

银黄清肺胶囊 HPLC 指纹图谱研究

周卿意骏^{1,2}, 张水寒^{1,2,4*}, 高尚³, 蔡萍², 肖娟²

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208
2. 湖南省中医药研究院中药研究所, 湖南 长沙 410013
3. 湖南安邦制药有限公司, 湖南 长沙 410083
4. 湖南省 2011 数字中医药协同创新中心, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 建立银黄清肺胶囊的 HPLC 指纹图谱, 为评价其质量提供依据。方法 采用 Inertsil ODS-2 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 检测波长 210 nm; 以乙腈-水 (含 0.1% 磷酸) 为流动相进行梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。测定 10 批银黄清肺胶囊的色谱图, 应用相似度分析软件建立银黄清肺胶囊共有模式, 并对色谱峰进行指认。结果 建立了银黄清肺胶囊 HPLC 指纹图谱, 在确定的方法下, 得到 10 批银黄清肺胶囊的色谱图, 并获得了 10 批样品的相似度; 确定共有峰 28 个, 其中 26 个归属到各药材, 确定 14 个已知成分。通过聚类分析, 10 批银黄清肺胶囊可以分为 2 类。结论 建立的 HPLC 指纹图谱方法操作简便, 准确稳定, 重复性好, 为银黄清肺胶囊的质量控制提供了有效的手段。

关键词: 银黄清肺胶囊; HPLC; 指纹图谱; 质量控制; 聚类分析

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)09-1314-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.09.011

HPLC fingerprint of Yinhuang Qingfei Capsule

ZHOUQING Yi-jun^{1,2}, ZHANG Shui-han^{1,2,4}, GAO Shang³, CAI Ping², XIAO Juan²

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
2. Institute of Chinese Materia Medica, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China
3. Anbang Pharmaceutical, Changsha 410083, China
4. 2011 Collaboration and Innovation Center for Digital Chinese Medicine in Hunan, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprint for Yinhuang Qingfei Capsule. **Methods** The HPLC method was used with the condition that the column was Inertsil ODS-2 C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); The detection wavelength was set at 210 nm; The mobile phase was eluted with gradient by mixture of acetonitrile and water (0.1% phosphoric acid); The flow rate was 1.0 mL/min; The column temperature was 30 °C; The injection was 10 μL. The common mode of HPLC fingerprint for ten batches of Yinhuang Qingfei Capsule was established with similarity analyses and the peaks were identified. **Results** Under the selected spectrum condition, the HPLC fingerprint for ten batches of Yinhuang Qingfei Capsule and the similarities for ten batches of samples were obtained. Twenty-eight peaks were found, 26 belong to herbs and 14 were assigned. The ten samples were classified into two clusters by cluster analysis. **Conclusion** The method can be used for the quality control of Yinhuang Qingfei Capsule with good precision, accuracy, and reproducibility.

Key words: Yinhuang Qingfei Capsule; HPLC; fingerprint; quality control; cluster analysis

银黄清肺胶囊是湖南安邦制药有限公司具有知识产权的独家品种, 处方由北葶苈子、麻黄、苦杏仁、浙贝母、枇杷叶、大青叶等 14 味中药组成, 具有清肺化痰、止咳平喘的功效, 主要用于治疗慢性

收稿日期: 2015-01-14

基金项目: 湖南省科技厅科技计划专项 (2014XK4008); 湖南省战略新兴产业项目科技攻关类项目 (2014GK1022); 长沙市生物与新医药产业科技支撑重大专项项目: 中药创新关键技术研究及产业化 (K1204035-31)

作者简介: 周卿意骏 (1990—), 男, 硕士在读, 研究方向为中药制剂质量标准研究。Tel: 18673261196 E-mail: 1063170110@qq.com

*通信作者 张水寒, 女, 研究员, 博士生导师, 从事中药资源、中药制剂及质量标准研究、新药开发研究。

Tel: (0731)88881651 E-mail: zhangshuihan0220@126.com

支气管炎急性发作之痰热壅肺证。在临床上作为治疗支气管炎急性发作的药物, 具有较好的疗效^[1-2]。该制剂具有速效、量小、疗程短的特点, 且为中药小胶囊(0.15 g/粒), 方便有吞咽困难(儿童/体虚老人)吞服。现代药理研究表明该制剂对免疫系统有一定的调节作用, 具有止咳、祛痰、平喘、抗炎、抑菌、镇痛等多种药理作用。

目前银黄清肺胶囊的企业质量控制方法为国家食品药品监督管理局标准 WS₃-889(Z-174)-2009Z。标准中仅采用 TLC 法对成品中北葶苈子、浙贝母、五味子、穿山龙、枳实等药材进行定性鉴别, 采用 HPLC 法对方中麻黄碱进行定量测定。但银黄清肺胶囊成分复杂, 仅以几种有效成分无法全面表征中药制剂的物质基础和化学成分群的整体性和复杂性, 难以全面控制银黄清肺胶囊的内在质量。指纹图谱是顺应中药多组分、多靶点的整体综合作用的特点, 从“全成分”的角度出发的一种现代中药质量控制方法, 对非单一成分药物的质量控制更加全面^[3-5]。本研究采用 HPLC 法建立了银黄清肺胶囊的指纹图谱, 对指纹图谱中主要特征峰进行了化学指认, 并对各化学成分进行了初步归属, 通过相似度评价、聚类分析等识别技术, 为制定全面而整体的银黄清肺胶囊质量控制方法提供实验依据。

