

银黄制剂的 HPLC-ELSD 指纹图谱研究

赵刚^{1,2}, 杜玮^{1,2}, 魏玉辉¹, 姚小军³, 武新安^{1*}

(1. 兰州大学第一医院 药剂科, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000;

3. 兰州大学化学化工学院, 甘肃 兰州 730000)

摘要:目的 建立稳定可控的银黄制剂的 HPLC-ELSD 的指纹图谱, 探讨主成分分析法和聚类分析法在中药制剂指纹图谱中的应用。方法 用梯度洗脱法对样品进行 HPLC-ELSD 测定, 且采用聚类分析和主成分分析法对不同厂家和批次的样品图谱进行化学模式识别研究。结果 建立的银黄制剂指纹图谱表征了不同厂家和批次的制剂之间的客观差异。结论 聚类分析和主成分分析法能有效地应用于银黄制剂的指纹图谱分析, 为有效的控制该制剂的质量提供评价依据。

关键词:银黄制剂; 指纹图谱; 聚类分析法; 主成分分析法; 质量控制

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)07-1053-04

HPLC-ELSD Fingerprints of Yinhuang preparations

ZHAO Gang^{1,2}, DU Wei^{1,2}, WEI Yu-hui¹, YAO Xiao-jun³, WU Xin-an¹

(1. Department of Pharmacy, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. College of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 3. College of Chemistry and Chemical Engineering,

Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract : Objective To evaluate the quality of Yinhuang preparations effectively and develop a credible method for the quality control of Chinese materia medica. **Methods** Fingerprints of different Yinhuang preparations were obtained by HPLC-ELSD method. The technique of projection discriminate study based on hierarchical cluster analysis and principal component analysis was applied to investigate the experimental data. **Results** The developed fingerprints showed that there were differences among the Yinhuang preparation by different manufacturers. **Conclusion** This method using the hierarchical cluster analysis and principal component analysis could be effectively applied to the quality control of Chinese materia medica.

Key words : Yinhuang preparations; fingerprints; hierarchical cluster analysis; principal component analysis; quality control

银黄制剂是将黄芩与金银花药材经提取、浓缩和滤过等工艺制备而成, 具有抗菌、清热解毒、消炎、退热等功效, 用于上呼吸道感染、急慢性扁桃体炎、咽喉炎等症的治疗^[1]。现已有口服液、颗粒、片剂等多种剂型应用于临床。目前文献报道多采用紫外分光光度法^[2]、毛细管电泳法^[3]、薄层扫描法^[4]和 HPLC 法^[5,6]等方法测定银黄制剂中的绿原酸和黄芩苷作为质量控制标准。但是由于金银花和黄芩富含黄酮类和皂苷类等多种化学成分^[7~10], 仅测定其中两种成分不能全面客观地反映其内在的质量标准。中药指纹图谱技术包含信息量大, 是表征中药复杂成分与其内在质量关系的有效手段^[11~13]。为

了全面控制其质量, 本实验建立了银黄制剂的 HPLC-ELSD 指纹图谱, 对银黄制剂中有效成分进行全面综合分析, 并利用聚类分析和主成分分析法对图谱进行化学模式识别, 无需对化学成分进行定量, 即可准确、有效地对中药制剂进行质量评价, 为更好地控制中药制剂提供了简单可靠的分析方法。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20AT 二元梯度泵, SPD-M20A 二极管阵列检测器, DGU-20A 在线脱气系统, SIL-20A 自动进样系统, CTO-20A 柱温箱, LC solution 色谱工作站(日本岛津公司), Alltech-2000ES 蒸发光散射检测器(Alltech, 美国), N3000 色谱工

* 收稿日期: 2008-11-16

作者简介: 赵刚(1981—), 男, 陕西西安人, 硕士, 从事中药制剂质量控制和体内药物分析研究, 在该领域已发表论文6篇。

Tel.: 13572257499 E-mail: weidu82@163.com

* 通讯作者 武新安

作站(浙江大学),XWK—无油空气泵(天津市华生分析仪器厂)。SHZ—型循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂),高速离心机(深圳国华仪器厂)。

