doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2022.23.020

基于指纹图谱结合化学计量学的香砂平胃颗粒质量评价

元晓静

（中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院，福建 福州 350000）

摘要：目的 建立评价香砂平胃颗粒质量的高效液相色谱（HPLC）指纹图谱结合聚类分析（CA）及正交偏最小二乘判别分析（OPLS－DA）法。**方法** 色谱柱为Waters XTERRA C_{18}柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈－0.05%磷酸溶液（梯度洗脱），流速为1.0 mL/min，检测波长为220 nm（苍术素、苍术醇）、284 nm（厚朴酚、和厚朴酚、橙皮苷、川陈皮素及甘草苷），柱温为25 ℃，进样量为10 μL。以苍术素为参照，建立14批香砂平胃颗粒的HPLC指纹图谱；与对照品溶液比对，确定共有峰；结合化学计量学方法对制剂进行质量评价。**结果** 确定23个共有峰，指认7个成分，分别为甘草苷、橙皮苷、苍术醇、苍术素、川陈皮素、和厚朴酚、厚朴酚；14批制剂的指纹图谱相似度为0.971～0.994；CA和OPLS－DA结果显示，14批样品聚为3类，表明不同年份样品间的质量存在一定差异；发现5个差异性标志物，分别为苍术醇、和厚朴酚、厚朴酚、7号峰和16号峰。**结论** 所建立的HPLC指纹图谱结合CA及OPLS－DA方法，可有效评价香砂平胃颗粒的质量。

关键词：香砂平胃颗粒；高效液相色谱法；指纹图谱；相似度；聚类分析；正交偏最小二乘判别分析

中图分类号：R932；R284.1；R286.0　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1006－4931(2022)23－0088－04

Quality Evaluation of Xiangsha Pingwei Granules Based on Fingerprint Combined with Chemometrics

YUAN Xiaojing

(The 900th Hospital of the Joint Logistics Support Force of Chinese PLA, Fuzhou, Fujian, China 350000)

Abstract: Objective To establish a high－performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint combined with cluster analysis (CA) and orthogonal partial least squares－discriminant analysis (OPLS－DA) method for evaluating the quality of Xiangsha Pingwei Granules. **Methods** The chromatographic column was Waters XTERRA C_{18} column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile－0.05% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelengths were 220 nm (atractylodin and atractylol) and 284 nm (magnolol, honokiol, hesperidin, nobiletin and liquiritin), the column temperature was 25 ℃, and the injection volume was 10 μL. The HPLC fingerprint of 14 batches of Xiangsha Pingwei Granules were established with atractylodin as the reference, the common peaks were determined by the comparison with the reference solution, and the quality of the preparation was evaluated by the HPLC fingerprint combined with chemometrics. **Results** Twenty－three common peaks were determined and seven components were identified, which were liquiritin, hesperidin, atractylol, atractylonin, nobiletin, honokiol and magnolol, respectively. The fingerprint similarity of 14 batches of preparations was in the range of 0.971－0.994. The results of CA and OPLS－DA showed that 14 batches of samples were grouped into three clusters, indicating that there were some differences in the quality of samples in different years. Five different markers were identified, which were atractylol, honokiol, magnolol, peak 7 and peak 16, respectively. **Conclusion** The established HPLC fingerprint combined with CA and OPLS－DA can effectively evaluate the quality of Xiangsha Pingwei Granules.

Key words: Xiangsha Pingwei Granules; HPLC; fingerprint; similarity; cluster analysis; orthogonal partial least squares－discriminant analysis

第一作者：元晓静，女，大学本科，药师，研究方向为药品质量标准，（电子信箱）309129821@qq.com。

352－357.

[10] 王石全，刘 颖，江 莉，等. 新建疫苗车间洁净度确认及环境监测微生物数据库的建立[J]. 微生物学免疫学进展，2016，44(6)：43－47.

