

基于指纹图谱分析和多成分同时定量的护肝片质量评价研究*

杨瑾, 殷智, 袁德培

(湖北民族学院医学院, 恩施 445000)

摘要 目的: 建立护肝片的 HPLC 指纹图谱, 并测定其主要成分的含量, 为护肝片的质量控制提供可靠方法。方法: 采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈 (A)–0.05% 磷酸水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0–6 min, 6%A; 6–9 min, 6%A → 40%A; 9–30 min, 40%A → 50%A; 30–45 min, 50%A; 45–65 min, 50%A → 75%A), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 250 nm, 柱温 30 °C; 建立护肝片 HPLC 指纹图谱, 并对 (R, S)–告依春、柴胡皂苷 a、五味子醇甲、柴胡皂苷 d、五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素的含量测定方法进行方法学考察。结果: 在指纹图谱研究中, 共确定护肝片 HPLC 指纹图谱 20 个共有峰, 通过与混合对照品比较, 指认其中 7 个指标成分, 分别是 (R, S)–告依春 (1 号峰)、柴胡皂苷 a (3 号峰)、五味子醇甲 (5 号峰)、柴胡皂苷 d (6 号峰)、五味子酯甲 (8 号峰)、五味子甲素 (17 号峰) 和五味子乙素 (20 号峰), 利用相似度软件对 23 批样品指纹图谱进行分析, 各批样品相似度均在 0.95 以上。在建立的色谱条件下测定 7 个成分, 分离度良好, 方法精密度和重复性的 RSD 均 < 1.5%, 供试品溶液在 24 h 内稳定, 各成分具有良好的线性关系和较宽线性范围; 6 批护肝片中 (R, S)–告依春、柴胡皂苷 a、五味子醇甲、柴胡皂苷 d、五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素质量分数分别为 0.07–0.12、0.13–0.20、0.51–0.58、0.06–0.13、0.07–0.14、0.10–0.17 和 0.18–0.23 mg · 片⁻¹。结论: 所建立的护肝片 HPLC 指纹图谱检测和定量测定分析方法快速、准确, 可以有效地评价护肝片的质量。关键词: 护肝片; 高效液相色谱; (R, S)–告依春; 柴胡皂苷 a; 五味子醇甲; 柴胡皂苷 d; 五味子酯甲; 五味子甲素; 五味子乙素; 指纹图谱; 质量控制

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254–1793 (2018) 11–2029–09

doi: 10.16155/j.0254–1793.2018.11.25

Quality evaluation of Hupan tablets based on HPLC fingerprint and simultaneous determination of multi-components*

YANG Jin, YIN Zhi, YUAN De-pei

(Medical School, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China)

Abstract Objective: To establish the HPLC fingerprint of Hupan tablets and determine the main components, so as to provide a reference for the quality control. **Methods:** The analysis was carried out on an Agilent Zorbax SB –C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with gradient elution of acetonitrile (A)–0.05% phosphoric acid aqueous solution (B) (0–6 min, 6%A; 6–9 min, 6%A → 40%A; 9–30 min, 40%A → 50%A; 30–45 min, 50%A;

* 生物资源保护与利用湖北省重点实验室开放基金项目 (PKLHB171)

第一作者 Tel: 13597780019; E-mail: 1736143814@qq.com

45–65 min, 50%A → 75%A) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 250 nm and the column temperature was 30 °C. The HPLC fingerprint was established, and determination method of (*R, S*)-epigoitrin, saikosaponin a, schisandrin, saikosaponin d, schisantherin, deoxyschizandrin and schisandrin B was studied methodologically. **Results:** 20 common peaks were found in the fingerprint of Hugin tablets, 7 of which were identified by comparison with the reference as (*R, S*)-epigoitrin (peak 1), saikosaponin a (peak 3), schisandrin (peak 5), saikosaponin d (peak 6), schisantherin (peak 8), deoxyschizandrin (peak 17) and schisandrin B (peak 20). The similarities of 23 batches of samples were above 0.95. The 7 compounds were well separated under the established chromatographic conditions. The RSD values for precision and repeatability tests were all less than 1.5% and the sample solution was stable during 24 h. All the compounds had a good linearity and wide linear range. The contents of (*R, S*)-epigoitrin, saikosaponin a, schisandrin, saikosaponin d, schisantherin, deoxyschizandrin and schisandrin B in 6 batches of Hugin tablets were 0.07–0.12 mg, 0.13–0.20 mg, 0.51–0.58 mg, 0.06–0.13 mg, 0.07–0.14 mg, 0.10–0.17 mg tablet and 0.18–0.23 mg per tablet, respectively. **Conclusion:** The method is fast and accurate, and can be used for the quality control of Hugin tablets.

