

HPLC 指纹图谱结合化学模式识别评价生脉颗粒质量

张 鑫, 马瑞娟, 钟华美, 张德柱

陕西盘龙药业集团股份有限公司, 陕西 商洛 711400

摘 要: **目的** 建立生脉颗粒 HPLC 指纹图谱和化学模式识别方法评价其质量。**方法** 采用 HPLC 法建立 10 批生脉颗粒的指纹图谱, 计算相似度, 确定共有峰, 进行层次聚类分析和主成分分析, 并结合正交偏最小二乘 - 判别分析进行模式识别, 筛选影响生脉颗粒质量的差异性成分。**结果** 确定了 16 个共有峰, 指认了 5 个色谱峰, 各批次相似度均大于 0.940。10 批生脉颗粒样品分为 3 类, 3 个主成分的累积方差贡献率为 93.481%; 6 个峰所对应的成分可能是导致不同批次之间生脉颗粒样品质量差异的主要标志物。**结论** 建立的 HPLC 指纹图谱与化学模式识别方法相结合可对生脉颗粒的质量进行综合评价。**关键词:** 生脉颗粒; 指纹图谱; 相似度; 层次聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘法 - 判别分析

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2025)03 - 0618 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.03.011

Quality evaluation of Shengmai Granules with HPLC fingerprint and chemical pattern recognition method

ZHANG Xin, MA Ruijuan, ZHONG Huamei, ZHANG Dezhu

Shaanxi Panlong Pharmaceutical Group Limited By Share Ltd., Shangluo 711400, China

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint of Shengmai Granules combined with the chemical pattern recognition method to evaluate quality. **Methods** HPLC fingerprints of 10 batches of Shengmai Granules were established. The similarity was calculated and the common peaks were confirmed, and the hierarchical clustering analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) were carried out. The chemical pattern recognition was carried out by orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) method. The differential components in Shengmai Granules quality were screened. **Results** There were 16 common peaks of HPLC fingerprint of Shengmai Granules, and five components were identified. The similarities of Shengmai Granules were greater than 0.940. 10 Batches of Shengmai Granules were divided into three categories and the cumulative variance contribution rate of the three principal components was 93.481%. Six common peaks were the main bioactive markers causing differences in the quality of different batches of Shengmai Granules. **Conclusion** The established method of HPLC fingerprint combined with the chemical pattern recognition method can be used for the systemic evaluation of quality of Shengmai Granules.

Key words: Shengmai Granules; fingerprint; similarity; HCA; PCA; OPLS-DA

生脉颗粒是由生脉散演变而成。生脉散来源于张元素《医学启源》, 由人参、麦冬、五味子组成, 具有益气生津、敛阴止汗的功效^[1-3], 临床主要用于治疗气阴两伤、心悸气短、脉微虚汗等症^[4-5]。现存主要的两种处方是人参方和党参方, 由于人参的补气功效太强, 主要用于急症重症, 而党参具有药效平缓的功效, 适用人群范围更广, 因此党参方将处方中的人参替换成党参。生脉颗粒的标准收录于国家药品标准 WS3-B-2111-96-2011 中, 但仅有针对五

味子、党参的薄层色谱鉴别和五味子醇甲的含量测定, 目前市场上具有生脉颗粒批准文号的生产厂家较多, 药品质量良莠不齐, 现有的标准已无法对其进行全面系统的评价控制, 且现有文献报道主要有处方工艺^[6]、质量标准^[7]、临床应用研究^[8-9], 另有生脉饮的质量标准和指纹图谱研究^[10-13], 无生脉颗粒(党参方)的指纹图谱报道。中药指纹图谱是目前全面评价中成药质量标准的一种重要方法, 在评价产品的一致性和稳定性方面具有优势, 具有整体

收稿日期: 2024-11-12

基金项目: 陕西省科技厅古代经典名方研究与开发创新团队项目(2022TD-50); 陕西省中医药管理局重点研究项目(2023-010)

作者简介: 张 鑫, 男, 主管中药师, 硕士, 主要从事中药质量标准及新药研发工作。E-mail: awoshizx@126.com

性和模糊性,这与中医理论的整体性原则和中药作用机制的模糊性是相对应的。化学模式识别方法是利用统计学、信号处理、数学等工具从化学量测数据中找出样本的特征,进而对样品进行识别归类的一种技术,主要包括层次聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)、偏最小二乘-判别(OPLS-DA)分析等^[14-15]。因此本研究通过HPLC指纹图谱与HCA、PCA、OPLS-DA化学模式识别方法相结合对生脉颗粒的质量进行综合评价,发掘不同批次之间的差异和产品质量差异的主要标志物,为探讨生脉颗粒不同批次之间质量的稳定性和全面的质量控制提供科学依据。