[11] 冯 震，李 芳，宋明辉，等. 核糖体基因片段分析及在药品葡萄球菌污染控制应用中的探讨[J]. 药物分析杂志，2018，38(4)：680－687.

[12] 范一灵，房 蕊，蒋 波，等. 微生物鉴定分型技术应用于医药企业微生物污染调查[J]. 中国医药工业杂志，2010，41(11)：810－817.

[13] 李琼琼，宋明辉，秦 峰，等. 制药企业生产环境中污染葡萄球菌菌种鉴定方法的比较评价及毒素基因调查分析[J]. 中国医药工业杂志，2019，50(4)：416－421.

[14] 徐全华，王 羿. 无菌药品生产环境微生物的鉴定和种群分析[J]. 中国药事，2019，33(12)：1411－1418.

[15] 张国林，苏远科，沈海英，等. 16S rRNA/ITS基因序列分析与微生物分类鉴定及其在药品微生物质量控制中的应用[J]. 中国现代应用药学，2017，34(10)：1489－1495.

[16] 赵丽元，李寅生，丁红雨，等. 无菌药品生产企业洁净环境微生物16S rRNA数据分析与应用[J]. 中国医药工业杂志，2021，52(8)：1064－1068.

（收稿日期：2021－08－24；修回日期：2022－06－10）

香砂平胃颗粒是由炒苍术、姜炙厚朴、陈皮、醋香附、甘草、砂仁制成的中药复方制剂，具有健脾、温中、燥湿功效，用于治疗饮食不节、食湿互滞、胃脘胀痛、消化不良[1]。《中华人民共和国卫生部药品标准 中药成方制剂》WS_3 - B2369 - 97 中仅有颗粒剂检查项，相关文献仅采用高效液相色谱（HPLC）法对方中姜炙厚朴、陈皮的3个成分做了定量检测。指纹图谱结合化学计量学已广泛用于评价中药及其制剂的质量，其中指纹图谱通过HPLC法得到中药或中药制剂的特征成分色谱图，借助相似度评价系统，实现对中药及其制剂内在质量的一致性评价和产品稳定性的全面监测[2-4]。聚类分析（CA）和正交偏最小二乘判别分析（OPLS - DA）等化学计量学方法可对分散的数据进行分析[5-7]，发挥其高预测精度优势，筛选出质量差异标志物，二者结合既能体现整体信息，又能说明个体差异。本研究中通过建立HPLC指纹图谱结合化学计量学分析出不同批次香砂平胃颗粒的相似性和稳定性，筛选出差异性成分，为香砂平胃颗粒标准的全面提升提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪（美国 Waters 公司），配有可变换波长紫外检测器；BT55S 型电子天平（赛多利斯科学仪器有限公司，精度为 0.01 mg）；KQ - 550D 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司，功率为 500 W，频率为 40 kHz）。

1.2 试药

对照品苍术素（批号为 111924 - 202006，含量 99.3%），厚朴酚（批号为 110729 - 202015，含量 99.4%），和厚朴酚（批号为 110730 - 202111，含量 99.1%），橙皮苷（批号为 110721 - 202116，含量 95.3%），川陈皮素（批号为 112055 - 202102，含量 99.6%），甘草苷（批号为 111610 - 202113，含量 97.8%），均购自中国食品药品检定研究院；苍术醇（成都曼思特生物其余科技有限公司，批号为 200759 - 21 - 4，纯度为 99.1%）；其余试剂均为色谱纯，水为屈臣氏蒸馏水；香砂平胃颗粒［云南腾药制药股份有限公司，规格为每袋 10 g，共 14 批，编号为 S1 - S5（生产于 2021 年），S6 - S10（生产于 2020 年），S11 - S14（生产于 2019 年）］。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Waters XTERRA C_{18} 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相[8-10]：乙腈（A）- 0.05% 磷酸溶液（B），梯度洗脱（0 ~ 20 min 时 20%A → 45%A，20 ~ 32 min 时 45%A → 60%A，32 ~ 43 min 时 60%A，43 ~ 60 min 时 60%A → 85%A）；波长：220 nm（20 ~ 32 min 时苍术素、苍术醇），284 nm（0 ~ 20 min 时甘草苷、橙皮苷，32 ~ 60 min，厚朴酚、和厚朴酚、川陈皮素）；流速：1.0 mL / min；柱温：25 ℃；进样量：10 μL。

