

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)24-0058-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.24.013



人参叶配方颗粒高效液相色谱指纹图谱及化学模式识别研究*

黄凯伟^{1,2}, 张 辉^{1,2Δ}, 许树萍^{1,2}, 杨惠琳^{1,2}, 李仰华^{1,2}, 赵伟志^{1,2}, 谭 沛^{1,2}

(1. 华润三九医药股份有限公司, 广东 深圳 518110; 2. 华润三九现代中药制药有限公司, 广东 惠州 516000)

摘要:目的 为人参叶配方颗粒的质量控制和评价提供参考。方法 采用高效液相色谱(HPLC)法, 色谱柱为 CORTECS T₃ 柱(150 mm × 4.6 mm, 2.7 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 203 nm, 柱温为 25 °C, 进样量为 10 μL。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)建立 21 批样品的 HPLC 指纹图谱, 确定共有峰, 并进行相似度评价。采用聚类分析(CA)法、主成分分析(PCA)法、正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)法评价不同批次样品的质量差异, 并筛选标志物。结果 共标定了 14 个共有峰, 指认了 4 个特征峰, 分别为山柰酚-3-O-槐糖苷、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rd; 21 批样品的相似度均大于 0.900; CA 结果表明 21 批样品可聚为 3 类; PCA 提取到 4 个主成分, 方差累积贡献率为 91.119%; OPLS-DA 结果表明山柰酚-3-O-槐糖苷是对人参叶配方颗粒影响较大的标志物。结论 该方法简便、可行, 重复性、精密度、稳定性较好, 可为人参叶配方颗粒质量控制及整体性评价提供参考。

关键词: 人参叶; 配方颗粒; 指纹图谱; 高效液相色谱法; 质量评价; 化学模式识别

Study on HPLC Fingerprint and Chemical Pattern Recognition of Ginseng Folium Formula Granules

HUANG Kaiwei^{1,2}, ZHANG Hui^{1,2}, XU Shuping^{1,2}, YANG Huilin^{1,2}, LI Yanghua^{1,2}, ZHAO Weizhi^{1,2}, TAN Pei^{1,2}

(1. China Resources Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen, Guangdong, China 518110; 2. China Resources Sanjiu Modern Chinese Medicine Pharmaceutical Co., Ltd., Huizhou, Guangdong, China 516000)

Abstract: Objective To provide a reference for the quality control and evaluation of Ginseng Folium Formula Granules. **Methods** The high-performance liquid chromatography (HPLC) method was adopted; the chromatographic column was the CORTECS T₃ column (150 mm × 4.6 mm, 2.7 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 203 nm, the column temperature was 25 °C, and the injection volume was 10 μL. The Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (2012 Version) was used to establish HPLC fingerprint of 21 batches of samples, the common peaks were marked, and the similarity evaluation was performed. The quality of samples from different batches was evaluated by the cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) methods, and the markers were screened. **Results** A total of 14 common peaks were marked, of which four were identified, including kaempferol-3-O-sophoroside, ginsenoside R_{g1}, ginsenoside Re and ginsenoside Rd. The similarity of 21 batches of samples was greater than 0.900. The CA showed that 21 batches of samples were clustered into three groups. The PCA showed that four principal components were extracted, with a cumulative variance contribution rate of 91.119%. The OPLS-DA showed that kaempferol-3-O-sophoroside had a significant effect on Ginseng Folium Formula Granules. **Conclusion** This method is simple, feasible, repeatable, precise and stable, which can provide a reference for quality control and overall evaluation of Ginseng Folium Formula Granules.

Key words: Ginseng Folium; formula granules; fingerprint; HPLC; quality evaluation; chemical pattern recognition

* 基金项目: 广东省深圳市科技计划项目[JSGG20191129093418578]。

第一作者: 黄凯伟, 男, 硕士研究生, 主管中药师, 研究方向为中药配方颗粒工艺及质量标准, (电子信箱)huangkaiwei3@999.com.cn。

Δ通信作者: 张辉, 男, 大学本科, 高级工程师, 研究方向为中药配方颗粒工艺及质量标准, (电子信箱)ycahui@999.com.cn。

新药杂志, 2014, 23(19): 2034-2038.

[18] 王 琦. 刺五加总苷对水平台所致大鼠睡眠剥夺的睡眠周期的影响[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2014.

[19] 朱 蕾, 张 茹, 李廷利. 刺五加对睡眠剥夺大鼠学习记忆及海马单胺类神经递质的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 219-223.

