

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.23.018

基于高效液相色谱指纹图谱结合 PLS - DA 的肝复康丸质量控制

苏 若¹, 李桂女²

(1. 海南医学院第二附属医院, 海南 海口 570102; 2. 海南医学院第一附属医院, 海南 海口 570100)

摘要:目的 建立肝复康丸高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 结合偏最小二乘判别分析(PLS - DA)法, 为其质量标准的提升提供参考。方法 色谱柱为 Agilent Ecilipse C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 - 0.05% 醋酸溶液(梯度洗脱), 流速为 0.95 mL/min, 检测波长为 203 nm(太子参环肽 B)、238 nm(车叶草苷和去乙酰车叶草酸酐)、254 nm(五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素)、320 nm(阿魏酸和 4 - 香豆酸)及 369 nm(槲皮素和山柰素), 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012A 版建立 HPLC 指纹图谱。采用 PLS - DA 法分析 4 个生产厂家共 16 批肝复康丸的质量。结果 建立了 16 批肝复康丸的 HPLC 指纹图谱, 确认了 26 个共有峰; 16 批肝复康丸相似度为 0.894~0.959; 通过与对照品比对, 共标定 11 个色谱峰。PLS - DA 分析结果显示, 4 个生产厂家的肝复康丸成分较一致, 但 26 个共有峰含量存在差异, 并确定了导致质量差异的 5 个差异标志物。结论 建立的 HPLC 指纹图谱操作简单、准确、重复性好, 与 PLS - DA 相结合, 可为肝复康丸的质量标准提升提供参考。

关键词:肝复康丸; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 偏最小二乘判别分析; 质量控制

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006 - 4931(2022)23 - 0080 - 05

Quality Control of Ganfukang Pills Based on HPLC Fingerprint Combined with PLS - DA

SU Ru¹, LI Guinyu²

(1. The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan, China 570102; 2. The First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan, China 570100)

Abstract: Objective To establish the high - performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of Ganfukang Pills, and to provide a reference for improving their quality standard combined with the partial least squares - discriminant analysis (PLS - DA) method. **Methods** The chromatographic column was Agilent Ecilipse C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.05% acetic acid solution (gradient elution), and the flow rate was 0.95 mL/min. The detection wavelengths were 203 nm (heterophyllin B), 238 nm (asperuloside and deacetylation plantain anhydride), 254 nm (schisandrin, schisantherin A, deoxyschisandrin and γ - schisandrin), 320 nm (ferulic acid and 4 - coumaric acid) and 369 nm (quercetin and kaempferide). The column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. The HPLC fingerprint was established by the Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Version 2012A). The quality of 16 batches of Ganfukang Pills from four manufacturers was analyzed by the PLS - DA method. **Results** The HPLC fingerprint of 16 batches of

第一作者: 苏若, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为医院药学和药品质量分析, (电子信箱)785696021@qq.com。

强、重复性好, 可用于荆防合剂的质量控制。

参考文献

- [1] 陈文璐, 张怡萍, 牟艳芳, 等. 基于生物信息技术的荆防颗粒治疗冠状病毒感染疾病机制探析[J]. 中草药, 2020, 51(15): 3937 - 3951.
- [2] 赵 琰. 荆防败毒散: 应用历史久远的经典治疫名方[N]. 中国医药报, 2021 - 02 - 05(003).
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 233.
- [4] 任晓蕾, 霍金海, 张树明, 等. 川菊止痛胶囊的质量标准研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(5): 571 - 574.
- [5] 张雪梅, 张刘伟, 梁宗锁, 等. 乳核散结胶囊中相关药材薄层色谱鉴别[J]. 中国药业, 2020, 29(11): 70 - 73.
- [6] 刘卫根, 王亮生, 徐文华, 等. 不同商品等级羌活中有机酸和香豆素类化合物的测定[J]. 中成药, 2012, 34(11): 2181 - 2186.
- [7] 张幸福, 范莹莹, 王 菲, 等. RP - HPLC 法测定 5 种剂型的九味羌活制剂中紫花前胡苷、异欧前胡素[J]. 中成药, 2014, 36(7): 1458 - 1461.
- [8] 魏晓锐, 徐金玲, 刘艳霞. 高效液相色谱法同时测定胆胃平颗粒中柚皮苷和新橙皮苷含量[J]. 中国药业, 2017, 26(11): 28 - 30.
- [9] 姚 娜, 黄燕明, 李雪银, 等. HPLC 同步测定麸炒枳壳配方颗粒特征图谱与柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷含量[J]. 中国现代中药, 2019, 21(11): 1569 - 1572.
- [10] 沈 燕, 韩 超, 黄芳珍, 等. 高效液相色谱 - 串联质谱法测定羌活中异欧前胡素和紫花前胡苷[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(12): 2088 - 2091.
- [11] 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.
- [12] 廖华丽, 丁冬梅, 李 清. 防风薄层色谱指纹图谱的建立及其方法学研究[J]. 山西医科大学学报, 2018, 49(6): 644 - 649.

