

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)15-0070-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.15.017



超高效液相色谱指纹图谱结合化学模式识别评价白蒲黄胶囊质量

王 蕙, 陈 姨

(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 建立评价白蒲黄胶囊质量的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱和化学模式识别方法。方法 色谱柱为 Waters Acquity BEH C₁₈ 柱(150 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈 - 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液(梯度洗脱), 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 35 °C, 切换检测波长 210 nm 及 323 nm, 进样量为 2 μL。建立 2 个厂家 10 批样品的指纹图谱, 并进行相似度评价、聚类分析(CA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA), 筛选不同批次样品的差异性标志物。结果 方法学考察结果显示, 精密性、重复性、稳定性试验结果的 RSD 均小于 2.0%。10 批样品共标定了 19 个共有峰; 通过与对照品比对, 指认 7 个成分, 分别为盐酸黄柏碱(4 号峰)、绿原酸(6 号峰)、咖啡酸(10 号峰)、菊苣酸(11 号峰)、黄芩苷(13 号峰)、盐酸小檗碱(17 号峰)、白头翁皂苷 B₄(19 号峰)。10 批样品的指纹图谱相似度均不低于 0.978。10 批样品按厂家聚为 2 类; 在 OPLS-DA 模型下, 以变量重要性投影值大于 1 筛选出 4 个差异性标志物, 分别为白头翁皂苷 B₄(19 号峰)、5 号峰、菊苣酸(11 号峰)、绿原酸(6 号峰)。结论 该方法操作简单、结果准确, 可客观评价白蒲黄胶囊的质量。

关键词: 白蒲黄胶囊; 超高效液相色谱法; 指纹图谱; 化学模式识别; 质量评价

Quality Evaluation of Baipuhuang Capsules by UPLC Fingerprint Combined with Chemical Pattern Recognition

WANG Hui, CHEN Yi

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

Abstract: Objective To establish an ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) fingerprint and chemical pattern recognition method for evaluating the quality of Baipuhuang Capsules. **Methods** The chromatography column was Waters Acquity BEH C₁₈ column (150 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (gradient elution), the flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 35 °C, the switching wavelengths were 210 nm and 323 nm, and the injection volume was 2 μL. The fingerprints of ten batches of samples from two manufacturers were established, and the similarity evaluation, clustering analysis (CA), and orthogonal partial least squares - discriminant analysis (OPLS - DA) were conducted to screen for differential biomarkers in different batches of samples. **Results** The methodological examination results showed that the RSDs of the precision, repeatability, and stability test results of the seven components were all lower than 2.0%. Nineteen common peaks were calibrated in ten batches of samples. By comparing with the reference substance, seven components were identified, namely phellodendrine hydrochloride (peak 4), chlorogenic acid (peak 6), caffeic acid (peak 10), chicoric acid (peak 11), baicalin (peak 13), berberine hydrochloride (peak 17), and pulchinoside B₄ (peak 19). The similarity of the fingerprints of ten batches of samples was 0.978 or above. Ten batches of samples were classified into two categories according to the manufacturers. Under the OPLS - DA model, four differential biomarkers were screened based on the variable importance in projection (VIP) value greater than 1, namely pulchinoside B₄ (peak 19), peak 5, chicoric acid (peak 11), and chlorogenic acid (peak 6). **Conclusion** The method is simple and accurate, which can objectively evaluate the quality of Baipuhuang Capsules.

Key words: Baipuhuang Capsules; UPLC; fingerprint; chemical pattern recognition; quality evaluation

白蒲黄胶囊是由白头翁、蒲公英、黄芩、黄柏 4 味中药材加工制成的制剂, 具有清热凉血、解毒消炎功效, 临床用于治疗肠炎、痢疾等症^[1]。其现行标准《国家中成药标准汇编内科脾胃分册》中采用高效液相色谱(HPLC)法测定黄芩苷含量, 但 HPLC 法检测时间长, 指标成分单一。魏婷婷等^[2]采用超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定白蒲黄胶囊中白头翁皂苷的含量。但质谱仪价格昂贵, 操作复杂, 为能高效、全面评价该制剂质量的一致性, 本研究中建立了白蒲黄胶囊的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱, 并结合化学模式识别技术对

