

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.09.031

双黄连片高效液相色谱指纹图谱的建立及聚类分析和主成分分析

唐佩琴

(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 建立双黄连片的高效液相色谱指纹图谱,并进行聚类分析和主成分分析。方法 色谱柱为 Agilent Zorbax - C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.07% 甲酸溶液(梯度洗脱),流速为 0.9 mL/min,检测波长为 320 nm(绿原酸和木犀草苷)、220 nm(连翘酯苷 A 和连翘苷)、275 nm(黄芩苷、汉黄芩苷及黄芩素),柱温为 30 ℃,进样量为 10 μL。以连翘酯苷 A 峰为参照,绘制 12 批双黄连片的高效液相色谱指纹图谱,采用 2012 年版《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》进行相似度评价,确定共有峰,并采用 SPSS 22.0 统计学软件进行聚类分析和主成分分析。结果 建立了 12 批双黄连片的高效液相指纹色谱图谱,共确定 18 个共有峰,方法学考察结果符合指纹图谱的技术要求,相同厂家的药品聚为一类;经主成分分析,2 个主成分因子的累计方差贡献率为 92.242%,样品中绿原酸、木犀草苷、连翘酯苷 A、连翘苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、峰 9、峰 11、峰 15 对应成分的含量变化均是导致样品质量差异的重要原因。结论 该方法中建立的高效液相色谱指纹图谱可为双黄连片的质量评价提供参考。

关键词:双黄连片;高效液相色谱法;指纹图谱;聚类分析;主成分分析;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(2020)09-0102-04

Establishment of HPLC Fingerprint, Cluster Analysis and Principal Component Analysis of Shuanghuanglian Tablets

TANG Peiqin

(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 a high-performance liquid chromatography(HPLC) fingerprint of Shuanghuanglian Tablets, and to conduct cluster analysis and principal component analysis. **Methods** The determination was performed on Agilent Zorbax - C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.07% formic acid solution (gradient elution) at the flow rate of 0.9 mL/min. The detection wavelength was 320 nm for chlorogenic acid, luteolin-7-glucoside, 220 nm for forsythoside A, forsythin and 275 nm for baicalin, wogonoside and baicalein with 30 ℃ column temperature. The injection volume was 10 μL. Taken arctiin as reference peak, the HPLC fingerprints of 12 batches of Shuanghuanglian Tablets were determined, and the similarity in the 12 batches of samples was evaluated by Traditional Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Evaluation System(2012 edition) to determine the common peak. Cluster analysis and principal component analysis were performed by using SPSS 22.0 statistical software. **Results** The HPLC fingerprints of the 12 batch of Shuanghuanglian Tablets were established, and a total of 18 common peaks were calibrated. The method was validated by methodological investigation. The medicinal materials of the same origin could be grouped into one class. Through principal component analysis, accumulative contribution rate of 2 principal component factors was 92.242%. It was indicated that the content change of corresponding components of common peaks of No. 9, 11, 15, chlorogenic acid, luteolin-7-glucoside, forsythoside A, forsythin, baicalin, wogonoside and baicalein in samples was an important reason for the quality difference of samples. **Conclusion** The established HPLC fingerprint can provide reference for quality evaluation of Shuanghuanglian Tablets.

Key words: Shuanghuanglian Tablets; high-performance liquid chromatography; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; quality control

双黄连片由连翘、黄芩、金银花 3 味药材按 2:1:1 的处方配比制备而得,具有疏风解表、清热解毒之功效,临床用于治疗外感风热所致感冒^[1],收载于 2015 年版《中国药典(一部)》。现行质量标准分别采用 3 种不同的色谱条件和不同的样品前处理来检测黄芩苷、绿原酸及连翘苷 3 种成分的含量,操作烦琐。目前,已有关于双黄连制剂包括口服液、颗粒剂、粉针剂等剂型的质量控制分析^[2-4],但鲜有双黄连片的多成分质量控制。中药制剂是多种药材的内在多活性成分多靶点协同起效,仅对单一成分定量分析并不能准确判断其质量和疗效。中药

指纹图谱可系统、科学、全面、综合地反映中药复方制剂的整体性,是一种半定量鉴别技术,强调对图谱共有峰归属的辨识和图谱相似性评价,已成为国际认可化的质量评价模式,广泛应用于中药产品质量一致性和稳定性评价。主成分分析法是将指纹图谱中的多指标信息转换成综合指标,达到简化综合分析的目的^[5-7]。本研究中共收集了 2 个不同生产厂家 12 批次双黄连片,建立了高效液相色谱指纹图谱,共确定 18 个共有峰,并采用聚类分析及主成分分析法考察双黄连片的质量特征,确定引起质量差异的特征色谱峰,为系统评价双黄连片的质量提

