

基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别的护肝片质量控制研究

杨琳¹, 李廷利^{2*}

1. 黑龙江中医药大学 高教研究与教学质量评估中心, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 建立中成药护肝片的 HPLC 指纹图谱, 为其质量评价提供依据。方法 采用 HPLC 法, 以五味子醇甲为参照, 绘制 10 批护肝片原料粉样品的 HPLC 图谱; 利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004 A) 进行相似度评价, 确定共有峰。采用主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 对样品进行模式识别分析。结果 10 批护肝片样品的 HPLC 图谱有 22 个共有峰, 经对照品进行化学指认共鉴定了其中的 6 个色谱峰, 分别是五味子醇甲、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、五味子甲素、五味子乙素。10 批供试品的相似度均大于 0.97, 表明该药物总体质量较为稳定; 但通过 PCA 发现不同批次药物质量之间存在微小差异, 且主要分为 2 类, 最后进一步采用 OPLS-DA 筛选出了导致批次药物质量差异的 2 种主要成分, 分别为 12 号峰 (柴胡皂苷 d) 和 22 号峰。结论 护肝片指纹图谱的构建和化学模式识别为护肝片的质量评价提供了可行的理论依据, 可为生产厂家在药品生产中更高效、合理地控制药品质量提供科学依据。

关键词: 护肝片; 指纹图谱; HPLC; 模式识别; 五味子醇甲; 柴胡皂苷 a; 柴胡皂苷 c; 柴胡皂苷 d; 五味子甲素; 五味子乙素; 质量评价; 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: 0253-2670(2019)14-3351-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.14.013

Quality evaluation of Hupan Tablets based on HPLC fingerprint and chemical pattern recognition

YANG Lin¹, LI Ting-li²

1. Higher Education Research and Teaching Quality Evaluation Center, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of Hupan Tablets and provide a scientific basis for the quality control of Hupan Tablets. **Methods** HPLC method was adopted and using schizandrin as reference, and 10 batches of Hupan Tablets were determined. Similarity evaluation was performed by using *Similarity Evaluation System for Fingerprint Chromatogram of TCM* (2004A) to confirm the common peak. Pattern recognition analysis was performed using principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discrimination analysis (OPLS-DA). **Results** There were 22 common peaks in HPLC of 10 batches of samples. Schizandrin, saikosaponin a, saikosaponin c, saikosaponin d, schizandrin A, and schizandrin B were identified by chemical identification of the reference substance. The similarity of 10 batches of samples was higher than 0.97, which indicated that the overall quality of the drug was relatively stable. However, there were slight differences between the quality of different batches of drugs found by PCA, and they were mainly divided into two categories. Finally, OPLS-DA was used to screen out two main components that caused the quality differences in the batches, namely peak 12 (saikosaponin D) and peak 22. **Conclusion** The construction of fingerprint of Hupan Tablets and chemical pattern recognition provides a practical and theoretical basis for the quality evaluation of Hupan Tablets, which can provide a scientific basis for manufacturers to control drug quality more efficiently and reasonably in drug production.

收稿日期: 2019-04-02

基金项目: 黑龙江省科技厅科技攻关计划项目 (GB08C317)

作者简介: 杨琳 (1983—), 女, 助理研究员, 主要研究方向为中药药效物质基础及作用机制研究。E-mail: yanglin0716@126.com

*通信作者 李廷利 (1957—), 男, 博士研究生导师, 教授, 主要研究方向为中药药效物质基础及作用机制。

Key words: Hugu Tablets; fingerprint; HPLC; pattern recognition; schizandrin; saikosaponin a; saikosaponin c; saikosaponin d; schisandrin A; schisandrin B; quality assessment; principal component analysis; orthogonal partial least squares-discrimination analysis

