

连翘败毒丸高效液相色谱指纹图谱研究及聚类分析

许翔

(中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院药学科,福建 福州 350000)

摘要:目的 建立连翘败毒丸的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并进行聚类分析。方法 采用HPLC法,色谱柱为YMC Hydrosphere-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.5%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为0.7 mL/min,检测波长为328 nm(0~16 min),220 nm(16~40 min),277 nm(40~62 min),柱温为30℃,进样量为10 μL。以连翘苷为参照,测定12批样品的HPLC图谱,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A版)对12批样品进行相似度评价,确定共有峰。采用SPSS 22.0统计学软件进行聚类分析。结果 12批样品的HPLC图谱有23个共有峰,相似度均超过0.90,并指出其中7个成分;经验证,12批样品的HPLC图谱与对照指纹图谱一致性较好;12批样品可聚为三大类。结论 所建立的指纹图谱可为连翘败毒丸的质量评价提供参考。

关键词:连翘败毒丸;高效液相色谱;指纹图谱;聚类分析;质量控制

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)18-0010-03

HPLC Fingerprint and Cluster Analysis of Lianqiao Baidu Pills

XU Xiang

(Department of Pharmacy, The 900th Hospital of the Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Fuzhou, Fujian, China 350000)

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint of Lianqiao Baidu Pills, and to conduct cluster analysis(CA). **Methods** HPLC method was adopted, the chromatographic column was YMC Hydrosphere-C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.5% acetic acid solution(gradient elution), the flow rate was 0.7 mL/min, the detection wavelength was set at 328 nm(0-16 min), 220 nm(16-40 min) and 277 nm(40-62 min), the column temperature was 35℃ and the sample size was 10 μL. The HPLC fingerprints of 12 batches of samples were determined with phillyrin as reference. The similarity of 12 batches of samples was evaluated by using Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM(Version 2004A), and the common peak was identified. CA was conducted by using SPSS 22.0 software. **Results** There were 23 common peaks in HPLC chromatograms of 12 batches of samples, their similarity was higher than 0.90 and 7 components were identified. After verification, the HPLC fingerprint of 12 batches of samples was in good agreement with the control fingerprint, and 12 batches of samples could be grouped into three categories. **Conclusion** The established fingerprint can provide reference for the quality evaluation of Lianqiao Baidu Pills.

Key words: Lianqiao Baidu Pills; HPLC; fingerprint; cluster analysis; quality control

连翘败毒丸由连翘、金银花、黄连、黄芩、黄柏、赤芍等19味中药材组方,有清热解毒、散风消肿功效,临床主要用于治疗脏腑积热与风热湿毒引起的疮疡初起、红肿疼痛、憎寒发热、风湿疮疹、遍身刺痒、大便秘结^[1]。本研究中建立了连翘败毒丸的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并结合聚类分析,为其质量控制和快速评价提供借鉴。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1200型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司,包括在线脱气机、四元梯度泵、自动进样器、VWD-G1314C型检测器、Chemstation数据处理系统);AUW-220D型十万分之一电子天平(日本岛津公司);KQ-250DB型数控超声波清洗器(昆山超声波仪器有限公司)。

1.2 试剂

连翘苷对照品(批号为110821-201816,含量95.1%),连翘酯苷A对照品(批号为111810-201707,

含量97.2%),绿原酸对照品(批号为110753-201817,含量96.8%),黄芩苷对照品(批号为110715-201821,含量95.4%),盐酸小檗碱对照品(批号为110713-201814,含量86.7%),汉黄芩苷对照品(批号为112002-201702,含量98.5%),芍药苷对照品(批号为110736-201842,含量97.4%),均购于中国食品药品检定研究院;连翘败毒丸(承德天元药业股份有限公司,批号分别为171019,171222,180126,180222,180319,180408,180513,180619,180910,181021,181107,181126,编号为S1~S12,规格为每袋9g);乙腈、甲醇均为色谱纯,磷酸为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[2-3]

色谱柱:YMC Hydrosphere-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.5%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~16 min、16% A→25% A, 16~30 min、25% A→38% A, 30~40 min、38% A→59% A, 40~54 min、59% A→

80% A, 54 ~ 62 min、80% A→16% A);流速:0.7 mL/min;检测波长:328(0 ~ 16 min), 220 nm(16 ~ 40 min), 277 nm(40 ~ 62 min);柱温:30 ℃;进样量:10 μ L。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:分别称取连翘苷、连翘酯苷 A、绿原酸、黄芩苷、汉黄芩苷、盐酸小檗碱、芍药苷的对照品各适量,精密称定,以甲醇溶解并定容,制成质量浓度分别为 2.245 6, 2.001 7, 1.113 4, 0.582 7, 0.511 9, 1.201 2, 0.894 1 mg/mL 的混合对照品溶液,冷藏避光保存。