第一作者:唐佩琴,大学本科,药师,研究方向为质量分析与医院药学,(电子信箱)315653310@qq.com。

供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器: Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 包括 G1311A 四元梯度泵、G1329A 自动进样器、G1314B-DAD 检测器、G1316A 柱温箱、Agilent-Chemstation 数据处理系统(安捷伦科技有限公司); AUW-220D 型电子天平(美国岛津公司, 精度为 0.01 mg); KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山超声波仪器有限公司, 功率为 500 W, 频率为 50 kHz); Milli-QAcademic 型超纯水系统(默克密理博公司)。

试剂: 双黄连片(编号 S1~S5, 哈尔滨圣泰生物制药有限公司, 批号分别为 20180611, 20180907, 20181105, 20181211, 20190122; 编号 S6~S12, 药都制药集团股份有限公司, 批号分别为 190103, 190212, 190317, 190425, 190521, 190602, 190705); 绿原酸对照品(批号为 110753-201817, 含量为 96.8%), 木犀草苷对照组(批号为 111720-201609, 含量为 94.9%), 连翘酯苷 A 对照品(批号为 111810-201707, 含量为 97.2%), 连翘苷对照品(批号为 110821-201816, 含量为 95.1%), 黄芩苷对照品(批号为 110715-201821, 含量为 95.4%), 汉黄芩苷对照品(批号为 112002-201702, 含量为 98.5%), 黄芩素对照品(批号为 111595-201607, 含量为 98.5%), 均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈(批号为 AS184407), 甲醇(批号为 MS1923814)均为色谱纯, 均购自美国 Merck 公司, 甲酸(分析纯, 批号为 20190517, 西陇科学股份有限公司); 水为超纯水。

2 方法与结果^[8-10]

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.07% 甲酸溶液(B), 梯度洗脱(0~12 min 时 8%→16% A, 12~20 min 时 16%→25% A, 20~26 min 时 25%→30% A, 26~33 min 时 30%→35% A, 33~42 min 时 35%→55% A, 42~46 min 时 55% A, 46~68 min 时 55%→75% A); 分段切换波长: 320 nm(0~32 min, 绿原酸和木犀草苷), 220 nm(32~46 min, 连翘酯苷 A 和连翘苷), 275 nm(46~68 min, 黄芩苷、汉黄芩苷及黄芩素); 流速: 0.9 mL/min; 柱温: 30℃; 进样量: 10 μL; 色谱记录时间: 68 min。

2.2 溶液制备

取绿原酸、木犀草苷、连翘酯苷 A、连翘苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷对照品各适量, 精密称定, 用 60% 甲醇溶液溶解并配制成每 1 mL 含绿原酸 0.037 5 mg、木犀草苷 0.087 9 mg、连翘酯苷 A 0.288 5 mg、连翘苷 0.143 6 mg、黄芩苷 0.134 7 mg、汉黄芩苷 0.108 2 mg、黄芩素 0.066 4 mg 的混合对照品溶液, 避光、冰箱冷藏

保存, 备用。取样品 20 片, 研细, 取约 1.0 g, 精密称定, 置 50 mL 棕色容量瓶中, 加入 60% 甲醇溶液 35 mL, 恒温超声处理(功率为 450 W, 频率为 40 kHz)45 min, 取出, 放冷, 加 60% 甲醇溶液至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

精密度试验: 取同一混合对照品溶液, 按拟订色谱条件连续进样 6 针(每针 10 μL), 记录指纹图谱, 以连翘酯苷 A 为参比峰。结果各共有峰相对保留时间的 $RSD < 1.2\%$ ($n=6$), 相对峰面积的 $RSD < 2.2\%$ ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取同一批(批号为 20181211)样品, 依法制备供试品溶液, 在室温放置 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 h 时按拟订色谱条件进样分析, 记录指纹图谱, 以连翘酯苷 A 峰为参比峰。结果各共有峰相对保留时间的 $RSD < 1.8\%$ ($n=6$), 相对峰面积的 $RSD < 2.0\%$ ($n=6$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

