728	1.785	3.511	99.91	1.92	100.18
	2	0.499 7	1.732	1.785	3.521	100.21		
	3	0.498 5	1.611	1.660	3.318	102.81		
	4	0.500 0	1.667	1.710	3.327	97.07		
	5	0.500 9	1.653	1.572	3.219	99.65		
	6	0.501 3	1.611	1.678	3.312	101.41		
小檗碱	1	0.500 6	1.720	1.733	3.468	100.85	1.52	100.97
	2	0.499 1	1.655	1.629	3.328	102.71		
	3	0.498 9	1.694	1.708	3.375	98.42		
	4	0.501 1	1.695	1.695	3.409	101.12		
	5	0.500 1	1.703	1.682	3.392	100.41		
	6	0.500 7	1.694	1.617	3.348	102.34		
丹皮酚	1	0.501 0	0.263	0.262	0.522	98.92	1.27	99.35
	2	0.499 5	0.275	0.257	0.529	98.56		
	3	0.499 9	0.255	0.261	0.510	97.69		
	4	0.498 7	0.267	0.258	0.525	100.23		
	5	0.501 0	0.255	0.260	0.513	99.44		
	6	0.500 6	0.261	0.255	0.519	101.25		
大黄素甲醚	1	0.500 4	0.751	0.735	1.512	103.42	2.13	101.88
	2	0.500 3	0.767	0.806	1.561	98.63		
	3	0.499 7	0.743	0.727	1.469	99.83		
	4	0.498 9	0.733	0.732	1.496	104.17		
	5	0.499 6	0.745	0.737	1.502	102.84		
	6	0.500 4	0.753	0.728	1.499	102.39		

液,按“2.1”项色谱条件连续进样 6 次,每次 10 μL 。以黄芩苷为内参物,依据公式 $f_k/s=f_k/f_s=(C_k\times A_s)/(C_s\times A_k)$ (其中 C_k 为待测成分含量, A_k 为待测成分峰面积, C_s 为内标含量, A_s 为内标峰面积)计算其余 9 种成分的相对校正因子(RCF)。结果儿茶素、羟基

红花黄色素 A、黄柏碱、龙胆苦苷、木兰花碱、药根碱、小檗碱、丹皮酚和大黄素甲醚的平均 RCF 分别是 0.922 9、1.148 7、1.171 6、1.532 7、1.113 5、0.316 8、0.200 6、0.389 4、0.594 4,见表 3,RSD%均小于30%。

表 3 黄芩苷对各成分的相对因子($n=3$)Table 3 The relative factors of baicalin to each component ($n=3$)

序号	儿茶素	羟基红花黄色素 A	黄柏碱	龙胆苦苷	木兰花碱	药根碱	小檗碱	丹皮酚	大黄素甲醚
1	0.922 7	1.181 7	1.158 6	1.532 6	1.111 7	0.316 9	0.200 3	0.386 8	0.580 2
2	0.929 0	1.159 9	1.189 9	1.556 8	1.125 6	0.319 7	0.202 5	0.392 8	0.574 7
3	0.921 1	1.147 7	1.164 6	1.520 9	1.115 2	0.316 9	0.200 6	0.390 3	0.582 1
4	0.920 9	1.135 0	1.172 2	1.530 9	1.113 4	0.316 1	0.200 2	0.389 3	0.604 8
5	0.922 3	1.134 8	1.172 9	1.528 2	1.107 6	0.315 9	0.200 0	0.388 9	0.612 8
6	0.921 7	1.132 7	1.171 3	1.526 7	1.107 3	0.315 5	0.199 8	0.388 3	0.611 9
平均值	0.922 9	1.148 7	1.171 6	1.532 7	1.113 5	0.316 8	0.200 6	0.389 4	0.594 4
RSD%	0.33%	1.67%	0.90%	0.81%	0.60%	0.48%	0.48%	0.52%	2.91%

表 4 不同流速、柱温、色谱柱及仪器的影响

Table 4 Effects of varying flow rates, column temperatures, chromatographic columns, and instruments

