复方刺五加颗粒 HPLC 指纹图谱建立及多成分含量测定研究

杨雯雯,杨赛赛,王旭,严妍,刘磊*,吴修红*
(黑龙江中医药大学,黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要 目的:利用高效液相色谱(HPLC)法建立了复方刺五加颗粒的指纹图谱,并测定 6 种成分的含量,为其质量控制和评价提供参考。方法:采用 HPLC 法建立 10 批复方刺五加颗粒指纹图谱,并进行相似度评价、结合化学模式识别分析进行评价,同时对复方刺五加颗粒中紫丁香苷、刺五加苷 E、异嗪皮啶、五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素进行多成分含量测定。结果:10 批复方刺五加颗粒相似度均 >0.921,其中紫丁香苷、刺五加苷 E、异嗪皮啶、五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素的线性范围分别为 2.92 ~5.84 μg、2.55 ~5.10 μg、0.405 ~0.81 μg、0.095 ~0.19 μg、0.14 ~0.28 μg、0.68 ~1.36 μg 线性关系良好,加样回收率为 100.2% ~101.4%,*RSD* 为 1.2% ~1.6%,精密度、重复性、稳定性均符合要求。结论:该方法简单、便捷,可为评价复方刺五加颗粒质量提供依据。

关键词 复方刺五加颗粒;含量测定;指纹图谱
中图分类号:R284.1 **文献标识码**:A **文章编号**:1002 - 2392(2025)03 - 0043 - 09
DOI:10.19664/j.cnki.1002 - 2392.250051

复方刺五加颗粒是由刺五加、五味子两味药组成的复方制剂,具有益气健脾、补肾安神的功效,适用于脾肾阳虚导致的体虚乏力、食欲不振、腰膝酸软、失眠多梦等症[1-2]。刺五加性温而味甘,其功效为补益气血,调理脾胃[3-4],刺五加中主要化学成分包含紫丁香苷、异嗪皮啶、刺五加苷 E 等。其中紫丁香苷具有抗疲劳、提高记忆力的作用,同时对肾虚引起的失眠有显著改善作用[5-6];异嗪皮啶具有较好的抗炎、抗肿瘤的作用[7-8];刺五加苷 E 具有抗帕金森、通过调节 PI3K/AKT 途径治疗肺动脉高压的作用[9-10]。五味子中以木脂素类成分为主[11],五味子醇甲在现代医学研究中发现其具有保护血管、抗炎[12]、抗氧化[13-14]、增强抗疲劳能力的作用。五味子甲素可以作用于 Ykt6 从而起到保护神经的作用[15];五味子乙素可以通过调控 TLR2/MYD88 信号通路缓解炎症的作用[16]。

指纹图谱作为一种现代分析技术的重要工具,不仅拥有高度的专属性,能够区分不同来源和批次间的成分差异,而且稳定性高、重复性强[17-18]。在复方制剂的研究中,结合化学分析与模式识别的方法,指纹图谱不仅可以为中药的质量评价提供科学而精确的依据,同时也为药品监管提供了有力的技术支持[19-20]。指纹图谱能够反映复方制剂中化学成分的种类及数量信息和中药内各种化学成分的整体状态,对评估中药品质优劣、真伪,保证质量的一致性和稳定性做出了突出贡献[21-23]。

本研究为完善复方刺五加颗粒的质量标准,对其建立了 HPLC 指纹图谱鉴别方法;紫丁香苷、刺五加苷 E、异嗪皮啶、五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素 6 种成分含量测定方法以及化学模式识别方法,以期为复方刺五加颗粒的质量控制以及临床合理用药提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

Waters E2695 型高效液相色谱仪(美国沃特世公司);FA2004 电子分析天平(上海津平科学仪器有限公司);MS105DU 电子分析天平(METTLER TOLEDO 公司);SB - 5200DTD 超声波清洗仪(宁波新艺超声设备有限公司);DZKW - C 恒温水浴锅(上海树立仪器仪表有限公司);SHZ - DIII 循环水真空泵(予华仪器有限责任公司)。

收稿日期:2024 - 10 - 08 **修回日期**:2024 - 12 - 19
基金项目:黑龙江省揭榜挂帅(2023ZXJ02C01);黑龙江省重点研发计划(2024ZX12C16)
作者简介:杨雯雯(1998 -),女,硕士研究生,研究方向:中药药效物质基础及质量评价研究。
*通信作者:刘磊(1985 -),男,博士,助理研究员,研究方向:中药药效物质基础及作用机制研究。
吴修红(1978 -),女,博士,教授,博士生导师,研究方向:中药药效物质基础及质量评价研究。

1.2 试剂与药品

10 批复方刺五加颗粒颗批号及所用药材信息如表 1 所示；紫丁香苷（批号 111574 - 202106，含量 94.3%）、刺五加苷 E（批号 111713 - 202105，含量 98.1%）、异嗪皮啶（批号 110837 - 202310，含量 99.9%）、五味子醇甲（批号 110857 - 202316，含量 99.2%）、五味子甲素（批号 110764 - 201905，含量 99.5%）、五味子乙素（批号 110765 - 201803，含量 99.1%），以上对照品均来自于中国食品药品检定研究院；水为娃哈哈纯化水；乙腈、甲醇均为色谱级购于北京迈瑞达科技有限公司。

表 1 1 ~ 10 批复方刺五加颗粒

样品编号	批号	生产日期
S1	20240201	2024.2.25
S2	20240202	2024.2.26
S3	20240203	2024.2.27
S4	20231201	2023.12.01
S5	20231202	2023.12.04
S6	20231203	2023.12.08
S7	20231204	2023.12.16
S8	20231205	2023.12.24
S9	20231206	2023.12.28
S10	20231207	2023.12.31