绿原酸、黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所);乙腈为色谱纯,其他试剂均为国产分析纯,去离子水。

银黄口服液分别购自陕西白鹿药业有限公司(A,批号 060152、060327、060716、060834, No. 1~4)、山西太行药业股份有限公司(B,批号 050503、060102B、060304A、060601, No. 5~8)、湖北太子药业(C,批号 051103、060503、06060060802, No. 9~12);银黄颗粒购自西安交大药业有限公司(D,批号 051101、060202、060203、060403、060906, No. 13~17)。

2 方法和结果

2.1 色谱分析条件

2.1.1 HPLC 条件:Cosmosil-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:1%醋酸(A)和乙腈(B)二元梯度系统,采用梯度洗脱,0~10 min,10%~18% B,10~15 min,18% B,15~26 min,18%~28% B,26~30 min,28% B,30~40 min,28%~60% B,40~65 min,60%~100% B,65~80 min,100% B。检测波长:276 nm;柱温:40℃;体积流量:0.8 mL/min;进样量:10 μL。

2.1.2 ELSD 条件:漂移管温度:90℃,载气(N₂)流量:2.5 L/min。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取绿原酸对照品 1.2 mg,黄芩苷对照品 1.5 mg,置于 10 mL 量瓶,加甲醇溶解并稀释至刻度,制得对照品溶液。

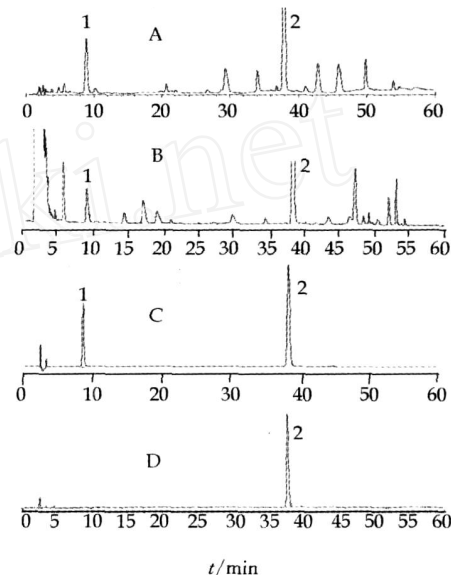
2.3 供试品溶液的制备:精密吸取银黄口服液 2 mL,置于 10 mL 量瓶内,加纯水稀释至刻度,混匀放置 2 min,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。精密称取银黄颗粒 2 g,研细置于 10 mL 量瓶内,加纯水稀释至刻度,混匀,室温放置 30 min 后超声 20 min,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 稳定性试验:取同一批供试品,制备供试品溶液,分别于 0、2、4、8、24 h 进样 10 μL。测得结果表明,各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 7.1%,可见供试品在 24 h 内稳定良好。

2.5 精密度试验:取同一批供试品溶液,连续进样 5 次。测得结果表明,各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD %均小于 7.1%。

2.6 重现性试验:取同一批供试品 6 份,制备供试品溶液,分别进样。测定结果表明,各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD %均小于 7.1%。

2.7 指纹图谱的测定:分别精密吸取对照品溶液和银黄制剂的供试品溶液各 10 μL,按上述色谱条件进样分析,记录色谱图,见图 1。结果表明,12 批不同厂家和批号银黄口服液 DAD 图谱共有 15 个共有峰,ELSD 图谱共有 18 个共有峰;5 批银黄颗粒 DAD 图谱共有 12 个共有峰,ELSD 图谱共有 13 个共有峰。其中绿原酸、黄芩苷的出峰时间分别为 8.78 min 和 37.56 min。以 No. 1 的 HPLC-ELSD 指纹图谱作为示范图谱,见图 2。



A, C-DAD 色谱图 B, D-ELSD 色谱 1-绿原酸 2-黄芩苷
A, C-DAD chromatograms B, D-ELSD chromatograms
1-chlorogenic acid 2-baicalin

