

健肝乐颗粒质量评价

张东方， 鲁晓光
(南阳市产品质量检验检测中心，河南 南阳 473000)

摘要：目的 评价健肝乐颗粒质量。**方法** 分析采用 Welchrom C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)；流动相乙腈-0.3% 磷酸，梯度洗脱；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 230 nm，建立 HPLC 指纹图谱。采用聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘判别分析考察质量一致性。HPLC 法测定没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、甘草苷、异甘草苷、甘草酸铵 7 种指标成分的含量。**结果** 16 批样品指纹图谱中有 21 个共有峰，相似度均不低于 0.97，指认出 7 种成分。各批样品聚为 2 类，VIP 大于 1 的成分有 11 种。芍药苷含量最高，异甘草苷含量最低。**结论** 该方法稳定可靠，不同批次健肝乐颗粒质量一致。

关键词：健肝乐颗粒；HPLC 指纹图谱；聚类分析；主成分分析；正交偏最小二乘判别分析；含量测定

中图分类号：R284.2 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2024)03-0927-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2024.03.031

健肝乐颗粒源于东汉张仲景《伤寒论·太阳篇》，由白芍、甘草组成，为经典名方发展而来的现代制剂。该组方具有养血护肝，解毒止痛的功效。具有降低转氨酶，消褪黄疸以及改善各类肝炎临床症状的作用，临床用于治疗急性病毒性肝炎。现执行标准^[1]中无含量测定项，无法满足中药现代化的发展需求。目前，该复方制剂研究主要集中在临床方面^[2-5]，其质量控制研究^[6]较少。且目前尚未见有关健肝乐颗粒指纹图谱及化学模式识别的研究报道。在查阅文献[7-14]的基础上，发现该制剂虽然只有 2 味药材，但化学成分多而复杂。本实验以中药指纹图谱结合聚类分析 (HCA) 方法、主成分分析法 (PCA) 以及正交偏最小二乘判别分析法 (OPLS-DA) 将指纹图谱提供的信息进行再评价。再根据不同入血成分保肝作用强弱不同，再经过实验筛选，选取芍药中没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷，甘草中甘草苷、芹糖甘草苷、异甘草苷、甘草酸铵作为指标成分，以期为提高健肝乐颗粒的质量标准提供依据，为优化生产工艺达到药效最佳提供基础。

1 材料

Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司)；BP211D 型电子天平 (德国赛多利斯公司)；WT-1200 型超声波清洗器 (济宁万通超声仪器设备厂)。异甘草苷 (批号 17042102，纯度 98%)、芍药内酯苷 (批号 19121705，纯度 99.28%)、芹糖甘草苷 (批号 20081705，纯度 98%) 对照品 (成都普菲德生物技术有限公司)；芍药苷 (批号 110736-201539，纯度 96.4%)、甘草酸铵 (批号 110731-202021，纯度 96.2%)、没食子酸 (批号 110831-200803，纯度 90.1%)、甘草苷 (批号 111610-201908，纯度 92.0%) 对照品 (中国食品药品检定研究院)。健肝乐颗

粒购于武汉康乐药业有限公司，批号 1322014、1323014、1322004、1323003、1323002、1322008、1220037、1222036、1222035、1222061、1322013、1322008、1323001、1323002、1220035、1220034，编号 S1~S16，其中 S1~S6、S11~S14 规格为 15 g/袋，含蔗糖；S7~S10、S15~S16 规格为 6 g/袋，无蔗糖。白芍、甘草购于市场，经南阳市产品质量检验检测中心鲁晓光副主任药师鉴定为正品。甲醇、乙腈均为色谱纯 (美国 GIOVINI Chemical 公司)；水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Welchrom C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)；流动相乙腈 (A) -0.3% 磷酸 (B)，梯度洗脱 (0~10 min, 10%~20% A；10~22 min, 20% A；22~35 min, 20%~40% A；35~50 min, 40% A)；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 230 nm；进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、甘草苷、芹糖甘草苷、异甘草苷、甘草酸铵对照品适量，甲醇溶解并稀释，制成质量浓度分别为 25.21、24.71、92.84、11.86、12.69、3.74、46.95 μg/mL 的溶液，即得。

2.2.2 供试品溶液 取本品适量，混匀研细，精密称取 0.5 g (S7~S10 各取 0.2 g)，精密加入 25 mL 甲醇，称定质量，超声提取 30 min，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，即得。