2.2 溶液制备

取苍术素、苍术醇、厚朴酚、和厚朴酚、橙皮苷、川陈皮素、甘草苷对照品各适量，精密称定，加甲醇溶解，得质量浓度分别为 0.113 2，0.100 5，0.100 2，0.098 6，0.057 4，0.050 1，0.030 8 mg / mL 的混合对照品溶液。

取样品 5 袋，研匀，取 2.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 80% 甲醇 50 mL，称定质量，超声处理（功率为 450 W）40 min，称定质量，用 80% 甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

按处方组成和生产工艺分别制备缺炒苍术、姜炙厚朴、陈皮和甘草的阴性样品，按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

精密度试验：取样品（编号为 S2）适量，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次。结果以 12 号峰苍术素为参照，其余 22 个共有峰相对保留时间的 *RSD* 为 0.39% ~ 0.57%（$n = 6$），相对峰面积的 *RSD* 为 1.18% ~ 1.74%（$n = 6$），表明仪器精密度良好。

稳定性试验：取 2.2 项下供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件分别于 0，3，6，9，12，15，20 h 时进样测定。结果显示，以 12 号峰苍术素为参照，其余 22 个共有峰相对保留时间的 *RSD* 为 0.46% ~ 0.72%（$n = 7$），相对峰面积的 *RSD* 为 1.33% ~ 1.85%（$n = 7$），表明供试品溶液在 20 h 内稳定。

重复性试验：取样品（编号为 S2）各适量，共 6 份，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。结果以 12 号峰苍术素为参照，其余 22 个共有峰相对保留时间的 *RSD* 为 0.13% ~ 0.26%（$n = 6$），相对峰面积的 *RSD* 为 1.05% ~ 1.42%（$n = 6$），表明方法重复性良好。

2.4 指纹图谱[11-12]

指纹图谱建立及相似度评价：取 14 批样品（编号为 S1 - S14），按 2.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件进样分析。根据中药指纹图谱相似度评价系统 2012A 版，以编号为 S2 样品的色谱图为参考，建立香砂平胃颗粒指纹图谱的共有模式，确定共有峰 23 个，详见图 1。其中，12 号峰（苍术素）保留时间适中，色谱峰响应最大，故选择为参照峰（R）。与对照图谱比较，各指纹图谱的相似度在 0.971 ~ 0.994 之间，表明样品各批次间共有成分基本一致。相似度评价结果见表 1。

共有峰指认及归属：取 2.2 项下混合对照品溶液和阴性对照品溶液，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录