Keywords: Hugin tablets; HPLC; (*R, S*)-epigoitrin; saikosaponin a; schisandrin; saikosaponin d; schisantherin; deoxyschizandrin; schisandrin B; fingerprint; quality control

中药指纹图谱是其化学组成整体性的化学表征,能够反映研究对象尽量多的组分,主要用于评价中药质量的真实性、稳定性和优良性,是全面、整体地控制中药质量最有效的方法之一。经过十几年的研究和运用,中药指纹图谱技术日臻成熟,在中药质量标准控制领域得到很好发展,《中华人民共和国药典》2015年版一部已收载三七通舒胶囊、抗宫炎片、血脂康片/胶囊等指纹图谱质控方法^[1]。

护肝片是一种用于治疗慢性肝炎及早期肝硬化的常用基本药物,全方由柴胡、茵陈、板蓝根、五味子、猪胆粉、绿豆 6 味药材制成,具有疏肝理气、健脾消食和降低转氨酶之功效^[2]。方中柴胡具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气功效,化学成分主要有皂苷类及黄酮类化合物,其中柴胡皂苷为其主要活性成分之一,该成分具有增强机体特异性免疫反应^[3],能抗菌消炎^[4-5]和抗病毒^[6]等;茵陈是一种具有保肝功效的特色中药,可以清利湿热、利胆退黄,其主要化学成分包括黄酮、有机酸、香豆素,临床实践中常与其他中药配伍用于甲、乙型和黄疸型肝炎的治疗^[7];板蓝根具有抗病毒,抗菌,抗内毒素,调节免疫等作用,多用于流行性感、乙肝等病毒性疾病的防治,目前,化合物 (*R, S*)-告依春被认为是抗病毒的代表性有效成分之一^[8-9];五味子能够增加机体免疫力^[10],抗肿瘤作用^[11],降血脂保肝^[12],主要含有木脂素和挥发性物质 2 类化学成分,其中木脂素成分研究较多^[13-14]。

中药往往是多成分、多靶点协同发挥作用起到疾病防治目的,较单一或几个组分的成分研究,指纹图谱更加全面、系统和科学。本研究建立了 4 个厂家 23 批次护肝片 HPLC 指纹图谱,并建立被指认的 7 个共有峰定量检测方法,为系统客观评价及控制护肝片质量提供参考依据。

1 仪器和材料

2695 型高效液相色谱仪 (2489 紫外可见光检测器,沃特世公司); BT-125D 型电子天平 (梅特勒-托利多公司); KQ-500ES 超声波清洗机 (昆山市超声仪器有限公司,功率 500 W)。

护肝片 23 批,通化利民药业有限责任公司生产,批号分别为 161005 (S1)、161006 (S2)、161120 (S3)、161125 (S4)、161201 (S5); 黑龙江葵花药业股份有限公司生产,批号分别为 201602090 (S6)、201608051 (S7)、201610095 (S8)、201605054 (S9)、201610170 (S10)、201610124 (S11); 通化爱心药业股份有限公司生产,批号分别为 160501 (S12)、160510 (S13)、160804 (S14)、171015 (S15)、171105 (S16)、171106 (S17); 安徽九方制药有限公司生产,批号分别为 160510 (S18)、160804 (S19)、171015 (S20)、171105 (S21)、160501 (S22)、171105 (S23)。

对照品 (*R, S*)-告依春 (批号 111753-201706, 含量 100%)、柴胡皂苷 a (批号 110777-201711, 含量 91.1%)、五味子醇甲 (批号 110857-201714, 含

量 99.9%)、柴胡皂苷 d(批号 110778-201711, 含量 95.8%)、五味子酯甲(批号 111529-201706, 含量 95.2%)、五味子甲素(批号 110764-201714, 含量 99.3%)、五味子乙素(批号 110765-201512, 含量 99%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.05% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~6 min, 6%A; 6~9 min, 6%A → 40%A; 9~30 min, 40%A → 50%A; 30~45 min, 50%A; 45~65 min, 50%A → 75%A); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 250 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取对照品(*R,S*)-告依春、柴胡皂苷 a、五味子醇甲、柴胡皂苷 d、五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素各适量,精密称定,加甲醇制成含(*R,S*)-告依春 4.81 μg · mL⁻¹、柴胡皂苷 a 7.25 μg · mL⁻¹、五味子醇甲 22.43 μg · mL⁻¹、柴胡皂苷 d 4.42 μg · mL⁻¹、五味子酯甲 4.81 μg · mL⁻¹、五味子甲素 5.98 μg · mL⁻¹ 和五味子乙素 9.17 μg · mL⁻¹ 的混合溶液,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.2 供试品溶液 取护肝片 10 片,去包衣,研细,取粉末 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 30 mL,称量,超声(功率 250 W,频率 40 kHz)处理 1 h,再称量,用甲醇补足减失的量,摇匀,0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 HPLC 指纹图谱的建立