UPLC 指纹图谱进行分析, 筛选造成批间质量差异的标志物, 为其质量一致性研究提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters Acquity 型 UPLC 仪(美国 Waters 公司); Quintix 224 型电子天平(德国 Sartorius 公司, 精度为 0.1 mg); KQ-600DB 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 80 kHz)。

1.2 试剂

白头翁皂苷 B₄ 对照品(批号为 111766-202103, 含

第一作者: 王蕙, 女, 大学本科, 药师, 研究方向为药物分析与药物检验, (电子信箱)748508008@qq.com。

量96.4%),绿原酸对照品(批号为110753-202119,含量96.3%),咖啡酸对照品(批号为110885-201703,含量99.7%),菊苣酸对照品(批号为111752-202105,含量98.3%),黄芩苷对照品(批号为110715-202223,含量97.2%),盐酸小檗碱对照品(批号为110713-202015,含量85.9%),盐酸黄柏碱对照品(批号为111895-201805,含量94.9%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈(色谱纯,德国Merck公司);磷酸(色谱纯,北京汇海科仪科技有限公司);水为屈臣氏蒸馏水;白蒲黄胶囊(规格为每粒0.3g,哈尔滨蒲公英药业有限公司,批号分别为22090512,22110708,23010111,23020216,23030325,编号为S1-S5;黑龙江瑞格制药有限公司,批号分别为20221026,20221209,20230117,20230220,20230313,编号为S6-S10)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[3-5]

色谱柱:Waters Acquity BEH C₁₈柱(150 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈(A)-0.02 mol/L磷酸二氢钾溶液(B),梯度洗脱(0~6 min时15%A→20%A,6~9 min时20%A→25%A,9~14 min时25%A→35%A,14~20 min时35%A→55%A);流速:0.3 mL/min;检测波长:323 nm(0~14 min,菊苣酸、绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱),210 nm(14~20 min,白头翁皂苷B₄);柱温:35℃;进样量:2 μL。

2.2 溶液制备

取白头翁皂苷B₄、菊苣酸、绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱对照品各适量,精密称定,加75%甲醇制成质量浓度分别为0.3967,0.1522,0.2256,0.1285,0.1131,0.2629,0.1004 mg/mL的混合对照品溶液。取样品(编号为S8)10粒,混匀,研细,取1.0g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入75%甲醇溶液25 mL,密塞,超声(功率为400 W,频率为50 kHz)处理30 min,放冷,滤过,取滤液,置100 mL容量瓶中,用流动相洗涤容器及残渣,合并洗液,加流动相定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。分别取白头翁、蒲公英、黄芩、黄柏中药饮片细粉适量,按供试品溶液制备方法制备单味对照药材溶液。

2.3 方法学考察

精密度试验:精密量取2.2项下供试品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,以11号峰为参照。结果各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.47%(n=6),相对峰面积的RSD均小于0.95%(n=6),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取2.2项下供试品溶液6份,按2.1项下色谱条件进样测定,以11号峰为参照。结果各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.73%(n=6),相对峰面

积的RSD均小于1.58%(n=6),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液适量,按2.1项下色谱条件分别于制备后0,4,8,12,20,24,36 h时进样测定,以11号峰为参照。结果各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.61%(n=7),相对峰面积的RSD均小于1.47%(n=7),表明供试品溶液放置36 h内稳定性良好。

2.4 指纹图谱建立

指纹图谱建立及相似度评价:取10批(编号别为S1-S10)样品,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A版)对指纹图谱进行分析,选定S8为对照图谱,采用多点校正后自动匹配,共标定19个共有峰,生成叠加图谱(图1)。10批样品的相似度分别为0.980,0.983,0.981,0.979,0.978,0.995,0.991,0.990,0.992,0.993,表明不同厂家和批次间的样品质量一致性较好。