2 方法与结果

2.1 指纹图谱研究

2.1.1 色谱条件

色谱柱：Diamonsil C_{18}（4.6 mm × 250 mm，5 μm）；流动相：乙腈（A）- 0.1% 磷酸水（B）；梯度洗脱（0 ~ 20 min，10% A→20% A；20 ~ 30 min，20% A→25% A；30 ~ 60 min，25% A→40% A；60 ~ 65 min，40% A→45% A；65 ~ 70 min，45% A→50% A；70 ~ 85 min，50% A→54% A；85 ~ 90 min，54% A→58% A；90 ~ 100 min，58% A→62% A；100 ~ 125 min，62% A→75% A），柱温：25 ℃；流速：1.0 mL/min；进样量：10 μL；检测波长：220 nm。

2.1.2 溶液制备

2.1.2.1 供试品溶液制备

取复方刺五加颗粒适量，研细，称取约 4 g，加甲醇 30 mL，超声处理 40 min 过滤，滤液蒸干，残渣加甲醇适量溶解，转移至 5 mL 容量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。

2.1.2.2 混合对照品溶液制备

精密称取紫丁香苷 7.44 mg，刺五加苷 E 6.45 mg，异嗪皮啶 4.05 mg，五味子醇甲 1.07 mg，五味子甲素 1.41 mg，五味子乙素 3.45 mg 加甲醇溶解（刺五加苷 E 先加 50% 甲醇溶解）分别定溶至 5 mL 容量瓶，作为母液。分别精密吸取上述对照品母液适量，混合定容至 5 mL 容量瓶，最终混合对照品溶液浓度为含紫丁香苷 0.298 mg · mL^{-1}，刺五加苷 E 0.258 mg · mL^{-1}，异嗪皮啶 0.194 mg · mL^{-1}，五味子醇甲 0.051 mg · mL^{-1}，五味子甲素 0.014 mg · mL^{-1}，五味子乙素 0.069 mg · mL^{-1}。

2.1.2.3 阴性对照品溶液制备

分别制备缺刺五加、五味子的阴性颗粒，各阴性颗粒按供试品溶液制备方法制备成阴性对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

2.1.3.1 精密度试验

取同一份复方刺五加颗粒样品（20240201），适量，按“2.1.2.1”供试品溶液制备方法制备供试品溶液，按“2.1.1”色谱条件连续进样 6 次，以 14 号五味子醇甲色谱峰为参照峰，结果测得各共有峰相对保留时间 *RSD* 值均 < 1.0%，相对峰面积 *RSD* 值均 < 2.6%，表明仪器精密度良好，见表 2。

表 2 复方刺五加颗粒方法学验证结果

共有峰编号	相对保留时间 *RSD*/%		相对峰面积 *RSD*/%	
	精密度	稳定性	精密度	稳定性
1	0.11	0.14	2.22	2.73
2	0.11	0.19	2.21	2.65
3	0.12	0.23	1.98	2.34
4	0.09	0.17	1.98	2.56
5	0.07	0.21	2.21	2.75
6	0.12	0.23	2.25	2.09
7	0.10	0.17	2.60	2.17
8	0.12	0.18	2.34	2.67
9	0.13	0.24	1.87	2.80
10	0.11	0.21	2.02	2.07
11	0.07	0.18	2.25	1.98
12	0.09	0.21	2.58	1.96
13	0.09	0.23	2.34	1.84
14	0.12	0.25	2.05	2.73
15	0.12	0.24	1.67	1.78
16	0.12	0.21	1.59	1.95
17	0.11	0.23	2.37	1.78
18	0.09	0.18	1.79	1.86
19	0.08	0.19	2.54	1.92
20	0.09	0.22	2.03	2.20
21	0.12	0.23	1.79	2.23
22	0.09	0.21	2.24	2.67
23	0.07	0.18	2.22	2.34

2.1.3.2 稳定性试验

取同一份复方刺五加颗粒样品（20240201），适量，按“2.1.2.1”供试品溶液制备方法制备供试品溶液，分别于 0、4、8、12、18、24、36 h 按“2.1.1”色谱条件进行测定，以 14 号五味子醇甲色谱峰为参照峰，结果测得各个共有峰相对保留时间 *RSD* 值均 < 0.26%，相对峰面积 *RSD* 值均 < 2.8%，表明供试品溶液在 36 h 内稳定性良好，见表 2。

2.1.3.3 重复性试验

取同一份复方刺五加颗粒样品（20240201），适

量，按“2.1.2.1”供试品溶液制备方法平行制备6 份供试品溶液，按“2.1.1”色谱条件连续进样 6 次，以 14 号五味子醇甲色谱峰为参照峰，结果测得各个共有峰相对保留时间 *RSD* 值均 <0.13%，相对峰面积 *RSD* 值均 <2.6%，表明该方法重复性好，见表 2。

2.1.4 复方刺五加颗粒指纹图谱建立

取 10 批复方刺五加颗粒样品，按“2.1.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件进样，得到 10 批样品的 HPLC 色谱图，导入“2012 版”中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件进行分析评价，设定复方刺五加颗粒样品 S1 为参照指纹图谱（R），采用中位数法，结合多点校正并进行 Mark 峰匹配，10 批样品 HPLC 叠加指纹图谱（见图 1），共确定 23 个共有峰。其中 14 号峰（五味子醇甲）峰面积较大，与相邻色谱峰分离效果好且保留时间稳定，可设为参照峰。结果测得 23 个共有峰的相对保留时间 *RSD* 均 < 0.23%，相对峰面积 *RSD* 在 5.2% ~ 12.9%，说明 10 批样品中 23 个共有峰的相对保留时间稳定，相对峰面积具有一定的差异。