2.3.1 精密密度试验 取同一批护肝片供试品溶液(批号 201602090),在“2.1”项色谱条件下,连续进样 6 针,记录色谱图,以五味子醇甲为参比峰,计算各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.4%,相对峰面积的 RSD 均小于 0.8%,表明仪器精密密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取同一批护肝片(批号 201602090)供试品溶液,按“2.1”项色谱条件,分别在 0、3、6、12、15、24 h 进样,记录色谱图,以五味子醇甲为参比峰,计算各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.2%,相对峰面积的 RSD 均小于 2.8%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.3 重复性试验 取同一批护肝片样品(批号 201602090),按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份溶液,在“2.1”项色谱条件下分析,记录色谱图,以五味子

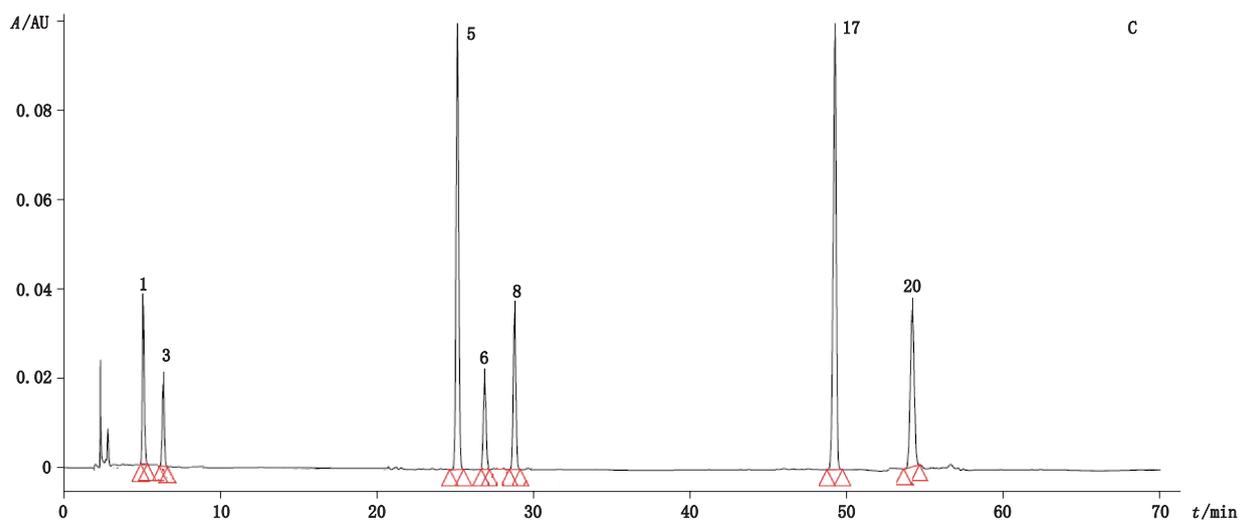
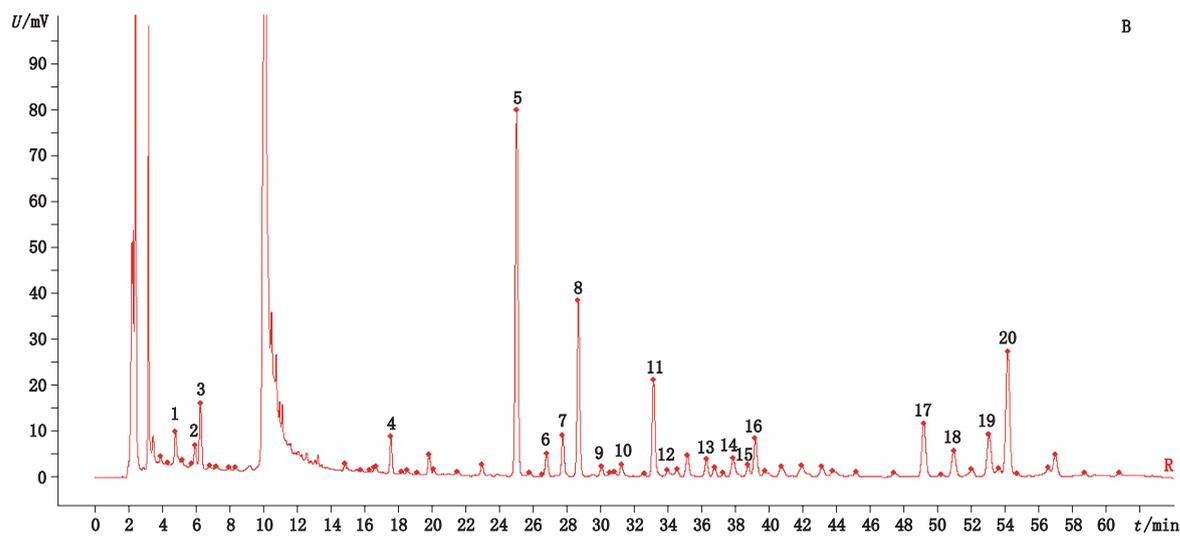
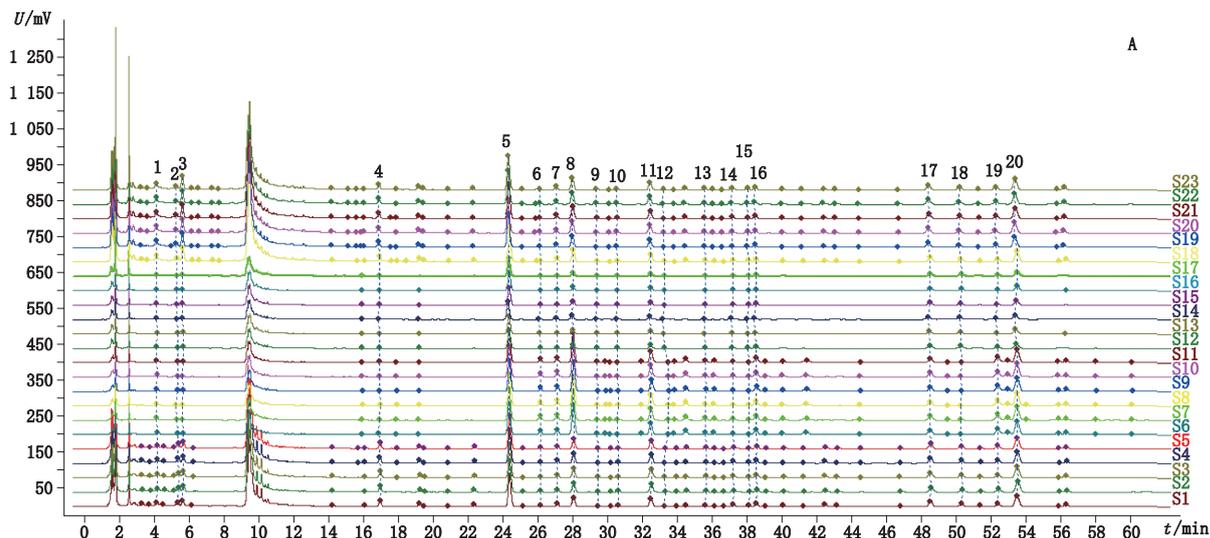
醇甲为参比峰,计算各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.5%,相对峰面积的 RSD 均小于 1.3%,结果表明方法重复性良好。