(收稿日期: 2022 - 03 - 03; 修回日期: 2022 - 06 - 27)

Ganfukang Pills were established, and 26 common peaks were identified. The similarity of 16 batches of Ganfukang Pills was in the range of 0.894 – 0.959. A total of 11 chromatographic peaks were identified by the comparison with the reference. The results of PLS – DA analysis showed that the components of Ganfukang Pills from four manufacturers were relatively consistent, but the contents of 26 common peaks were different, and five different markers leading to the quality differences of Ganfukang Pills from four manufacturers were identified. **Conclusion** The established HPLC fingerprint is simple, accurate and repeatable, which can provide a reference for improving the quality standard of Ganfukang Pills combined with PLS – DA.

Key words: Ganfukang Pills; HPLC; fingerprint; partial least squares – discriminant analysis; quality control

肝复康丸是由五味子、太子参、白花蛇舌草加工而成的复方丸剂,具有收敛、益气、解毒、降低转氨酶的功效,常用于急慢性肝炎、早期肝硬化、肝功能不良等症^[1]。《中华人民共和国卫生部药品标准 中药成方制剂(第七册)》WS₃ – B – 1146 – 92中仅采用薄层色谱法对五味子、太子参、白花蛇舌草做了定性鉴别,以及检查丸剂通则项下相关项目^[1]。文献[2 – 3]也仅对五味子单味药材中的五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素等成分做了方法学研究,方法专属性低,无法全面、准确地评价肝复康丸的质量。指纹图谱以高效液相色谱(HPLC)法为分析手段,与指标成分定量分析相结合,用于评价中药制剂质量的整体性和稳定性^[4]。偏最小二乘判别分析(PLS – DA)法是通过主成分分析(PCA)结合统计软件,实现分类和筛选差异标志物的目的^[5]。中药指纹图谱结合 PLS – DA 和 PCA 等化学模式识别技术具有直观性及预测性等特点,已广泛应用于中药质量的控制和评价^[6 – 7]。本研究中采用 HPLC 法建立了肝复康丸的指纹图谱,并指出其中 11 种成分,同时结合 PLS – DA 分析了 4 个生产厂家的 16 批样品,为肝复康丸的质量评价提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);XS525 型电子天平(瑞士梅特勒 – 托利多集团,精度为 0.01 mg);KQ – 500DBG 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 450 W,频率为 40 kHz);QYSW – 30A 型超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 试药

五味子醇甲对照品(批号为 110957 – 202025,含量为 99.5%),五味子酯甲对照品(批号为 111549 – 202006,含量为 95.9%),五味子甲素对照品(批号为 110763 – 202115,含量为 99.1%),五味子乙素对照品(批号为 110767 – 202013,含量为 99.6%),槲皮素对照品(批号为 100181 – 202110,含量为 99.5%),山柰素对照品(批号为 110861 – 202117,含量为 95.2%),4 – 香豆酸对照品(批号为 112057 – 202009,含量为 99.3%),阿魏酸对照品(批号为 110783 – 202111,含量为 98.7%),均购自中国食品药品检定研究院;太子参环肽 B

对照品(批号为 200511,含量 ≥ 98.1%),车叶草苷对照品(批号为 191218,含量 ≥ 98.0%),去乙酰车叶草酸酐对照品(批号为 1911018,含量 ≥ 96.8%),均购自四川省维克奇生物科技有限公司;乙腈、甲醇、磷酸均为色谱纯;肝复康丸为市售,其相关信息见表 1。

表 1 肝复康丸样品信息、生产厂家与规格

Tab. 1 Information, manufacturers and specifications of

Ganfukang Pills samples					
编号	批号	生产厂家(规格)	编号	批号	生产厂家(规格)
A1	200523	湖北瑞华制药有限公司(每袋 6 g)	C1	200316	湖北诺得胜制药有限公司(每袋 6 g)
A2	200917		C2	200622	
A3	201026		C3	200907	
A4	201110		C4	201113	
B1	20190919	健民药业集团股份有限公司(每袋 3 g)	D1	1911094	陕西金象制药有限公司(每袋 6 g)
B2	20200522		D2	2005113	
B3	20200910		D3	2006245	
B4	20201124		D4	2009174	