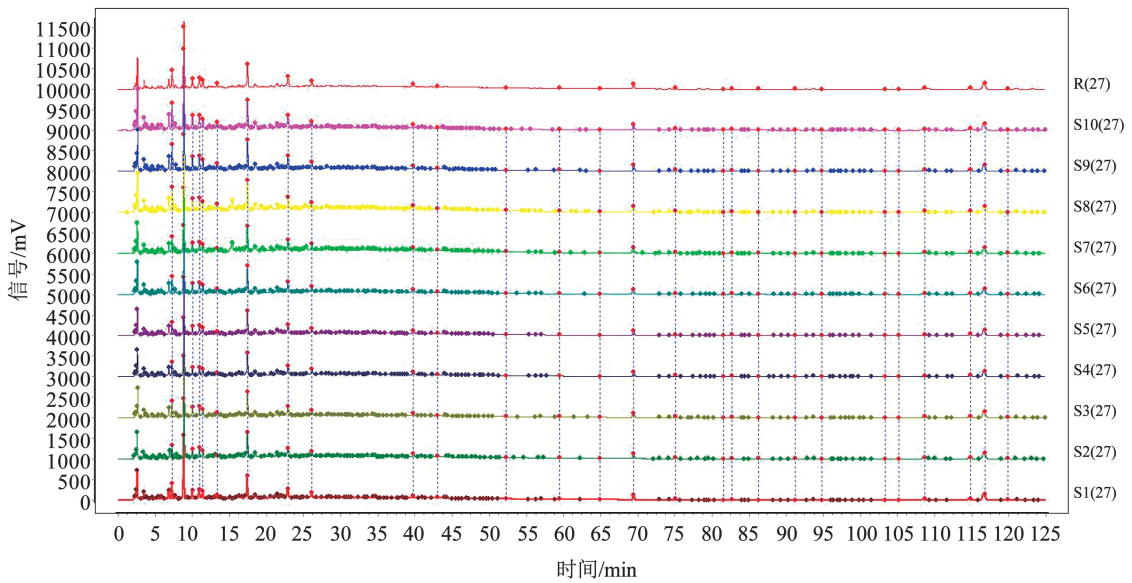


图 1 10 批复方刺五加颗粒指纹图谱

2.1.4.1 相似度评价

将 10 批复方刺五加颗粒的色谱图数据导入 2012 版“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”。选定 S1 号样品的色谱图为参照图谱，对 10 批样品进行多点校正和自动匹配，设定时间窗宽度为 0.2 min，进行多点矫正和全谱峰匹配，生成 HPLC 叠加指纹图谱和对照图谱（R）。计算 10 批复方刺五加颗粒的色谱图相似度，均 >0.921，见表 3。表明不同批次复方刺五加颗粒具有较好的质量一致性。

表 3 10 批复方刺五加颗粒相似度比较

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1.000	0.959	0.993	0.994	0.975	0.992	0.997	0.982	0.917	0.945
S2	0.996	1.000	0.921	0.954	0.917	0.975	0.994	0.963	0.956	0.923
S3	0.983	0.987	1.000	0.967	0.967	0.994	0.991	0.968	0.984	0.957
S4	0.975	0.996	0.995	1.000	0.988	0.991	0.945	0.934	0.934	0.967
S5	0.978	0.956	0.994	0.996	1.000	0.996	0.976	0.963	0.921	0.994
S6	0.985	0.985	0.998	0.991	0.995	1.000	0.956	0.933	0.998	0.995
S7	0.996	0.985	0.989	0.996	0.993	0.994	1.000	0.945	0.923	0.996
S8	0.987	0.974	0.978	0.992	0.996	0.967	0.987	1.000	0.976	0.997
S9	0.988	0.988	0.998	0.975	0.945	0.945	0.943	0.997	1.000	0.997
S10	0.954	0.967	0.996	0.992	0.987	0.987	0.965	0.997	0.985	1.000

2.1.4.2 共有峰的归属

取“2.1.2”项下复方刺五加颗粒供试品溶液（图 2）及阴性供试品溶液（图 3），按照“2.1.1”项下色谱条件测定，将供试品溶液与阴性供试品溶液色谱峰进行比较，经过对色谱峰及保留时间进行对比分析，对 23 个共有峰进行归属，结果 14 个共有峰可以在原药材中找到具体归属，其中 1、2、7、8、9 来自刺五加原药材，14、15、16、17、18、19、20、21、22 号峰来自五味子原药材。