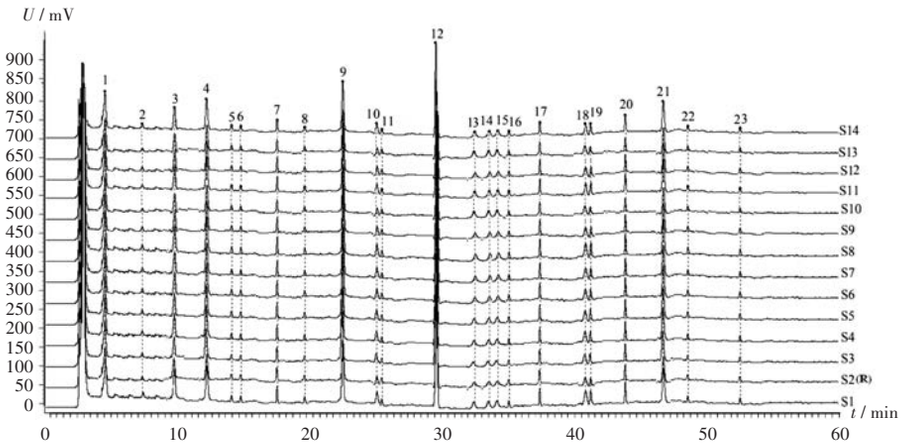


图 1　14 批香砂平胃颗粒高效液相色谱叠加指纹图谱

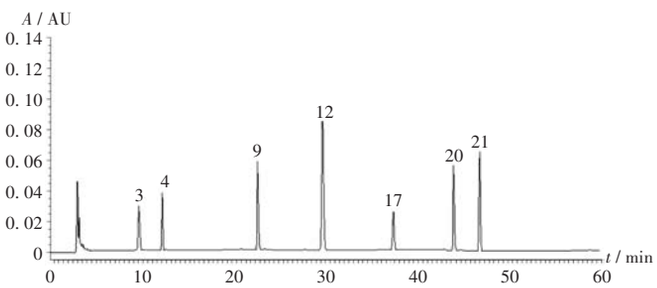
Fig. 1　HPLC superimposed fingerprint of 14 batches of Xiangsha Pingwei Granules

表 1　14 批香砂平胃颗粒相似度评价结果

Tab. 1　Results of similarity evaluation of 14 batches of Xiangsha Pingwei Granules

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0. 972	S6	0. 986	S11	0. 991
S2	0. 971	S7	0. 982	S12	0. 992
S3	0. 978	S8	0. 983	S13	0. 993
S4	0. 979	S9	0. 985	S14	0. 994
S5	0. 975	S10	0. 987		

色谱图，并与图 1 进行对比指认，结果见图 2 和图 3。共有峰中，3，4，9，12，17，20，21 号色谱峰分别指认为甘草苷、橙皮苷、苍术醇、苍术素、川陈皮素、和厚朴酚、厚朴酚；其中，3 号峰归属于甘草，4 号峰和 17 号峰归属于陈皮，9 号峰和 12 号峰归属于炒苍术，20 号峰和 21 号峰归属于姜炙厚朴。



3. 甘草苷　4. 橙皮苷　9. 苍术醇　12. 苍术素　17. 川陈皮素　20. 和厚朴酚　21. 厚朴酚

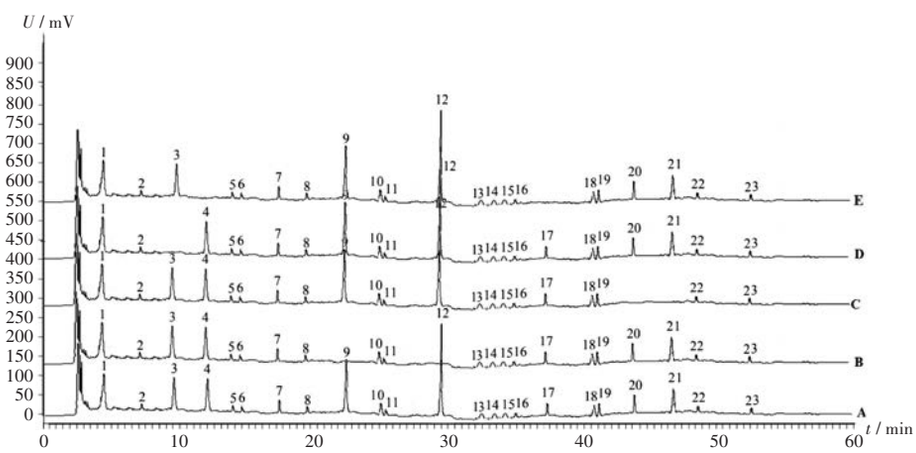
图 2　混合对照品溶液高效液相色谱图

3. Liquiritin　4. Hesperidin　9. Atractylol　12. Atractylodin　17. Nobiletin　20. Honokiol　21. Magnolol

Fig. 2　HPLC chromatograms of mixed reference solution

2. 5　CA

采用 SPSS 24. 0 统计学软件分析，以 14 批样品中 23 个共有峰的峰面积为变量，采用组间连接 CA[13]。由图 4 可知，14 批样品按生产年份可聚为三类，分别为 S1 - S5，S6 - S10，S11 - S14。



