

(rha-C-2), 72.07 (rha-C-3), 73.78 (rha-C-4), 70.89 (rha-C-5), 18.43 (rha-C-6), 111.05 (api-C-1), 78.15 (api-C-2), 80.64 (api-C-3), 75.09 (api-C-4), 65.69 (api-C-5)。以上 NMR 数据与文献报道的连翘酯苷 B 的氢谱和碳谱测定结果基本一致^[7]。

2.5.2 洋丁香苷: ¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD) δ: 2.78(2H, dt, J = 2.0, 8.0 Hz, H-β), 3.71, 4.05(2H, m, H-α), 4.37(1H, d, J = 8 Hz, glu-H-1), 5.18(1H, d, J = 1.2 Hz, rha-H-1), 6.26(1H, d, J = 16 Hz, H-α'), 6.55(1H, dd, J = 2.0, 8.0 Hz, H-6), 6.67(1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 6.69(1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 6.77(1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.94(1H, dd, J = 2.0, 8.0 Hz, H-6'), 7.05(1H, d, J = 1.6 Hz, H-2'), 7.59(1H, d, J = 16 Hz, H-β')。 ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD) δ: 131.48(C-1), 117.11(C-2), 146.12(C-3), 144.66(C-4), 116.31(C-5), 121.26(C-6), 72.34(C-α), 36.55(C-β), 127.63(C-1'), 115.23(C-2'), 146.84(C-3'), 149.83(C-4'), 116.52(C-5'), 123.21(C-6'), 114.68(C-α'), 148.02(C-β'), 168.30(C-γ'), 104.20(glu-C-1), 76.01(glu-C-2), 81.63(glu-C-3), 70.39(glu-C-4), 76.01(glu-C-5), 62.34(glu-C-6), 102.99(rha-C-1), 72.34(rha-C-2), 72.06(rha-C-3), 73.78(rha-C-4), 70.39(rha-C-5), 18.44(rha-C-6)。以上 NMR 数据与文献报道的洋丁香苷的氢谱和碳谱测定结果基本一致^[7]。

3 讨论

独一味提取物样品经过大孔吸附树脂柱和葡聚糖凝胶柱纯化后,除去样品中大量杂质的同时,使连翘酯苷 B 和洋丁香苷分离在两个馏分中,分别制备,降低了 RP-HPLC 制备的难度,增加了制备色谱柱载样量,缩短制备周期,大大提高了制备效率。

参照分析色谱条件,本实验考察了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-1%醋酸水溶液等系统,最终确定以甲醇-1%醋酸水溶液系统为流动相。此系统可使主峰和杂质峰充分分离,并能节约制备成本。而且甲醇沸点要低于乙腈,避免了回收溶剂时因温度过高而破坏单体。

本实验建立了从独一味药材中分离制备连翘酯苷 B 和洋丁香苷对照品的方法,操作比较简便,重现性好,符合对照品质量分数的要求,可供中药定性、定量分析。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 许敬英,苏奎,周静. 苯丙素苷类化合物的研究进展(II)[J]. 时珍国医国药,2007,18(7):1770-1772.
- [3] 高燕,蒲小平. 洋丁香苷抗鱼藤酮致 SH-SY5Y 细胞损伤机制的研究[J]. 中国药理学通报,2007,23(2):161-165.
- [4] 赵磊,蒲小平. 洋丁香苷对 MPTP 所致帕金森病小鼠模型的神经保护作用[J]. 中国药理学通报,2007,23(1):42-46.
- [5] 朴景华,蒲小平,马建,等. 洋丁香苷对东莨菪碱所致记忆获得性障碍的改善作用[J]. 中国药理学通报,2001,17(6):625-627.
- [6] 景富春,陈虹. 肉苁蓉的神经保护作用研究进展[J]. 时珍国医国药,2006,17(10):1878-1879.
- [7] 鲁春华,沈月毛. 紫珠的水溶性成分[J]. 中国天然药物,2008,6(3):176-178.