2.2.3 阴性样品溶液制备 按处方和工艺，分别制备缺白芍、缺甘草的阴性样品，按“2.2.2”项下方法制备，即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取本品 (S1) 适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得各成分相对保留时间、相对峰面积 (以峰 8 甘草苷为参照) RSD 均小于 1.9%, 表明仪器精密度良好。

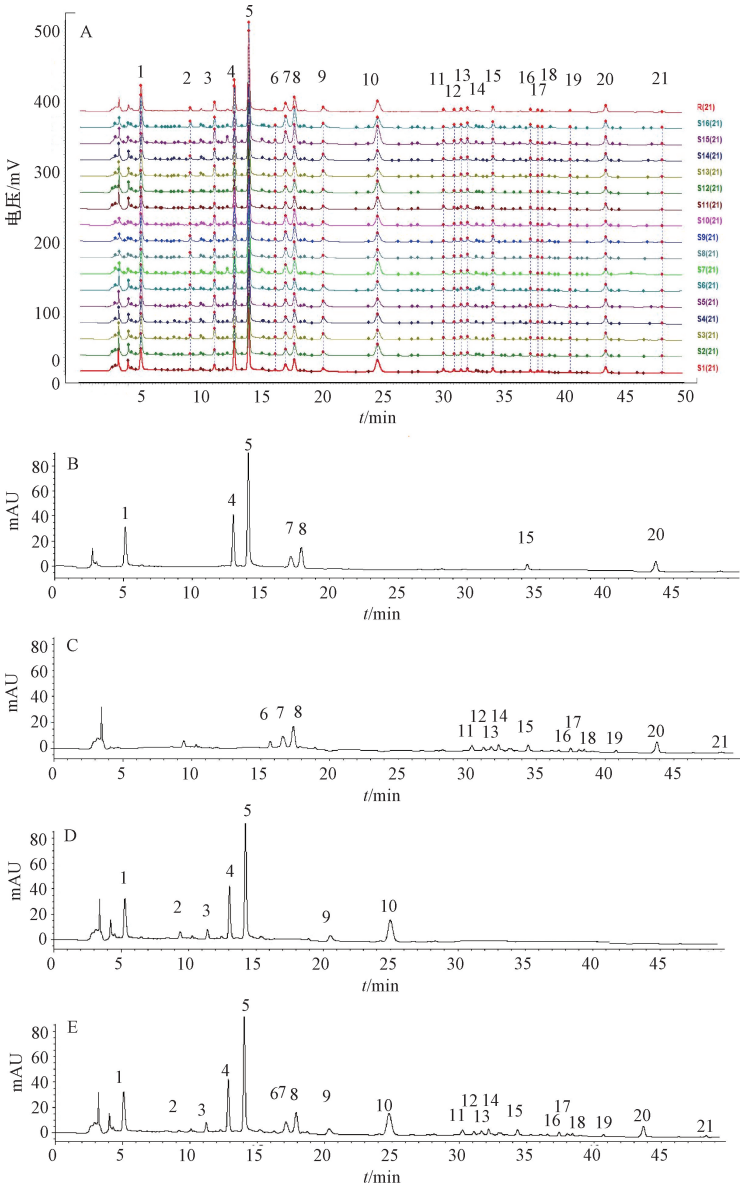
2.3.2 重复性试验 取本品 (S1) 适量, 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得各成分相对保留时间、相对峰面积 (以峰 8 为参照) RSD 均小于 1.7%, 表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取本品 (S1) 适量, 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 于 0、2、4、6、8、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得各成分相对保留时间、相对峰面积 (以峰 8 为参照) RSD 均小于 2.0%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4 HPLC 指纹图谱建立

2.4.1 图谱生成 取 16 批样品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012)”, 设置 S1 为参照, 时间窗宽度为 0.3 min, 生成方法为中位数法, 全峰匹配结合多点校正, 得到共有指纹图谱和对照指纹图谱 (R), 见图 1A。通过与对照品色谱图 (图 1B) 比对, 确认峰 1 为没食子酸, 峰 4 为芍药内酯苷, 峰 5 为芍药苷, 峰 7 为蔗糖甘草苷, 峰 8 为甘草苷, 峰 15 为异甘草苷, 峰 20 为甘草酸铵, 并选取分离度好、峰面积稳定、保留时间适宜的甘草苷 (峰 8) 作为参照峰。