2.3.4 指纹图谱的建立及相似度评价 取收集的护肝片样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件依次进样测定,记录色谱图。将 23 份护肝片指纹图谱导入国家药典委员会编写的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 年版)软件进行分析。因 S6 号样品图谱各峰信号强度较大,分离完全,且峰形较佳,所以将 S6 号样品的图谱作为参照图谱,时间窗宽度设定为 0.20,采用多点校正全谱匹配指纹图谱,并生成指纹图谱共有模式。结果 23 批护肝片样品指纹图谱中,共确认 20 个共有峰,23 批指纹图谱的相似度分别为 0.984、0.985、0.984、0.984、0.984、0.950、0.951、0.951、0.951、0.951、0.951、0.959、0.960、0.959、0.959、0.960、0.959、0.981、0.984、0.983、0.983、0.983,均大于 0.95。指纹图谱叠加图及其共有模式见图 1。

2.3.5 部分共有峰指认及相对峰面积计算 通过与混合对照品色谱图进行比对,可以对指纹图谱中 7 个化合物进行指认,结果 1 号峰为(*R,S*)-告依春,3 号峰为柴胡皂苷 a,5 号峰为五味子醇甲,6 号峰为柴胡皂苷 d,8 号峰为五味子酯甲,17 号峰为五味子甲素,20 号峰为五味子乙素;其平均保留时间分别为(4.78 ± 0.01) min、(6.28 ± 0.02) min、(24.99 ± 0.02) min、(26.77 ± 0.03) min、(28.65 ± 0.02) min、(49.11 ± 0.01) min 和(54.07 ± 0.02) min。其中 5 号峰峰位居中,分离度良好,峰面积较大,因此选作参考峰,计算其他共有峰相对峰面积,结果见表 1。

2.4 护肝片中 7 个化合物成分测定

2.4.1 线性关系的考察及检测下限和定量下限的检测 精密量取“2.2.1”项下(*R,S*)-告依春、柴胡皂苷 a、五味子醇甲、柴胡皂苷 d、五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素混合对照品溶液 0.5、1、2、4、6、8、10 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至至刻度,摇匀,制成 7 份不同质量浓度的混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件,分别进样 10 μL 进行测定,记录色谱图峰面积。以各组分峰面积 *Y* 为纵坐标,对照品质量浓度 *X* (μg · mL⁻¹) 为横坐标,进行线性回归,得到各组分线性回归方程及相关系数。取浓度混合对照品溶液,按信噪比(*S/N*) 3:1 和 10:1 分别测定各组分检测下限(LLOD)和定量下限(LLOQ),结果见表 2。