A. 供试品溶液　B - E. 阴性对照品溶液（分别缺苍术、厚朴、甘草、陈皮）

图 3　阴性对照品溶液高效液相色谱图

A. Test solution　B - E. Negative reference solution (lack of Atractylodis Rhizoma, Magnoliae Officinalis Cortex, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma and Citri Reticulatae Pericarpium, respectively)

Fig. 3　HPLC chromatograms of negative reference solution

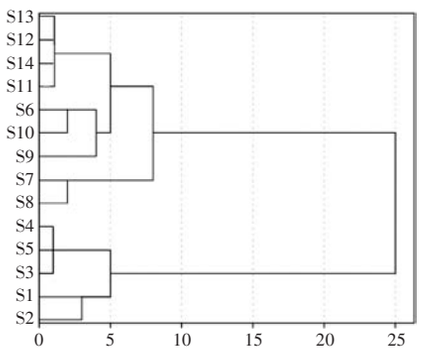


图 4　14 批香砂平胃颗粒聚类分析图

Fig. 4　Cluster analysis of 14 batches of Xiangsha Pingwei Granules

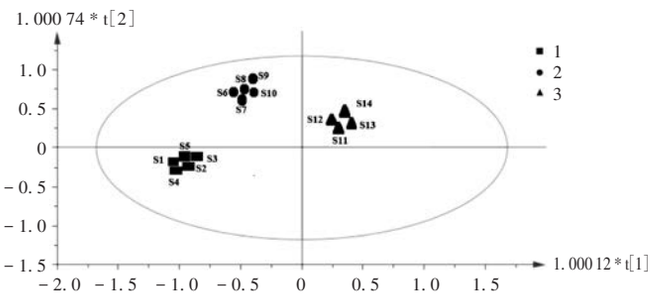


图 5　14 批香砂平胃颗粒 OPLS－DA 得分散点图

Fig. 5　OPLS－DA scoring plot of 14 batches of Xiangsha Pingwei Granules

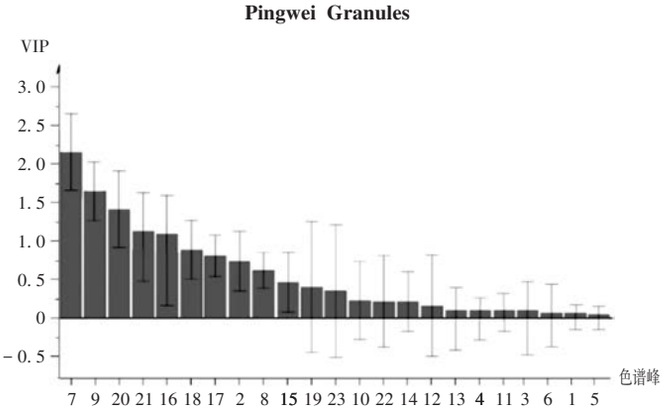


图 6　共有峰 VIP 图

Fig. 6　VIP plot of common peaks

2.6　OPLS－DA

以 14 批样品中 23 个共有峰的峰面积为变量，采用 SIMCA 14.1 软件进行 OPLS－DA[5,14]，得出造成 3 组间差异的标志性共有峰，详见图 5。结合变量重要性投影值（VIP）筛选出导致 14 批样品差异的主要共有峰。以 VIP＞1 为标准，筛选出 5 个差异性标志物的色谱峰，分别为 7 号峰、9 号峰（苍术醇）、20 号峰（和厚朴酚）、21 号峰（厚朴酚）、16 号峰，表明上述峰的差异对分类的影响较大。详见图 6。