图 1 银黄口服液(A、B)和对照品(C、D)的色谱图
Fig. 1 HPLC Chromatograms of Yinhuang oral liquid (A and B) and reference substances (C and D)

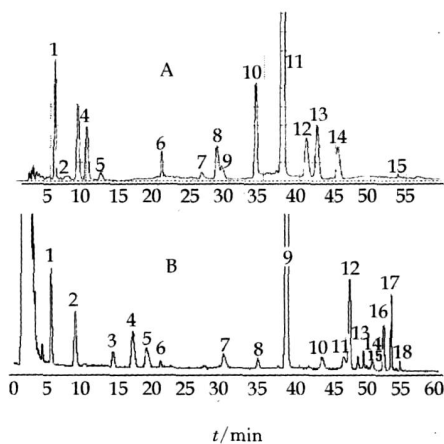


图 2 银黄口服液的 HPLC-DAD (A) 和 ELSD (B) 指纹图谱

Fig. 2 HPLC-DAD (A) and ELSD (B) fingerprints of Yinhuang oral liquid

2.8 相似度测定:采用中药色谱图分析和数据管理

系统,对 17 批银黄制剂进行相似度评价,结果见表 1。

表 1 银黄制剂指纹图谱相似度结果

Table 1 Similarity of Yinhuang preparations fingerprints

批号	相关系数法	夹角余弦法	批号	相关系数法	夹角余弦法
1	0.951 241	0.996 444	10	0.984 697	0.873 564
2	0.986 156	0.972 289	11	0.857 150	0.991 934
3	0.971 622	0.972 289	12	0.992 983	0.954 231
4	0.996 9179	0.992 835	13	0.949 123	0.954 166
5	0.992 147	0.994 500	14	0.992 843	0.992 166
6	0.994 233	0.950 541	15	0.985 730	0.984 204
7	0.945 749	0.992 637	16	0.989 870	0.988 347
8	0.992 737	0.967 175	17	0.989 806	0.988 298
9	0.963 459	0.986 230			

2.9 对 HPLC-ELSD 指纹图谱的聚类分析和主成分分析

2.9.1 DAD 指纹图谱的聚类分析和主成分分析:本研究选用 17 批不同批次和厂家的银黄制剂样本,建立了 DAD 指纹图谱,记录保留时间和用归一法计算各个峰的相对峰面积。对色谱峰的保留时间和峰面积采用聚类分析和主成分分析法进行化学模式识别。17 个不同批次和厂家的银黄制剂聚类分析图见图 3。由聚类分析结果可以看出,17 个不同批次和厂家的样品大致可以聚为 3 类(α 、 β 和 γ)。样品 13~17 号聚为 α 类,它们都为银黄颗粒且来源于同一厂家;样品 1~6 和 8~10、12 号先聚为一类后,再与 7 号共同聚为 β 类,这说明样品 1~6 和 8~10、12 号具有相似的生产工艺,而 7 号所代表的批次产品质量不稳定。11 号单独聚为 γ 类,11 号虽然与 9~10、12 号为同一厂家生产,但是同一厂家不同批次的产品点也有不同的分布,这反映了不同批次产品的原材料和(或)生产工艺等环节的差异所造成的质量差异。

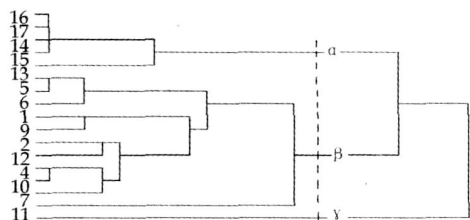


图 3 银黄制剂的 DAD 指纹图谱的聚类分析图
Fig 3 Cluster dendrogram constructed DAD fingerprints of Yinhuang preparation

对色谱数据进行主成分分析,取特征值较大的两个主成分(方差贡献率为 62.24%)的得分向量作图,结果见图 4。可知,相同厂家的银黄制剂样品分布都相对集中,17 个不同批次和厂家的样品可明显地分为 4 类,样品 1~4、13~17 分布比较紧凑,表明两个厂家的产品质量稳定性较好。7 号和 11 号由于