护肝片是由柴胡、五味子、茵陈、板蓝根、猪胆粉及绿豆 6 味药材组成的中成药,其处方来源于东汉时期张仲景所著的《伤寒论》中小柴胡汤和茵陈蒿汤,根据方剂配伍原理并结合现代中药药理研究结果化裁,是保肝中药中的代表品种^[1-2],对于治疗病毒性肝炎^[2]、脂肪肝^[3]、肝硬化^[4]、酒精肝、药物性肝损伤^[5]等疾病具有较好的临床疗效。护肝片的中药化学成分较为复杂,《中国药典》2015 年版一部^[6]中仅以五味子醇甲作为对照品进行含量测定,未能对护肝片的整体化学组成进行表征,也难以对护肝片进行全面的质量控制^[7]。

中药指纹图谱技术是目前较为常用的一种质量控制方法,具有的整体性和模糊性的特点^[8-13]。其中化学模式识别以全面控制中药质量为目的,不仅可以综合、降维和分类多个指标,还可以处理和识别指纹图谱的信息,更科学、合理地表达中药材质量信息^[14-16]。指纹识别强调完整性,模式识别注重差异性^[7],因此本实验应用高效液相色谱法建立护肝片的指纹图谱,对黑龙江葵花药业集团有限公司提供的 10 个不同批次的护肝片进行质量分析,通过指纹图谱相似度评价,综合比较不同批号中成药之间的差异,并结合主成分分析(principal component analysis, PCA)法和正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)法对所得到的指纹图谱进行进一步分析^[17]。本实验将建立一种更为系统的护肝片质量评价方法,为护肝片的质量评价提供内控标准,也为推动护肝片的二次开发奠定坚实的基础。

1 材料

1.1 实验样品

护肝片原料粉,外观为棕褐色粉末,含五味子以五味子醇甲计不得少于 0.28 mg,由黑龙江葵花药业集团有限公司提供,批号分别为 1004174F、1004175F、1004176F、1005022F、1005024F、1005025F、1005026F、1005027F、1005028F、1005029F,分别编号为 S1~S10。

1.2 对照品

五味子醇甲(批号 RFS-W-100823-03),成都瑞芬思生物技术有限公司;柴胡皂苷 a(批号 0900-200611)、柴胡皂苷 c(批号 0902-200612)、

柴胡皂苷 d(批号 0901-200605),成都思科华生物技术有限公司;五味子甲素(批号 110857-200316)、五味子乙素(批号 110857-200317),成都科普生物技术有限公司;各对照品经 HPLC 测定质量分数均>98%。

1.3 仪器

Waters 2695-e2998 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;色谱柱:Kromasil, C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 大连依利特分析仪器有限公司);Hypersil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 中国科学院大连化学物理研究所)及 Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm, Waters 公司);B3200S-T 超声震荡仪,必能信超声上海有限公司;AB204-N 型电子分析天平,梅特勒-托利多仪器上海有限公司。

1.4 试剂

HPLC 级乙腈(批号 70111)、HPLC 级甲醇(批号 70118),美国 DIKMA 试剂公司;优级纯冰醋酸(批号 100803),天津市富宇精细化工有限公司;优级纯磷酸(批号 20061028),北京益利精细化学品有限公司;分析级甲醇(批号 110110),天津市富宇精细化工有限公司;娃哈哈纯净水,杭州娃哈哈集团有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters 公司 Symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液,梯度洗脱条件见表 1;柱温 35 ℃;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 210 nm;理论塔板数按五味子醇甲计算所有组分不低于 3 000。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素 6 个对照品适量,置于 10 mL 量瓶中,用 100%甲醇溶液溶解并稀释至刻度,分别制成质量浓度为 0.1 mg/mL 的储备液;分别量取适量的 6 个对照品储备液,放置于 10 mL 量瓶中混合后加入甲醇稀释并定容,最终制成质量浓度均为 1 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备

取护肝片样品粉末,过四号筛,精密称取 0.5 g 浸于 5 mL 100%甲醇溶液的锥形瓶中,称定质量,

表 1 梯度洗脱条件

Table 1 Optimum gradient elution

t/min	乙腈/%	0.05%磷酸水溶液/%
0	5	95
10	8	92
22	20	80
40	48	52
60	52	48
70	70	30
81	72	28
83	100	0