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[8 – 10]与系统适用性试验

色谱柱:Agilent Ecilipse C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A) – 0.05% 醋酸溶液(B),梯度洗脱(程序见表 2);流速:0.95 mL / min;检测波长:203 nm(太子参环肽 B),238 nm(车叶草苷和去乙酰车叶草酸酐),254 nm(五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素),320 nm(阿魏酸和 4 – 香豆酸),369 nm(槲皮素和山柰素);柱温:30 ℃;进样量:10 μL。在此色谱条件下,11 个成分与相邻色谱峰的分离度均大于 1.5,对称因子为 0.96 ~ 1.06,表明系统适用性良好。

表 2 流动相梯度洗脱程序(%)

Tab. 2 Program of gradient elution of mobile phase (%)

时间	流动相 A	流动相 B	时间	流动相 A	流动相 B
0 ~ 10 min	6	94	32 ~ 40 min	35	65
10 ~ 20 min	6 → 15	94 → 85	40 ~ 44 min	35 → 65	65 → 35
20 ~ 32 min	15 → 35	85 → 65	44 ~ 70 min	65 → 88	35 → 12

2.2 溶液制备

分别取五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、车叶草苷、去乙酰车叶草苷酸、槲皮素、太子参环肽 B、山柰素、阿魏酸、4 – 香豆酸对照品各适量,精密称定,加甲醇溶解成质量浓度分别为 182.7, 236.7,

218.3, 200.8, 240.2, 366.8, 147.2, 198.5, 201.2, 421.5, 202.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液。分别取16批样品, 每批5袋, 研细, 混匀, 取2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入85%甲醇50 mL, 密塞, 静置1 h, 称定质量, 室温超声提取(功率为450 W, 频率为40 kHz) 40 min, 放冷至室温, 再次称定质量, 用85%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液, 按2.1项下色谱条件连续进样测定6次, 以车叶草苷(14号峰)为参照。结果26个共有峰相对保留时间的RSD为0.14%~0.54% ($n=6$), 相对峰面积的RSD为0.28%~0.97% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(编号为A3), 按2.2项下方法制备供试品溶液, 室温下放置0, 5, 10, 15, 20, 24, 48, 72 h时按2.1项下色谱条件进样测定, 以车叶草苷(14号峰)为参照。结果26个共有峰相对保留时间的RSD为0.35%~1.09% ($n=8$), 相对峰面积的RSD为0.69%~2.37% ($n=8$), 表明供试品溶液在室温下放置72 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(编号为A3), 按2.2项下方法制备供试品溶液, 共6份, 按2.1项下色谱条件进样测定, 以车叶草苷(14号峰)为参照。结果26个共有峰相对保留时间的RSD为0.77%~1.96% ($n=6$), 相对峰面积的RSD为0.91%~1.93% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

2.4 指纹图谱研究

2.4.1 指纹图谱及对照指纹图谱生成与共有峰确定

按2.2项下方法制备16批样品的供试品溶液, 按2.1项下色谱条件进样测定, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统2012A版分析。以A4为参照图谱, 获得16批样品的HPLC叠加指纹图谱。由图1可知, 共有峰

有26个。通过与混合对照品溶液保留时间比对, 共标定11个色谱峰, 分别为去乙酰车叶草酸酐(1号峰)、阿魏酸(5号峰)、4-香豆酸(6号峰)、槲皮素(10号峰)、山柰素(12号峰)、车叶草苷(14号峰)、太子参环肽B(18号峰)、五味子醇甲(20号峰)、五味子酯甲(22号峰)、五味子甲素(23号峰)、五味子乙素(24号峰)。详见图2。16批样品的相似度分别为0.941, 0.939, 0.947, 0.933, 0.956, 0.951, 0.959, 0.953, 0.894, 0.897, 0.900, 0.899, 0.913, 0.916, 0.915, 0.920, 表明样品质量总体稳定。

2.4.2 参照峰选择及相对峰面积和相对保留时间计算

由图1和图2可知, 车叶草苷(14号峰)峰面积响应大且与前后峰分离好, 故以车叶草苷为参照。16批样品HPLC叠加指纹图谱中各共有峰相对保留时间的RSD为0.19%~1.95%, 相对峰面积的RSD为1.14%~2.87%。

2.5 PLS-DA 模型建立与分析

2.5.1 PLS-DA 模型建立

为分析不同厂家样品的差异性, 将26个共有峰峰面积导入SIMCA 14.1软件, 启动PLS-DA程序, 获得PLS-DA模型^[11]。提取2个主成分, 行置换检验(设置分类矩阵变量, 随机排列20次), R^2 拟合直线和 Q^2 拟合直线在Y坐标轴的截距分别为0.573和-0.255, 提示所建模型不存在过拟合现象。详见图3。