[20] 董 梅. 刺五加水煎液改善睡眠作用的机制研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2011.

[21] 卞宏生, 蔡江莹, 杨凡静. 刺五加总苷及刺五加苷 B 对持续黑暗条件下果蝇睡眠-觉醒节律的量效关系研究[J]. 中国药物依赖性杂志, 2020, 29(3): 231-236.

[22] LAU KM, YUE GG, CHAN YY, et al. A review on immunomodulatory activity of Acanthopanax senticosus and its active components[J]. Chin Med, 2019, 14: 25.

[23] ASHTON JE, HARRINGTON MO, LANGTHORNE D, et al. Sleep deprivation induces fragmented memory loss[J]. Learn Mem, 2020, 27(4): 130-135.

(收稿日期: 2024-04-09; 修回日期: 2024-06-27)

药材人参叶是五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥叶。2020年版《中国药典(一部)》记载,人参叶性寒,味甘、苦,归肺、胃经,补气,益肺,祛暑,生津,用于气虚咳嗽、暑热烦躁、津伤口渴等治疗^[1]。现代研究表明,人参叶成分主要包括人参皂苷^[2]、黄酮^[3]等,药理作用主要有抗氧化^[4-5]、免疫调节^[6]、保护心肺^[7]等。与人参相比,人参叶价格低廉且原料来源丰富,有研究建立了人参叶药材指纹图谱分析的高效液相色谱(HPLC)法,并对多个产地的人参叶进行了指纹图谱研究^[8],有报道分析了重庆市石柱土家族自治县和吉林省白山市抚松县产人参叶的指纹图谱,结果均表明不同产地的人参叶主要成分相对含量存在一定差异^[9]。人参叶配方颗粒是由人参叶药材饮片经提取浓缩干燥制粒而成,易携带、免煎易服且疗效确切^[10-11]。为加强其质量控制及促进其临床合理使用,本研究中采用HPLC法建立了人参叶配方颗粒的指纹图谱,并采用化学模式识别技术对指纹图谱进行分析。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters e2695型色谱系统(美国Waters公司),配有Alliance2695型四元梯度输液泵、120位高性能自动进样器、原装进口色谱柱温箱、Waters 2998型二极管阵列检测器、Empower色谱管理系统;XS204型电子天平(精度0.1 mg),ME36S型电子天平(精度0.001 mg),均购自瑞士Mettler Toledo公司;KUDOS型超声仪(上海科导超声仪器有限公司);UPLHW-IV型超纯水过滤系统(四川优普超纯科技有限公司)。

1.2 试剂

人参配方颗粒(华润三九医药股份有限公司),21批,编号为S1-S21,其中S1-S9和S16-S21、S10-S12、S13-S15样品产地分别为吉林省白山市、通化市、本溪市;山柰酚-3-O-槐糖苷对照品(上海鸿永生物科技有限公司,批号为19895-95-5,含量90.8%);人参皂苷Rg₁对照品(批号为110703-201933,含量

93.4%),人参皂苷Re对照品(批号为110754-202028,含量93.9%),人参皂苷Rd对照品(批号为111818-201603,含量92.1%),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈,磷酸均为色谱纯,甲醇为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:CORTECS T₃柱(150 mm × 4.6 mm, 2.7 μm);流动相:乙腈(A) - 0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min时5%A → 20%A, 10~18 min时20%A → 22%A, 18~20 min时22%A → 31%A, 20~30 min时31%A → 33%A, 30~40 min时33%A → 60%A, 40~45 min时60%A → 90%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:203 nm;柱温:25 °C,进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

取4种对照品各适量,精密称定,加甲醇,制成每1 mL含山柰酚-3-O-槐糖苷0.1 mg、人参皂苷Rg₁ 0.25 mg、人参皂苷Re 0.5 mg和人参皂苷Rd 0.2 mg的混合对照品溶液。取样品0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入80%甲醇25 mL,称定质量,超声(功率250 W,频率40 kHz)处理30 min,放冷,补足减失的质量,滤过,取上清液,经0.22 μm微孔滤膜,取续滤液,即得供试品溶液。按人参叶配方颗粒处方和工艺制成缺人参叶的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:分别精密吸取2.2项下3种溶液,按2.1项下色谱条件测定,记录色谱图。结果供试品溶液与混合对照品溶液相应保留时间内具有相同的色谱峰,且阴性对照无干扰,表明该方法专属性良好。详见图1。