影响因素	儿茶素	羟基红花黄色素 A	黄柏碱	龙胆苦苷	木兰花碱	药根碱	小檗碱	丹皮酚	大黄素甲醚	
不同体积流量/ (mL/min)	0.8	0.981 4	1.126 0	1.160 2	1.490 1	1.125 8	0.291 0	0.200 1	0.351 0	0.511 6
	1.0	0.996 6	1.154 4	1.155 7	1.535 3	1.160 5	0.298 4	0.202 9	0.358 7	0.500 5
	1.2	0.965 3	1.127 3	1.127 6	1.549 7	1.118 2	0.286 0	0.199 3	0.349 1	0.513 8
	平均值	0.981 1	1.135 9	1.147 8	1.525 0	1.134 8	0.291 8	0.200 8	0.352 9	0.508 6
	RSD/%	1.60	1.41	1.54	2.04	1.99	2.14	0.94	1.44	1.40
不同柱温/℃	25	1.035 7	1.169 4	1.152 7	1.521 2	1.112 9	0.285 5	0.197 3	0.348 6	0.518 6
	30	0.996 6	1.154 4	1.155 7	1.535 3	1.160 5	0.298 4	0.202 9	0.358 7	0.500 5
	35	1.020 4	1.141 9	1.184 9	1.490 8	1.130 5	0.288 5	0.198 9	0.344 3	0.517 1
	平均值	1.017 6	1.155 2	1.164 4	1.515 8	1.134 6	0.290 8	0.199 7	0.350 5	0.512 1
	RSD/%	1.94	1.19	1.53	1.50	2.12	2.32	1.44	2.11	1.96
不同色谱柱	Agilent HC C ₁₈	0.924 3	1.163 2	1.121 1	1.538 8	1.107 5	0.300 8	0.203 1	0.393 6	0.579 0
	Agilent SB C ₁₈	0.956 3	1.205 0	1.097 9	1.500 1	1.099 6	0.293 3	0.205 6	0.378 7	0.566 1
	LiChrospher RP-18	0.943 9	1.185 5	1.091 7	1.483 0	1.067 6	0.295 2	0.201 9	0.381 8	0.563 5
	平均值	0.941 5	1.184 6	1.103 6	1.507 3	1.091 6	0.296 4	0.203 5	0.384 7	0.569 5
	RSD/%	1.71	1.77	1.40	1.90	1.94	1.32	0.93	2.04	1.46
不同仪器	Agilent 1260(DEABB03888)	0.980 2	1.156 0	1.167 8	1.623 7	1.147 0	0.315 3	0.212 4	0.384 9	0.543 5
	Agilent 1260(DEABB0393)	1.024 1	1.177 4	1.166 1	1.594 9	1.134 2	0.312 6	0.212 7	0.383 9	0.536 5
	Agilent 1260(M8418AA)	0.980 7	1.144 1	1.159 5	1.561 6	1.124 2	0.305 9	0.212 7	0.370 5	0.523 2
	平均值	0.995 0	1.159 2	1.164 5	1.593 4	1.135 2	0.311 3	0.212 6	0.379 8	0.534 4
	RSD/%	2.53	1.46	0.38	1.95	1.01	1.54	0.09	2.11	1.93

2.6.7 不同条件对校正因子的影响 采用“2.3”项对照品溶液,参照“2.1”项色谱条件,分别考察流速(0.8、1.0、1.2 mL·min⁻¹)、柱温(25、30、35 ℃)、不同色谱柱($n=3$)以及不同仪器对 RCF 的影响,RSD 值均小于 3.0%详见表 4。

2.6.8 样品含量测定 取 14 批样品,按“2.2”项方法制备供试液,分别运用 QAMS 与 ESM 测定其中 10 种成分的含量,并比较两种方法所得结果的相对平均偏差(RAD),结果显示,各成分 RSD 值均小于 3.0%,如表 5,表明 QAMS 经验证可用于化癍止痛贴

膏的多指标含量测定。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

通过系统优化色谱条件以提升化癍止痛贴膏中多成分的分离效果。首先对不同的提取溶剂(50%、70%、100%甲醇)和超声时间(30、45、60 min)进行对比实验,显示 10 个成分在 70%甲醇的提取溶剂条件下超声 30 min 溶出率最高。接着在比较甲醇-水和乙腈-水体系后,确定乙腈-水系统具有更短分