2.5.2 PLS-DA

PLS-DA模型中所有数据点均在95%置信区间内, 表明4个生产厂家样品的整体质量差异不大; 同一厂家样品紧密聚集, 各批次间差距小, 表明产品质量稳定(图4)。PLS-DA载荷散点图中, 距离中心离散程度越远, 成分权重越大, 对样品差异性作用也越大。太子参环肽B(18号峰)、五味子醇甲(20号峰)、车叶草苷(14号峰)、五味子甲素(23号峰)、五味子乙素(24号峰)

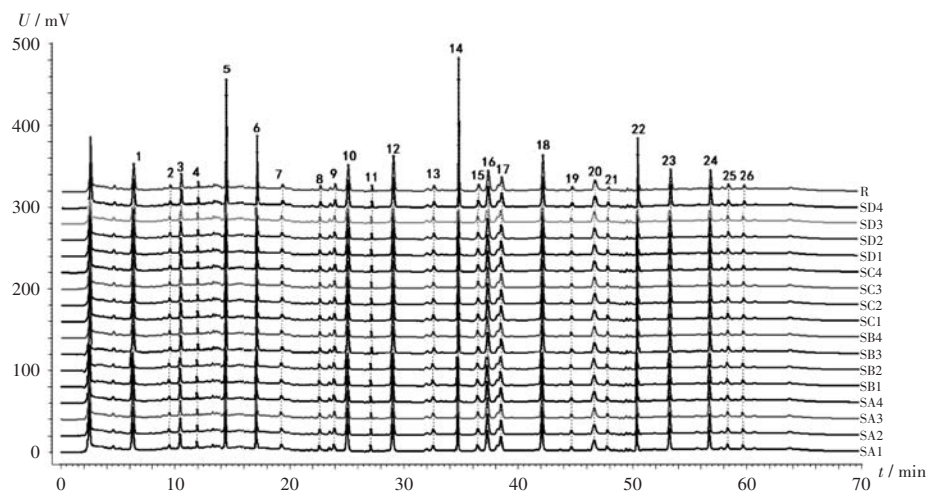
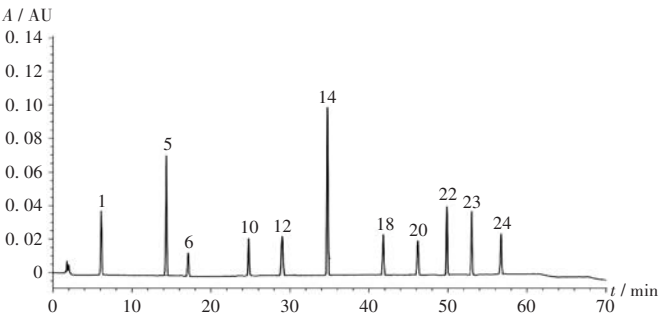


图1 16批肝复康丸高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig.1 HPLC superimposed fingerprint of 16 batches of Ganfukang Pills



1. 去乙酰车叶草酸酐 5. 阿魏酸 6. 4-香豆酸 10. 槲皮素
12. 山柰素 14. 车叶草苷 18. 太子参环肽B 20. 五味子醇
甲 22. 五味子酯甲 23. 五味子甲素 24. 五味子乙素

图2 混合对照品溶液高效液相色谱图

1. Deacetylation plantain anhydride 5. Ferulic acid 6. 4-Coumaric acid
10. Quercetin 12. kaempferide 14. Asperuloside 18. Heterophyllin B
20. Schisandrin 22. Schisantherin A 23. Deoxyschizandrin
24. γ -Schisandrin