2.4.2 色谱峰归属 依据单味药材、对照品溶液的紫外光谱信息和保留时间进行比对, 结果见图 1C~1D。由此可知, 色谱峰 1~5、9~10 归属于白芍, 6~8、11~21 归属于甘草。



注: A 为 16 批样品 HPLC 色谱图及对照指纹图谱, B 为对照品, C~D 分别为缺白芍、缺甘草阴性样品, E 为供试品。

1. 没食子酸 4. 芍药内酯苷 5. 芍药苷 7. 蔗糖甘草苷 8. 甘草苷 15. 异甘草苷 20. 甘草酸铵

图 1 各成分 HPLC 色谱图

2.4.3 相似度评价 16 批样品与对照指纹图谱的相似度分别为 0.986、0.985、0.996、0.996、0.995、0.996、0.974、0.992、0.991、0.989、0.985、0.985、0.997、0.997、0.985、0.992，表明不同批次、工艺样品成分组成基本一致，质量均一性良好。

2.5 化学模式识别

2.5.1 聚类分析（HCA） 采用 SPSS 26.0 软件，以 Euclidean 距离为度量标准，通过组间对比法，以 16 批样品共有峰峰面积与相对峰面积为变量进行系统聚类^[15-20]，结

果见图 2。由此可知，以共有峰面积为变量时，16 批样品聚为 2 类，S1~S6、S8、S9、S11~S14、S16 为一类，S7、S10、S15 为一类，表明它们在成分含量上整体一致，但也具有一定的差异性，可能与生产工艺、投料量不同有关，但总体上不大；以相对峰面积为变量时，16 批样品可聚为 2 类，S1~S5、S7~S16 为一类，S6 为一类。综上所述，不同批次、规格、剂型样品成分组成相似度高，质量稳定可靠。

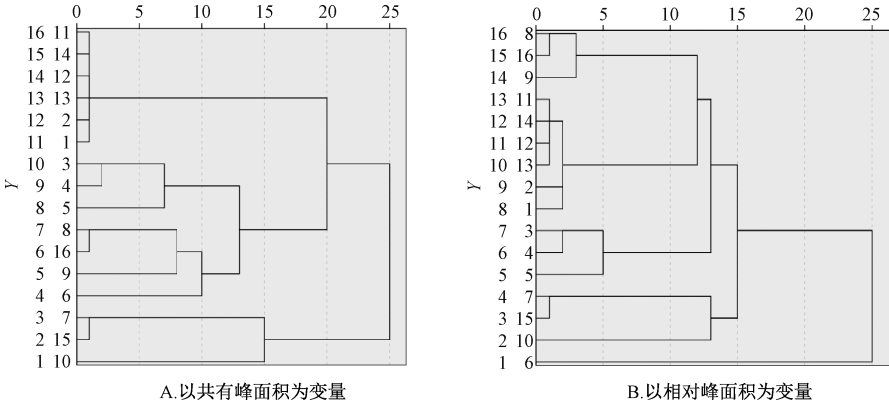


图 2 16 批健脾颗粒聚类分析图

2.5.2 主成分分析（PCA） 采用 SIMCA 14.0 软件对 16 批样品共有峰峰面积进行 PCA 分析，结果见图 3A。由此可知，21 个共有峰分成 4 个主成分，16 批样品分为 2 类，S1~S6、S11~S14 为一类，S7~S10、S15~S16 为一类。

2.5.3 正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA） 采用 SIMCA 14.0 软件对 16 批样品进行 OPLS-DA 分析，结果见

图 3。由此可知，VIP 大于 1 的成分有 11 种，峰号分别为 5~9、11、13、15、16、18、21； R^2Y 为 0.992， Q^2 为 0.977，均不小于 0.50，表明模型稳定性、预测性良好^[19-23]；经 200 次置换检验后 Q^2 回归线与纵轴的相交点小于零，表明模型不存在过拟合，可用于预测分析。