1 仪器与试药

Vanquish 高效液相色谱仪(美国 ThermoFisher 公司);Chromeleon6 软件;SECURA125-1CN 十万分之一天平(北京赛多利公司);KQ-500KDE 超声波清洗器(江苏昆山超声仪器公司)。

五味子醇甲(批号 110857-201815,质量分数以 97.5%计)、五味子乙素(批号 110765-201813,质量分数以 99.1%计)、五味子醇乙(批号 112108-202401,供色谱峰定位用)、5-羟甲基糠醛(批号 111626-202316,质量分数以 98.4%计)、党参炔苷(批号 111732-201908,供鉴别用)对照品均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、磷酸为色谱纯;水为实验室自制超纯水;其他试剂均为分析纯。

10 批生脉颗粒均由陕西盘龙药业集团股份有限公司提供,规格 10 g/袋,批号分别为 20220901、20221001、20221101、20221201、20230201、20230202、20230301、20230302、20230901、20230903,编号为 S1~S10;五味子(批号 23120105,产地辽宁)、党参片(批号 23110102,产地甘肃)购自甘肃瑞信药业科技有限公司,麦冬(批号 2208002,产地四川)购自河北新京源药业有限公司,经陕西盘龙医药研究院张德柱主任药师鉴定,五味子为木兰科植物北五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实,党参为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. 的干燥厚片,麦冬为百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L.f.) Ker-Gawl. 的干燥块根,均为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Zorbax Eclipse XDB C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸(B),

梯度洗脱 0~10 min (8%~15% A), 10~32 min (15%~30% A), 32~38 min (30%~42% A), 38~48 min (42%~55% A), 48~58 min (55%~58% A), 58~88 min (58%~83% A);检测波长:0~6.5 min (300 nm), 6.5~88 min (216 nm);柱温为 30 ℃;体积流量为 1.0 mL/min;进样量为 10 μL。理论塔板数按五味子醇甲峰计算应不低于 60 000。

2.2 对照品溶液的制备

取 5-羟甲基糠醛、党参炔苷、五味子醇甲、五味子醇乙和五味子乙素对照品适量,加甲醇溶解稀释制成含 5-羟甲基糠醛、党参炔苷、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子乙素 100、50、60、10、10 μg/mL 的混合对照品溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备

取生脉颗粒内容物约 10 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70%甲醇 25 mL,称定质量,超声处理(功率 500 W、功率 45 kHz) 30 min,放冷,用 70%甲醇补足减失的质量,滤过,取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 药材样品溶液的制备

分别取五味子、党参和麦冬,按照生脉颗粒处方工艺制备的单味药样品各 10 g,按照“供试品溶液的制备”项下方法制备样品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取批号 20221001 生脉颗粒样品(编号 S2),制备供试品溶液,连续进样 6 次,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,各共有峰相对保留时间的 RSD 值为 0.05%~2.39%,相对峰面积的 RSD 值为 0.63%~3.76%。

2.5.2 重复性试验 取批号 20221001 生脉颗粒样品(编号 S2),制备 6 份供试品溶液,进行检测,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,各共有峰相对保留时间的 RSD 值为 0.12%~2.23%,相对峰面积的 RSD 值为 0.50%~2.60%。

2.5.3 稳定性试验 取批号 20221001 生脉颗粒样品(编号 S2),制备供试品溶液,分别在 0、3、6、9、12、15、18、21、24 h 进行测定,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,各共有峰相对保留时间的 RSD 值为 0.13%~2.14%,相对峰面积的 RSD 值为 0.57%~2.62%,表明该供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6 指纹图谱的建立

2.6.1 相似度计算 取 10 批生脉颗粒(编号 S1~

S10), 制备供试品溶液, 进样测定, 将得到的 10 批样品色谱图导入中国药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件, 见图 1。选择批号 221001 样品(编号 S2)作为参照图谱, 采用中位数法, 时间宽度设定为 0.3, 多点校正后, 生成生脉颗粒的对照指纹图谱, 见图 2, 并进行相似度计算。共确定 16 个共有峰, 选择 6 号峰为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间, 分别为 0.100 7、0.126 6、0.474 0、0.564 8、0.701 0、1.000 0、1.029 9、1.045 3、1.059 8、1.101 3、1.140 5、1.183 1、1.251 0、1.280 6、1.594 0、1.620 6。10 批生脉颗粒色谱图的相似度均大于 0.940, 见表 1。