1 仪器与材料

岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪, 包括 LC-10AT 泵、SIL-10AD 进样器、SPD-M10A 检测器、CTO-10AS 柱温箱、CLASS-VP 5.0 色谱工作站, 日本岛津公司; AL204 电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; KQ5200DE 型数控超声仪, 昆山市超声仪器有限公司。

乙腈为色谱纯, 甲醇、磷酸均为分析纯, 水为娃哈哈纯净水。各对照品分别为盐酸麻黄碱(批号 171241-201007, 质量分数 $\geq 98\%$)、苦杏仁苷(批号 110820-201004, 质量分数 $\geq 98\%$)、橙皮苷(批号 110721-201115, 质量分数 $\geq 98\%$)、芦丁(批号 100080-200707, 质量分数 $\geq 98\%$)、柚皮苷(批号 110722-201312, 质量分数 $\geq 98\%$)、靛玉红(批号 110717-200204, 质量分数 $\geq 98\%$)、槲皮素(批号 100081-201408, 质量分数 $\geq 98\%$)、齐墩果酸(批号 110709-201206, 质量分数 $\geq 98\%$)、五味子醇甲(批号 110857-201412, 质量分数 $\geq 98\%$)、甘草苷(批号 111610-201106, 质量分数 $\geq 98\%$)、五味子甲素(批号 110764-201312, 质量分数 $\geq 98\%$)、贝母素甲

(批号 110750-201110, 质量分数 $\geq 98\%$)、贝母素乙(批号 110751-201110, 质量分数 $\geq 98\%$), 均购自中国食品药品检定研究院; 橙皮素(批号 13061701, 质量分数 $\geq 98\%$)购自成都曼斯特生物公司。北葶苈子、麻黄、苦杏仁、银杏叶、浙贝母、枇杷叶、大青叶、五味子、枳实、甘草、穿山龙、一枝蒿、石菖蒲、生石膏等 14 味药材均由湖南安邦制药有限公司提供, 由湖南省中医药研究院张水寒研究员鉴定, 分别为十字花科植物独行菜 *Lepidium apetalum* Willd. 的成熟种子、麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf. 的干燥草质茎、蔷薇科植物山杏 *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. 的干燥成熟种子、银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶、百合科植物浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq. 的干燥鳞茎、蔷薇科植物枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. 的干燥叶、十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥叶、木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实、芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥幼果、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎、薯蓣科植物穿龙薯蓣 *Dioscorea nipponica* Makino 的干燥根茎、菊科植物一枝蒿 *Artemisia rupetris* L. 的干燥全草、天南星科植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott 的干燥根茎、硫酸盐类矿物石膏 *Gypsum fibrosum*。10 批银黄清肺胶囊样品(批号 S1: 130301、S2: 130401、S3: 140103、S4: 130503、S5: 130101、S6: 130103、S7: 140101、S8: 130501、S9: 130303、S10: 130403)均由湖南安邦制药有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Inertil C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 检测波长 210 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μ L; 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 2%~5%乙腈; 5~10 min, 5%~10%乙腈; 10~30 min, 10%~20%乙腈; 30~50 min, 20%~30%乙腈; 50~60 min, 30%~50%乙腈; 60~80 min, 50%~80%乙腈; 80~85 min, 80%~85%乙腈; 85~90 min, 85%~95%乙腈; 90~115 min, 95%乙腈; 115~120 min, 95%~2%乙腈。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 分别取盐酸麻黄碱、五味子醇甲、苦杏仁苷、橙皮苷、橙皮素、靛玉红、槲皮素、

齐墩果酸、贝母素甲、贝母素乙、五味子甲素、甘草苷、芦丁、柚皮苷对照品适量，用甲醇分别制成质量浓度分别为 0.20、6.00、0.20、0.40、0.20、0.10、0.01、0.08、0.35、0.27、0.18、0.20、0.20、0.25 mg/mL 的各对照品溶液。

2.2.2 银黄清肺胶囊供试品溶液 取本品内容物，混匀，取胶囊内容物约 1.2 g，精密称定，置烧瓶中，加入甲醇 30 mL，称定质量，超声 0.5 h，放至室温，用甲醇补足减失的质量，滤过，摇匀，经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.2.3 各药材供试品溶液 各药材打成粗粉，分别取北葶苈子 0.48 g、麻黄 0.3 g、苦杏仁 0.36 g、浙贝母 0.36 g、枇杷叶 0.36 g、大青叶 0.24 g、石菖蒲 0.36 g、穿山龙 0.36 g、一枝蒿 0.24 g、银杏叶 0.36 g、五味子 0.12 g、枳实 0.12 g、甘草 0.12 g，分别精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 30 mL，称定质量，超声提取 0.5 h，放冷，用甲醇补足减失的质量，摇匀，提取液滤过，取续滤液，用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过，取续滤液，作为药材供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取样品 S1 1 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，精密量取同一供试品溶液，连续进样 6 次，考察色谱峰相对保留时间 (t_R) 和相对峰面积的一致性。21 号峰(五味子醇甲)峰形好，分离度较好，质量分数较高且稳定，故选为参照峰，计算其中 28 个色谱峰 t_R 的 RSD 均小于 1.5%，相对