1. (R,S)- 告依春((R,S)-epigoitrin) 3. 柴胡皂苷 a(saikosaponin a) 5. 五味子醇甲(schisandrin) 6. 柴胡皂苷 d(saikosaponin d) 8. 五味子酯甲(schisantherin) 17. 五味子甲素(deoxyschizandrin) 20. 五味子乙素(schisandrin B)

图 1 23 批护肝片 HPLC 指纹图谱 (A)、对照指纹图谱 (B) 和混合对照品色谱图 (C)

Fig. 1 Fingerprints of 23 batches of Huguang tablets (A), reference fingerprint (B) and chromatogram of mixed reference substances (C)

表 1 23 批样品 (S1~S23) 共有峰相对峰面积

Tab. 1 The relative peak areas of 20 common chromatographic peaks of 23 samples (S1~S23)

峰号 (peak No.)	相对峰面积 (relative peak area)											
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
1	0.059	0.065	0.064	0.064	0.067	0.050	0.050	0.050	0.051	0.051	0.051	0.041
2	0.092	0.068	0.087	0.108	0.087	0.016	0.017	0.017	0.016	0.016	0.016	0.018
3	0.125	0.117	0.127	0.128	0.127	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.057
4	0.150	0.150	0.150	0.150	0.150	0.018	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.018
5 (s)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
6	0.041	0.039	0.042	0.041	0.039	0.129	0.129	0.128	0.128	0.129	0.129	0.035
7	0.089	0.089	0.090	0.090	0.089	0.168	0.168	0.152	0.152	0.168	0.168	0.056
8	0.302	0.302	0.301	0.301	0.301	0.965	0.966	0.965	0.965	0.966	0.966	0.216
9	0.023	0.022	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021	0.036
10	0.037	0.036	0.037	0.037	0.037	0.014	0.016	0.015	0.014	0.014	0.016	0.031
11	0.290	0.292	0.292	0.292	0.292	0.401	0.401	0.400	0.400	0.401	0.401	0.174
12	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.027
13	0.052	0.052	0.052	0.052	0.052	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.027
14	0.065	0.065	0.065	0.065	0.066	0.055	0.056	0.056	0.056	0.056	0.055	0.071
15	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.013	0.013	0.012	0.013	0.013	0.013	0.029
16	0.106	0.106	0.106	0.106	0.106	0.169	0.169	0.170	0.169	0.169	0.169	0.092
17	0.226	0.227	0.227	0.227	0.228	0.197	0.199	0.198	0.198	0.199	0.198	0.212
18	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.015	0.017	0.015	0.015	0.017	0.015	0.188
19	0.140	0.139	0.140	0.140	0.142	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.089
20	0.508	0.510	0.509	0.509	0.510	0.590	0.591	0.591	0.591	0.591	0.590	0.369

峰号 (peak No.)	相对峰面积 (relative peak area)										
	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23
1	0.041	0.042	0.041	0.041	0.041	0.181	0.133	0.135	0.136	0.137	0.132
2	0.018	0.019	0.020	0.019	0.019	0.049	0.052	0.065	0.065	0.065	0.066
3	0.057	0.057	0.058	0.057	0.058	0.289	0.289	0.289	0.291	0.289	0.290
4	0.018	0.018	0.021	0.018	0.018	0.121	0.121	0.122	0.121	0.122	0.121
5 (s)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
6	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.024	0.048	0.023	0.023	0.024	0.048
7	0.056	0.056	0.056	0.056	0.056	0.090	0.090	0.091	0.091	0.091	0.090
8	0.216	0.216	0.216	0.216	0.216	0.354	0.354	0.354	0.353	0.354	0.353
9	0.035	0.036	0.036	0.036	0.036	0.019	0.019	0.032	0.033	0.033	0.034
10	0.031	0.030	0.031	0.031	0.031	0.038	0.038	0.038	0.037	0.037	0.038
11	0.175	0.174	0.173	0.175	0.176	0.248	0.248	0.247	0.246	0.246	0.247
12	0.029	0.030	0.028	0.028	0.028	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
13	0.028	0.027	0.028	0.028	0.028	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048	0.047
14	0.071	0.071	0.071	0.072	0.071	0.061	0.059	0.059	0.059	0.059	0.059
15	0.028	0.029	0.028	0.028	0.029	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.044
16	0.092	0.091	0.091	0.091	0.091	0.092	0.092	0.092	0.092	0.092	0.093
17	0.212	0.214	0.212	0.214	0.214	0.219	0.219	0.219	0.219	0.219	0.219
18	0.188	0.185	0.187	0.187	0.187	0.122	0.121	0.121	0.121	0.121	0.122
19	0.088	0.087	0.088	0.089	0.087	0.128	0.129	0.129	0.128	0.128	0.129
20	0.370	0.369	0.369	0.369	0.370	0.466	0.467	0.467	0.466	0.466	0.467