供试品溶液:取装量差异项下的内容物,研细,取约 2.5 g,精密称定,置 50 mL 棕色容量瓶中,加入 30 mL 甲醇溶液,室温超声(功率 450 W,频率 40 kHz)处理 40 min 后取出,放冷,用甲醇定容,摇匀,滤过,即得。

2.3 HPLC 指纹图谱的建立

方法学考察:按标准进行方法学考察,结果精密度、稳定性、重复性试验结果的 *RSD* 均小于 2%,表明仪器精密度、方法重复性良好,供试品溶液室温放置 24 h 内稳定。

指纹图谱的建立及相似度分析:取 12 批样品,依法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样,测定,得 HPLC 图谱,导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A 版)软件,得 HPLC 指纹图谱,详见图 1 和图 2。S1 ~ S12 号样品与对照图谱的相似度分别为 0.989, 0.971, 0.967, 0.992, 0.909, 0.981, 0.988, 0.974, 0.979, 0.994, 0.993, 0.989, 均大于 0.9。在 23 个共有峰中,12 号峰的面积最大,峰位居中,分离完全,通过与混合对照品图谱对照,指认出其其为连翘苷,设为参照峰(S),

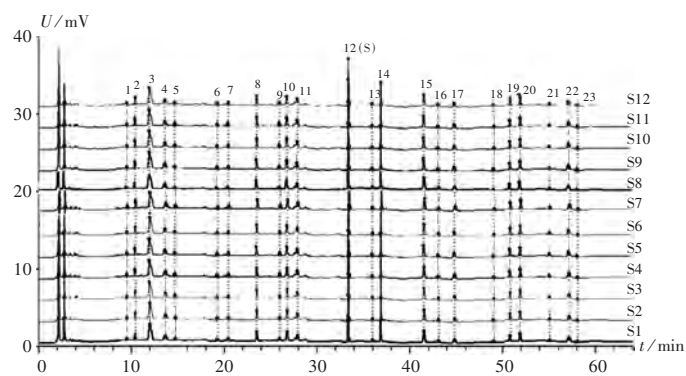


图1 12批样品 HPLC 叠加指纹图谱

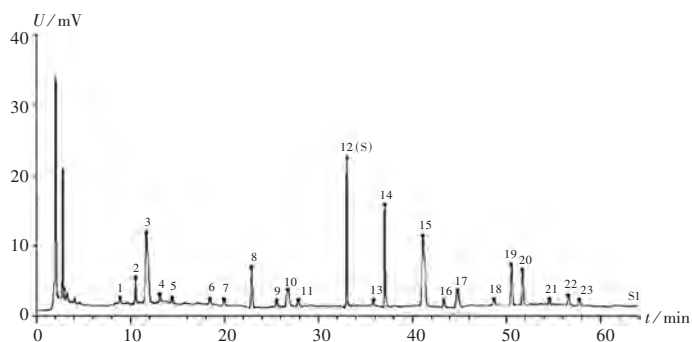


图2 样品 HPLC 对照指纹图谱

计算其他共有峰对 12 号峰的相对峰面积。详见表 1。

共有峰指认:采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A 版)对 12 批样品的 HPLC 图谱进行比较分析。结果,可指认 23 个共有峰中的 7 个成分,分别为绿原酸(3 号峰)、芍药苷(8 号峰)、连翘苷(12 号峰)、连翘酯苷 A(14 号峰)、盐酸小檗碱(15 号峰)、黄芩苷(19 号峰)、汉黄芩苷(20 号峰)。混合对照品色谱图见图 3。

2.4 聚类分析^[4-5]

将 12 批样品中 23 个共有峰的相对峰面积数据输入 SPSS 22.0 统计学软件,采用组间均联法,以欧氏距离平方为测度,采用系统聚类分析法进行模式识别分析,结果见图 4。根据聚类分析树状图,当类间距介于 15 ~ 25 时,12 批样品被分成了 3 大类:S4、S10、S11 为一类,S1、S2、S3、S6、S7、S8、S9、S12 为一类,样品 S5 单独为一类。聚类分析结果与相似度结果基本一致。