峰面积的 RSD 均小于 2.0%，说明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取样品 S1 6 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，考察色谱峰 t_R 和相对峰面积的一致性。以五味子醇甲为参照峰，计算其中 28 个色谱峰的 t_R 的 RSD 均小于 1.5%，相对峰面积的 RSD 均小于 1.5%，表明方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取样品 S1 1 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别在 0、4、8、12、18、24 h 进样分析，考察色谱峰的 t_R 和相对峰面积的一致性。以五味子醇甲为参照峰，计算其中 28 个色谱峰的 t_R 的 RSD 均小于 1.0%，相对峰面积峰的 RSD 均小于 2.0%，表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.4 指纹图谱的建立及共有峰的指认

2.4.1 指纹图谱的建立 按照“2.2.2”项下方法制备 10 批样品的供试品溶液，各取 10 μ L 在“2.1”项色谱条件下进行测定，得到 10 批银黄清肺胶囊 HPLC 指纹图谱(图 1)。确定 28 个色谱峰为银黄清肺胶囊的所共有，且共有峰的总面积占总峰面积的 90%，因此确定该 28 个色谱峰为银黄清肺胶囊的指纹图谱共有峰，建立的共有指纹图谱(R)见图 1。以 21 号峰(五味子醇甲)为参照峰(S)，取 10 批银黄清肺胶囊指纹图谱计算各色谱峰保留时间和保留峰面积与同一图谱中 S 峰的保留时间和保留峰面积的比值，得到的 t_R 和相对峰面积见表 1、2。结果可以看出，各共有峰的 t_R 与相对峰面积的 RSD

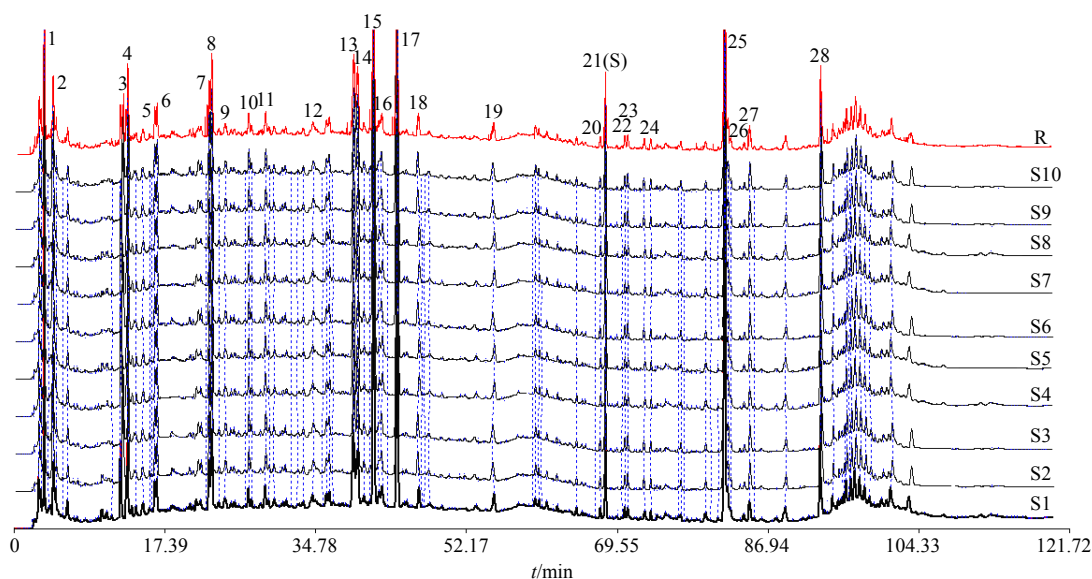


图 1 10 批银黄清肺胶囊样品 HPLC 指纹图谱及其共有指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of ten batches of Yinhuang Qingfei Capsule

表1 10批银黄清肺胶囊指纹图谱共有峰相对保留时间
Table 1 Relative retention time of common peaks of ten batches of Yinhuang Qingfei Capsule