表 5 QAMS 与 ESM 的测定结果

Table 5 Determination results of QAMS and ESM

序号	黄芩苷			儿茶素			羟基红花黄色素 A			黄柏碱			龙胆苦苷		
	ESM	ESM	QAMS	RSD/%	ESM	QAMS	RSD/%	ESM	QAMS	RSD/%	ESM	QAMS	RSD/%	ESM	QAMS
S1	3.802	1.281	1.312	1.69	2.979	2.916	1.52	1.829	1.845	0.60	0.281	0.270	2.94		
S2	3.811	1.316	1.369	2.80	2.905	2.840	1.57	1.823	1.839	0.61	0.279	0.269	2.64		
S3	3.705	1.242	1.291	2.73	2.985	2.893	2.26	2.015	2.021	0.23	0.352	0.365	2.56		
S4	3.668	1.250	1.300	2.75	2.913	2.848	1.57	1.978	1.986	0.30	0.360	0.371	2.16		
S5	3.636	1.251	1.281	1.65	3.014	2.899	2.77	1.981	1.989	0.30	0.361	0.374	2.67		
S6	3.705	1.295	1.347	2.79	2.985	2.893	2.26	2.015	2.021	0.23	0.352	0.366	2.76		
S7	3.668	1.250	1.290	2.19	2.913	2.848	1.57	1.978	1.986	0.30	0.360	0.375	2.91		
S8	3.636	1.251	1.281	1.65	3.014	2.949	1.57	1.981	1.989	0.30	0.361	0.374	2.67		
S9	4.127	1.308	1.360	2.77	2.887	2.772	2.90	1.875	1.887	0.47	0.349	0.336	2.70		
S10	4.143	1.286	1.337	2.74	2.861	2.756	2.64	1.890	1.902	0.44	0.350	0.336	2.93		
S11	4.528	1.371	1.417	2.30	2.829	2.768	1.57	1.814	1.829	0.58	0.324	0.312	2.67		
S12	4.123	1.312	1.364	2.77	2.894	2.839	1.40	1.876	1.889	0.47	0.349	0.335	2.88		
S13	4.123	1.308	1.361	2.77	2.885	2.780	2.64	1.871	1.884	0.48	0.349	0.337	2.64		
S14	4.127	1.252	1.301	2.71	2.649	2.565	2.30	1.759	1.778	0.73	0.349	0.335	2.91		

序号	木兰花碱			药根碱			小檗碱			丹皮酚			大黄素甲醚		
	ESM	QAMS	RSD/%												
S1	0.730	0.757	2.55	0.261	0.270	2.24	3.784	3.707	1.45	0.578	0.584	0.70	1.803	1.740	2.54
S2	0.736	0.713	2.21	0.262	0.271	2.24	3.807	3.730	1.46	0.578	0.583	0.70	1.719	1.651	2.84
S3	0.583	0.607	2.80	0.271	0.279	2.25	3.726	3.651	1.45	0.561	0.567	0.71	1.461	1.405	2.76
S4	0.869	0.959	6.93	0.271	0.279	2.25	3.729	3.654	1.44	0.560	0.566	0.72	1.653	1.589	2.76
S5	0.923	0.957	2.60	0.270	0.278	2.25	3.746	3.670	1.44	0.560	0.565	0.72	1.648	1.589	2.56
S6	0.896	0.927	2.48	0.278	0.287	2.25	3.726	3.651	1.45	0.561	0.567	0.71	1.257	1.216	2.35
S7	0.869	0.900	2.45	0.271	0.279	2.25	3.729	3.654	1.44	0.560	0.566	0.72	1.653	1.589	2.76
S8	0.923	0.957	2.60	0.270	0.278	2.25	3.746	3.670	1.44	0.560	0.565	0.72	1.648	1.589	2.56
S9	0.863	0.890	2.22	0.285	0.294	2.22	3.708	3.631	1.48	0.586	0.592	0.68	1.634	1.586	2.10
S10	0.862	0.890	2.19	0.288	0.297	2.22	3.714	3.637	1.48	0.585	0.591	0.68	1.628	1.561	2.98
S11	0.945	0.914	2.38	0.315	0.325	2.20	3.622	3.546	1.50	0.611	0.616	0.65	1.638	1.579	2.59
S12	0.859	0.891	2.53	0.285	0.294	2.22	3.697	3.621	1.48	0.587	0.592	0.68	1.642	1.579	2.76
S13	0.890	0.921	2.42	0.285	0.294	2.22	3.704	3.627	1.48	0.586	0.592	0.68	1.637	1.579	2.56
S14	0.863	0.890	2.22	0.285	0.294	2.22	3.995	3.913	1.48	0.527	0.532	0.69	1.532	1.476	2.60