用胶塞塞住瓶口后超声提取（频率 50 Hz）2 次，每次 15 min；冷却至室温后称量，并用 100% 甲醇补足缺失部分，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即为护肝片供试品溶液。

2.4 精密度试验

精密量取护肝片的供试品溶液（含柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素），按上述色谱条件连续进样 6 次。以五味子醇甲的保留时间和峰面积为参照，记录各个峰的相对保留时间和相对峰面积。结果可见护肝片供试品溶液中有 22 个共有峰相对峰面积的 RSD 小于 3%，相对保留时间的 RSD 小于 1%，表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取适量护肝片原料粉供试品溶液，分别于室温

下放置 0、6、12、18、24 h，按“2.1”项下色谱条件进样测定。以五味子醇甲的保留时间和峰面积为参照，记录各峰的相对保留时间和相对峰面积。结果可见护肝片原料粉供试品溶液中有 22 个共有峰相对峰面积的 RSD 小于 3%，相对保留时间的 RSD 小于 1%，表明护肝片供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6 重复性试验

精密称取 5 份护肝片原料粉样品，按上述方法制备护肝片原料粉供试品溶液，再按“2.1”项下色谱条件进行检测。以五味子醇甲的保留时间和峰面积为参照，记录各个峰的相对保留时间和相对峰面积。结果可见护肝片供试品溶液中有 22 个共有峰的相对峰面积的 RSD < 3%，相对保留时间的 RSD < 1%，表明该实验方法的重复性良好。

2.7 护肝片 HPLC 指纹图谱的建立

2.7.1 共有峰的确定 取 10 批护肝片原料粉样品各适量，按上述方法制备护肝片原料粉供试品溶液，再按上述色谱条件进样测定。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2004 A）》对 10 批不同批号的护肝片原料粉样品的 HPLC 图谱进行分析，得 HPLC 指纹图谱（图 1）。最终本实验选择分离度较好且含量较大的 22 个色谱峰作为护肝片的指纹图谱共有特征峰。

2.7.2 相似度计算 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2004 A）》，以五味子醇甲色谱峰的保