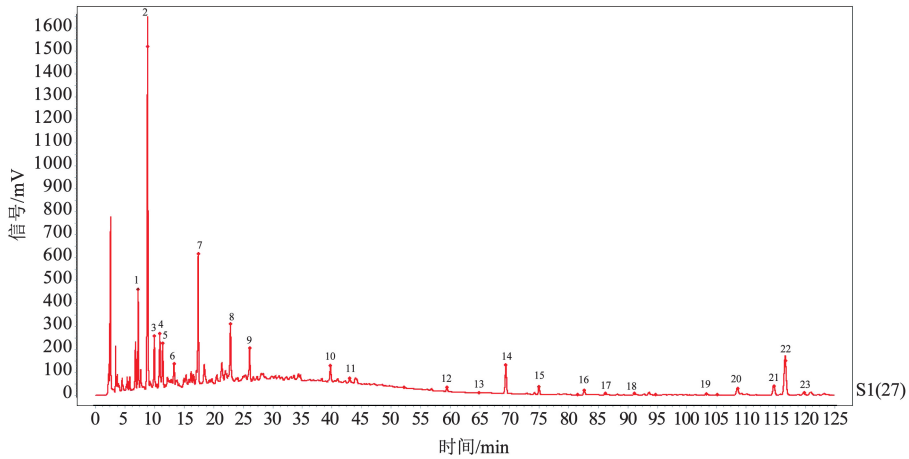


图 2　复方刺五加颗粒供试品色谱图

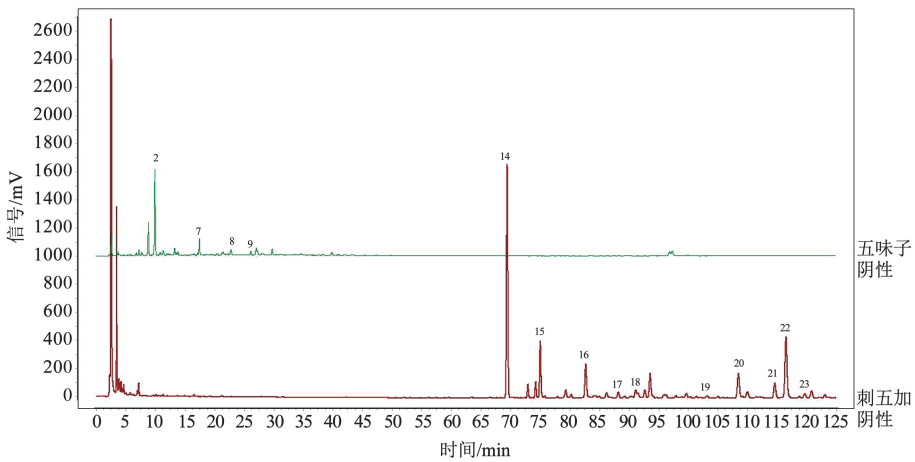


图 3　阴性供试品 HPLC 色谱图

2.1.4.3　参比峰的选择

五味子醇甲是复方刺五加颗粒的主要成分之一，且供试品色谱图中可看出，14 号峰峰面积较大且保留时间居中，分离度良好，因此，确定 14 号五味子醇甲色谱峰为参比峰。

2.1.4.4　共有峰的指认

取“2.1.2”项下复方刺五加颗粒供试品溶液（图 2）及混合对照品溶液（图 4），按照“2.1.1”项下色谱条件测定，经过对色谱峰及保留时间进行对比分析，定位了 23 个共有峰，其中 2，7，8，14，20，22 号峰分别为紫丁香苷、刺五加苷 E、异嗪皮啶、五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素。

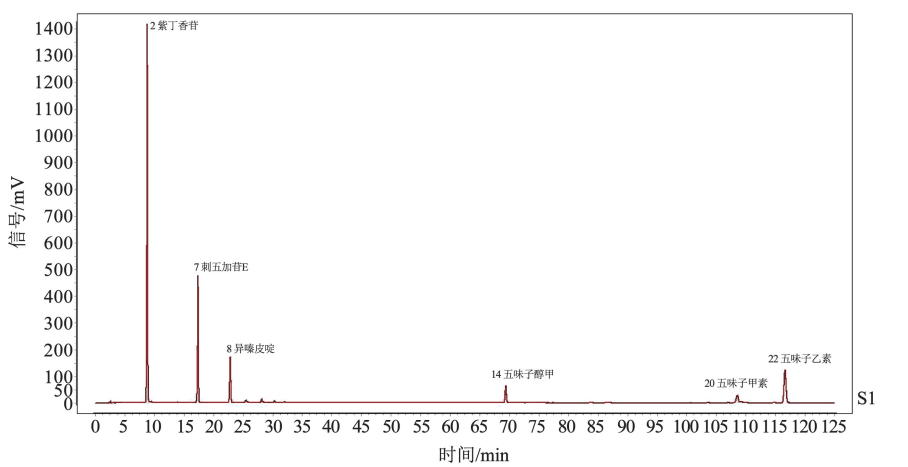


图 4　混合标准品 HPLC 色谱图

2.2 化学模式识别

2.2.1 聚类分析(HCA)

将 10 批复方刺五加颗粒样品 23 个共有峰的相对峰面积为变量,导入 SPSS 21 软件中,采用平方欧式距离法进行系统聚类分析(HCA),见图 5。当平方欧式距离介于 15 时,10 批样品被分为 2 类,S1、S2、S3、S6、S7、S8、S9 可聚为 1 类,S4、S5、S10 可聚为 1 类,这说明,同一生产工艺,不同批次的样品,其品质也会存在一定的差别,与相似度结果一致。

2.2.2 主成分分析(PCA)

为探究 10 批次复方刺五加颗粒的质量差异,将 10 批样品 23 个共有峰的相对峰面积设为变量,导入 SPSS 21 软件中,进行主成分分析(PCA)。选用特征值 >1 的为筛选标准,得到 5 个主成分,得到累计方差贡献率为 92.642%,说明这 5 个主成分可以解释复方刺五加颗粒 23 个共有峰的绝大部分信息。成分载荷矩阵反应 5 个主成分和 23 个共有峰之间的相关系数,载荷的绝对值越大,其对主成分的贡献率越大,见表 4。将 10 批复方刺五加颗粒样品 23 个共有峰的相对峰面积为变量,导入 SIMCA 14.1 软件中得 10 批样品 PCA 得分图(图 6),S4、S5、S10 在同一平面,可分为第 1 类,见图 6A,S1、S2、S3、S6、S7、S8、S9 分为第 2 类,与聚类分析结果一致,说明 10 批次样品质量相对稳定,并且 10 个样品均在 95% 的置信区间,说明10 批样品差异较小,见图 6B。

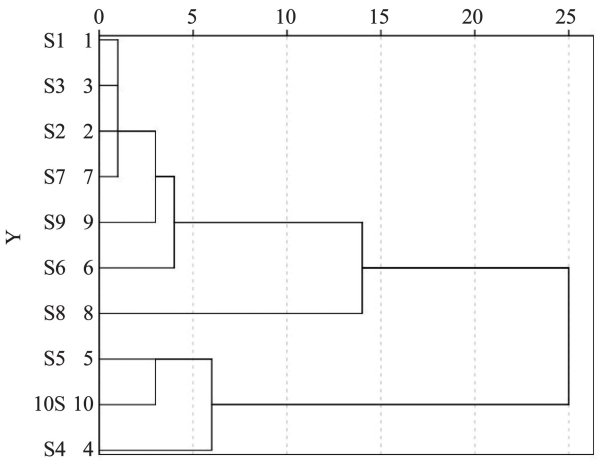
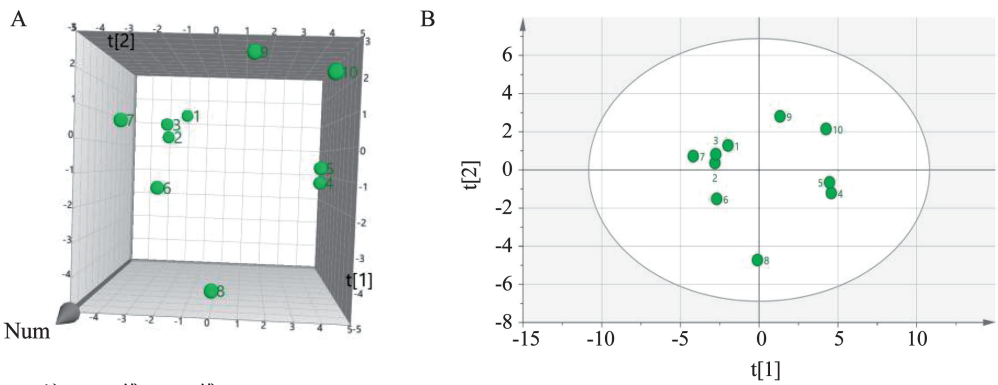