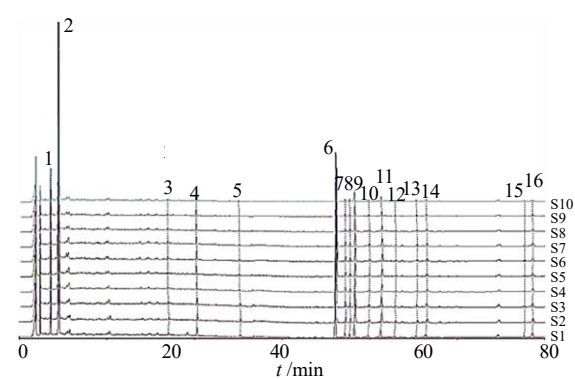
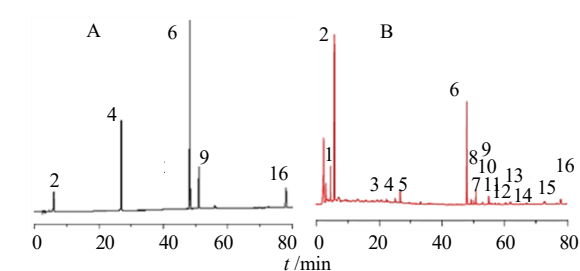


图 1 10 批生脉颗粒叠加 HPLC 指纹图谱
Fig. 1 Superposition of HPLC fingerprints of 10 batches of Shengmai Granules



2-5-羟甲基糠醛, 4-党参炔苷, 6-五味子醇甲, 9-五味子醇乙, 16-五味子乙素。
2-5-HMF, 4-lobetyolin, 6-schizandrol A, 9-schisandrin b, 16-schisandrin B.

图 2 混合对照品色谱图(A)和对照指纹图谱(B)
Fig. 2 Chromatogram of mixed reference solutions (A) and reference fingerprint (B)

2.6.2 色谱峰的归属和指认 分别取对照品、供试品溶液和五味子、党参和麦冬药材样品溶液, 进样测定, 对各色谱峰进行指认并归属。通过保留时间与对照品进行对比, 指认了 2、4、6、9、16 号峰 5

表 1 生脉颗粒指纹图谱相似度评价结果

Table 1 Results of similarity evaluation of Shengmai Granules

批次	相似度	批次	相似度
S1	0.998	S6	1.000
S2	1.000	S7	0.997
S3	1.000	S8	0.995
S4	1.000	S9	0.995
S5	0.997	S10	0.969

个色谱峰, 分别为 5-羟甲基糠醛、党参炔苷、五味子醇甲、五味子醇乙和五味子乙素。通过与党参、麦冬和五味子单味药材的色谱图来对比, 对上述 16 个峰进行归属, 结果发现生脉颗粒样品中峰 1、2、3、4、5 来源于党参, 峰 1、2、13 来源于麦冬, 峰 1、2、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 来源于五味子, 峰 1、2 在 3 种药材中均存在, 且峰 2 (5-羟甲基糠醛) 在 3 种药材中含量均较高。

2.7 化学模式识别

2.7.1 HCA 以 10 批生脉颗粒的 16 个共有峰的相对峰面积为变量, 采用 SPSS 20 软件, 采用组间连接, 平方欧式距离进行 HCA, 见图 3。结果显示当平方欧式距离为 10 时, 10 批样品可分为 3 类, S5、S6、S8、S3、S4 样品聚为一类, S9、S10 聚为一类, S1、S2 聚为一类。可以看出生产批次比较接近的样品差异性较小, 批次时间差异较大的差异性大, 也可能与生产使用的中药材的不同批次样品导致的差异有关。

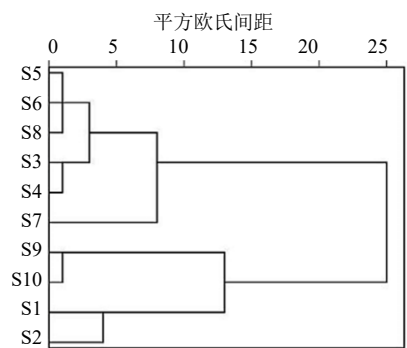


图 3 生脉颗粒的层次聚类分析
Fig. 3 HCA of Shengmai Granules

2.7.2 PCA PCA 是对复杂的多变量进行降维方式分析, 通过少数几个代表性的成分反映原始数据的大部分信息^[16]。本实验以 10 批生脉颗粒的 16 个共有峰的峰面积为变量, 生成 10×16 的数据矩阵, 采用 SPSS 20 软件进行主成分分析, 提取了 3 个主