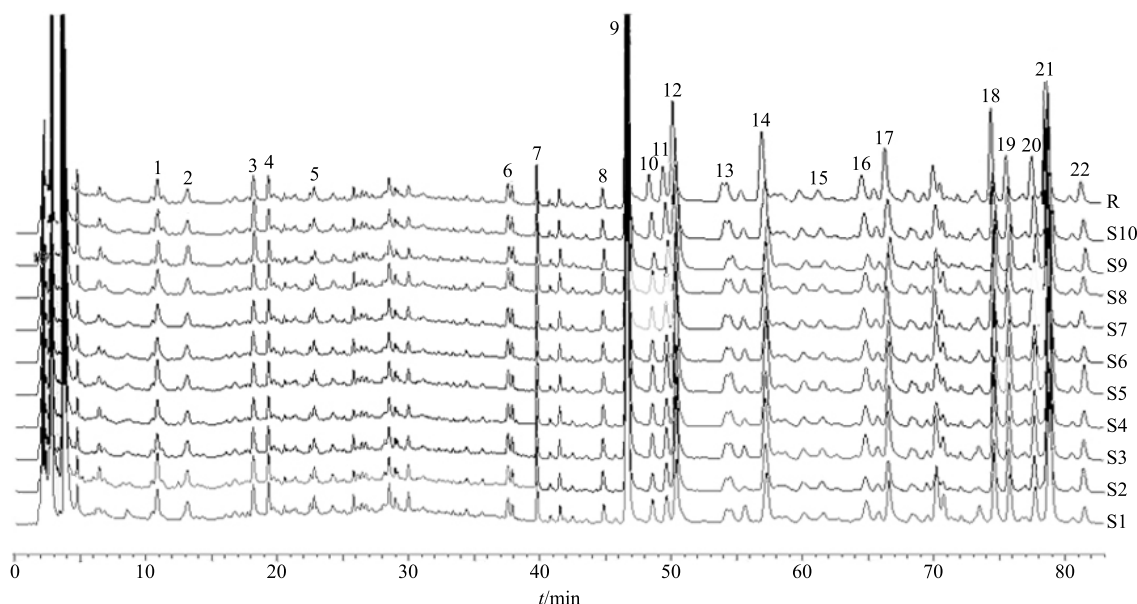


图 1 10 批护肝片的 HPLC 指纹图谱 (210 nm)

Fig. 1 HPLC fingerprint of ten batches of Hugan Tablets (210 nm)

留时间和峰面积积分值为 1, 计算其余共有峰的相对保留时间和相对峰面积。实验结果显示, 10 个批次护肝片原料粉中 22 个共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 3%, 表明 22 个共有峰的出峰时间较稳定, 但其相对峰面积的 RSD 相差较大, 表明不同批次护肝片原料粉中的 6 味组成药材的成分含量存在一定的差异。通过整体相似度评价, 结果分别为 0.996、0.975、0.992、0.987、0.996、0.996、0.997、0.997、0.993、0.998, 结果表明本实验所用的 10 批

护肝片原料粉的质量较稳定。

2.8 主要色谱峰的化学指认

本研究采用对照品对各共有色谱峰进行化学指认, 最终确认了 6 个色谱峰, 分别为柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 a、五味子醇甲、柴胡皂苷 d、五味子甲素、五味子乙素。见图 2。

2.9 化学模式识别

2.9.1 PCA PCA 能够快速提取、重组和降低复杂信息中多个变量的维数, 生成主成分。在投影处理

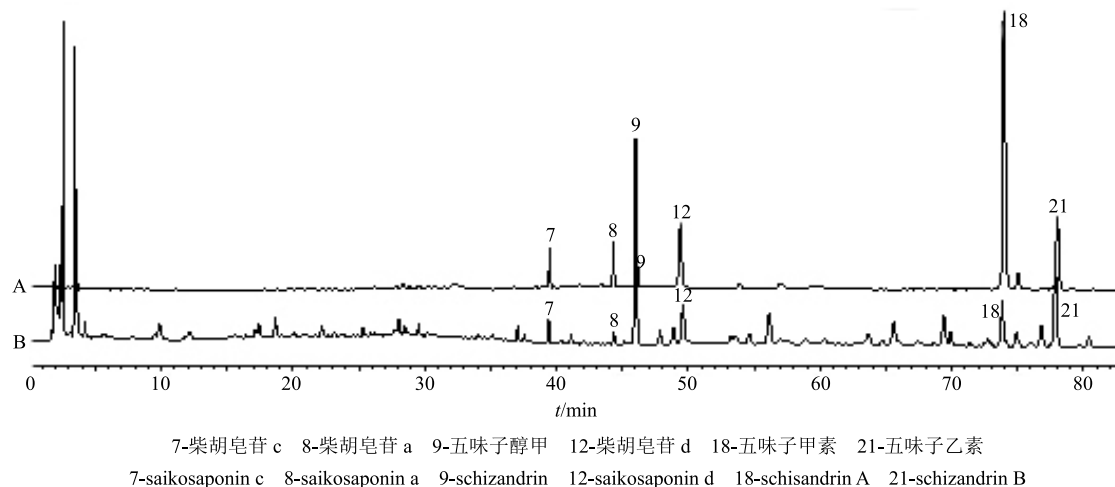


图 2 混合对照品 (A) 和护肝片供试品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of mixed standard solution (A) and Huguang Tablets samples for test (B)

后, 样本落在主成分平面上, 主成分平面可以代表不同样本的整体信息。本实验以指纹图谱中 22 个共有峰的相对峰面积为变量, 建立 10×22 的原始数据矩阵, 并使用多元统计软件 SIMCA 14.0 对 10 批护肝片样品进行 PCA。由图 3 ($R_X^2=0.465$, $R_Y^2=0.192$) 显示, 10 批药物主要分为 2 大类, S1、S9 为第 1 类, S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S10 为第 2 类。