图 5 10 批复方刺五加颗粒的 HCA 树状图



注:A. 三维;B. 二维。

图 6 10 批复方刺五加颗粒的 PCA 得分图

表 4 10 批复方刺五加颗粒的成分载荷矩阵

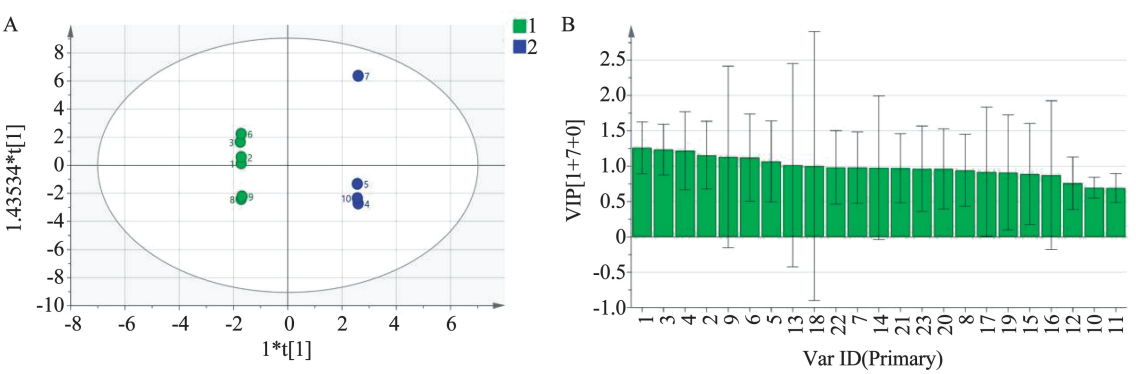
峰号	共有峰	主成分载荷				
		1	2	3	4	5
1	未指认(unidentified)	0.937	−0.171	−0.223	−0.044	0.003
2	紫丁香苷(syringin)	0.956	−0.180	−0.056	−0.065	−0.148
3	未指认(unidentified)	0.947	−0.192	−0.125	−0.143	−0.045
4	未指认(unidentified)	0.922	−0.267	−0.175	0.007	−0.070
5	未指认(unidentified)	0.834	−0.469	−0.101	0.027	−0.189
6	未指认(unidentified)	0.891	−0.222	−0.111	−0.034	0.140
7	刺五加苷 E(acanthopanax senticosus e)	0.814	−0.399	−0.060	0.099	0.310
8	异嗪皮啶(isopyramidine)	0.834	−0.470	0.015	−0.093	−0.068
9	未指认(unidentified)	−0.140	−0.173	0.946	−0.194	0.041
10	未指认(unidentified)	0.207	−0.844	−0.057	0.316	0.207
11	未指认(unidentified)	0.309	−0.633	0.120	0.504	0.389
12	未指认(unidentified)	0.642	0.336	0.517	−0.250	0.310
13	未指认(unidentified)	0.688	0.393	0.246	−0.319	0.312
14	五味子醇甲(schisandrin)	0.410	0.738	−0.372	0.357	0.030

续表 4

峰号	共有峰	主成分载荷				
		1	2	3	4	5
15	未指认(unidentified)	0.548	0.804	0.000	0.122	0.122
16	未指认(unidentified)	0.289	0.852	−0.332	0.206	0.016
17	未指认(unidentified)	0.602	0.490	0.121	0.269	0.431
18	未指认(unidentified)	−0.289	0.204	−0.366	−0.570	0.286
19	未指认(unidentified)	0.023	0.346	0.542	0.575	−0.333
20	五味子甲素(schisandrin a)	0.890	0.301	0.185	0.022	0.084
21	未指认(unidentified)	0.914	0.196	0.091	−0.074	−0.265
22	五味子乙素(schisandrin b)	0.915	0.184	0.073	−0.062	−0.297
23	未指认(unidentified)	0.887	0.088	0.125	−0.157	−0.331

2.2.3　正交最小偏二乘法 – 判别分析(OPLS – DA)

为进一步探究 10 批样品之间的成分差异,将 10 批样品 23 个共有峰的相对峰面积设为变量,导入 SIMCA 14.1 软件中,进行主正交最小偏二乘法 – 判别分析(OPLS – DA)。该模型 $R^2X = 0.968$, $R^2Y = 1$, $Q^2 = 0.828$,该模型各数值均 > 0.5,表明 OPLS – DA 模型具有较好的预测能力。由图 7A 可知,OPLS – DA 分析将 10 批样品分为 2 类,S1、S2、S3、S6、S7、S8、S9 可聚为 1 类,S4、S5、S10 可聚为 1 类,与 HCA 和 PCA 结果一致。*VIP* 值能够反应 23 个共有峰的贡献程度,以 *VIP* > 1 作为标准,由图 7B 可知,其中 > 1 的有8 个,分别为峰 1、峰 2、峰 3、峰 4、峰 5、峰 6、峰 9、峰 13,指认峰 2 为紫丁香苷。综上所述,结合 OPLS – DA 中 *VIP* 值分析,说明紫丁香苷是复方刺五加颗粒的主要差异标志物。