成分, 得分系数矩阵见表 2, 累积方差贡献率为 93.481%, 因此这 3 个主成分可代表生脉颗粒指纹图谱共有峰的大部分信息。将 10 批生脉颗粒的 16 个共有峰的峰面积为变量导入 Simca14.1 软件, 生脉颗粒的 PCA 得分图见图 4。将 10 批生脉颗粒样品分为 3 大类, 结果与 HCA 基本一致, 同时也验证了 HCA 的结果。在主成分载荷图中对主成分影响权重越大的变量投影后离远点的距离的绝对值越大, PCA 载荷散点图见图 5, 可以看出 5、13、15、16 (五味子乙素) 号峰对主成分 1 的贡献率较大; 12、6 (五味子醇甲)、11、7 号峰对主成分 2 的贡献率较大。

表 2 特征值和累积方差贡献率
Table 2 Eigenvalue and total variance of Shengmai Granules

成分	初始特征值		
	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	10.858	67.860	67.860
2	2.511	15.694	83.554
3	1.588	9.927	93.481

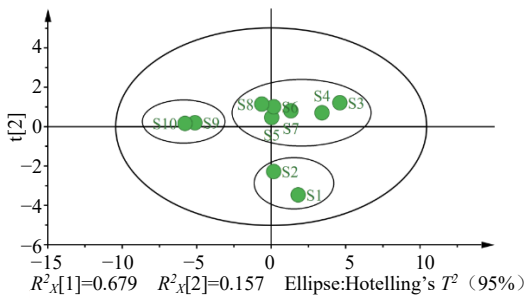


图 4 生脉颗粒的 PCA 得分图
Fig. 4 PCA score plot of Shengmai Granules

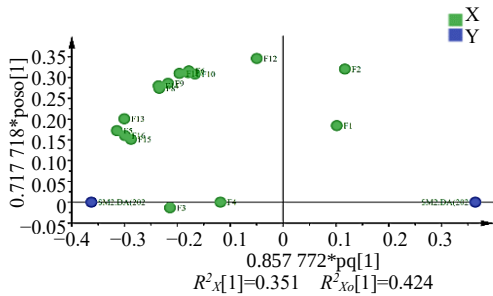


图 5 生脉颗粒的主成分模型载荷图
Fig. 5 Loading plot of Shengmai Granules

2.7.3 OPLS-DA 分析 为了探索生脉颗粒批次间质量的差异性成分, 对 10 批生脉颗粒样品中的 16 个共有峰峰面积导入 Simca14.1 软件, 对 10 批样品

进行 OPLS-DA 有监督的模型分析, 结果见图 6。不同年份的各自聚成一类, 在该模型下 R^2_X 为 0.991, R^2_Y 为 0.991, Q^2 为 0.956, 三者值均大于 0.5, 表明该模型具有较好的预测能力。为验证该模型是否合适, 经过 200 次置换检验 (图 7), $R^2=0.537$, $Q^2=-1.65$, 且左侧随机排列值均小于右侧原始值, 说明该模型是有效的, 不存在过度拟合, 可以用于生脉颗粒指纹图谱样品中差异性标志物的筛选。通过提取 OPLS-DA 模型中 16 个变量的 VIP 值, 以 VIP 值大于 1 为标准^[17], 筛选出 6 个主要峰 5、13、16 (五味子乙素)、15、14、8 号峰, 见图 8。