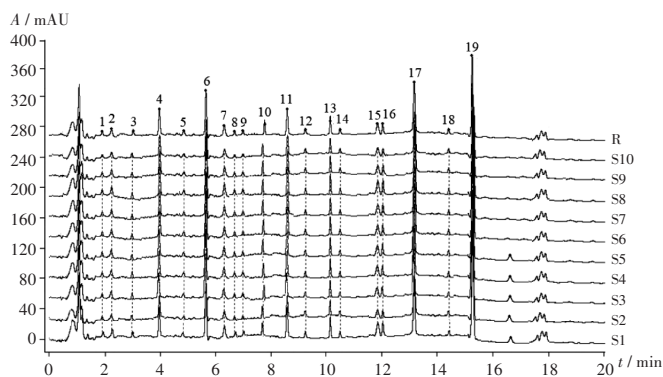


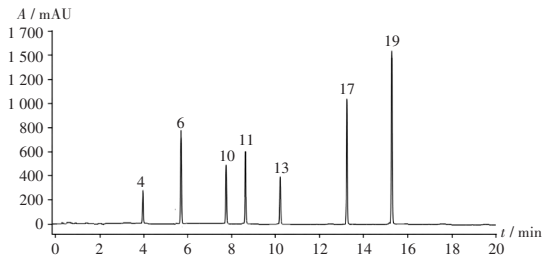
图1 10批白蒲黄胶囊超高效液相色谱叠加指纹图谱
Fig. 1 Overlay UPLC fingerprints of ten batches of Baipuhuang Capsules

共有峰指认:取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液、单味对照药材溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样分析,通过各峰的保留时间及化学成分的色谱图对比,共指认7个成分,分别为盐酸黄柏碱(4号峰)、绿原酸(6号峰)、咖啡酸(10号峰)、菊苣酸(11号峰)、黄芩苷(13号峰)、盐酸小檗碱(17号峰)、白头翁皂苷B₄(19号峰),详见图2。由图3可知,1号峰、3号峰、12号峰、18号峰、19号峰归属白头翁;6号峰、7号峰、10号峰、11号峰、14号峰归属蒲公英;2号峰、8号峰、9号峰、13号峰归属黄芩;4号峰、5号峰、15号峰、16号峰、17号峰归属黄柏。

2.5 化学模式识别

聚类分析(CA):以19个共有峰的峰面积为变量,导入SPSS 22.0统计学软件,以欧式平方距离为度量进行CA。由图4可知,当类间距为5时,10批样品按厂家可聚为2类,即编号为S1-S5的样品聚为一类,编号为S6-S10的样品聚为一类。

正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA):将19个共

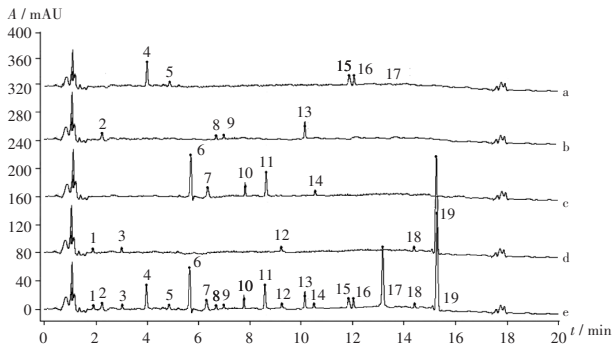


4. 盐酸黄柏碱 6. 绿原酸 10. 咖啡酸 11. 菊苣酸 13. 黄芩苷
17. 盐酸小檗碱 19. 白头翁皂苷 B₄

图2 混合对照品溶液超高效液相色谱图

4. Phellodendrine hydrochloride 6. Chlorogenic acid 10. Caffeic acid
11. Chicoric acid 13. Baicalin 17. Berberine hydrochloride
19. Pulchrenoside B₄

Fig. 2 UPLC chromatogram of mixed reference solution



a. 黄柏对照药材溶液 b. 黄芩对照药材溶液 c. 蒲公英对照药材溶液 d. 白头翁对照药材溶液 e. 供试品溶液(编号为S8)

图3 供试品溶液与各单味对照药材溶液超高效液相色谱图

a. Phellodendri Chinensis Cortex reference medicinal materials solution
b. Scutellariae Radix reference medicinal materials solution c. Taraxaci Herba reference medicinal materials solution d. Pulsatillae Radix reference medicinal materials solution e. Test solution (No. S8)