| 峰号 | t_R | | | | | | | | | | RSD/% |
|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | S1 | S1 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | |
| 1 | 0.050 6 | 0.051 1 | 0.050 2 | 0.050 3 | 0.050 7 | 0.050 6 | 0.050 2 | 0.050 9 | 0.051 2 | 0.050 1 | 0.770 9 |
| 2 | 0.065 3 | 0.065 2 | 0.064 6 | 0.064 5 | 0.065 6 | 0.065 1 | 0.064 9 | 0.064 5 | 0.065 5 | 0.065 7 | 0.692 6 |
| 3 | 0.183 6 | 0.186 3 | 0.187 7 | 0.185 6 | 0.183 5 | 0.182 5 | 0.182 7 | 0.185 8 | 0.183 3 | 0.185 2 | 0.941 9 |
| 4 | 0.193 3 | 0.192 5 | 0.191 9 | 0.193 3 | 0.194 2 | 0.192 6 | 0.193 1 | 0.193 4 | 0.196 2 | 0.193 2 | 0.605 1 |
| 5 | 0.238 7 | 0.239 5 | 0.236 5 | 0.237 7 | 0.237 9 | 0.238 1 | 0.237 5 | 0.236 6 | 0.237 2 | 0.238 5 | 0.393 4 |
| 6 | 0.241 7 | 0.241 1 | 0.246 7 | 0.243 4 | 0.243 5 | 0.246 3 | 0.241 6 | 0.243 3 | 0.243 2 | 0.245 3 | 0.797 3 |
| 7 | 0.330 9 | 0.330 2 | 0.332 3 | 0.331 7 | 0.336 2 | 0.331 5 | 0.336 3 | 0.330 2 | 0.331 3 | 0.331 6 | 0.668 7 |
| 8 | 0.334 1 | 0.333 5 | 0.337 3 | 0.330 2 | 0.331 6 | 0.332 9 | 0.336 5 | 0.331 8 | 0.332 6 | 0.333 9 | 0.651 6 |
| 9 | 0.357 2 | 0.360 5 | 0.358 6 | 0.352 3 | 0.356 7 | 0.356 2 | 0.359 8 | 0.356 5 | 0.355 8 | 0.356 5 | 0.643 1 |
| 10 | 0.396 2 | 0.395 6 | 0.392 1 | 0.394 5 | 0.392 3 | 0.395 1 | 0.389 1 | 0.395 5 | 0.392 5 | 0.393 4 | 0.554 4 |
| 11 | 0.425 3 | 0.427 7 | 0.429 5 | 0.422 7 | 0.428 7 | 0.426 5 | 0.423 9 | 0.425 6 | 0.421 3 | 0.426 7 | 0.610 3 |
| 12 | 0.505 5 | 0.505 9 | 0.501 3 | 0.504 6 | 0.502 5 | 0.501 1 | 0.502 5 | 0.506 6 | 0.509 6 | 0.502 7 | 0.535 8 |
| 13 | 0.575 9 | 0.574 9 | 0.575 2 | 0.576 3 | 0.574 7 | 0.573 2 | 0.572 9 | 0.574 1 | 0.579 8 | 0.572 1 | 0.377 8 |
| 14 | 0.581 3 | 0.581 1 | 0.589 2 | 0.583 9 | 0.589 1 | 0.586 6 | 0.581 2 | 0.5790 | 0.588 9 | 0.582 3 | 0.661 9 |
| 15 | 0.607 2 | 0.603 6 | 0.604 4 | 0.609 5 | 0.606 1 | 0.607 5 | 0.602 1 | 0.606 7 | 0.602 1 | 0.609 2 | 0.444 1 |
| 16 | 0.621 3 | 0.629 5 | 0.638 7 | 0.619 9 | 0.627 2 | 0.629 8 | 0.634 5 | 0.625 3 | 0.628 3 | 0.629 1 | 0.888 7 |
| 17 | 0.646 8 | 0.641 3 | 0.640 2 | 0.645 7 | 0.648 5 | 0.642 2 | 0.641 2 | 0.645 8 | 0.649 2 | 0.641 9 | 0.511 4 |
| 18 | 0.682 3 | 0.687 6 | 0.689 3 | 0.681 5 | 0.689 2 | 0.679 3 | 0.689 2 | 0.681 2 | 0.685 2 | 0.680 1 | 0.593 3 |
| 19 | 0.809 5 | 0.815 5 | 0.802 6 | 0.808 1 | 0.807 5 | 0.815 2 | 0.810 8 | 0.808 7 | 0.809 4 | 0.817 3 | 0.545 7 |
| 20 | 0.991 6 | 0.982 6 | 0.983 7 | 0.990 3 | 0.998 5 | 0.989 7 | 0.991 2 | 0.998 7 | 0.998 1 | 0.988 2 | 0.582 0 |
| 21(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 | 0.000 0 |
| 22 | 1.032 9 | 1.032 6 | 1.039 8 | 1.037 2 | 1.032 9 | 1.038 2 | 1.031 2 | 1.037 8 | 1.021 7 | 1.033 9 | 0.498 6 |
| 23 | 1.037 7 | 1.037 2 | 1.042 9 | 1.050 1 | 1.048 2 | 1.042 3 | 1.042 2 | 1.051 1 | 1.050 2 | 1.045 6 | 0.488 0 |
| 24 | 1.077 0 | 1.075 8 | 1.072 3 | 1.078 5 | 1.079 6 | 1.078 4 | 1.072 3 | 1.073 4 | 1.076 5 | 1.075 3 | 0.241 6 |
| 25 | 1.202 9 | 1.204 6 | 1.202 5 | 1.207 3 | 1.206 6 | 1.207 9 | 1.209 8 | 1.207 6 | 1.209 8 | 1.206 2 | 0.210 9 |
| 26 | 1.235 1 | 1.236 8 | 1.238 2 | 1.237 7 | 1.236 1 | 1.238 2 | 1.236 7 | 1.237 8 | 1.236 5 | 1.235 4 | 0.090 0 |
| 27 | 1.244 9 | 1.236 6 | 1.241 9 | 1.249 7 | 1.232 5 | 1.248 7 | 1.248 1 | 1.245 6 | 1.242 8 | 1.246 6 | 0.443 4 |
| 28 | 1.365 8 | 1.365 2 | 1.355 8 | 1.357 4 | 1.368 1 | 1.365 6 | 1.372 3 | 1.361 6 | 1.365 9 | 1.368 7 | 0.371 3 |