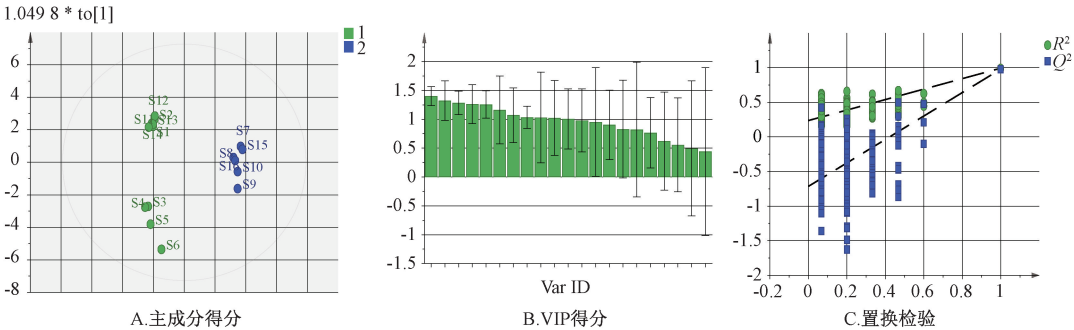


图 3 16 批健脾颗粒 OPLS-DA 分析图

2.5.4 指标成分筛选 中药质量标志物^[21]（Q-marker）可反映中药安全性和有效性，并能进行定性定量分析。研究中中药质量标志物可提高质量一致性、可控性和溯源性，更好地控制中药生产过程、进行质量监管。本实验根据文献 [7-14] 报道及上述结果，确定没食子酸（峰 1）、芍药内酯苷（峰 4）、芍药苷（峰 5）、芹糖甘草苷（峰 7）、甘草苷（峰 8）、异甘草苷（峰 15）、甘草酸铵（峰 20）作为指标成分。

2.6 指标成分含量测定 采用 HPLC 法。

2.6.1 溶液制备 同“2.2”项。

2.6.2 色谱条件 同“2.1”项。

2.6.3 系统适用性考察和专属性试验 取对照品、供试品（S1）、阴性样品溶液适量，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由此可知，各指标成分分离度符合要求，理论塔板数均大于 4 000，阴性无干扰，表明该方法专属性良好。

2.6.4 线性关系考察 分别取对照品溶液 1.0、2.0、5.0、10.0、15.0、20.0 μL ，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以对照品进样量为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，结果见表 1，可知各指标成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 各指标成分线性关系

指标成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ng
没食子酸	$Y=1\,404.4X+10.008$	0.999 8	25.21~504.0
芍药内酯苷	$Y=1\,653.1X+2.595\,3$	1.000 0	24.71~494.2
芍药苷	$Y=1\,057.4X+5.043\,2$	1.000 0	92.84~1 856.8
蔗糖甘草苷	$Y=1\,395X+1.728\,5$	1.000 0	11.86~237.2
甘草苷	$Y=2\,183.5X+1.494\,9$	1.000 0	12.69~253.8
异甘草苷	$Y=1\,516.6X+0.171$	0.999 9	3.74~74.8
甘草酸铵	$Y=302.08X+4.357$	0.999 5	46.95~939

2.6.5 精密度试验 取对照品溶液适量，在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、甘草苷、蔗糖甘草苷、异甘草苷、甘草酸铵峰面积 RSD 分别为 1.8%、1.6%、1.0%、0.41%、0.92%、1.8%、1.2%，表明仪器精密度良好。

2.6.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液（S1），于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、甘草苷、蔗糖甘草苷、异甘草苷、甘草酸铵峰面积 RSD 分别为 2.0%、0.82%、1.4%、1.3%、1.1%、2.0%、2.0%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6.7 重复性试验 取供试品溶液（S1）6 份，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、甘草苷、蔗糖甘草苷、异甘草苷、甘草酸铵含量

RSD 分别为 1.5%、1.4%、0.9%、2.0%、0.9%、0.5%、1.1%，表明该方法重复性良好。

2.6.8 加样回收率试验 精密称取各成分含量已知的样品（S1）0.25 g，共 6 份，加入对照品溶液适量，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、甘草苷、蔗糖甘草苷、异甘草苷、甘草酸铵平均加样回收率分别为 98.41%、97.51%、96.13%、95.59%、96.16%、97.62%、98.09%，RSD 分别为 2.0%、1.9%、1.3%、1.6%、1.1%、1.1%、1.1%。

2.6.9 测定方法 取出 16 批样品内容物，混匀后研细，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算含量，结果见表 2。