精密度试验:取供试品溶液(编号S1)适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,分别以峰2、峰4为参照峰1、参照峰2,计算峰1和其余11个特征峰的相对保留时间和相对峰面积(稳定性、重复性试验同)。结果相对保留时间均小于0.1%;峰14相对峰面积RSD为5.2%,

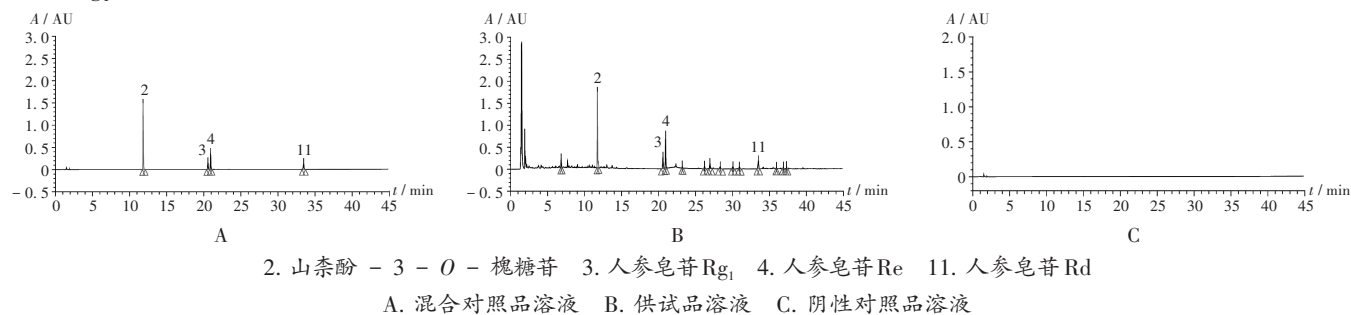


图1 高效液相色谱图

2. Kaempferol-3-O-sophoroside 3. Ginsenoside Rg₁ 4. Ginsenoside Re 11. Ginsenoside Rd
A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

其余特征峰均小于0.8% ($n = 6$)。表明方法精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液(编号S1)6份,分别于室温放置0,4,8,12,18,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,计算特征峰的相对保留时间和相对峰面积。结果相对保留时间均小于0.1%;峰14相对峰面积RSD为5.2%,其余特征峰均小于0.9% ($n = 6$)。表明供试品在室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取供试品溶液(编号S1)6份,按2.1项下色谱条件进样测定,计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积。结果相对保留时间均小于0.1%;峰14相对峰面积RSD为4.4%,其余特征峰均小于0.7% ($n = 6$)。表明方法重复性良好。

2.4 指纹图谱的建立与相似度评价

取样品各适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)进行分析,形成21批样品的HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱(见图2和图3),确定人参叶配方颗粒特征图谱共有14个特征峰。通过与混合对照品溶液色谱图(见图1A)比对,指认出峰2,3,4,11分别为山柰酚-3-O-槐糖苷、人参皂苷R_{g1}、人参皂苷Re、人参皂苷Rd。21批人参叶配方颗粒的相似度均大于0.900,表明不同批次人参叶的成分组成基本一致,质量较稳定。详见表1。

2.5 化学模式识别分析

聚类分析(CA):将人参叶配方颗粒的指纹图谱共有峰面积导入SPSS 26.0统计学软件进行CA分析(见图4)。结果表明,当平方欧式距离为15时,21批样品可聚为3类,其中S10和S15为一类,S14为一类,剩余样品为一类;S14、S10、S15中化合物含量与其他批次相比存在一定差异,基本趋势与相似度评价结果一致。

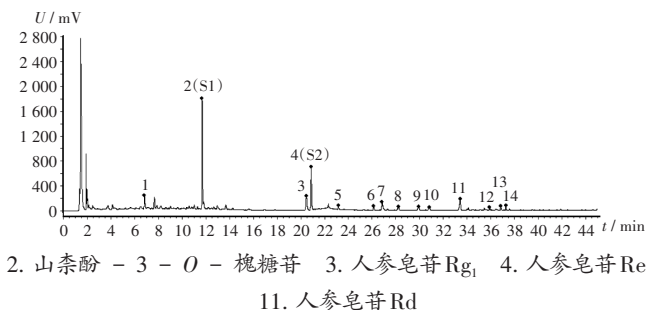


图3 人参叶配方颗粒对照指纹图谱

2. Kaempferol - 3 - O - sophoroside 3. Ginsenoside R_{g1}
4. Ginsenoside Re 11. Ginsenoside Rd

Fig. 3 Reference fingerprint of Ginseng Folium Formula Granules

表1 相似度评价结果

Tab. 1 Results of similarity evaluation

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.995	S8	0.999	S15	0.962
S2	0.996	S9	1.000	S16	0.987
S3	0.998	S10	0.979	S17	0.987
S4	0.998	S11	0.986	S18	0.983
S5	0.999	S12	0.998	S19	0.992
S6	0.999	S13	0.998	S20	0.992
S7	0.999	S14	0.910	S21	0.991