大部分都小于 1%，个别峰的 RSD 大于 1%但小于 3%，可初步说明 10 批银黄清肺胶囊样品的成分以及各成分的量都较稳定。

2.4.2 共有指纹峰的指认 采用对照品对各峰的成分进行指认，分别精密吸取供试品溶液、对照品溶液各 10 μL，注入高效液相色谱仪，记录 120 min 色谱图，通过各峰保留时间和色谱行为的比较，对各峰进行指认，见图 2。共确认了 14 个色谱峰的化学成分，分别为 3 号峰（麻黄碱）、8 号峰（苦杏仁苷）、13 号峰（橙皮苷）、14 号峰（橙皮素）、15 号峰（柚皮苷）、17 号峰（芦丁）、18 号峰（靛玉红）、19 号峰（槲皮素）、20 号峰（齐墩果酸）、21 号峰（五味子醇甲）、22 号峰（甘草苷）、24 号峰（五味

子甲素）、26 号峰（贝母素甲）、27 号峰（贝母素乙）。

2.4.3 共有指纹峰的归属确认 按“2.2.2”项下方法分别制备供试品溶液以及除生石膏以外其余 13 味药材的样品溶液。分别精密吸取供试品溶液、13 味药材样品溶液各 10 μL，注入高效液相色谱仪，记录 120 min 色谱图。对保留时间一致的色谱峰进行分析比较，根据紫外光谱信息，对全方与药材指纹图谱的相关峰进行指认，确定特征峰的药材归属，见图 3。通过银黄清肺胶囊复方与全方药材相关性研究，确认银黄清肺胶囊复方 HPLC 指纹图谱的 26 个特征峰的来源，其中 2 个峰不能得到归属，其余指纹峰来自麻黄（3、4、10 号峰）、北葶苈子（5、6 号峰）、苦杏仁（8 号峰）、浙贝母（26、27 号峰）、

表 2 10 批银黄清肺胶囊指纹图谱共有峰相对峰面积

Table 2 Relative peak area of common peaks of ten batches of Yinhuang Qingfei Capsule