注:A. 得分图;B. *VIP* 值。

图 7　10 批复方刺五加颗粒的 OPLS – DA 分析图

2.3　复方刺五加颗粒中 6 个成分含量测定

2.3.1　色谱条件　同“2.1.1”项。

2.3.2　供试品溶液制备　同“2.1.2.1”项。

2.3.3　混合对照品溶液制备　同“2.1.2.2”项。

2.3.4　线性关系考察试验

精密吸取不同浓度下的混合对照品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进行测定。以峰面积(y)对照品浓度(x)进行线性回归,得到线性方程,见表 5。

表 5　各成分线性关系考察结果

对照品	线性方程	线性范围/μg	r
紫丁香苷	$y = 951\,929x + 3\,691\,631$	2.920 ~ 5.84	0.999 8
刺五加苷 E	$y = 403\,020x + 589\,595$	2.550 ~ 5.10	0.999 3
异嗪皮啶	$y = 910\,070x - 1\,443\,985$	0.405 ~ 0.81	0.999 7
五味子醇甲	$y = 322\,792x - 514\,433$	0.095 ~ 0.19	0.999 8
五味子甲素	$y = 77\,433x - 67\,620$	0.140 ~ 0.28	0.999 9
五味子乙素	$y = 360\,486x - 624\,035$	0.680 ~ 1.36	0.999 5

2.3.5　精密度试验

精密吸取“2.1.2.2”项下配置的混合对照品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件重复进样 6 次,测定紫丁香苷、刺五加苷 E、异嗪皮啶、五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素峰面积的 *RSD* 值在 1.4% ~ 2.4%,表明仪器精密度良好,见表 6。

2.3.6　重复性试验

称取样品(20240201)适量,按“2.1.2.1”项下方法平行制备 6 份复方刺五加颗粒供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积,测定紫丁香苷、刺五加苷 E、异嗪皮啶、五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素峰面积的 *RSD* 值在 1.2% ~ 2.7%,表明重复性良好,见表 6。

2.3.7　稳定性试验

称取样品(20240201)适量,按“2.1.2.1”项下方

法制备复方刺五加颗粒供试品溶液，并按“2.1.1”项下色谱条件于 0、4、8、12、18、24、36 h 后进行测定，记录峰面积，测定紫丁香苷、刺五加苷 E、异嗪皮啶、五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素峰面积的 *RSD* 值在 1.0% ~2.8%，表明样品在 36 h 稳定性良好，见表 7。

表 6 精密度试验结果

化合物	相对峰面积							*RSD*/%
	测量值						平均值	
紫丁香苷	1 5024 960	15 972 188	15 675 595	15 947 296	15 445 194	15 868 320	15 655 592	2.3
刺五加苷 E	5 979 002	6 169 707	6 073 749	6 454 892	6 272 333	6 103 467	6 175 525	2.7
异嗪皮啶	4 165 905	4 200 393	4 145 939	4 285 116	4 151 997	4 193 066	4 190 402	1.2
五味子醇甲	1 844 152	1 782 335	1 753 718	1 864 359	1 828 154	1 828 593	1 816 885	2.2
五味子甲素	823 544	799 725	779 974	830 470	805 795	785 391	804 149	2.5
五味子乙素	4 025 186	4 144 382	4 071 343	4 064 248	4 006 321	4 003 101	4 052 130	1.3

表 7 稳定性试验结果

化合物	相对峰面积							平均值	*RSD*/%
	0 h	4 h	8 h	12 h	18 h	24 h	36 h		
紫丁香苷	15 024 960	14 972 188	15 135 595	15 257 296	15 345 194	14 968 320	15 253 263	15 136 688	1.0
刺五加苷 E	5 959 002	6 369 707	6 073 749	6 454 892	6 192 333	6 103 467	6 105 923	6 179 867	2.8
异嗪皮啶	4 365 905	4 200 393	4 345 939	4 405 116	4 151 997	4 193 066	4 206 721	4 267 019	2.3
五味子醇甲	1 844 152	1 782 335	1 753 718	1 864 359	1 828 154	1 828 593	1 793 026	1 813 476	2.1
五味子甲素	833 544	799 725	779 974	830 470	805 795	785 391	783 923	802 688	2.7
五味子乙素	4 225 186	4 144 382	4 071 343	4 064 248	4 006 321	4 003 101	4 000 717	4 073 614	2.1

2.3.8 含量测定

取上述 10 批供试品溶液，按“2.1.2.1”项下方法制备复方刺五加颗粒供试品溶液，并按“2.1.1”项下色谱条件下进行测定，记录峰面积，测定紫丁香苷、刺五加苷 E、异嗪皮啶、五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素的含量，结果见表 8。

表 8 各成分含量测定结果（$n=10$，$mg\cdot g^{-1}$）

批号	紫丁香苷	刺五加苷 E	异嗪皮啶	五味子醇甲	五味子甲素	五味子乙素
20240201	0.448	0.503	0.160	0.047	0.021	0.120
20240202	0.446	0.540	0.153	0.046	0.020	0.116
20240203	0.472	0.512	0.156	0.046	0.019	0.114
20231201	0.468	0.547	0.160	0.048	0.020	0.113
20231202	0.461	0.523	0.151	0.047	0.020	0.110
20231203	0.446	0.515	0.150	0.047	0.020	0.112
20231204	0.468	0.515	0.152	0.045	0.019	0.112
20231205	0.470	0.514	0.150	0.045	0.020	0.117
20231206	0.464	0.508	0.153	0.046	0.021	0.111
20231207	0.484	0.512	0.159	0.047	0.020	0.114
平均值	0.463	0.519	0.154	0.046	0.020	0.114
RSD%	2.7	2.7	2.6	2.4	2.4	2.7

2.3.9 加样回收率试验

精密称 10 批次的复方刺五加颗粒样品，每份约 2 g，分别加入已知浓度对照品适量，按“2.1.2.1”制备供试液，并按“2.1.1”项下色谱条件进行测定计算回收率。测得紫丁香苷、刺五加苷 E、异嗪皮啶、五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素平均回收率分别为