2.9.2 OPLS-DA 为了更好地分析 10 批护肝片样本之间的差异, 本实验采用 OPLS-DA 法进行建模分析, 如图 4-A 所示, 数据矩阵的模型区分参数 $R_Y^2=0.998$, 模型预测参数 $Q^2=0.977$ (>0.9), 结果表明, 所建立的 OPLS-DA 法稳定, 具有较强的

预测能力。本实验应用变量重要性投影值 (variable importance in project, VIP) >1.0 来筛选出对 10 批护肝片样本分类贡献较大的成分。在 VIP 图 (图 4-B) 和系数图 (图 4-C) 中剔除的置信区间包含 0 的变量 (9 号峰), 通过 S-plot 图 (图 4-D), 保证所选离子具有较高可靠性和较大的变化程度, 结果共找到 2 个有意义变量, 按照 VIP 值大小依次为 12 号峰 (柴胡皂苷 d) 和 22 号峰。这 2 个化合物是造成 10 批护肝片样本出现差异的主要成分, 可为生产厂家在药品生产中更高效、合理地控制药品质量提供科学依据。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

本实验考察了 Hypersil C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)、Kromasil C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 和 Waters Symmetry C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 3 种色谱柱, 按“2.1”项下色谱条件对同一护肝片原料粉供试品溶液进行分析^[18]。结果表明, Waters 公司 Symmetry C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 分析本样品出峰较多, 峰形较好; 本实验分别考察

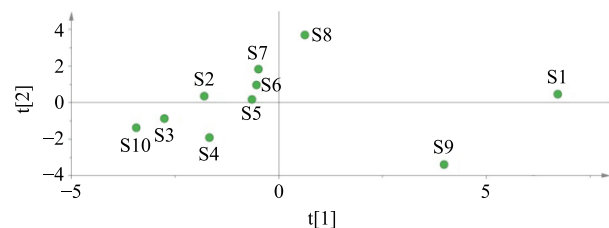
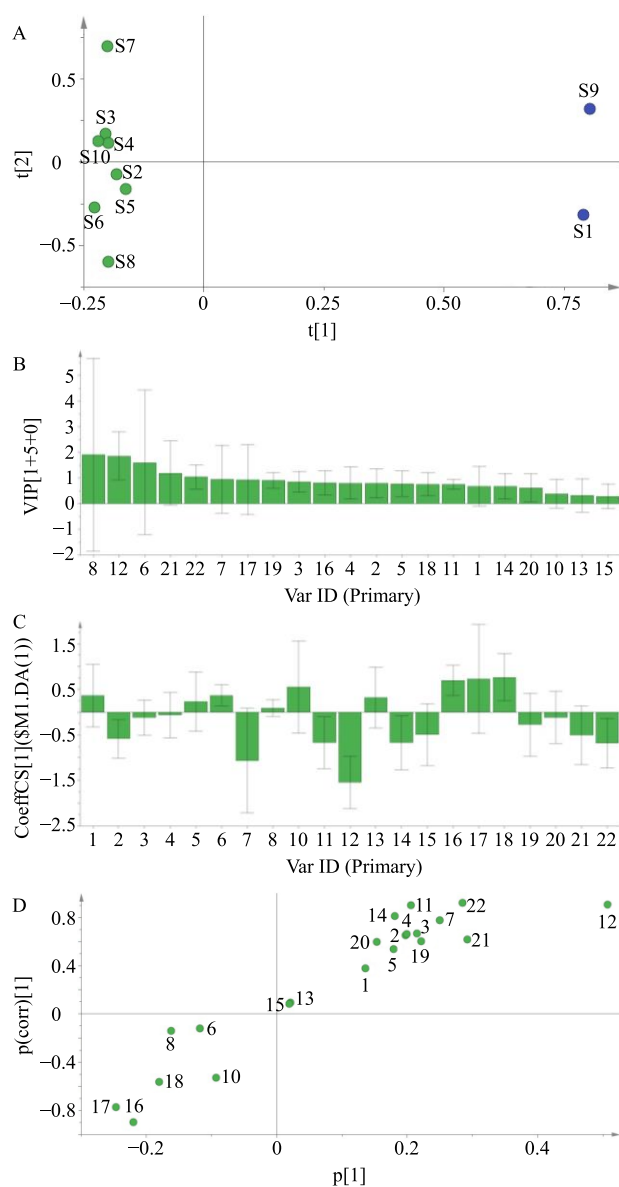