表 2 7个成分的回归方程、检测下限和定量下限

Tab. 2 Linear regression equations, LODs and LOQs of seven components

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	<i>r</i>	线性范围 (linear range) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LLOD / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LLOQ / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
(<i>R, S</i>)-告依春((<i>R, S</i>)-epigoitrin)	$Y=124.43X+21.80$	0.999 1	0.48~9.60	0.046 7	0.123 5
柴胡皂苷 a (saikosaponin a)	$Y=342.76X-6.84$	0.999 2	0.72~14.40	0.037 5	0.135 0
五味子醇甲 (schisandrin)	$Y=987.54X+116.76$	0.999 8	2.24~44.80	0.031 8	0.126 6
柴胡皂苷 d (saikosaponin d)	$Y=54.82X-19.06$	0.999 2	0.44~8.80	0.045 8	0.093 6
五味子酯甲 (schisantherin)	$Y=273.74X+38.45$	0.999 8	0.48~9.60	0.019 6	0.078 5
五味子甲素 (deoxyschizandrin)	$Y=468.43X-12.75$	0.999 7	0.60~12.00	0.036 9	0.103 8
五味子乙素 (schisandrin B)	$Y=483.28X-20.75$	0.999 8	0.92~18.40	0.022 5	0.083 3

2.4.2 仪器精密度试验 取批号为 201602090 (S6 号样品) 的供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,连续进样 6 针进行分析,记录峰面积。结果(*R, S*)-告依春、柴胡皂苷 a、五味子醇甲、柴胡皂苷 d、五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素峰面积的 RSD 分别为 0.7%、0.8%、0.4%、1.0%、0.3%、0.4% 和 0.6%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取批号为 201602090 (S6 号样品) 的供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,分别于 0、2、4、8、12、18、24 h 进样,记录峰面积。结果(*R, S*)-告依春、柴胡皂苷 a、五味子醇甲、柴胡皂苷 d、五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素峰面积的 RSD 分别为 0.6%、1.2%、0.6%、1.1%、0.8%、0.6% 和 0.5%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.4 重复性试验 取批号为 201602090 的 S6 号样品,按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,

按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果(*R, S*)-告依春、柴胡皂苷 a、五味子醇甲、柴胡皂苷 d、五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素平均含量分别为 0.11、0.17、0.58、0.12、0.12、0.15、0.22 $\text{mg} \cdot \text{片}^{-1}$, RSD 分别为 0.8%、1.0%、0.7%、0.9%、0.5%、0.5% 和 0.7%,表明本方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 取批号为 201602090 的 S6 号样品 0.5 g,共取 6 份,精密称定,分别置具塞锥形瓶中,各加入含(*R, S*)-告依春 0.058 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、柴胡皂苷 a 0.085 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、五味子醇甲 0.252 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、柴胡皂苷 d 0.056 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、五味子酯甲 0.075 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、五味子甲素 0.088 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和五味子乙素 0.108 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液(按“2.2.1”项下方法制备)1 mL,按“2.2.2”项下方法制备供试溶液,依法测定,记录峰面积,计算各组分加样回收率,结果见表 3。

表 3 护肝片 7 个成分的加样回收率结果 ($n=6$)

Tab. 3 Recoveries of six maker components in Hupan tablets

成分 (component)	样品含量 (original)/mg	对照品加入量 (spiked)/mg	测得总量 (found)/mg	回收率 (recovery) / %	平均回收率 (average recovery) /%	RSD / %
(<i>R, S</i>)-告依春((<i>R, S</i>)-epigoitrin)	0.063	0.058	0.120	99.09	98.9	1.2
	0.063	0.058	0.118	97.85		
	0.060	0.058	0.119	101.12		
	0.061	0.058	0.117	98.49		
	0.062	0.058	0.118	98.50		
	0.065	0.058	0.121	98.22		
柴胡皂苷 a (saikosaponin a)	0.091	0.085	0.173	98.23	97.9	0.8
	0.091	0.085	0.173	98.52		

表 3(续)