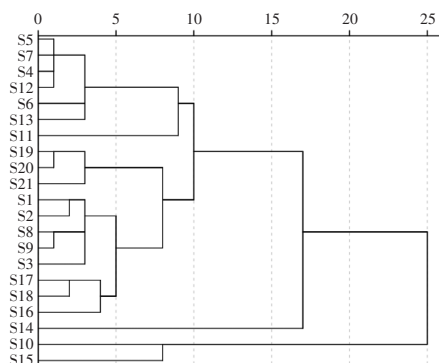


图4 聚类分析树状图

Fig. 4 Dendrogram of CA

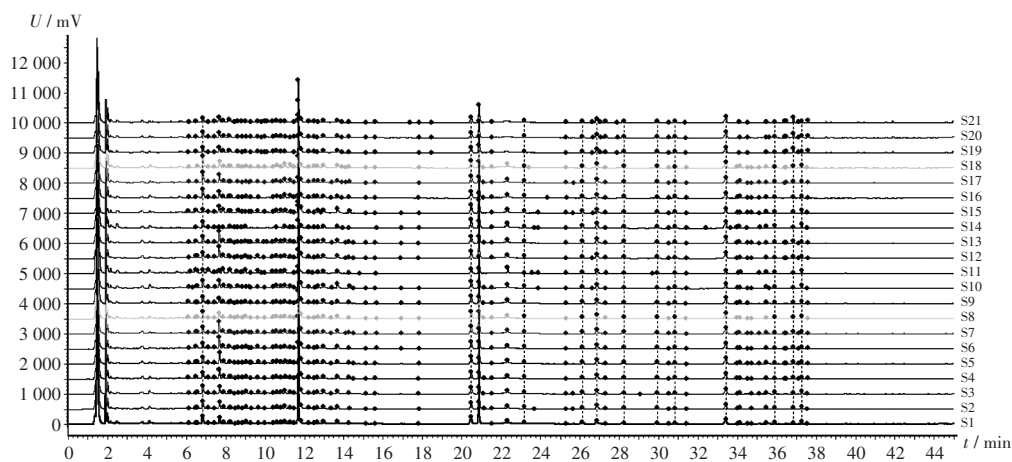


图2 21批人参叶配方颗粒的高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 2 HPLC superimposed fingerprint of 21 batches of Ginseng Folium Formula Granules

主成分分析(PCA):采用SPSS 26.0统计学软件对21批样品各特征峰峰面积的标准化值进行PCA,以成分特征值 > 1 为标准提取得到4个主成分(PC1、PC2、PC3、PC4),计算得特征值和方差贡献率(见表2),主成分因子载荷矩阵见表3。可知,前4个主成分累积方差贡献率为91.119%,表明提取的4个主成分能反映人参叶指纹图谱的大部分信息。

表2 4个主成分分析特征值和方差贡献率

Tab. 2 Eigenvalues and variance contribution rates of four principal components

主成分	特征值	方差贡献率(%)	累积方差贡献率(%)
PC1	6.169	44.061	44.061
PC2	3.451	24.651	68.712
PC3	1.872	13.369	82.081
PC4	1.265	9.038	91.119

表3 主成分因子载荷矩阵

Tab. 3 Loading matrix of principal component factors

峰号	PC1	PC2	PC3	PC4	峰号	PC1	PC2	PC3	PC4
1	0.344	0.080	0.233	-0.872	8	0.901	0.373	-0.077	0.056
2	-0.035	-0.291	0.762	0.522	9	0.812	0.523	-0.192	0.123
3	0.893	-0.242	0.297	0.090	10	0.603	0.416	0.302	-0.126
4	0.921	-0.340	-0.072	-0.113	11	0.737	0.619	-0.184	0.028
5	0.588	0.172	0.733	-0.070	12	0.365	-0.817	-0.322	-0.117
6	0.816	-0.291	-0.088	0.316	13	-0.316	0.793	-0.319	0.170
7	0.853	-0.101	-0.439	0.162	14	0.230	-0.892	-0.181	-0.050