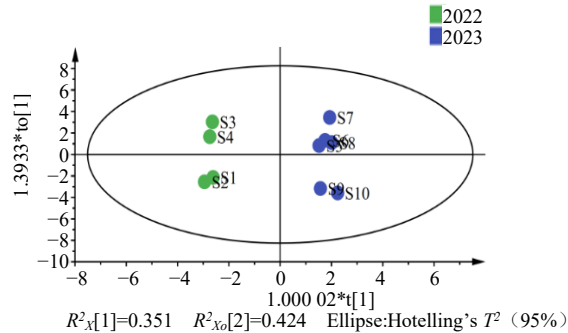


图 6 生脉颗粒的 OPLS-DA 的得分图
Fig. 6 OPLS-DA score plot of Shengmai Granules

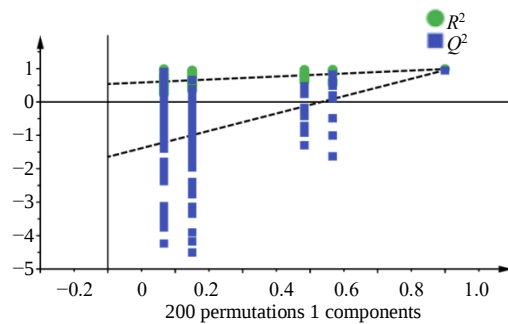


图 7 OPLS-DA 模型的 200 次置换检验
Fig. 7 200 Response permutation tests for OPLS-DA model

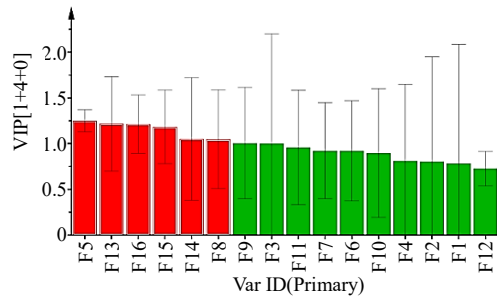


图 8 生脉颗粒的 OPLS-DA 的 VIP 值图
Fig. 8 VIP plot of OPLS-DA for Shengmai Granules

这 6 个峰所对应的成分可能是导致不同批次之间生脉颗粒样品产生差异的主要原因,是产品质量差异的主要标志物,同时也提示生产企业在生脉颗粒质量控制中应该关注这 6 个成分。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备的选择

根据生脉颗粒制备工艺方法和标准,在供试品溶液制备时,首先采用回流和超声两种方法进行考察,发现超声中各色谱峰的面积较大,且色谱峰形较好,故确定提取方法为超声,然后建立 $L_9(3^4)$ 正交表考察不同的提取溶剂(甲醇、乙醇和 70% 甲醇)、不同的提取时间(20、30、40 min)、不同的功率(150、350、500 W),以样品中各共有峰的峰面积作为考察指标,结果发现采用 70% 甲醇作为溶剂,超声 30 min,功率 500 W 时各色谱峰的分度度较好,峰面积较大,基线平稳,故作为本实验的制备前处理方法。

3.2 检测波长的选择

采用 PDA 检测器对供试品溶液进行全波长扫描,结果发现 5-羟甲基糠醛在 284 nm 下有最大吸收,党参炔苷在 215 nm、五味子醇甲在 216 nm、五味子醇乙和五味子乙素在 217 nm 下有最大吸收,第一个未知色谱峰在 300 nm 下有最大吸收,为了使第一个峰形更好,干扰峰较少,采用变化波长进行测定,前两个峰采用 300 nm 下测定,其余色谱峰均在其最大吸收峰 216 nm 下测定,从而保证测定时减少其他杂质峰的干扰。

本实验建立了生脉颗粒样品的 HPLC 指纹图谱,标定了 16 个共有峰,通过与对照品和各单味药材色谱图对比,进行峰的归属,确定了 5 个已知成分,分别是 5-羟甲基糠醛(5-HMF)、党参炔苷、五味子醇甲、五味子醇乙和五味子乙素,并发现 3 味药材中均含有 5-HMF。5-HMF 是中药材和中药复方中常见成分,具有神经毒性,损害人体横纹肌和内脏,同时会对眼黏膜、上呼吸道黏膜产生刺激作用^[18],此外还有报道称 5-HMF 也具有抗氧化、改善血液流变的生物活性^[19],这表明 5-HMF 可能是生脉方中发挥抗心肌缺血作用的药效成分,因此建议在含量控制中增加 5-HMF 的测定。由于 5-HMF 是葡萄糖等单糖化合物在高温或弱酸等条件下脱水产生的 1 个具有呋喃环结构的醛类化合物,麦冬和党参中 5-HMF 含量较低,而在生脉颗粒中 5-HMF 含量较高,可能是党参和麦冬中的多糖在与五味子