101.1%、100.4%、100.2%、101.4%、100.9%、100.8%。*RSD* 分别为 1.4%、1.6%、1.6%、1.2%、1.3%、1.5%，*RSD*≤3.0%，表明本试验的加样回收率和 *RSD* 值均在要求范围内，说明该方法加样回收率良好。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

本试验考察不同提取溶剂（甲醇、三氯甲烷 - 水）对各成分色谱峰的影响，发现三氯甲烷 - 水提取方法，杂峰较多，基线不平整；而甲醇作为提取溶剂时各成分色谱峰出峰效果较好，故确定甲醇作为提取溶剂。由于复方刺五加颗粒各成分极性跨度较大，溶剂峰和杂峰在不同波长下对各成分色谱峰影响不同，无法满足各成分的同时定量，故对样品进行全波长扫描（210 ~ 400 nm），在 220 nm 波长下，各成分色谱峰分离情况较好，杂峰相对较少，故采用 220 nm 波长下进行检测。本试验对不同流动相（乙腈 - 水、甲醇 - 水、乙腈 - 0.1% 磷酸水）进行考察，结果表明“乙腈 - 0.1% 磷酸水”分离效果较好，且 0.1% 磷酸水能使色谱峰峰型更好，因此确定“乙腈 - 0.1% 磷酸水”为本试验流动相。

3.2 指标性成分的选择

中药包含多种成分，这些成分共同作用以达到治疗疾病、调理身体等功效。正是因为有了这一多成分的基础，中药才能发挥出广泛而多样的药效。为了确保中药的质量和疗效，建立和完善多成分分析检测的技术和方法显得尤为重要[24]。复方刺五加颗粒中刺五加的主要成分为紫丁香苷、刺五加苷 E、异嗪皮啶等化合物，具有良好的抗炎、抗氧化、抗疲劳、改善记忆力、防治心肌梗死的功效[25-27]；五味子的主要成分为五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素，具有镇静催眠、抗氧化等功效[28]。同时参照相关文献[29-31]，选取紫丁香苷、刺五加苷 E、异嗪皮啶、五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素 6 种化合物作为本研究的指标。

3.3 化学计量学讨论结果

HCA、PCA 和 OPLS - DA 结果 S1 ~ S10 均分为两类，表明组与组之间存在一定差异，推断可能是由于生产原料批次、品质和生产工艺等方面因素影响。其中 PCA 中有 5 个，包括了共有成分的 92.642%，说明这 5 个成分能概括原有数据的大部分信息[32]。其中紫丁香苷、刺五加苷 E、异嗪皮啶、五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素 6 个成分对主成分有较大影响，为复方刺五加颗粒中多成分含量测定提供依据。

综上，本实验通过建立 HPLC 法测定复方刺五加颗粒中紫丁香苷、刺五加苷 E、异嗪皮啶、五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素 6 个成分的含量，此方法简单，重复性、稳定性、准确度均较好[33]。又对 10 批复方刺五加颗粒进行了质量标准评价，每个批次的相似度都 > 0.9，表明 10 批复方刺五加颗粒相似度高、质量均一、稳定，差异较小[34]。影响中药复方制剂质量因素有两方面，一是生产原药材；二是生产工艺[35]，复方刺五加颗粒生产工艺相对稳定，由此推测导致各批次产生细微含量差异的原因可能是存放时间过长或环境等方面因素的影响。因此有必要对中药制备过程中化学成分进行深入研究，从而为中药制备技术的改进提供数据支撑，同时也为构建中药质量控制体系奠定基础。

参考文献：

[1] 韩继鹏. 刺五加五味子软胶囊制备工艺及质量评价研究[D]. 哈尔滨：哈尔滨商业大学，2020.

[2] 胡文婷，李廷利，朱蕾，等. 刺五加与五味子合用对小鼠镇静催眠作用的研究[J]. 中药药理与临床，2011，27(6)：66 - 68.

[3] 宋娟，张晶玉，吕重宁，等. 基于 HPLC 指纹图谱及多成分定量对刺五加的质量评价[J]. 中草药，2024，55(4)：1326 - 1333.

[4] PARK S Y，CHANG S Y，YOOK C S，et al. New 3，4 - seco - lupane - type triterpene glycosides from *Acanthopanax senticosus* forma inermis[J]. J Nat Prod，2000，63(12)：1630 - 1633.

[5] 陈士林，林余霖. 中草药大典：原色中草药植物图鉴[M]. 北京：军事医学科学出版社，2006：309.

[6] 关皎，丁思宇，王宜优，等. 超快速液相色谱法同时测定刺五加中刺五加苷 B 和刺五加苷 E 的含量[J]. 中药新药与临床药理，2023，34(11)：1608 - 1611.

[7] LI W F，XING W，WANG S C，et al. An online coupled peritoneal macrophage/cell membrane chromatography and high - performance liquid chromatography/mass spectrometry method to screen for anti - inflammatory components from the Chinese traditional medicine *Chloranthus multistachys* Pei[J]. Biomed Chromatogr，2013，27(11)：1580 - 1586.

[8] NIU X F，XING W，LI W F，et al. Isofraxidin exhibited anti - inflammatory effects in vivo and inhibited TNF - α production in LPS - induced mouse peritoneal macrophages *in vitro* via the MAPK pathway[J]. Int Immunopharmacol，2012，14(2)：164 - 171.

[9] YAO Y，LIAO C Y，QIU H H，et al. Effect of eleutheroside E on an MPTP - induced Parkinson's disease cell model and its mechanism[J]. Molecules，2023，28(9)：3820.

[10] 田京辉，郭姗姗，陈静静，等. 刺五加苷 E 对野百合碱诱导肺动脉高压模型大鼠的治疗作用[J]. 医药导报，2022，41(2)：216 - 220.

[11] 马小娟，王钫键，李瑞海. 基于指纹图谱和网络药理学的五味子质量标志物预测分析[J/OL]. 天津化工，1 - 6[2024 - 12 - 15]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1201.TQ.20240528.1359.004.html.

[12] ZHONG S，BAI L P，LIU X D，et al. Cough inhibition activity of *Schisandra chinensis* in guinea pigs[J]. J Med Food，2021，24(4)：348 - 357.