成分 (component)	样品含量 (original)/mg	对照品加入量 (spiked)/mg	测得总量 (found)/mg	回收率(recovery)/ %	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
柴胡皂苷 a (saikosaponin a)	0.092	0.085	0.174	98.18		
	0.094	0.085	0.174	97.47		
	0.097	0.085	0.179	98.25		
	0.092	0.085	0.171	96.49		
五味子醇甲 (schisandrin)	0.282	0.252	0.535	100.21	99.6	0.6
	0.282	0.252	0.533	99.80		
	0.281	0.252	0.532	99.81		
	0.280	0.252	0.531	99.81		
	0.278	0.252	0.522	98.48		
	0.282	0.252	0.533	99.77		
柴胡皂苷 d (saikosaponin d)	0.055	0.056	0.110	99.00	99.0	0.2
	0.055	0.056	0.110	98.86		
	0.056	0.056	0.111	98.82		
	0.051	0.056	0.106	99.05		
	0.049	0.056	0.104	99.23		
	0.048	0.056	0.103	98.83		
五味子酯甲 (schisantherin)	0.062	0.075	0.136	99.20	99.1	0.7
	0.062	0.075	0.134	98.10		
	0.063	0.075	0.138	99.77		
	0.070	0.075	0.143	98.88		
	0.071	0.075	0.146	100.00		
	0.066	0.075	0.139	98.45		
五味子甲素 (deoxyschizandrin)	0.074	0.088	0.161	99.32	99.2	0.8
	0.074	0.088	0.162	99.98		
	0.073	0.088	0.158	97.99		
	0.075	0.088	0.162	99.01		
	0.074	0.088	0.162	100.00		
	0.072	0.088	0.158	98.63		
五味子乙素 (schisandrin B)	0.116	0.108	0.223	99.51	99.2	0.5
	0.114	0.108	0.219	98.83		
	0.116	0.108	0.221	98.56		
	0.112	0.108	0.219	99.27		
	0.111	0.108	0.219	100.05		
	0.113	0.108	0.219	99.01		

2.4.6 样品定量测定 取护肝片供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,按标准曲线法分别计算样品中(*R,S*)-告依春、柴胡皂苷 a、五味子醇甲、柴胡

皂苷 d、五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素的平均含量,结果见表 4。

表 4 7 个成分含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{片}^{-1}$, $n=3$)

Tab. 4 Determination of seven marker components

编号 (No.)	(<i>R,S</i>)-告依春 ((<i>R,S</i>)-epigointrin)	柴胡皂苷 a (saikosaponin a)	五味子醇甲 (schisandrin)	柴胡皂苷 d (saikosaponin d)	五味子酯甲 (schisantherin)	五味子甲素 (deoxyschizandrin)	五味子乙素 (schisandrin B)
S1	0.07	0.15	0.53	0.08	0.09	0.12	0.18
S6	0.12	0.18	0.56	0.11	0.12	0.15	0.23
S7	0.10	0.20	0.58	0.13	0.14	0.17	0.21
S12	0.10	0.13	0.51	0.06	0.07	0.10	0.21
S18	0.08	0.18	0.56	0.11	0.12	0.15	0.19
S19	0.08	0.16	0.54	0.09	0.10	0.13	0.19

3 讨论

近年来,中医药工业总产值持续增长,中药也逐步走向国门为世界认可,中医药已成为中国与世界各国开展人文交流,促进东西方文明交流互鉴的重要内容,故而中药质量的把控尤为重要。因中药制剂多为数种药材制成,所含成分丰富,治疗疾病具有多靶向性等特征,显然传统药品质量检测方法不能客观真实地评价中药质量。中药指纹图谱具有整体性、特征性及模糊性,是一种综合的、量化的质量鉴别手段,可以对中药质量进行定性和定量评价分析,是一种中药质量系统、客观的评价方式。护肝片是较常用肝病防治基本药物,全方由柴胡、茵陈、板蓝根、五味子、猪胆粉、绿豆 6 味药材制成,成分复杂,从指纹图谱峰大小和成分含量值可以看出, (*R,S*)-告依春及柴胡皂苷类成分含量较低,但因其方中均具有重要作用,故而在护肝片指标成分研究中不可或缺,应在质量控制研究中重点监测,作为评价护肝片质量重要指标之一。

在 200~400 nm 下对混合对照品溶液进行扫描,发现最大吸收波长为 228 nm,但实验发现,利用该波长得到的色谱图干扰峰信号较强,不利于目标成分分离;参考《中华人民共和国药典》2015 年版一部护肝片含量项下^[1]检测波长 250 nm,干扰峰影响消除,目标化合物也能完全显现。流动相摸索过程中,流动相首选甲醇-水和乙腈-水系统,但发现柴胡指标成分柴胡皂苷未能出峰,当利用乙腈-磷酸盐溶液系统时,目标化合物能有较高响应,其他化合物也能完全分离,所以选择乙腈-0.05% 磷酸水溶液作为流

动相。

本研究共收集到 4 个厂家 23 批次护肝片,建立护肝片的 HPLC 指纹图谱,共确认指纹图谱中 20 个共有峰,并指认了其中 7 个化合物;同时又建立了这 7 个成分((*R,S*)-告依春、柴胡皂苷 a、五味子醇甲、柴胡皂苷 d、五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素)的定量检测方法,并选取 4 个厂家生产的 6 批次样品进行含量考察。本方法客观、简捷,重现性好,精密度高,可以为控制护肝片质量提供参考依据。