表 2 各指标成分含量测定结果（mg/袋，*n*=3）

编号	没食子酸	芍药内酯苷	芍药苷	蔗糖甘草苷	甘草苷	异甘草苷	甘草酸铵
S1	17.15	21.53	45.15	6.45	7.59	2.10	35.70
S2	16.47	21.19	44.64	5.71	7.49	2.10	36.32
S3	23.81	22.45	52.90	6.08	7.98	2.63	44.36
S4	23.74	22.42	51.12	6.06	7.95	2.51	46.95
S5	24.63	23.49	58.31	6.44	8.50	2.76	48.60
S6	22.49	24.40	59.07	7.02	6.70	4.09	44.79
S7	20.25	19.08	71.71	9.37	9.87	2.84	40.39
S8	19.46	24.20	59.13	8.37	9.56	3.43	35.23
S9	21.51	26.81	65.63	9.23	10.60	3.69	37.77
S10	22.65	28.57	74.49	9.00	9.55	3.58	35.87
S11	17.18	21.60	45.56	5.86	7.62	2.20	36.26
S12	22.92	24.69	58.65	6.73	8.85	2.85	52.03
S13	17.49	21.96	46.31	5.92	7.72	2.20	40.26
S14	23.64	22.50	56.01	6.26	8.22	2.71	49.35
S15	23.54	22.41	84.72	10.84	11.43	3.44	47.80
S16	22.94	28.84	68.31	10.12	11.81	3.90	40.05
平均值	21.23	23.50	58.83	7.46	8.84	2.94	41.96

3 讨论

3.1 提取方法选择 先进行了提取溶剂的筛选实验，结果表明在甲醇溶液中，待测成分提取较充分。进一步考察提取方式，分别比较了加热回流 30、120、150 min 及超声处理 30、40、60、90 min，结果显示甲醇超声处理 30 min 时目标成分有效溶出。

3.2 色谱条件考察 考察了不同流动相，包括乙腈-水、甲醇-0.3% 磷酸、乙腈-0.3% 磷酸、乙腈-0.3% 甲酸，发现乙腈-0.3% 磷酸梯度洗脱时分离效果良好，保留时间适宜，930

色谱峰峰形佳。通过紫外扫描，发现 7 种成分分别在 258、230、360 nm 处得到最大吸收，230 nm 处 7 种成分均有较强的紫外吸收，且基线最稳定。通过与文献 [22-26] 及本实验比较，发现波长切换法和 230 nm 单波长测出的结果差异不大，考虑到基线稳定性和重复性，选择 230 nm 作为检测波长。

3.3 指纹图谱在复方中药制剂分析中的应用及其作用 中药质量影响因素包括植物种属、采收期、栽培区域、贮藏条件、加工工艺等，进而造成成分差异，使其药理活性及

临床应用也存在差异，并使中药质量控制及评价成为复杂难题。指纹图谱能够与中医“整体”的传统理论呼应，将多指标成分定量法与指纹图谱结合，同时提供定性和定量信息，将是一种更适合、更有吸引力的用于复方中药制剂的分析方法，能更好地揭示不同厂家批次间中药制剂的细微差异。

在指标成分筛选过程中发现，该色谱系统还可同时分离测定芍药、甘草中另外几种具有保肝作用的指标成分丹皮酚、槲皮素、异鼠李素，但在该制剂中含量过低，暂不进行定量研究。中药现代化的发展离不开对有效成分量效关系的深入研究，经典名方尤其应注重多组分的含量研究，以改进生产工艺，使制剂疗效达到最佳。

参考文献：

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准（中药成方制剂第十七册）[S]. 北京：人民卫生出版社，1998：209.

[2] 田凌云，吴 哲，占 凯. 健肝乐颗粒治疗慢性乙型肝炎 68 例[J]. 中西医结合肝病杂志，2022，32（4）：371-372；374.

[3] 董 博，胡海石，王德景，等. 健肝乐颗粒联合异甘草酸镁治疗慢性乙型病毒性肝炎临床研究[J]. 中国药业，2019，28(1)：57-59.

[4] 蔡 岳. 熊去氧胆酸胶囊联合健肝乐颗粒治疗自身免疫性肝炎对外周血 Beclin1 及 Th1/Th2 平衡指标的影响[J]. 中国药物经济学，2023，18(4)：84-87.

[5] 陈 鹏，周晓琳. 健肝乐颗粒治疗药物性肝损伤临床疗效与成本分析[J]. 中国药业，2020，29(4)：75-76.