共煎中五味子提供酸性环境下降解生产的,并与徐芳辉等^[20]报道一致。16 个共有峰中麦冬药材的特有成分没有显示,可能由于麦冬主要含有皂苷类成分,无紫外吸收,在指纹图谱中未能体现。通过 HCA、PCA 将 10 批生脉颗粒样品分为 3 类,最后以 VIP 值大于 1 筛选出 6 个差异性的质量标志物,分别为 5、13、16(五味子乙素)、15、14、8 号峰,提示生产企业在其质量控制中应多加关注这 6 个成分的变化,同时由于 5、13、14、15、8 号峰尚未知,因此为了全面控制其质量,后续可以采用高分辨质谱对其进行鉴定和确认,从而准确系统地对其质量进行控制。

本实验建立了基于波长切换法生脉颗粒的 HPLC 指纹图谱,并结合化学模式识别法对 10 批生脉颗粒进行研究,确定了能够反映整体共有峰性质的 6 个峰,并分析出不同批次样品之间的差异性标志成分,为生脉颗粒的质量标准提高提供依据,并且该方法是一种更全面、系统的质量评价和分析方法,为生产企业在药品的生产中更加合理地控制该药品的质量提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 835.
- [2] 肖燕. 生脉配方颗粒的制备工艺与质量控制研究 [D]. 成都: 西华大学, 2015.
- [3] 曹阳, 杨眉, 刘燕, 等. HPLC 法测定生脉颗粒(党参方)中五味子醇甲的含量 [J]. 川北医学院学报, 2013, 28(3): 240-243.
- [4] 喻贵英, 越亮, 孙建彬, 等. HPLC 同时测定生脉颗粒中的 3 种人参皂苷 [J]. 华西药学杂志, 2022, 37(4): 414-416.
- [5] 魏宏伟, 刘沛, 刘翠哲. HPLC 同时测定复方生脉颗粒中有效成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 95-99.
- [6] 晏玉英, 陆一霞. 生脉颗粒剂的处方、工艺研究 [J]. 中成药, 1994, 16(4): 9-10.
- [7] 王莲萍, 刘专专, 孙岩, 等. 生脉颗粒质量标准研究 [J]. 西部中医药, 2014, 27(11): 38-41.
- [8] 陈一平, 任青伟. 生脉颗粒加味治疗冠心病室性早搏气阴两虚证 40 例观察 [J]. 浙江中医杂志, 2021, 56(6): 422.
- [9] 杨泽春, 张宏伟, 李知生, 等. 生脉颗粒联合西药常规治疗慢性心力衰竭合并低血压患者的临床效果 [J]. 医疗装备, 2019, 32(15): 2-3.
- [10] 梁悦, 刘涛, 李松洋, 等. 生脉注射液 4 种成分测定

- 及 HPLC 特征图谱建立 [J]. 中成药, 2020, 42(9): 2285-2290.
- [11] 王炜祺, 宋怡霖, 薛雯蔚, 等. 基于 HPLC 指纹图谱及模式识别的生脉饮热稳定性评价 [J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2024, 47(1): 14-20.
- [12] 黄娜娜, 李俊, 饶高雄, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合多种化学模式识别评价生脉饮(党参方)质量 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(23): 2433-2442.
- [13] 党晓月, 朱志军, 王永祥, 等. 生脉饮 HPLC 指纹图谱与化学模式识别研究 [J]. 中药材, 2020, 43(12): 2988-2991.
- [14] 张鑫, 陈衍斌, 许刚, 等. 龙生蛭胶囊的 HPLC 指纹图谱及其化学模式识别研究 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(3): 553-558.
- [15] 龚秀娟, 彭亮, 陈晓颖, 等. HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别评价蜜款冬花质量 [J]. 中草药, 2024, 55(18): 6344-6354.
- [16] 乔俊昊, 杨颜溶, 孙静洋, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别及多指标成分定量评价香附质量 [J]. 中草药, 2024, 55(17): 5999-6008.
- [17] 阿基业, 何骏, 孙润彬. 代谢组学数据处理—主成分分析十个要点问题 [J]. 药学学报, 2018, 53(6): 929-937.
- [18] 刘月新, 潘雪, 邹茜, 等. 探讨 5-羟甲基糠醛在中药及复方中的存在意义 [J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(15): 3-5.
- [19] 王梅, 王越欣, 武英茹, 等. 5-羟甲基糠醛在中药加工过程中的变化及药理作用研究概况 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(11): 2319-2327.
- [20] 徐芳辉, 胡志成, 易欣宜, 等. 5-羟甲基糠醛在中药质量标准中的应用现状 [J]. 中国医药导报, 2017, 14(15): 47-50.

【责任编辑 解学星】