参考文献

- [1] 祝明,陈碧莲,石上梅. 中药指纹图谱技术在中国药典 2015 年版一部中的应用[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(5): 611
ZHU M, CHEN BL, SHI SM. Application of fingerprint technology on traditional Chinese medicine in Chinese Pharmacopoeia (2015 edition) volume I [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2016, 33(5): 611
- [2] 中华人民共和国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 961
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 961
- [3] 武剑. 柴胡多糖对巨噬细胞免疫功能的调节及对 TLR4 信号通路的影响[D]. 上海: 复旦大学, 2012
WU J. Effects of *Bupleurum* Polysaccharides on the Immunologic Function and TLR 4 Signaling Pathway of Macrophages [D]. Shanghai: Fudan University, 2012
- [4] 杨天鸣,盖静,赵萌. 柴胡水提取物抗菌作用研究[J]. 中兽医医药杂志, 2011, 30(2): 49
YANG TM, GAI J, ZHAO M. Research on the bacteriostasis effect of aqueous extract from *Bupleurum chinenses* DC. [J]. *J Tradit Chin Vet Med*, 2011, 30(2): 49
- [5] 杜婷,杜士明,王刚,等. 竹叶柴胡与北柴胡的抗炎保肝作用比较[J]. 医药导报, 2014, 33(9): 1144
DU T, DU SM, WANG G, et al. Comparison of anti-inflammatory

- and hepatoprotective activities of *Bupleurum marginatum* Wall. ex DC. and *Bupleurum chinense* DC. [J]. Her Med, 2014, 33(9): 1144
- [6] 李云静. 小柴胡汤及其拆方抗流感病毒作用的体外实验研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2010
- LI YJ. Xiaochaihu decoction and Its Disassemble Prescriptions of Anti-Influenza Virus *in vitro* [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2010
- [7] 曹锦花. 茵陈的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(6): 489
- CAO JH. Advanced study on chemical constituents and pharmaceutical activities of *Artemisiae Scopariae Herba* [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2013, 30(6): 489
- [8] 肖珊珊, 金郁, 孙毓庆. 板蓝根化学成分、药理及质量控制研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(6): 455
- XIAO SS, JIN Y, SUN YQ. Recent progress in the studies of chemical constituents, pharmacological effects and quality control methods on the roots of *Isatis indigotica* [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2003, 20(6): 455
- [9] 张诗静, 刘明华, 李寒冰, 等. 板蓝根药材中告依春与 fructopyrano-(1→4)-glucopyranose 双糖体外抗病毒作用及量效关系研究 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(9): 1083
- ZHANG SJ, LIU MH, LI HB, *et al.* The *in vitro* anti-virus effects and dose-effect relationship of epigoitrin and fructopyrano-(1→4)-glucopyranose based on "deletion/increment" strategy [J]. Chin J New Drugs, 2013, 22(9): 1083
- [10] 梁婧, 侯海燕, 兰晓霞, 等. 五味子乙素的药理作用及其分子机制的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(4): 506
- LIANG J, HOU HY, LAN XX, *et al.* Advance in study on pharmacological effects and molecular mechanisms of schisandrin B [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2014, 31(4): 506
- [11] 任丽佳, 李林, 殷放宙, 等. 五味子抗肿瘤活性成分及作用机制研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(1): 140
- REN LJ, LI L, YIN FZ, *et al.* Review of the current progress in the anti-tumor constituents of *Fructus Schisandrae Chinensis* and the underlying mechanisms [J]. Chin Pharmacol Bull, 2012, 28(1): 140
- [12] 苑荣爽, 李贺, 孙靖辉, 等. 北五味子多糖对高脂诱导非酒精性脂肪性肝病大鼠的降血脂作用及其抗氧化活性 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2017, 43(6): 1103
- YUAN RS, LI H, SUN JH, *et al.* Lipid-lowering effect and antioxidant activity of polysaccharide from *Schisandra chinensis* in rats with non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet [J]. J Jilin Univ (Med Ed), 2017, 43(6): 1103
- [13] 王越. 五味子化学成分的研究 [D]. 吉林: 吉林大学, 2015
- WANG Y. Study on Chemical Constituents from *Schisandrae Chinensis Fructus* [D]. Jinlin: Jilin University, 2015
- [14] 杨擎, 曲晓波, 李辉, 等. 五味子化学成分与药理作用研究进展 [J]. 吉林中医药, 2015, 35(6): 626
- YANG Q, QU XB, LI H, *et al.* Schisandra chemical composition and pharmacological action research [J]. Jilin J Tradit Chin Med, 2015, 35(6): 626

(本文于 2018 年 1 月 30 日收到)