[6] 张雪荣，张 静，段立华. RP-HPLC 法测定健肝乐颗粒中芍药苷的含量[J]. 安徽农业科学，2009，37(21)：9834-9835；9852.

[7] 李雪梅，白颖锋，杭爱武，等. 基于网络药理学探究芍药甘草汤保肝作用[J]. 中成药，2021，43(7)：1924-1932.

[8] 吴玲芳，李雨桐，唐迎紫，等. 芍药甘草汤化学成分及药理作用研究进展[J]. 药物评价研究，2021，44（6）：1354-1360.

[9] 鲍 斌，赵咏麟，王辉俊，等. 芍药甘草汤化学成分、药动学及药效学研究进展[J]. 上海中医药大学学报，2022，36(4)：98-105.

[10] 朱广伟，张贵君，汪 萌，等. 中药芍药甘草汤基原及药效组分和药理作用研究概况[J]. 中华中医药杂志，2015，30(8)：2865-2869.

[11] 牟文清，徐 广，赵 佳，等. 甘草活性成分对抗抑郁药诱导的肝损伤的防治作用[J]. 中国中药杂志，2022，47

(22)：6146-6154.

[12] 王迎春，马永霖，甄亚钦，等. 基于指纹图谱和网络药理学的芍药甘草汤抗肝损伤活性成分及含量测定研究[J]. 世界科学技术（中医药现代化），2022，24(8)：3030-3042.

[13] 廖 楚，李恒飞，李晓东. 基于网络药理学及分子对接探讨芍药甘草汤治疗乙型病毒性肝炎肝损伤的作用机制[J]. 药物评价研究，2021，44(9)：1852-1861.

[14] 肖垚垚，朱 菁，刘心雨，等. 芍药甘草汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及其质量标志物（Q-Marker）的预测分析[J]. 中草药，2022，53(24)：7960-7969.

[15] 刘 敏，曹国琼，张仕林，等. 杜仲补天素丸的 HPLC 指纹图谱建立、化学模式识别分析及含量测定[J]. 中国药房，2021，32(8)：961-966.

[16] 李思毅，李 宏，刘陶世. 轻身调脂消渴片的指纹图谱建立、化学模式识别及含量测定[J]. 中国药房，2022，33（10）：1204-1212.

[17] 李林杰，谢谭芳，王昱涵，等. 壮药金母颗粒的指纹图谱建立、化学计量学分析及多组分含量测定[J]. 中国药房，2022，33(4)：439-445；464.

[18] 岳 超，徐 普，张文婷，等. 基于 HPLC 指纹图谱和多指标成分含量测定及化学模式分析的玉屏风丸的质量评价[J]. 药物分析杂志，2022，42(11)：2019-2028.

[19] 陈 璐，郑晓丹. HPLC 测定复方鱼腥草合剂中 8 个成分含量及化学模式分析[J]. 中国药师，2022，25（8）：1481-1485；1489.

[20] 郭守斌，江希连，江丽敏，等. UHPLC 测定芍菊上清丸中 9 种成分含量及化学模式分析[J]. 中国现代应用药学，2019，36(23)：2936-2942.

[21] 刘昌孝. 中药质量标志物（Q-Marker）研究发展的 5 年回顾[J]. 中草药，2021，52(9)：2511-2518.

[22] 吕欣锴，路 娟，郑 巧，等. UPLC 建立芍药甘草汤指纹图谱及测定多种水溶性活性成分的含量[J]. 中国现代中药，2020，22(5)：780-785.

[23] 何 利，姚晓艳，金 阳，等. 芍药甘草汤 HPLC 指纹图谱的建立和 7 种成分含量测定[J]. 中药材，2019，42(8)：1837-1841.

[24] 刘紫璇，吴样明，蒋鑫铖，等. 基于指纹图谱及一测多评法的芍药甘草汤物质基准质量评价研究[J]. 中南药学，2021，19(11)：2384-2389.

[25] 柴瑞平，路 娟，俞 月，等. 经典名方芍药甘草汤 UPLC 指纹图谱的建立[J]. 中国新药杂志，2019，28（4）：473-478.

[26] 郭立强，李 熙，刘 谦，等. 一测多评法比较不同产地甘草中 6 种有效成分含量[J]. 中国现代应用药学，2019，36(24)：3051-3055.