基于氢核磁共振-主成分分析建立洁尔阴洗液质量控制的研究

罗乔奇¹,田祥琴¹,张琦²,唐敏¹,谭小燕¹,钟雪梅¹,黄静^{1*}

(1. 四川大学华西药学院,四川 成都 610041; 2. 西南民族大学,四川 成都 610041)

摘要:目的 从全面的角度出发,建立一种基于氢核磁共振-主成分分析的洁尔阴洗液质量控制新方法。方法 将洁尔阴洗液与不同的缺味制剂(缺蛇床子、缺黄柏、缺苦参、缺辅料制剂或缺全药材制剂)用相同的方法处理后,以¹H-NMR 技术测定样品的全化学成分信息,然后对图谱进行数据提取和分析。结果 所得的数据通过模式识别法中的主成分分析(PCA),在得分散点图中实现了对不同种类的制剂的区分。结论 氢核磁共振-主成分分析是一种有效的全成分分析法,能够更全面地体现药品质量情况,并且操作简便,因此可作为洁尔阴洗液质量控制的手段之一。

关键词:洁尔阴洗液;¹H-NMR;主成分分析(PCA)

中图分类号:R284.2;R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)12-1907-05

收稿日期:2009-03-17

作者简介:罗乔奇(1982—),男,四川成都人,在读硕士研究生,从事天然药物化学研究。

Tel:(028)85503045 E-mail:georgelaw82@gmail.com

* 通讯作者 黄静 Tel:(028)85503045 E-mail:huangj_pharm@scu.edu.cn

Based on ¹H-NMR-PCA to establish a quality control method of Jie-Er-Yin Lotion

LUO Qiao-qi¹, TIAN Xiang-qin¹, ZHANG Qi², TANG Min¹, TAN Xiao-yan¹,
ZHONG Xue-mei¹, HUANG Jing¹

(1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Southeast University
for Nationalities, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To establish a new method of quality control for Jie-Er-Yin Lotion. **Methods** Jie-Er-Yin Lotion and different kinds of agents (without *Fructus Cnidii*, *Cortex Phellodendri Chinensis*, *Radix Sophorae Flavescens*, excipient agent or all medicinal material agents) were treated with the same approach, then using ¹H-NMR to get all of the chemical component information of the samples and analyze the data from the spectra. **Results** Analyzing the data with principal component analysis (PCA) by model recognition, the different agents can be distinguished in the scattered plots. **Conclusion** The ¹H-NMR-PCA is an useful method to identify Jie-Er-Yin Lotion from other preparations and can be used for the quality control of Chinese prepared medicines by simple operation.

Key words: Jie-Er-Yin Lotion; ¹H-NMR; principal component analysis (PCA)

洁尔阴洗液由蛇床子、艾叶、苍术、薄荷、黄柏、黄芩、苦参、地肤子、梔子、金银花等制成,对多种致病病原体均有杀灭、抑制作用。依据《中华人民共和国卫生部药品标准》WS3-022(Z- 005)-96(Z)洁尔阴洗液标准,采用 HPLC 对蛇床子素定量检测,以及采用 TLC 法分别对苦参碱、盐酸小檗碱和梔子苷定性检测^[1,2]。但对单一成分的检测并不能全面反映药材的使用情况。¹H-NMR 可以检测任何含有氢的有机成分,能够提供足够丰富的中成药中化学成分信息。而主成分分析(principal component analysis, PCA)法能从¹H-NMR 谱获得的大量数据中获得具有统计学意义的、综合性的、有价值的化学成分信息^[3]。故本实验采用¹H-NMR-PCA 法,尝试建立一种洁尔阴洗液质量控制的新方法,为提高该产品的质量水平奠定基础。

1 仪器与材料

Bruker AV II—600 核磁共振仪, Model 0406—1 高速离心机(上海医疗器械有限公司)。氘代溶剂 D₂O, TSP 内标(百灵威化学技术有限公司);其他试剂均为分析纯。数据分析软件:Excel, Mestrelab, SIMCA-P 11.0。

洁尔阴洗液均为正式产品且按现行标准检验合格。各缺味制剂仅分别去除蛇床子、黄柏、苦参、梔子、全部药材或全部辅料,按处方和工艺正常制备。以上制剂均由成都恩威集团提供,所有样品保存于四川大学华西药学院天然药物学系。见表 1。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备:精密量取洁尔阴洗液 1.5 mL,置于 EP 管中,离心 20 min (4 000 r/min)。精