| 峰号 | 相对峰面积 | | | | | | | | | | RSD/% |
|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | S1 | S1 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | |
| 1 | 2.915 1 | 2.962 2 | 2.943 1 | 2.925 7 | 2.911 3 | 2.923 2 | 2.933 2 | 2.936 1 | 2.901 5 | 2.913 3 | 0.609 0 |
| 2 | 1.212 2 | 1.221 5 | 1.226 2 | 1.215 8 | 1.228 7 | 1.216 5 | 1.227 9 | 1.205 8 | 1.220 2 | 1.219 5 | 0.591 5 |
| 3 | 1.028 1 | 1.026 7 | 1.021 5 | 1.031 6 | 1.026 2 | 1.028 1 | 1.026 5 | 1.031 1 | 1.023 3 | 1.028 9 | 0.305 3 |
| 4 | 0.763 6 | 0.767 8 | 0.763 5 | 0.765 6 | 0.768 2 | 0.763 7 | 0.761 5 | 0.766 3 | 0.763 2 | 0.768 7 | 0.322 4 |
| 5 | 0.327 1 | 0.332 5 | 0.328 1 | 0.324 7 | 0.326 3 | 0.327 7 | 0.3280 | 0.326 6 | 0.325 5 | 0.327 3 | 0.642 3 |
| 6 | 0.462 5 | 0.463 3 | 0.463 7 | 0.457 3 | 0.468 5 | 0.462 6 | 0.461 3 | 0.459 9 | 0.469 7 | 0.465 3 | 0.803 3 |
| 7 | 0.740 7 | 0.742 5 | 0.738 2 | 0.746 6 | 0.746 8 | 0.742 3 | 0.736 2 | 0.743 5 | 0.742 5 | 0.743 1 | 0.443 3 |
| 8 | 0.985 9 | 0.982 9 | 0.981 6 | 0.992 7 | 0.991 8 | 0.983 5 | 0.983 5 | 0.991 7 | 0.992 8 | 0.983 1 | 0.475 4 |
| 9 | 0.336 5 | 0.335 6 | 0.332 5 | 0.334 6 | 0.332 4 | 0.327 3 | 0.331 5 | 0.331 7 | 0.340 5 | 0.337 3 | 1.109 3 |
| 10 | 0.275 2 | 0.273 6 | 0.276 4 | 0.273 1 | 0.272 5 | 0.275 8 | 0.271 3 | 0.274 4 | 0.276 5 | 0.276 3 | 0.665 6 |
| 11 | 0.364 3 | 0.362 1 | 0.355 6 | 0.362 5 | 0.367 7 | 0.361 4 | 0.356 6 | 0.364 5 | 0.363 7 | 0.365 4 | 1.039 8 |
| 12 | 0.228 1 | 0.228 3 | 0.223 9 | 0.228 5 | 0.227 2 | 0.228 6 | 0.229 1 | 0.227 9 | 0.226 2 | 0.226 7 | 0.676 1 |
| 13 | 0.347 7 | 0.346 6 | 0.348 2 | 0.345 9 | 0.349 6 | 0.348 1 | 0.346 2 | 0.347 9 | 0.345 6 | 0.340 1 | 0.748 7 |
| 14 | 0.732 6 | 0.733 5 | 0.732 3 | 0.736 8 | 0.735 1 | 0.733 6 | 0.736 3 | 0.732 8 | 0.733 1 | 0.735 6 | 0.223 0 |
| 15 | 3.886 5 | 3.896 2 | 3.882 7 | 3.881 1 | 3.871 5 | 3.892 6 | 3.881 7 | 3.882 1 | 3.876 6 | 3.891 5 | 0.194 7 |
| 16 | 0.421 3 | 0.421 7 | 0.421 1 | 0.413 6 | 0.422 3 | 0.421 6 | 0.423 1 | 0.418 6 | 0.421 3 | 0.422 6 | 0.660 2 |
| 17 | 2.702 6 | 2.703 8 | 2.715 3 | 2.718 1 | 2.697 1 | 2.708 2 | 2.713 5 | 2.711 2 | 2.698 1 | 2.707 1 | 0.263 4 |
| 18 | 0.301 3 | 0.303 3 | 0.301 2 | 0.306 7 | 0.304 5 | 0.302 3 | 0.301 7 | 0.306 6 | 0.301 5 | 0.303 6 | 0.688 0 |
| 19 | 0.326 7 | 0.323 5 | 0.320 3 | 0.329 9 | 0.326 6 | 0.325 9 | 0.323 5 | 0.330 1 | 0.326 9 | 0.325 2 | 0.909 9 |
| 20 | 0.161 1 | 0.161 5 | 0.162 7 | 0.163 5 | 0.162 6 | 0.162 1 | 0.162 9 | 0.165 5 | 0.162 7 | 0.162 3 | 0.740 1 |
| 21(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 | 0.000 0 |
| 22 | 0.201 3 | 0.201 5 | 0.202 9 | 0.203 1 | 0.202 3 | 0.201 1 | 0.202 1 | 0.201 3 | 0.202 2 | 0.201 5 | 0.346 3 |
| 23 | 0.232 2 | 0.236 7 | 0.232 2 | 0.232 6 | 0.231 6 | 0.231 3 | 0.233 5 | 0.230 7 | 0.234 6 | 0.231 2 | 0.786 9 |
| 24 | 0.181 9 | 0.181 5 | 0.182 3 | 0.179 9 | 0.183 2 | 0.181 5 | 0.181 6 | 0.179 6 | 0.182 5 | 0.181 2 | 0.607 8 |
| 25 | 1.768 2 | 1.762 6 | 1.773 7 | 1.766 7 | 1.772 3 | 1.771 1 | 1.771 3 | 1.763 6 | 1.775 6 | 1.775 9 | 0.264 8 |
| 26 | 0.133 8 | 0.132 6 | 0.133 3 | 0.132 9 | 0.133 7 | 0.135 5 | 0.131 3 | 0.133 7 | 0.132 7 | 0.135 3 | 0.937 6 |
| 27 | 0.456 3 | 0.452 3 | 0.458 1 | 0.452 6 | 0.455 7 | 0.453 1 | 0.456 1 | 0.456 2 | 0.452 6 | 0.455 1 | 0.442 8 |
| 28 | 0.515 2 | 0.515 2 | 0.513 5 | 0.512 3 | 0.512 2 | 0.515 6 | 0.515 2 | 0.516 3 | 0.513 2 | 0.516 6 | 0.311 6 |