析时间和更高分离效率。进一步筛选水相添加剂,发现 0.1%甲酸效果较好,但仍存在峰拖尾与灵敏度不足;提高甲酸浓度至 1%可显著改善峰形,但部分色谱峰分离度下降。通过添加 0.1%三乙胺,在维持良好峰形的同时显著提高了分离度,最终确定流动相为乙腈-1%甲酸(含 0.1%三乙胺)水溶液。在优化柱温与检测波长时,比较多个波长(254、280、300 nm),实验结果显示,280 nm 波长下各成分吸收响应最高,且 30 ℃柱温下各成分分离度与峰形最佳,故确定柱温 30 ℃、检测波长 280 nm 为最终色谱条件。

3.2 特征图谱结果分析

本研究建立了化瘀止痛贴膏的特征图谱,指认

了 10 个来源于处方中各药味的化学成分,并通过色谱峰归属分析明确了其物质组成,为该制剂的药剂物质研究提供了依据。14 批样品的相似度均大于 0.90,表明产品质量总体稳定。CA 显示多数批次化学组成一致性较高;PCA 进一步将样品分为 3 簇,提示存在一定批次间差异。OPLS-DA 模型($R^2Y=0.939$, $Q^2=0.899$)分类性能良好,得分图显示 S14 为离散样本,其余批次聚集良好,反映工艺总体稳定。

3.3 多成分测定指标的选择

基于“君、臣、佐、使”的组方原则^[6],化瘀止痛贴膏中黄柏为君药,功能清热燥湿、泻火解毒,契合主治病机。赤芍与大黄共为臣药,协同增强清热逐瘀、

和营止痛之效。牡丹皮与赤芍相须为用,强化凉血散瘀之功;柴胡、黄芩、栀子配伍,共奏升阳和解、退热透邪之效^[7-9]。现代研究表明,方中多味药材的主要活性成分(如黄柏中的小檗碱、黄柏碱等生物碱类成分,黄芩中的黄芩苷,大黄中的大黄素甲醚,红花中的羟基红花黄色素 A,龙胆中的龙胆苦苷,以及广泛存在的儿茶素)均具有抗炎、抗氧化、抗菌等药理活性^[10-20]。因此,本研究结合指纹图谱,选取上述 10 种成分(儿茶素、羟基红花黄色素 A、黄柏碱、龙胆苦苷、木兰花碱、药根碱、黄芩苷、小檗碱、丹皮酚和大黄素甲醚)作为质量评价的指标成分。

3.4 QAMS 与 ESM 结果分析

相较于传统 ESM 在多组分含量测定中对大量高纯度对照品的依赖,QAMS 基于 RCF,仅需一个内参物即可实现多成分同步定量,显著降低了成本与对照品可获得性门槛,更适用于复杂体系的质量控制^[21-22]。本研究系统验证了色谱柱类型、柱温及流速对 RCF 的影响,证实该方法耐用性良好。黄芩苷因含量适宜、峰形对称、分离度佳及保留行为稳定,被选为内参物,并据此成功建立化瘀止痛贴膏的 QAMS 分析方法^[23]。QAMS 与 ESM 测定结果无显著差异,表明该方法可用于该制剂中多指标成分的含量控制。

综上所述,本研究将指纹图谱与 QAMS 相结合,构建了一套从整体化学特征到特定成分精准定量的综合质量评价体系,用于全面评估化瘀止痛贴膏的产品质量,并通过化学判别模式体现出不同批次样品间的差别。所建立的方法操作简便、分析效率高、结果准确可靠。化瘀止痛贴膏需求量较大,在临床应用前景广泛,本研究为提升和完善化瘀止痛贴膏的质量标准提供了科学依据和切实可行的解决方案。

参考文献

[1] 刘永利,何运恒,卢昌怀,等. 治伤巴布剂对大鼠急性软组织损伤模型炎症因子及氧化应激的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(6): 893-898.