2.6 正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)

在PCA基础上,采用SIMCA 14.0软件,以14个共有峰的峰面积为变量进行OPLS-DA,得分图见图5。模型中自变量的可解释率(R^2X)为0.989,模型预测能力(Q^2)为0.701(均大于0.5),表明该模型具有较好的解释和预测能力。由图5可知,21批样品分为3类,S11、S14为一类,S19-S21为一类,其余批次为一类。变量投影重要性(VIP)图见图6,以VIP值 > 1 为标准,共找到1个差异标志物(峰2),表明山柰酚-3-O-槐糖苷可能是影响样品质量的差异性成分;且S11、S14及S19-S21峰2的峰面积明显低于其他批次样品。

3 讨论

3.1 色谱条件选择

预试验中考察了不同流动相(乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%乙酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液)对各色谱峰的分离效果,结果以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相时,5号、11号与13号色谱峰间的分离度更好,且特征图谱的基线较平稳;考察了不同流速(0.8、1.0、1.2 mL/min)及不同柱温(20℃、25℃、30℃)条件下色谱峰分离的效果,结果流速为1.0 mL/min、柱温为25℃时,各色谱峰分离效果较好。

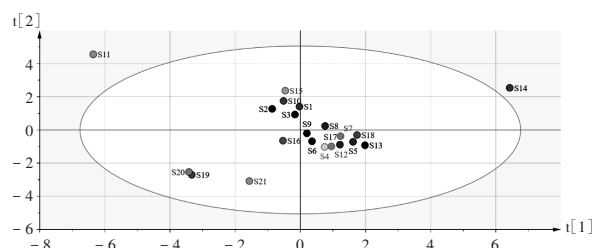


图5 OPLS-DA得分图

Fig. 5 Scoring plot of OPLS-DA

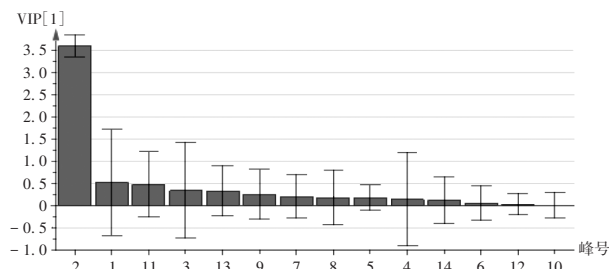


图6 OPLS-DA的VIP图

Fig. 6 VIP plot of OPLS-DA

3.2 供试品溶液制备方法选择

预试验中比较了超声和加热回流提取方法,结果二者差异不大,选择更方便的超声提取;考察了超声不同时间(15, 30, 45, 60 min),当提取时间在30~60 min时,色谱峰的总峰面积差异不大,故选择30 min;考察了超声功率为200~300 W的效果,结果均较好,250 W较常用,故选择;考察了不同提取溶剂(水、甲醇、乙醇、30%甲醇、50%甲醇、80%甲醇),结果以80%甲醇为溶剂时总峰面积较优,故选择;考察了不同的料液比(取样量0.20, 0.40, 0.50, 0.60, 0.80 g, 溶剂体积10, 25, 50 mL),结果表明,当取样量为0.5 g、溶剂体积为25 mL时,提取效率最高,色谱峰响应值较好。

3.3 指纹图谱和化学模式识别分析

本研究中建立了人参叶配方颗粒的指纹图谱,21批人参叶配方颗粒的分离度较好,共标定了14个特征峰,指认了4个峰,并结合特征峰的极性和保留时间的差异,分段计算特征峰的相对保留时间和相对峰面积。特征峰的个数和分离均明显优于文献报道^[8-9]。本研究中,各批次样品与对照指纹图谱的相似度均大于0.900,说明其质量均一稳定;21批样品可聚为3类,表明不同批次间的化学成分含量可能存在一定差异;根据VIP值找到1个差异标志物,即山柰酚-3-O-槐糖苷。2020年版《中国药典(一部)》人参叶的含量测定项^[1]仅以人参皂苷Rg₁和人参皂苷Re为指标,不能真实反映人参叶的质量水平。前期试验通过对人参不同部位(根和根茎、叶、花、茎)研究发现,山柰酚-3-O-槐糖苷是人参地上部位特有的成分,且在该特征成分在人参叶中的含量明显高于其他部位样品。后续拟从该特征性成分出发,建立专属性较好的含量测定方法。