重复性试验: 取同一批(批号为 20181211)样品, 依法制备供试品 6 份, 研细, 过筛(80 目), 取细粉, 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件进样测定, 记录指纹图谱, 以连翘酯苷 A 为参比峰。结果各共有峰相对保留时间的 $RSD < 1.3\%$, 相对峰面积的 $RSD < 2.5\%$ ($n=6$), 表明方法重复性良好。

2.4 高效液相色谱指纹图谱的建立

取样品(编号 S1~S12), 研细, 过 80 目筛, 取细粉, 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件进样测定, 采用 2012 年版《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》以下简称《评价系统》对 12 份指纹图谱进行分析。结果见图 1。

2.5 相似度评价分析

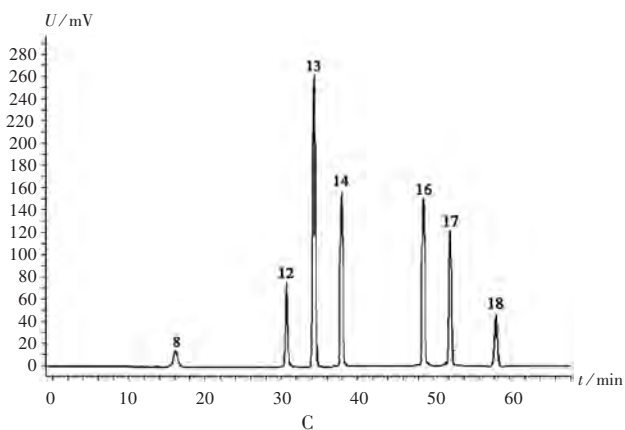
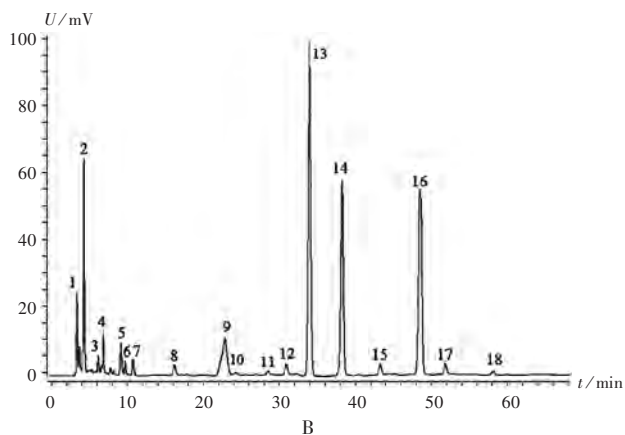
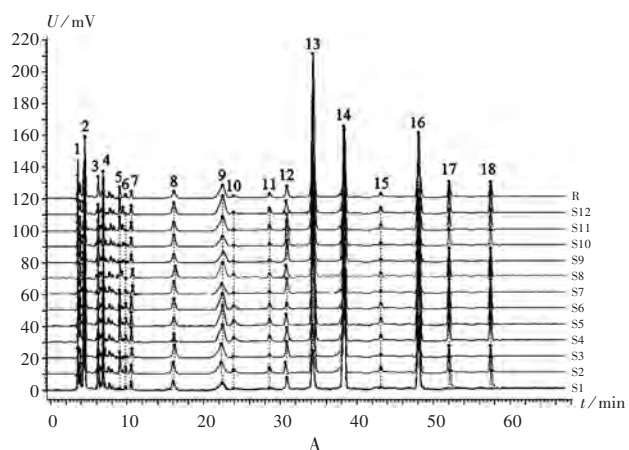
采用《评价系统》, 以供试品高效液相色谱指纹图谱为参照, 进行整体相似度评价。结果来自 2 个厂家的 12 批供试品溶液的指纹图谱相似度为 0.913~0.984, 表明各批次间各成分含量存在差异。结果见表 1。

2.6 共有峰指认

12 批供试品溶液高效液相色谱指纹图谱中共确定 18 个共有峰, 与图 1 C 比对, 指认出 7 个成分, 8 号峰为绿原酸、12 号峰为木犀草苷、13 号峰为连翘酯苷 A、14 号峰为连翘苷、16 号峰为黄芩苷、17 号峰为汉黄芩苷和 18 号峰为黄芩素。比对色谱峰相对保留时间和分离度等因素, 发现保留时间 34.22 min 处的 13 号峰位置适中, 与前后色谱峰分离完全, 且信号强度最大, 故选择 13 号峰(连翘酯苷 A)为参照, 计算其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积及其 RSD 。结果见表 2。

2.7 聚类分析^[11-12]