密吸取上清液 0.4 mL,加入 0.1 mL D₂O 溶液(含 1% TSP),置于 0.5 mm 核磁管中,用于¹H-NMR 检测。同法制得其他样品待测溶液。

表 1 样品来源

Table 1 Sources of samples

样品号	批号	样品号	批号	样品号	批号	样品号	样品情况
J1	0701059	J21	0705268	J41	0709116	QF1	缺辅料
J2	0701059	J22	0705268	J42	0709116	QF2	缺辅料
J3	0701063	J23	0706009	J43	0709123	QY1	缺全药材
J4	0701063	J24	0706009	J44	0709123	QY2	缺全药材
J5	0702013	J25	0706024	J45	0710099	QS1	缺蛇床子
J6	0702013	J26	0706024	J46	0710099	QS2	缺蛇床子
J7	0702045	J27	0706031	J47	0710181	QH1	缺黄柏
J8	0702045	J28	0706031	J48	0710181	QH2	缺黄柏
J9	0703074	J29	0707095	J49	0711051	QK1	缺苦参
J10	0703074	J30	0707095	J50	0711051	QK2	缺苦参
J11	0703191	J31	0707179	J51	0711067	QZ1	缺梔子
J12	0703191	J32	0707179	J52	0711067	QZ2	缺梔子
J13	0704150	J33	0707239	J53	0711128		
J14	0704150	J34	0707239	J54	0711128		
J15	0704161	J35	0708007	J55	0711166		
J16	0704161	J36	0708007	J56	0711166		
J17	0705203	J37	0708094	J57	0711244		
J18	0705203	J38	0708094	J58	0711244		
J19	0705213	J39	0708113				
J20	0705213	J40	0708113				

2.2 核磁共振图谱的测定:恒温在 296 K,以 20% D₂O(体积比)作为内锁,扫描 64 次,采样时间域为 64 K,谱宽为 12 335.526 Hz,采样时间为 2.66 s,脉冲间隔 D1 为 3.00 s,采用标准的预饱和脉冲序列(zgpr)压制水峰信号。将样品溶液分别在核磁共振仪上测定,获得相应的一组 FID 信号。

2.3 图谱处理及数据采集:将得到的各样品 FID 信号导入 Mestrelab 软件中进行傅立叶转换、象限和基线调整,并以内标 TSP(0.00)的化学位移值为基准校正图谱。每张图谱按 0.05×10⁻⁶ 积分间隔分

段积分,得到一个数据矩阵。矩阵中每行代表单个样本的所有变量,每列代表所有样本的同一变量。

2.4 分析方法的考察:参照《中国药典》2005 年版一部附录 X VII A 中药质量标准分析方法验证指导原则的要求,结合本实验的实际情况,对核磁共振仪器精密度、制备方法重复性、样品稳定性和图谱处理方法重复性进行了考察。试验采用夹角余弦^[4]作为判断指标。

2.4.1 精密度考察:取供试洁尔阴洗液(批号 0711067),制备供试样品,连续测定¹H-NMR 图谱 5 次,转换样品 FID 信号,获得 5 组样本的¹H-NMR 峰面积的积分值。随机以第一组数据作为共有模式,计算 5 组数据之间夹角余弦值分别为 1.000 0、0.999 9、0.999 9、0.999 9、0.999 9。夹角余弦值均在 0.999 9 以上,说明该实验所用核磁共振仪精密度良好。

2.4.2 重复性考察:取供试洁尔阴洗液(批号 0711067),制备 6 份供试样品,测定¹H-NMR 图谱,处理样品 FID 信号,获得 6 份样品¹H-NMR 峰面积的积分值。随机以第一份样品作为共有模式,计算 6 份样品之间的夹角余弦值分别为 1.000 0、0.980 9、0.981 3、0.998 9、0.999 0、0.999 0。夹角余弦值均在 0.980 0 以上,说明该实验样品制备方法重现性良好。

2.4.3 稳定性考察:取供试洁尔阴洗液(批号 0711067),制备 1 份供试样品,测定¹H-NMR 图谱,每天测定 1 次,连续测定 5 d,得到 5 组样品 FID 信号,处理,获得 5 组样品¹H-NMR 峰面积的积分值。随机以第一组数据作为共有模式,计算 5 组数据之间的夹角余弦值分别为 1.000 0、0.999 1、0.980 7、0.999 6、0.998 3,均在 0.980 0 以上,说明该样品经本实验方法处理后稳定性良好。