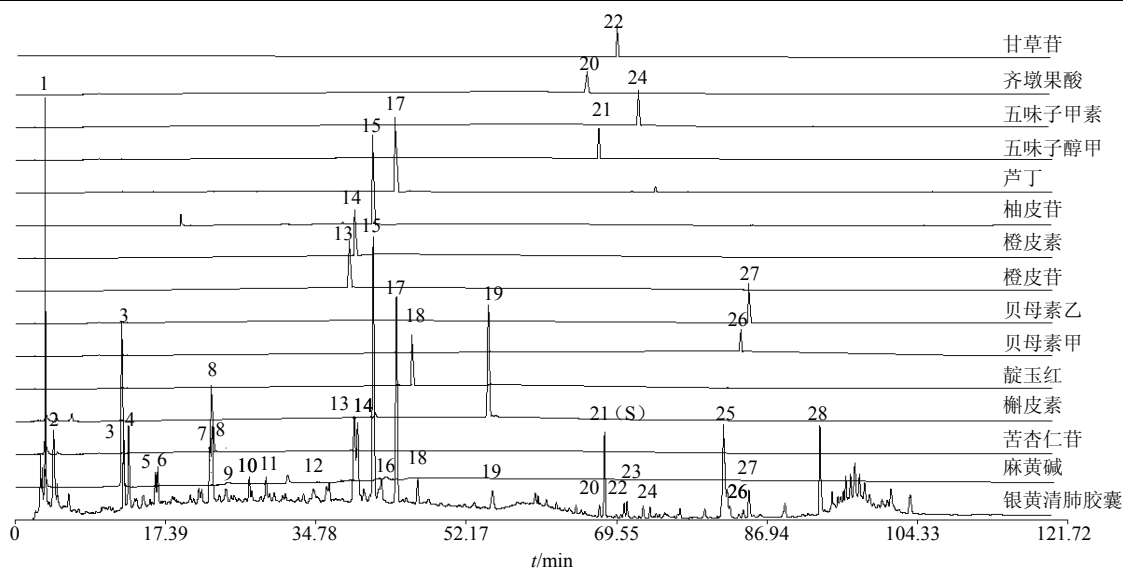


图 2 银黄清肺胶囊指纹图谱特征峰的成分确认

Fig. 2 Characteristic peak attribution in fingerprint of Yinhuang Qingfei Capsule

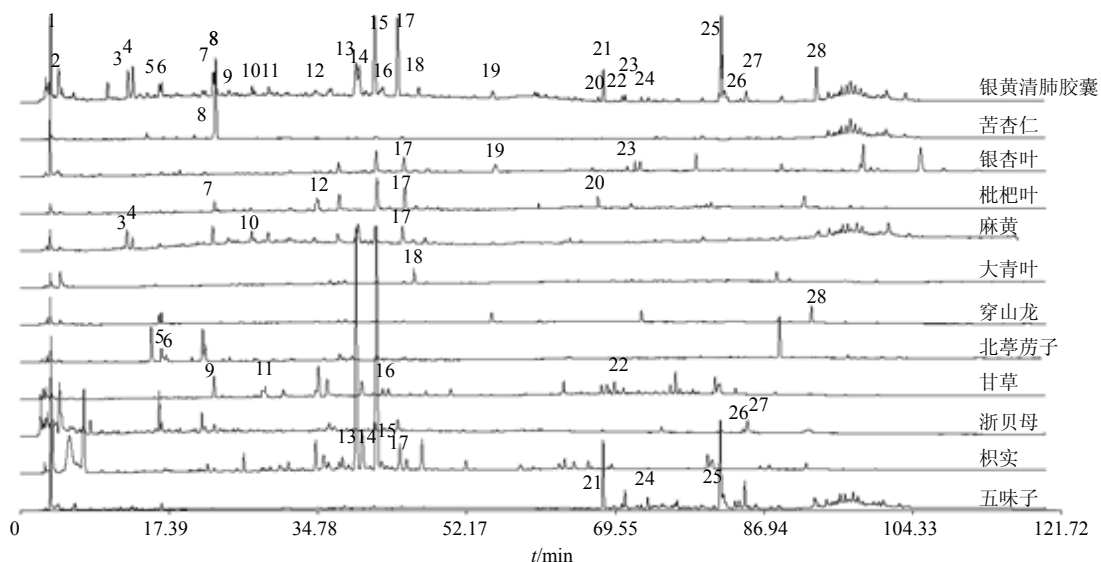


图 3 银黄清肺胶囊和各单味药 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC fingerprint of Yinhuang Qingfei Capsule and single herb medicine

银杏叶 (19、23 号峰)、枇杷叶 (7、12、20 号峰)、大青叶 (18 号峰)、五味子 (21、24、25 号峰)、枳实 (13、14、15 号峰)、甘草 (9、11、16、22 号峰)、穿山龙 (28 号峰), 17 号峰可能来自于麻黄、枇杷叶、银杏叶、枳实。

2.5 指纹图谱相似度评价

将测定获得的 10 批银黄清肺胶囊指纹图谱导入国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版), 进行色谱峰匹配, 匹配结果见图 1。10 批样品 S1~S10 与对照图谱之间的相似度依次为 0.921、0.958、0.966、0.962、0.946、0.933、0.917、0.957、0.952、0.961。由此可知, S2、S3、S4、S8、S9、S10 相似度良好, 均大于 0.95; 而 S1、S5、S6、S7 相似度稍低, 但均大于 0.90。由此可知, 各批次药材共有物质出峰时间大致相同, 成分较稳定, 质量分数也基本稳定。

2.6 样品系统聚类分析

以 10 批银黄清肺胶囊的共有峰相对峰面积为变量, 采用 SPSS 17.0 统计分析软件中的系统聚类法, 选取欧氏距离平方作为测度对 10 批样品进行系统聚类分析, 绘出树状图, 见图 4。由聚类结果可知: 10 批样品大致分为 2 类, 其中批次 S1、S7、S6、S5 归为一类, 批次 S3、S9、S4、S10、S2、S8 归为一类。由相似度分析结果可知, 批次 S1、S5、S6、S7 相似度相对较低, 而 S2、S3、S4、S8、S9、S10 相似度相对较高, 聚类分析结果与相似度评价结果基本一致, 2 种方法得到了相互印证。由此可