将 12 批样品 18 个共有峰的相对峰面积数据导入



8. 绿原酸 12. 木犀草苷 13. 连翘酯苷 A 14. 连翘苷
16. 黄芩苷 17. 汉黄芩苷 18. 黄芩素
A. 12批供试品溶液 B. 供试品溶液(批号为20181211)
C. 混合对照品溶液

图1 高效液相色谱指纹图谱

表1 12批双黄连片样品相似度评价结果

编号	编号	相似度	相似度	编号	相似度
S1	S5	0.926	0.919	S9	0.976
S2	S6	0.932	0.968	S10	0.984
S3	S7	0.913	0.959	S11	0.977
S4	S8	0.925	0.967	S12	0.963

SPSS 22.0 统计学软件,采用离差平方和法(Ward法),以欧氏距离平方(SED)为测度,采用系统聚类分析法进

表2 12批样品高效液相色谱指纹图谱共有峰的相对保留时间和相对峰面积

峰号	平均相对保留时间	RSD(%)	平均相对峰面积	RSD(%)
1	0.091 1	0.58	0.242 4	0.79
2	0.126 3	0.39	0.646 1	0.91
3	0.176 9	0.74	0.050 5	2.05
4	0.196 8	0.89	0.141 6	0.67
5	0.266 2	0.54	0.098 7	1.15
6	0.290 6	0.59	0.053 3	0.95
7	0.310 9	0.49	0.041 4	0.67
8	0.446 7	0.42	0.023 1	1.89
9	0.666 2	0.36	0.101 4	0.66
10	0.705 8	0.28	0.002 2	2.73
11	0.837 5	0.39	0.030 1	1.91
12	0.913 8	0.41	0.022 6	1.53
13(s)	1.000 0	0.00	1.000 0	0.00
14	1.131 6	0.52	0.585 9	1.33
15	1.275 3	0.65	0.025 3	1.70
16	1.431 1	0.33	0.555 6	1.51
17	1.528 9	0.49	0.028 3	1.55
18	1.707 6	0.36	0.023 2	1.75

行模式识别分析。结果见图2。根据聚类分析树状图,类间距离为5时,12批样品被分成了两大类:样品S1~S5与对照指纹图谱相似度小于0.94,样品S6~S12与对照指纹图谱相似度大于0.95。可见,聚类分析结果与相似度结果基本一致,同一厂家聚为一类,不同厂家的产品所含成分存在差异,而同一厂家各成分含量均匀、稳定,可能与厂家药材来源、采收和生产加工工艺有关。

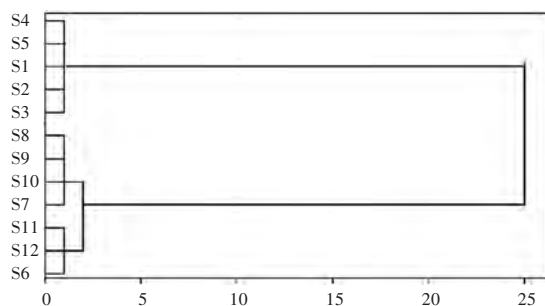


图2 12批样品聚类分析树状图

2.8 主成分分析^[13-14]

以指纹图谱中18个共有峰的峰面积为变量,构建19×18的原始数据矩阵,采用SPSS 22.0统计学软件对12批样品主成分进行分析。结果见表3和表4。可见,提取的2个主成分特征值均大于1,且累计方差贡献率达92.242%,2个主成分足以解释18个共有峰的主要特征和信息。主成分1主要反映绿原酸、木犀草苷、连翘酯苷A、连翘苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷的信息,峰9、峰11、峰15对主成分2贡献率较大。

表3 2个主成分的特征值及方差贡献率

主成分	特征值	方差贡献率(%)	累计方差贡献率(%)
1	11.521	63.723	63.723
2	5.736	28.519	92.242

表4 初始因子载荷矩阵

共有峰	主成分	
	1	2
峰1	0.01	-0.19
峰2	-0.83	0.32
峰3	-0.24	0.54
峰4	-0.91	0.31
峰5	0.12	0.04
峰6	0.14	-0.07
峰7	0.15	-0.98
峰8(绿原酸)	0.81	0.39
峰9	0.45	0.61
峰10	-0.86	0.16
峰11	0.16	0.77
峰12(木犀草苷)	0.91	0.42
峰13(连翘酯苷A)	0.96	-0.22
峰14(连翘苷)	1.00	0.42
峰15	0.20	0.69
峰16(黄芩苷)	0.89	-1.00
峰17(汉黄芩苷)	0.79	0.21
峰18(黄芩素)	0.83	-0.46