2.4.4 重复性考察:取洁尔阴洗液(批号 0705268),制备 1 份供试液,在选定的核磁共振测定条件下测定¹H-NMR 图谱,处理图谱 4 次,得到 4 组 NMR 峰面积的积分值。以第一次处理得到的数据为对照,计算 4 组数据之间的夹角余弦值分别为 1.000 0、0.999 3、0.988 9、0.990 8,均在 0.980 0 以上,说明该实验所用图谱处理方法重复性很好。

2.5 数据分析:模式识别的方法能够从复杂的数据中最大限度地提取简化后的信息以供分析。本实验选用了模式识别法中的主成分分析(PCA)^[5]。对所有数据分析结果显示,各样本间的差异主要体现在主成分 1 和 2 的得分值上,故以下分析均以主成分 1 和 2 的得分值进行分析。

2.5.1 样品数据的主成分分析:将洁尔阴洗液样品

数据矩阵中的数据(除 J-57、J-58 外)导入 SIMCA-P 软件,提取主成分 1~7,各主成分贡献率和累积贡献率见图 1。

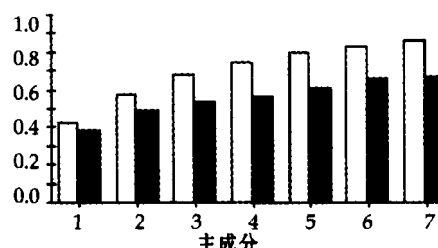


图 1 主成分累计贡献率图(J1~56)

Fig. 1 Cumulative contribution rate of PCs through PCA (J1—56)

可见前 7 个主成分累积贡献率达 0.859,即表示该 7 个主成分可以解释原变量信息的 85.9%。以主成分 1 的得分值(t_1)和主成分 2 的得分值(t_2)分别为横纵坐标绘制得分散点图,见图 2。可以看出大多数样品点聚集情况良好,基本落在了 95%置信区间以内。说明洁尔阴洗液样品本身情况稳定,并且实验操作过程也没有引入较大误差,这些数据可以直接用于进一步分析。

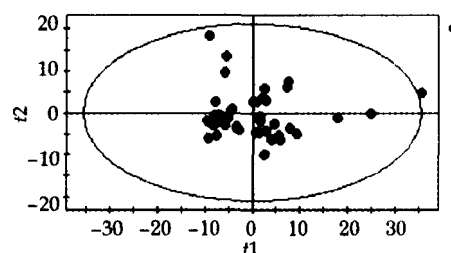


图 2 PCA 主成分 1 对主成分 2 的得分散点图(J1~56)

Fig. 2 Score scatter plot of PC1/PC2 through PCA (J1—56)

2.5.2 洁尔阴洗液样品、验证样品及缺辅料制剂样品数据的主成分分析:将数据矩阵中洁尔阴洗液(J1~56)、验证样品(J57 和 J58)和缺辅料制剂样品(F1 和 F2)数据导入 SIMCA-P 软件,进行主成分分析。首先提取主成分,各主成分贡献率和累积贡献率,见图 3。可知前 3 个主成分累计贡献率达 0.864。以主成分 1 的得分值(t_1)和主成分 2 的得分值(t_2)分别为横纵坐标绘制得分散点图,见图 4。

可知验证样品(J57 和 J58)的数据点与洁尔阴洗液的数据点聚集在一起,说明验证样品 J57、J58 与洁尔阴洗液的化学成分非常近似,为合格产品;而缺辅料制剂(QF1、QF2)的数据点与洁尔阴洗液的数据点在主成分 1 的得分值(t_1)上差异很大,说明缺辅料制剂与洁尔阴洗液的化学成分差异较大。

由于验证样品(J57、J58)为合格品(按现有标准

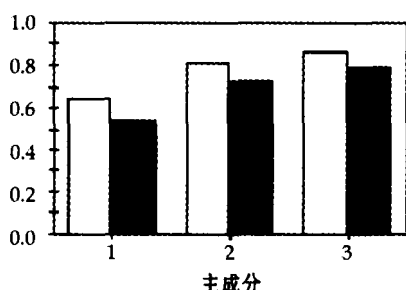


图 3 主成分累计贡献率图(J1~58,QF1~2)