图 3 10 批护肝片样品的 PCA 图

Fig. 3 PCA plots in ten batches of Huguang Tablets



A-OPLS-DA 散点得分图 B-VIP 图 C-系数图 D-S-plot 图
A-scatter plot of OPLS-DA B-VIP plot C-coefficient D-S-plot

图 4 10 批护肝片的模式识别分析

Fig. 4 Pattern recognition analysis of 10 batches of Huguang Tablets

了甲醇-水、甲醇-0.05%磷酸水溶液、乙腈-水梯度洗脱、乙腈-0.05%磷酸水溶液、乙腈-0.5%冰醋酸水溶液作为色谱流动相时，护肝片的色谱条件，结果表明，选择乙腈-0.05%磷酸水溶液作为流动相，色谱峰的峰形最佳，分离效果优于其他流动相系统；本实验采用二极管阵列检测器（PDA）在不同波长下进行紫外扫描。结果表明，210 nm 波长下色谱图噪音较少，与其他波长比较，各峰分离度较好，响应值较高；本实验考察了 25、30、35 °C 不同柱温条件，以色谱峰分离效果较好、分离时间相对较短、

分离时柱压小为参考，选择适宜柱温^[18]。结果表明，35 °C 为适宜柱温；本实验考察了 5、10、20 μL 3 种体积进样，选择最佳进样量。结果表明，10 μL 为最佳进样量。最终本实验选择了 Waters 公司 Symmetry C₁₈ 色谱柱，流动相为乙腈-0.05%磷酸水梯度洗脱，检测波长为 210 nm，柱温为 35 °C，进样量为 10 μL 作为最终的色谱条件。

3.2 参照峰的选择

护肝片原料粉 HPLC 图中，保留时间为 46.7 min 的色谱峰是 22 个共有峰中较为稳定的 1 个峰，保留时间居中，与对照品比较，确认其为五味子醇甲的吸收峰，故选其作为内标物。

3.3 提取方法的优化

本实验对提取方法（超声法、萃取法、水提醇沉法及醇提水沉法）、提取溶剂（甲醇、乙醇、水）及提取溶剂的浓度（25%甲醇、50%甲醇、75%甲醇、100%甲醇）进行了优化。同时本实验对超声频率和超声时间进行了考察时发现，护肝片原料粉供试品溶液中的药物成分提取率呈现先升后降的趋势，结果表明，超声频率和超声时间都会对护肝片原料粉中活性成分造成影响，以致供试品中护肝片的药物成分含量的急剧下降。结果表明，采用 100% 甲醇作为提取溶剂超声提取 2 次，超声频率为 50 Hz，时间为 15 min，得到的护肝片原料粉供试品的峰响应最好、提取率最高、提取效果最优。

4 结论

护肝片具有显著的保护肝细胞、降低转氨酶的作用。但其保肝与降转氨酶作用的药效物质基础不确定、作用机制不清楚、质量控制标准较为单一，从而影响了护肝片临床疗效的提高。因此，为了建立健全护肝片的质量控制标准，本研究采用 HPLC 法建立了护肝片的指纹图谱，共标定了 22 个共有峰，并选择含柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素的混合对照品溶液对其中的 6 个成分进行指认。结果表明，10 批次护肝片的样品质量较为稳定；此外还应用 PCA 和 OPLS-DA 法，对 10 批护肝片原料粉样品进行分类，筛选到 2 种差异性质量标志物，分别为 12 号峰（柴胡皂苷 d）和 22 号峰，以便于更好地辨识药物之间的质量差异。