Fig. 2 HPLC chromatograms of mixed reference solution

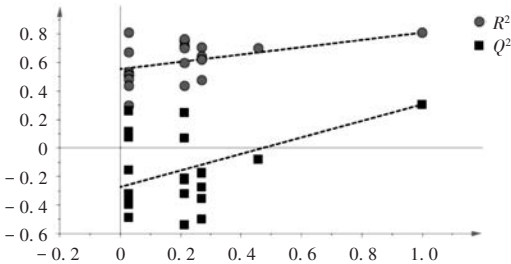


图3 PLS-DA模型置换检验图

Fig. 3 Permutation test of PLS-DA

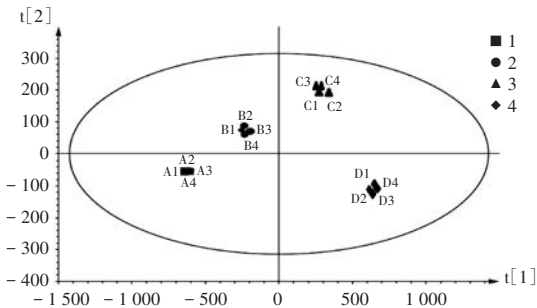


图4 4个厂家肝复康丸的PLS-DA得分散点图

Fig. 4 PLS-DA scoring plot of Ganfukang Pills from four manufacturers

5种成分距离中心离散程度较远(图5)。10个色谱峰的变量重要性投影大于1为差异标志物,其中太子参环肽B、五味子醇甲、车叶草苷、五味子甲素及五味子乙素5个已知化合物对结果权重影响大于50%。详见图6。

3 讨论

3.1 指认指标选择

肝复康丸的君药五味子来源于木兰科植物五味子的干燥成熟果实,被《神农本草经》列为上品,其药理作用为保肝、抗氧化、调节中枢神经系统等。五味子含有木脂素、挥发油、有机酸、多糖等多种化合物,其中五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素在木脂

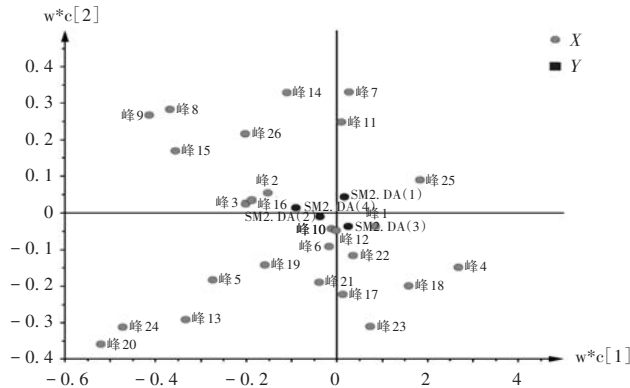


图5 16批肝复康丸的PLS-DA载荷散点图

Fig. 5 PLS-DA loading plot of 16 batches of Ganfukang Pills

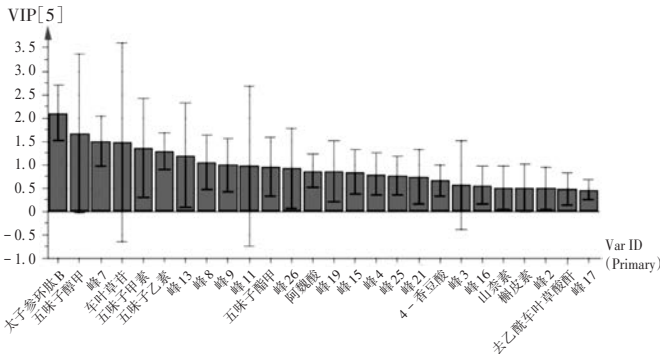


图6 PLS-DA变量重要性投影值图

Fig. 6 Variable importance in the projection plot of PLS-DA

素类成分中含量高^[12-13]。太子参药食两用,具有健脾益气、润肺生津功效,为石竹科孩儿参干燥块根,广泛用于治疗肝炎、心绞痛及冠状动脉粥样硬化性心脏病等症,主要活性成分为太子参环肽类、氨基酸类、脂肪酸类、微量元素类等,且太子参环肽B较其他环肽含量大^[14-15]。民间最常用的抗肿瘤中草药为白花蛇舌草,以全草入药,味苦、甘,性寒,常用于治疗肝炎、咽喉痛、肝癌、胃癌等症^[16-17],目前从白花蛇舌草中分离出的化学成分主要有环烯醚萜类化合物(车叶草苷和去乙酰车叶草酸酐)、黄酮类化合物(槲皮素和山柰素)及有机酸类(阿魏酸和4-香豆酸)等。故本研究中选择五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、车叶草苷、去乙酰车叶草酸酐、槲皮素、太子参环肽B、山柰素、阿魏酸、4-香豆酸为指认指标,并考察方中指标性成分对不同厂家样品质量稳定性的影响^[18]。

3.2 色谱条件选择

曾考察不同检测波长(190~400 nm),流动相不同溶剂(有机相为甲醇或乙腈,无机相为0.05%磷酸或0.05%醋酸)及同梯度比例,不同柱温(25, 30, 35℃),不同流速(0.8, 0.9, 1.0 mL/min),不同超声提取次数(1次、2次、3次),不同品牌色谱柱(Kromasil C₁₈柱、Agilent Ecilipse C₁₈柱)及不同品牌高效液相色谱仪(Agilent 1260型高效液相色谱仪、Ultimate型高效液相色谱仪)对肝