原料和(或)生产工艺等因素,与各自厂家的其他批次样品分布较远,这和上述的聚类分析结果一致。说明前两个主成分基本保留了原始样品的大部分信息。聚类分析和主成分分析能对样品进行有效分类。

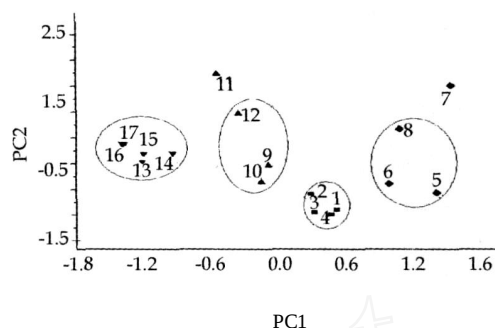


图 4 DAD 指纹图谱的主成分 PC1 和 PC2 的分析图

Fig 4 Plot of PC1 and PC2 of samples in DAD fingerprint

2.9.2 ELSD 指纹图谱的聚类分析和主成分分析法:本研究选用 17 批不同批次和厂家的银黄制剂样本,同时建立了 ELSD 指纹图谱,对色谱峰的保留时间和峰面积,采用聚类分析和主成分分析法进行化学模式识别。17 个不同批次和厂家的银黄制剂地聚类分析图见图 5。结果表明样品 1~17 可明显分为两类(α 和 β)。样品 13~17 均为同厂家银黄颗粒,具有相同的生产工艺,样品 11 号为银黄口服液,它与银黄颗粒共聚为 α 类,说明 11 号的生产原料可能与银黄颗粒的原料为同一来源地。样品 1~10、12 均为不同批次和厂家的银黄口服液,具有相同的生产工艺,聚为 β 类。

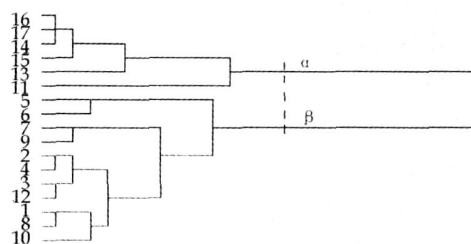


图 5 银黄制剂 ELSD 指纹图谱的聚类分析图
Fig 5 Cluster dendrogram constructed ELSD fingerprints of Yinhuang preparation

对 ELSD 色谱数据进行主成分分析,取特征值较大的两个主成分(方差贡献率为 62.71%)的得分向量作图,结果见图 6。可见,样品 1~4、5~8、9~12、13~17 分别各自聚为一类,各批产品完全按照厂家来源和生产工艺的不同呈现出不同的质量特征,明显的分为 4 个区间,这说明 4 个厂家的产品可以得到很好的区分。同一厂家不同批次的产品点也有不同的集中趋势。样品 13~17 在图中分布比较紧凑,表明该厂家的产品质量稳定性较好。

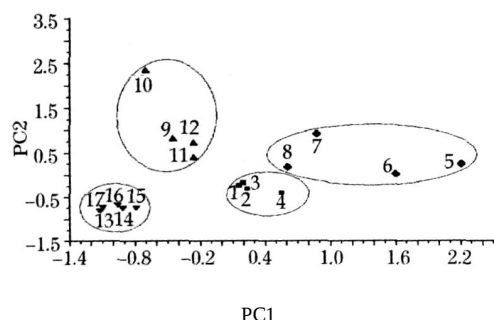


图6 ELSD 指纹图谱的主成分 PC1 和 PC2 的分析图

Fig 6 Plot of PC1 and PC2 of samples
in ELSD fingerprint

3 讨论

实验以尽可能获得较多的色谱图峰为原则,设计样品的提取方法。分别选取水、甲醇和乙醇为提取溶媒,并对提取物的图谱进行分析。当采用水作提取溶媒时供试液指纹图谱响应峰最多,且样品各峰分离良好,可能是由于银黄制剂中主要含水溶性成份。并比较了超声提取法、热回流提取法及索式提取法,发现超声提取 30 min 所得样品指纹图谱各峰响应值较高,且方法简便易行。因此,本实验选择水作提取溶媒,超声提取 30 min。