Fig. 3 UPLC chromatograms of the test solution and each reference medicinal materials solution

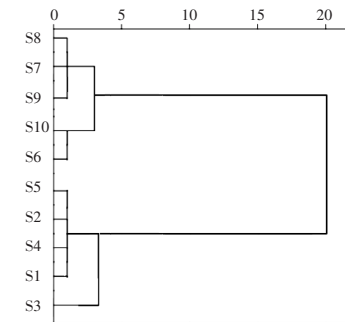


图4 10批白蒲黄胶囊聚类分析树状图

Fig. 4 Dendrogram of cluster analysis of ten batches of Baipuhuang Capsules

有峰的峰面积导入SIMCA - P 16.0软件进行OPLS - DA, 结果10批样品可按厂家分为2类, 与CA结果一致。详见图5。对数据进行变量重要性投影(VIP)筛选, 得到4个对差异贡献大(VIP > 1)的成分, 分别为白头翁皂苷 B₄ (19号峰)、5号峰、菊苣酸(11号峰)、绿原酸(6号峰)。

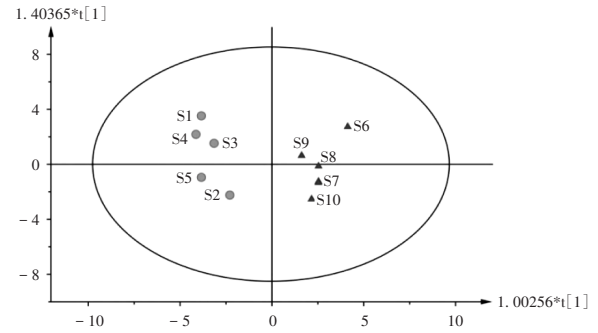


图5 10批白蒲黄胶囊正交偏最小二乘判别分析得分散点图

Fig. 5 OPLS - DA scatter plots of ten batches of Baipuhuang Capsules

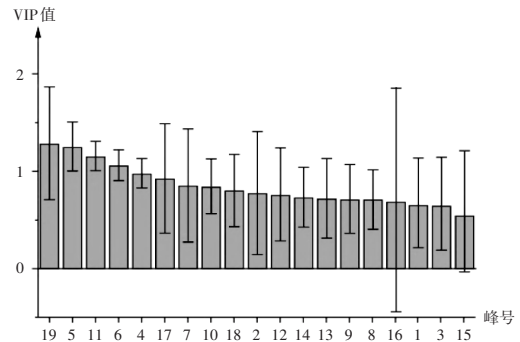


图6 10批白蒲黄胶囊正交偏最小二乘判别分析模型的变量重要性投影图

Fig. 6 VIP plot of OPLS - DA model of ten batches of Baipuhuang Capsules

详见图6。

3 讨论

3.1 质量评价方法选择

指纹图谱是指中药材或制剂经前处理后, 采用色谱分析手段, 获得能整体体现中药特征的图谱^[6]。化学模式识别可对指纹图谱的数据信息进行深入挖掘, 可直观地将不同样品按相似度进行分类, 并对原始数据进行降维筛选, 确定差异变量^[7]。目前, 指纹图谱结合化学模式识别的分析方法广泛用于评价中药质量的优劣及中药制剂一致性研究。本研究中联合应用CA和OPLS - DA化学模式识别技术与UPLC指纹图谱, 综合评价市售2个厂家10批白蒲黄胶囊的质量, 分析效率高, 分析时间短, 溶剂消耗少, 可聚类不同厂家的样品, 筛选不同厂家样品的4个差异性标志物。

3.2 质量控制指标性成分选择

白蒲黄胶囊中白头翁清热解毒、凉血止痢, 其含量最高的单体成分为白头翁皂苷 B₄, 具有抑制大肠杆菌等病原菌生长及增强机体抗炎能力的作用^[8-9]; 蒲公英消痛散结, 兼利湿, 发挥药效的重要物质基础为菊苣酸、绿原酸、咖啡酸等酚酸类化合物^[10-11]; 黄芩中黄酮类成分黄芩苷具有良好的抗菌、调节肠道微生物等功效^[12-13]; 黄柏泻火解毒、燥湿止泻, 主要活性成分为生