本实验首次采用指纹图谱结合化学计量学法对 10 批次护肝片原料粉的质量进行了研究，建立了对护肝片进行较为系统、整体和全面的分析和评价的

数据分析及处理方法。该方法能够有效评价出不同批次护肝片质量及需要重点关注的质量标志成分,为护肝片的质量评价提供了可行的理论依据,可为生产厂家在药品生产中更高效、合理地控制药品质量提供科学依据。

参考文献

- [1] 杨琳,梁雪琰,赵洪海,等.护肝片降低CCl₄肝损伤模型大鼠丙氨酸氨基转移酶作用及其机制[J].中医信息,2014,10(3):114-117.
- [2] 奚建英.护肝片治疗慢性乙型肝炎临床疗效分析[J].现代中西医结合杂志,2003,12(20):2175.
- [3] 朱小玉,于东,孟志刚,等.护肝片治疗非酒精性脂肪肝42例临床观察[J].北京医学,2006,28(8):489-490.
- [4] 马瑞宏,黄颖秋,杨金秋.护肝片联合丁二磺酸腺苷蛋氨酸治疗原发性胆汁性肝硬化的临床研究[J].现代药物与临床,2019,34(3):705-708.
- [5] 丁卫民,张丽娟,杨秀云.护肝片防治抗结核药物肝损害的临床观察[J].时珍国医国药,2006,17(11):2268-2269.
- [6] 中国药典[S].一部.2010.
- [7] 康建,周霖,孙志,等.基于UPLC指纹图谱结合化学模式识别的冠心丹参胶囊质量控制研究[J].中草药,2018,49(17):4051-4057.
- [8] 邓斌,王秋燕,周成高,等.益肾排毒丸中有效成分含量测定及指纹图谱研究[J].药物评价研究,2019,42(4):658-662.
- [9] Gao S M, Liu J S, Wang M, *et al.* Quantitative and HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics for quality evaluation of *Codonopsis Radix* processed with different methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(2): 160-168.
- [10] 吴瑞军,钟国跃,曾金祥,等.基于全二维液相色谱的牛黄上清丸指纹图谱研究[J].中草药,2019,50(3):588-597.
- [11] 秦建平,吴建雄,郎悦,等.痛宁凝胶的HPLC-MS指纹图谱研究[J].现代药物与临床,2016,31(4):427-430.
- [12] 张晓燕,龚苏晓,王磊,等.六经头痛片中辛夷和细辛GC指纹图谱研究[J].中草药,2017,48(20):4203-4207.
- [13] 彭苗苗,方芸.中药复方药效物质基础研究进展[J].中国药房,2010,21(7):659-660.
- [14] 马莹,郑伟然,王振中,等.桂枝茯苓胶囊中三萜酸类成分的UPLC/Q-TOF-MS指纹图谱研究[J].中草药,2019,50(3):626-631.
- [15] 孙如煜,李鹏跃,杜守颖,等.基于中药指纹图谱结合模式识别的清开灵硬胶囊批次间稳定性控制研究[J].中华中医药杂志,2017,32(10):4629-4633.
- [16] 戴云,叶艳青,冯伟博,等.化学模式识别在中药质量控制中的应用[J].云南民族大学学报:自然科学版,2007,16(4):334-337.
- [17] 王元清,韩彬,向荣,等.总量统计矩结合聚类分析与主成分分析评价虎杖饮片一致性与差异性[J].中草药,2015,46(19):2863-2869.
- [18] 周霖,周珮珮,王肖辉,等.UPLC-Q-Orbitrap HRMS结合主成分分析的丹灯通脑软胶囊质量评价研究[J].中草药,2018,49(18):4311-4318.