[13] YAN T X，LIU B，LI F Y，et al. Schizandrin ameliorates behavioral disorders in hepatic injury mice via regulation of oxidative stress and neuroinflammation[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol，2021，43(2)：

212 – 222.
[14] 邸同莲,刘小清,吴楠,等. 五味子中 1 个新的联苯环辛烯类木脂素[J]. 中草药,2023,54(12):3759 – 3770.
[15] 王田田. 基于化学蛋白质组学技术揭示五味子甲素神经保护作用机制[D]. 北京:中国医学科学院,2023.
[16] 许亚威,赵紫涵,李贺,等. 基于 TLR2/MyD88 信号通路探究五味子乙素对全身炎症反应综合征的影响[J]. 北华大学学报(自然科学版),2024,25(5):603 – 608.
[17] 高艳艳,陈晓鹤,苏磊,等. 高效液相色谱法指纹图谱结合化学模式识别的地骨皮饮片质量研究[J]. 世界中医药,2023,18(5):593 – 599.
[18] 涂杨丽,戴祥洁,肖胜佳,等. 基于指纹图谱、网络药理学及含量测定的血必净注射液质量标志物预测分析[J]. 中国中药杂志,2024,49(18):4885 – 4897.
[19] 吴淑辉,刘娟,肖婷,等. 丹润方 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定研究[J]. 湖南中医药大学学报,2023,43(10):1822 – 1829.
[20] 董宠,陈斌,许龙,等. 小儿解感颗粒 HPLC 指纹图谱及 3 种成分含量测定研究[J]. 安徽医专学报,2023,22(4):86 – 88,138.
[21] 龚宇,吴芳,刘新,等. 骨折挫伤胶囊 HPLC 指纹图谱及化学模式识别[J]. 中国现代应用药学,2024,41(5):657 – 663.
[22] 董晓龙,沈佳捷,朱佳钰,等. 苦参的指纹图谱建立及差异性成分含量测定[J]. 中国药房,2023,34(3):298 – 302.
[23] 高美美,黄建猷,翟雅南,等. 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别法评价不同产地杉木叶质量[J]. 药物分析杂志,2024,44(5):882 – 892.
[24] 周爱鲜,廖正根,勒孚仕,等. 基于指纹图谱与多指标成分定量结合化学模式识别分析的小儿热速清颗粒质量评价研究[J]. 药物分析杂志,2024,44(6):1062 – 1073.
[25] 胡闪闪. 紫丁香苷对 D – GalN/LPS 诱导的小鼠肝损伤的保护作用研究[D]. 南宁:广西大学,2023.
[26] 冯协和,戢太阳,刘菁. HPLC 法测定及己不同部位伞形花内酯和异嗪皮啶的含量[J]. 实用药物与临床,2021,24(7):629 – 633.
[27] 冯玲玲,陈树杰,车炜. 刺五加注射液对急性心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌保护作用的研究[J]. 天津中医药,2023,40(12):1587 – 1594.
[28] 翟宏焱,周光姣,王超群. 一测多评高效液相色谱法同时测定五味子中五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素[J]. 化学分析计量,2023,32(6):40 – 45.
[29] 程甲波. 刺五加抗疲劳谱效关系及质量评价研究[D]. 东北林业大学,2022.
[30] 高彦宇,李文慧,寇楠,等. 刺五加化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药信息,2019,36(02):113 – 116.
[31] 王维,刘聪,蒋岩,等. 复方五味子提取物的抗疲劳作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版),2017,43(03):502 – 506.
[32] 易静,刘德慧,杨蓉,等. 基于 HPLC 指纹图谱和多成分含量测定的苏合香丸质量评价研究[J]. 药物分析杂志,2024,44(9):1551 – 1559.
[33] 赵振霞,耿韫,雷蓉,等. 山菊降压胶囊多指标成分含量测定及量值传递分析菊花成分变化[J]. 药物分析杂志,2024,44(5):796 – 805.
[34] 张冠英,王文娣,张洪财. 柴胡 – 白芍药对水提物的含量测定及指纹图谱研究[J]. 化学工程师,2023,37(3):24 – 28.
[35] 杨宏玲,吴振国,张炜. 中药制剂质量控制管理影响因素与对策研究[J]. 光明中医,2021,36(15):2633 – 2635.

Establishment of HPLC Fingerprint and Multi – Component Content Determination of Compound Eleutherococcus Senticosus Granules

YANG Wenwen, YANG Saisai, WANG Xu, YAN Yan, LIU Lei, WU Xiuhong
(*Heilongjiang University of Chinese Medicine*, *Harbin* 150040, *China*)

Abstract Objective: To establish the HPLC fingerprint of Compound Eleutherococcus Senticosus Granules and to determine the content of six components, providing a reference for quality control and evaluation. Methods: HPLC was used to establish the fingerprint of Compound Eleutherococcus Senticosus Granules from 10 batches, followed by similarity evaluation and chemical pattern recognition analysis. The contents of the six components in the granules, namely, Syringin, Eleutheroside E, Isohypaphorine, Schisandrin A, Schisandrin B, and Schisandrin C, were also measured. Results: The similarity of the fingerprints from the 10 batches was all >0.921. The linear ranges for Syringin, Eleutheroside E, Isohypaphorine, Schisandrin A, Schisandrin B, and Schisandrin C were 2.92 ~ 5.84 μg, 2.55 ~ 5.10 μg, 0.405 ~ 0.81 μg, 0.095 ~ 0.19 μg, 0.14 ~ 0.28 μg, and 0.68 ~ 1.36 μg, respectively, all showing good linear relationships. The recovery rates were 100.2% ~ 101.4%, with RSDs of 1.2% ~ 1.6%. Precision, repeatability, and stability tests all met the required standards. Conclusion: The established method is simple and convenient, providing a basis for evaluating the quality of Compound Eleutherococcus Senticosus Granules.

Key words Compound eleutherococcus senticosus granules; Content determination; Fingerprint