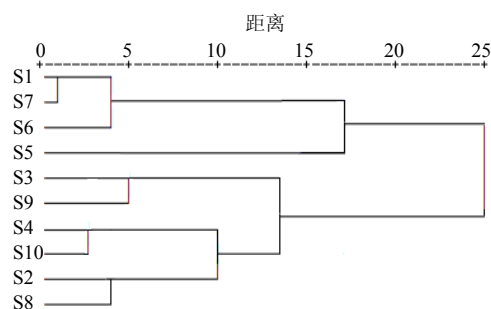


图 4 聚类分析树状图

Fig. 4 Dendrogram of cluster analysis

知不同批次银黄清肺胶囊的质量基本稳定, 但部分共有峰所对应的化学成分的量还存在一定的差异。

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

考察了 3 种不同型号色谱柱: Putulips bp C18 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、依利特 Hypersil BDS C18 色谱柱、Inertsil ODS-2 C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 结果表明, Inertsil ODS-2 C₁₈ 柱分离出的色谱峰分离度好、峰数多、稳定性好。故选择 Inertsil ODS-2 C₁₈ 柱为分析色谱柱。

3.2 色谱条件的选择

由于银黄清肺胶囊的化学成分复杂, 极性范围大, 故选择了梯度洗脱。在流动相筛选中, 考察了甲醇-0.1%甲酸水系统、乙腈-0.1%甲酸水系统、乙腈-0.1%磷酸水系统^[6-7]。结果显示, 甲醇-0.1%甲酸水系统分离效果较差, 且易产生基线漂移; 而乙腈-0.1%甲酸水系统基线稳定, 但分离度较差, 且色谱

峰较少。相比之下,乙腈-0.1%磷酸水系统的基线更为稳定,色谱峰个数较多,且拥有较好的分离度,因此选择乙腈-0.1%磷酸水溶液系统为 HPLC 分析的流动相系统。

3.3 检测波长的选择

使用二极管阵列检测器对样品进行 200~400 nm 的全波长扫描,并对各波长下的色谱图进行分析比较。结果表明,在 210 nm 下检测到峰的数目较多,各峰分离良好,特征峰明显且峰形较好,从图谱中可以尽可能地获取色谱组分信息以反映体系组成的全貌,且 210 nm 为原指标成分麻黄碱的最大吸收波长,因此选定 210 nm 为测定波长。

3.4 提取方法的选择

分别比较 3 种不同提取溶剂乙醇、50%甲醇以及甲醇的提取效果。结果表明,甲醇的提取溶液中的色谱峰较其他 2 种溶剂提取溶液中的色谱峰更为丰富,因此选择甲醇为提取溶剂。分别比较了超声震荡和加热回流 2 种提取方法,结果表明 2 种方法得到的 HPLC 指纹图谱全貌和各个色谱峰强度无明显差别,因超声提取法操作更加简便,且不易破坏有效成分,适合大量样品的快速提取,因此选择超声震荡提取法^[8]。

3.5 小结

中药指纹图谱是一种多指标的质控模式,可比较全面的反映复方中的化学成分信息,为中药质量评价提供了新思路和新方法,已日益成为了国内外广泛接受的中药质量评价模式^[9-10]。本研究建立了银黄清肺胶囊的 HPLC 指纹图谱,共标定了 28 个共有指纹峰,并归属到各药材,其中明确了 14 个峰的化学成分。方法简便易行且稳定可靠、重现性较

好。采用相似度和聚类分析对指纹图谱进行评价,两种方法的结果基本吻合,且不同批次相似度较好,均大于 0.9,说明不同批次银黄清肺胶囊的化学组成一致性较好。本研究为银黄清肺胶囊的质量控制研究提供了实验依据。

参考文献

- [1] 范伏元,李 姐. 银黄清肺胶囊治疗急性气管-支气管炎风热犯肺证 60 例疗效观察 [J]. 中医药导报, 2014, 20(1): 36-37.
- [2] 范伏元,柳玉佳. 银黄清肺胶囊联合阿莫西林克拉维酸钾治疗慢性支气管炎急性发作 30 例 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2013, 11(19): 71-72.
- [3] 邵建强. 中药指纹图谱的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 994-998.
- [4] 张铁军. 中药质量认识与质量评价 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 1-9.
- [5] 赵洪芝,孟宪生,叶挺祥,等. 六味地黄丸的 HPLC 指纹图谱和模式识别研究 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 48-51.
- [6] 钟宁远,吕林锋. 银黄清肺胶囊中盐酸麻黄碱含量测定方法的改进 [J]. 西北药学杂志, 2011, 26(4): 264.
- [7] 李志梅,潘柔和,谢秉湘. 高效液相色谱法测定银黄清肺胶囊中盐酸麻黄碱含量 [J]. 医学导报, 2010, 29(12): 1646-1647.
- [8] 范 兴,杨成梓,包侠萍,等. 芪骨胶囊 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2014, 45(9): 1257-1261.
- [9] 秦昆明,方前波,蔡宝昌,等. 指纹图谱技术在方剂现代研究中的应用现状 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2009, 11(2): 287-293.
- [10] 李 倩,罗祖良,杨小丽. 中药质量控制方法研究述评 [J]. 中医学报, 2012, 27(4): 448-451.