3 讨论

现行质量标准仅对连翘败毒丸的性状、大黄的薄层和丸项下的通则检查做了规定,难以全面评价其质量,文献报道鲜有对其综合质量的评价方法^[6]。在中医药理论中,中成药的药效是各味药发挥协同作用的结果,指纹图谱可全面控制中药内在化学成分的整体质量,它是以色谱峰的相对保留时间及相对峰面积来进行定性,以色谱峰面积进行定量,可作为分析中药内部有效成分的技术^[7-8]。

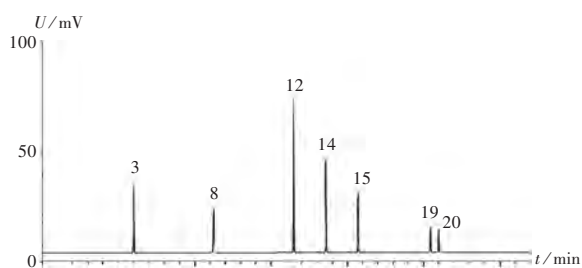
本研究中以 12 号峰(连翘苷峰)为参照峰,计算得的 12 批样品 23 个共有峰的相对保留时间的 *RSD* 为 0.05% ~ 1.10% (文中表略),均较小;而相对峰面积的 *RSD* 为 0.06% ~ 4.72%,其中 7, 18, 21, 23 号峰大于 2.0%,峰面积的差异可能与原料药材质量有关,不同产地和来源的药材质量有很大差异,建议药厂在选药投料生成前应注意药材成分含量的检测。

本研究曾采用二极管阵列检测器行全波长扫描,为了实现连翘苷、连翘酯苷 A、绿原酸、黄芩苷、汉黄芩苷、盐酸小檗碱、芍药苷的同时测定,采用不同时段切换不同检测波长:0 ~ 16 min 时,在 328 nm 波长处测定绿原酸;16 ~ 40 min 时,在 220 nm 波长处检测连翘苷、连翘酯苷 A 及芍药苷;40 ~ 62 min 时,在 277 nm 波长处检测黄芩苷、汉黄芩苷、盐酸小檗碱。同时比较了乙腈和甲醇作为有机相,0.1% 磷酸溶液、0.3% 磷酸溶液、0.5% 磷酸溶液及水作为无机相的检查效果,结果表明,以乙腈 - 0.5% 磷酸溶液系统得到的指纹图谱色谱峰数量多、信号强、分离效果好。研究过程中还比较了超声提取、加热回流提取及浸渍过夜提取 3 种提取方法的差异,结果提取率无明显差异,但超声提取时间短、操作简便,故为了节约成本采用超声提取法。