为了获得分离度好、灵敏性高以及检测峰尽可能多的色谱图,对色谱条件及参数进行了选择及优化,其中包括流动相的组成、检测波长、柱温以及运行时间。由于制剂中成分复杂,采用乙腈和水组成的流动相进行梯度洗脱时,得不到较理想的色谱图。因而对流动相及配比组成进行了优化,选用乙腈和 1% 醋酸系统梯度洗脱,运行时间为 60 min 即可获得较多的色谱峰。

采用二极管阵列检测器对样品进行了全波长扫描,结果在 254 nm 处各色谱峰均有较好的紫外吸收,色谱信息最为丰富。因此,选择该波长作为检测波长。实验比较了 25、30 和 40 3 个不同的柱温,发现随柱温上升各色谱峰保留时间略有提前,在

保证色谱峰分离度和节约时间的原则下,最终选择 40 为指纹图谱检测柱温。蒸发光散射检测器的有关参数根据流动相的构成及配比而设置。

本实验首次建立银黄制剂的 HPLC-ELSD 指纹图谱,并基于色谱图整体面貌的共性特征,运用系统聚类分析和主成分分析相结合的方法,对不同厂家和批次银黄制剂的质量进行了评价。结果表明,DAD 和 ELSD 指纹图谱的化学模式识别结果有一定的差异,且能相互弥补单一色谱在质量评价中的局限性,为考察和控制该制剂的质量提供了有效的方法,同时也为评价其他中药制剂提供了一种思路。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 丁青龙,顾卫中,黄晓瑾,等. 不同厂家银黄口服液液中黄芩苷、绿原酸含量测定[J]. 中国医院药学杂志,1996,16(7): 315-317.
- [3] 宋粉云,龚红全,林琳,等. 毛细管电泳法测定银黄胶囊及银黄颗粒中黄芩苷和绿原酸的含量[J]. 广东药学院学报,2007,23(3): 231-233.
- [4] 戈早川,余倩. 胶囊薄层扫描法测定银黄片与银黄注射液中的黄芩苷和绿原酸[J]. 药物分析杂志,1999,19(5): 348-350.
- [5] 桑旭峰,吴海雯,徐奇超. HPLC 同时测定银黄口服液液中绿原酸和黄芩苷含量[J]. 中成药,2005,27(1): 96-98.
- [6] 张志荣,王丽华,蒋春茂,等. 4 种银黄复方制剂中黄芩苷含量的比较研究[J]. 中国中药杂志,1995,20(5): 283-284.
- [7] Chai X Y, Li S L, Li P. Quality evaluation of *Flos Loniceræ* through a simultaneous determination of seven saponins by HPLC with ELSD [J]. *J Chromatogr A*. 2005, 1070: 43-48.
- [8] 赵国玲,刘佳佳,林丹,等. 金银花化学成分及药理研究进展[J]. 中成药,2002,24(12): 973-976.
- [9] 杨娟,傅军鹏. 黄芩活性成分及药效研究近况[J]. 实用医药杂志,2004,21(3): 271-273.
- [10] 刘源,邓少伟,原文鹏,等. RP-HPLC 法测定黄芩中 3 种黄酮[J]. 中草药,2005,36(8): 1247-1248.
- [11] 中药注射剂色谱指纹图谱实验研究操作规程指南(试行)[S]. 2001.
- [12] 侯小平,何新新,苏薇薇. 中药指纹图谱的控制技术[J]. 中药材,2001,24(5): 370-371.
- [13] 晏永新,钟铁,张小娟,等. 金银花不同产地加工品的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药,2007,38(11): 1643-1645.

保护环境 保护植被