[2] VON RÜDEN C, WUNDER J, SCHIRDEWAHN C, et al. Initial treatment of severe soft-tissue injuries in closed and open fractures to prevent fracture-related infection[J]. Injury, 2024, 55: 111935.

[3] 董晨鑫,程璐瑶,甘叶娜,等. 著名骨伤专家刘寿山筋骨病辨治

学术思想撷芳[J]. 中国医药导报, 2022, 19(28): 128-131.

[4] 滕泽学. 中药指纹图谱在药品检验中的应用及质量评价[J]. 实验室检测, 2025, 3(9): 151-153.

[5] 王智民,高慧敏,付雪涛,等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925-1928.

[6] 林永鸿,黄明达. 浅谈中药处方中君臣佐使的重要性[J]. 中医临床研究, 2019, 11(33): 141-142.

[7] 李岳,杨甜甜,周新苗,等. 柴胡-黄芩药对功效及临床应用[J]. 中成药, 2022, 44(11): 3721-3723.

[8] 常甜,姜泉,彭秋伟. 基于君臣佐使理论浅析姜泉运用药对治疗类风湿关节炎经验[J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(9): 35-38.

[9] 王志斌,唐文,童康,等. 基于病-证-症结合视域对方药配伍的思考[J]. 北京中医药大学学报, 2024, 47(7): 929-933.

[10] 王利娟,吴丹,徐先祥. 黄柏碱药理活性研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2025, 44(5): 81-85.

[11] 王玲,杜潇,祝华莲,等. 黄柏有效成分的药理作用研究进展[J]. 江苏中医药, 2022, 54(4): 77-81.

[12] 曹津津,孙启瑞,李文红,等. 木兰花碱的荧光性质及其在中药分析中的应用研究[J]. 分析化学, 2019, 47(6): 950-956.

[13] 胡蕊,尹丽,陶晓倩,等. 药根碱的研究进展[J]. 山东化工, 2021, 50(21): 78-79, 82.

[14] 陆琦,王婧斯,都暖,等. 黄芩苷药理作用及应用研究进展[J]. 临床合理用药, 2025, 18(10): 176-181.

[15] 刘钊,杨鸿,李雪丽. 大黄素甲醚通过影响 AKT 信号通路抑制 LPS 诱导人巨噬细胞的炎症反应[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(3): 566-569.

[16] 李明秀,李青松,杨晓彤,等. 龙胆苦苷作用于疾病的分子机制[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2025, 27(4): 950-961.

[17] 周露露,高原,牛智慧,等. 茶叶中儿茶素的药理作用及其研究进展[J]. 辽宁化工, 2018, 47(4): 316-318, 363.

[18] 孙武燕,张娟,张炫,等. 基于 JNK 信号通路和线粒体氧化应激研究儿茶素拮抗对乙酰氨基酚诱导肝损伤的作用机制[J]. 中草药, 2024, 55(8): 2589-2600.

[19] 曾健,李聪,熊磊,等. 大黄有效成分及其药理作用研究进展[J]. 山东化工, 2024, 53(10): 135-137, 141.

[20] ZHAO F, WANG P, JIAO Y Y, et al. Hydroxysafflor yellow A: A systematical review on botanical resources, physicochemical properties, drug delivery system, pharmacokinetics, and pharmacological effects[J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: 579332.

[21] 熊贤招,祝瑶露,汪新婵,等. 中药质量分析方法研究进展[J]. 中国医药科学, 2025, 15(1): 35-38.

[22] 王玉梅,胡青,孙健,等. 一测多评法同时测定麻黄配方颗粒中 5 种生物碱[J]. 中成药, 2023, 45(5): 1438-1442.

[23] 蔡晓翠,程江南,顾政一,等. 复方蒿芩滴鼻剂特征图谱结合一测多评法的质量评价研究[J]. 中国药理学杂志, 2025, 60(17): 1858-1868.