综上所述,本研究中建立了连翘败毒丸 HPLC 指

表1 12批药材样品 HPLC 图谱共有峰的相对峰面积

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	$\bar{X}$	RSD(%)
1	0.018 9	0.018 8	0.018 1	0.017 6	0.018 5	0.018 6	0.018 2	0.018 0	0.017 3	0.017 2	0.018 1	3.41
2	0.221 8	0.221 1	0.221 6	0.221 9	0.220 5	0.220 2	0.222 1	0.221 5	0.221 4	0.221 7	0.221 4	0.28
3	0.483 9	0.483 6	0.483 1	0.483 2	0.483 5	0.483 3	0.484 2	0.483 4	0.483 7	0.483 0	0.483 5	0.09
4	0.084 7	0.084 1	0.084 5	0.084 6	0.083 8	0.084 9	0.084 3	0.084 2	0.084 0	0.084 1	0.084 2	0.69
5	0.072 6	0.072 1	0.073 1	0.072 5	0.072 4	0.072 8	0.072 8	0.072 9	0.072 2	0.072 0	0.072 5	0.50
6	0.068 5	0.068 4	0.068 1	0.068 3	0.068 9	0.068 7	0.068 6	0.068 2	0.069 2	0.069 5	0.068 6	0.65
7	0.064 5	0.064 4	0.064 1	0.064 3	0.064 9	0.064 7	0.064 6	0.064 2	0.064 2	0.065 1	0.064 5	0.49
8	0.383 1	0.383 6	0.383 4	0.383 9	0.383 6	0.382 4	0.382 1	0.382 5	0.383 7	0.383 3	0.383 2	0.17
9	0.060 5	0.060 9	0.060 7	0.060 4	0.060 1	0.059 8	0.060 6	0.060 8	0.060 0	0.059 5	0.060 3	0.77
10	0.153 2	0.153 6	0.153 4	0.153 2	0.153 9	0.152 1	0.153 8	0.153 7	0.152 8	0.152 9	0.153 3	0.36
11	0.057 3	0.057 1	0.057 2	0.055 5	0.056 1	0.057 8	0.057 4	0.057 5	0.057 0	0.056 6	0.057 0	1.23
12(s)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
13	0.040 3	0.040 1	0.040 0	0.040 5	0.040 9	0.040 6	0.040 7	0.040 8	0.040 2	0.041 0	0.040 5	0.86
14	0.725 8	0.725 5	0.725 1	0.725 6	0.725 7	0.725 4	0.725 0	0.724 6	0.724 9	0.725 9	0.725 4	0.06
15	0.524 2	0.524 9	0.524 7	0.524 5	0.524 6	0.523 1	0.522 9	0.523 8	0.523 4	0.522 1	0.523 8	0.18
16	0.036 3	0.036 1	0.036 9	0.036 6	0.036 4	0.036 8	0.035 9	0.036 7	0.036 5	0.035 4	0.036 4	1.26
17	0.157 3	0.157 1	0.157 9	0.156 4	0.156 1	0.156 0	0.157 6	0.157 4	0.157 8	0.156 5	0.157 0	0.45
18	0.030 6	0.030 4	0.030 1	0.030 5	0.030 9	0.031 4	0.030 5	0.030 2	0.031 9	0.032 1	0.030 9	2.28
19	0.362 9	0.362 1	0.362 5	0.361 8	0.363 1	0.361 7	0.362 6	0.363 3	0.363 1	0.362 0	0.362 5	0.17
20	0.354 8	0.354 1	0.354 2	0.354 9	0.355 8	0.353 6	0.354 7	0.354 6	0.354 5	0.353 7	0.354 6	0.18
21	0.020 2	0.020 1	0.020 0	0.019 2	0.019 6	0.021 5	0.021 9	0.022 1	0.020 5	0.020 7	0.020 6	4.72
22	0.048 4	0.048 9	0.047 5	0.047 1	0.048 6	0.048 5	0.048 1	0.049 2	0.047 7	0.047 9	0.048 3	1.16
23	0.026 6	0.026 1	0.025 8	0.025 4	0.026 9	0.027 1	0.026 7	0.026 8	0.026 3	0.025 9	0.026 4	2.09



3. 绿原酸 8. 芍药苷 12. 连翘苷 14. 连翘酯苷 A
15. 盐酸小檗碱 19. 黄芩苷 20. 汉黄芩苷

图3 混合对照品溶液 HPLC 图

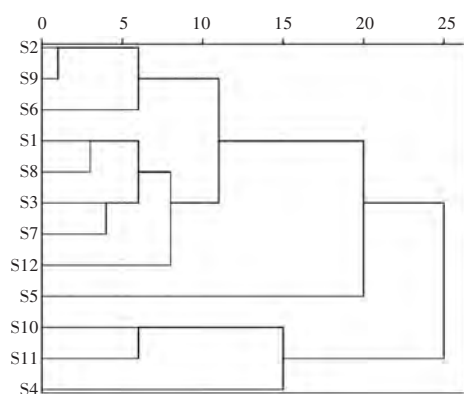


图4 12批样品聚类分析树状图

纹图谱,实现了对其多指标成分整体、综合的客观评价与分析,共识别出 23 个共有峰,并指认出其中 7 个指标性成分,能较好地反映出连翘败毒丸内在质量信息,可为有效控制连翘败毒丸的质量提供科学依据。

参考文献:

- [1] WS₃-B-3852-98, 卫生部药品标准·中药成方制剂 (第 19 册)[S].
- [2] 邹晓华,戴安印,何伟康,等. 感冒热毒清合剂质量标准研究[J]. 中国药业,2016,25(7):48-52.
- [3] 刘 廷,狄留庆,彭琳秀,等. UPLC-MS/MS 同时测定双黄连口服液 17 种有效成分[J]. 中草药,2015,46(22):3357-3363.
- [4] 王领弟,徐宝欣,李艳荣,等. 基于主成分和聚类分析的心安胶囊指纹图谱研究[J]. 中国药师,2017,20(1):35-37.
- [5] 李正杰,靳茂礼,张永锋,等. 连花清瘟胶囊超声逆流提取液超高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国药业,2013,22(23):5-6.
- [6] 薄一君. HPLC 法同时测定连翘败毒丸中绿原酸与连翘苷含量[J]. 首都食品与医药,2018,7(14):141-142.
- [7] 周里欣,林彦朝,章运典,等. 黄芩配方颗粒的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国药业,2017,26(2):27-31.
- [8] 杨方良,张 晶,孙国祥,等. 中药组方指纹图谱研究方法和思路[J]. 色谱,2016,34(7):715-725.

(收稿日期:2019-02-01)