3 讨论

3.1 测定目标成分选择

双黄连片处方中连翘、金银花和黄芩的用量比为2:1:1,连翘具有抗菌、强心、利尿等药理作用,主要含有连翘酯苷、连翘苷、齐墩果酸及挥发油等成分。其中,连翘脂苷是连翘中最主要的抗菌活性成分^[15],也是双黄连片主要的质控指标成分之一。黄芩具有泻火、除湿热的功效,是凉血解毒、清热燥湿的要药,故选取黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素等黄酮类化合物作为制剂中黄芩药材的质控指标^[16]。金银花具有抑菌、抗病毒、抗炎、解热作用,特征成分绿原酸和木犀草苷在高效液相色谱图中可清晰分辨^[17]。

3.2 色谱条件选择

采用DAD检测器在190~400 nm波长紫外光区对对照品溶液进行了全波长扫描;考察了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-磷酸水、甲醇-磷酸水、乙腈-甲酸溶液、甲醇-甲酸溶液流动相系统不同梯度洗脱条件;对Shimadzu VP-ODS柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),Diamondsil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),Agilent Zorbax-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱进行了优选;筛选0.6,0.8,0.9,1.0,1.2 mL/min的流速,以及柱温25,30,35℃。最终按拟订色谱条件进样,各色谱峰信息最多,各

成分分离情况良好,可用于双黄连片的指纹图谱分析。

本研究中建立的双黄连片高效液相色谱指纹图谱,提取到18个共有峰,以13号峰(连翘酯苷A)为参照峰,计算其他各共有峰的相对峰面积,并进行了聚类分析和主成分分析。利用降维思想,将较多原始变量综合成较少变量的主成分分析,能系统、客观地反映出其内在质量信息及引起不同批次双黄连片差异的主要原因,方法简便、实用,可作为评价双黄连片质量的参考依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015:736.
- [2] 周伟,狄留庆,毕肖林,等. 双波长高效液相色谱法同时测定双黄连口服液黄芩苷、绿原酸、连翘苷、连翘酯苷A的含量[J]. 中华中医药杂志,2011(9):2111-2113.
- [3] 程晓英,赵明会. 高效液相色谱法测定双黄连注射液中连翘苷含量[J]. 中国药业,2011,20(8):41-42.
- [4] 冯继承,冯文军,李云涛. 双黄连颗粒指纹图谱的方法学研究[J]. 黑龙江医药,2018,31(3):12-14.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 祝明,陈碧莲. 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):611-614.
- [8] 顾佩馨,殷爱玲. UPLC-MS/MS建立双黄连口服液中连翘苷、牛蒡子苷、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙含量测定方法[J]. 云南中医中药杂志,2016,37(5):56-58.
- [9] 殷爱玲,谈璐忠. UPLC-MS/MS同时测定双黄连片中5种有效成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(19):57-59.
- [10] 郭琪,闫艳,王海波,等. HPLC波长切换法同时测定清热解毒颗粒中8个成分的含量[J]. 药物分析杂志,2015,35(9):1601-1605.
- [11] 程钱,邹秦文,汪建芬,等. 高效液相色谱法同时测定山豆根中4种生物碱的含量与聚类分析[J]. 中国药业,2017,26(17):10-13.
- [12] 张洪峰,张学强,于丽霞,等. 基于HPLC指纹图谱与聚类分析对不同产地连翘质量评价[J]. 江苏中医药,2018,50(4):78-80.
- [13] 高微,陈明生,韦广辉,等. 尖尾风药材的HPLC指纹图谱建立及聚类分析和主成分分析[J]. 中国药房,2018,29(16):2215-2219.
- [14] 陈晓红,岳显可,迟宗良. 基于HPLC指纹图谱及主成分分析的金蝉花不同溶剂提取物的化学组分研究[J]. 中国药师,2016,19(11):2062-2066.
- [15] 全云云,袁岸,龚小红,等. 连翘抗炎药效物质基础筛选研究[J]. 天然产物研究与开发,2017,29(3):435-438.
- [16] 雷芳. 黄芩苷药理作用研究进展[J]. 中国药业,2010,19(15):87-88.
- [17] 路俊仙,梁瑞雪,林慧彬. 金银花抗流感病毒作用研究进展[J]. 现代中药研究与实践,2018,32(5):81-85.

(收稿日期:2019-09-12)