3　讨论

图 6 显示，造成样品质量差异的 5 个差异性标志物的色谱峰分别为 7 号峰、9 号峰（苍术醇）、20 号峰（和厚朴酚）、21 号峰（厚朴酚）、16 号峰，其中 20 号峰和 21 号峰均来源于姜炙厚朴，9 号峰来源于炒苍术。因此，建议生产企业将苍术醇、厚朴酚、和厚朴酚作为内控指标纳入含量测定，并严格把关药材质量，以保证产品的均一性。

本研究中采用波长切换法建立了 14 批样品的 HPLC 指纹图谱，相似度值均＞0.970，表明产品化学成分一致性较好。HPLC 指纹图谱共标定 23 个共有峰，指认出其中 7 个共有峰，化学计量学分析将 14 批样品按生产年份聚为三类，表明不同年份样品间的质量存在一定差异，编号为 S11－S14 中 7 个成分的含量较低，可能与样品生产时间较长有关，可进一步考察产品稳定性。

综上所述，所建立的 HPLC 指纹图谱结合化学计量学的方法可用于香砂平胃颗粒的质量控制，为该制剂质量标准的提升提供参考。

参考文献

[1] WS_3－B2369－97，中华人民共和国卫生部药品标准 中药成方制剂[S].

[2] 姚　瑶，赵淑淑，姚俊霞，等. 郁金配方颗粒 HPLC 指纹图谱及指标成分含量测定研究[J]. 中国药业，2021，30(10)：57－60.

[3] 闫　慧，孙国祥，迟晗笑，等. 基于标准制剂控制模式和定量指纹图谱评价复方甘草片的质量一致性[J]. 色谱，2019，37(11)：1200－1208.

[4] 李　鹂，陈　静，孙绍波. 余甘降酸茶的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药师，2020，23(1)：66－70.

[5] 郭　威，孙　蓉，王　亮，等. 基于指纹图谱和 OPLS－DA 的越南和国产土茯苓差异性化合物探索[J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23(14)：62－67.

[6] 张艳欣，吴佩颖，王丹丹. 中药指纹图谱中常用的数理统计方法[J]. 上海医药，2019，40(9)：74－77.

[7] 王越欣，苗雨露，李　宁，等. 青翘和老翘的 HPLC 指纹图谱比较及聚类分析、主成分分析[J]. 中国药房，2021，32(6)：663－668.

[8] 赵　艳，侯昕彤，赵　磊. HPLC 多波长测定香砂平胃丸中橙皮苷、厚朴酚、甘草苷、和厚朴酚及苍术素的含量[J]. 中国药物评价，2018，35(3)：206－208.

[9] 张　丹，王小旭，谢贺贺. UPLC 法同时测定感冒解痛散中 10 种成分的含量[J]. 西北药学杂志，2021，36(4)：555－559.

[10] 符必述，魏谭军，王　丽，等. HPLC 一测多评法测定神术合剂中广藿香酮等 7 个活性成分的含量[J]. 药学与临床研究，2021，29(5)：351－354.

[11] 孙秀漫，周楚娟，杨佳彬，等. 金莲花颗粒的高效液相指纹图谱研究[J]. 中国药业，2020，29(7)：113－116.

[12] 徐　妍，杨华蕊，杨永寿，等. 中药指纹图谱研究现状及展望[J]. 世界最新医学信息文摘，2018，18(76)：91－94.

[13] 孙德国，梁　璇，马灵珍. 独圣活血片中 8 种成分的含量测定及聚类分析、主成分分析[J]. 西北药学杂志，2021，36(1)：20－25.

[14] 孙　瑞，李任时，余伯阳. 基于特征图谱和 OPLS－DA 的茯苓产地溯源分析[J]. 海峡药学，2021，33(9)：18－22.

（收稿日期：2022－03－01；修回日期：2022－06－30）