Fig. 3 Cumulative contribution rate of PCs through PCA (J1—58, QF1—2)

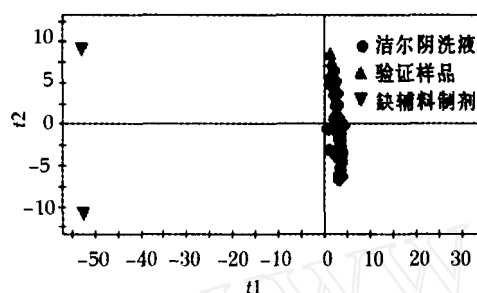


图 4 PCA 主成分 1 对主成分 2 的得分散点图 (J1~58,QF1~2)

Fig. 4 Score scatter plot of PC1/PC2 through PCA (J1—58, QF1—2)

检验也合格),故将其数据纳入,用于以下分析。

2.5.3 洁尔阴洗液及缺全药材制剂样品数据的主成分分析:将数据矩阵中洁尔阴洗液(J1~58)和缺全药材制剂样品(QY1、QY2)数据导入 SIMCA-P 软件,进行主成分分析。首先提取主成分,各主成分贡献率和累积贡献率见图 5。可知前 6 个主成分累计贡献率达 0.853。

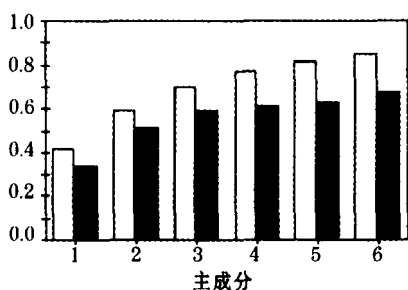


图 5 主成分累计贡献率图 (J1~58,QY1~2)

Fig. 5 Cumulative contribution rate of PCs through PCA (J1—58, QY1—2)

以主成分 1 的得分值(t_1)和主成分 2 的得分值(t_2)为横纵坐标获得得分散点图,见图 6。由结果来看,缺全药材制剂(QY1、QY2)的数据点与洁尔阴洗液(J1~58)在主成分 1 得分值(横坐标)上得到良好区分,显示缺全药材制剂与洁尔阴洗液的化学成分同样存在较大的差异。

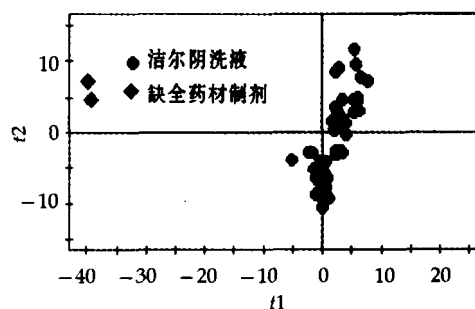


图 6 PCA 主成分 1 对主成分 2 的得分散点图 (J1~58,QY1~2)

Fig. 6 Score scatter plot of PC1/PC2 through PCA (J1—58, QY1—2)

2.5.4 洁尔阴洗液和各缺味制剂样品数据的主成分分析:将数据矩阵中洁尔阴洗液(J1~58)和缺味制剂样品(QS1、2,QH1、2,QZ1、2,QK1、2)数据导入 SIMCA-P 软件,进行主成分分析。首先提取主成分,各主成分贡献率和累积贡献率见图 7。可知,前 7 个主成分累计贡献率达 0.88。

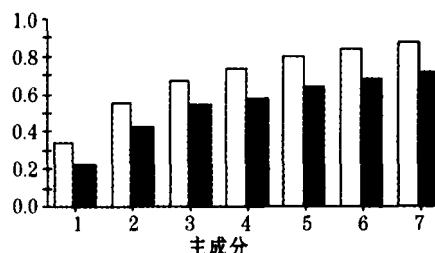


图 7 主成分累计贡献率图(J1~58,QS1、2,QH1、2,QZ1、2,QK1、2)

Fig. 7 Cumulative contribution rate of PCs through PCA(J1—58, QS1—2, QH1—2, QZ1—2, and QK1—2)

以主成分 1 的得分值(t_1)和主成分 2 的得分值(t_2)为横纵坐标获得的得分散点图,见图 8。可见 4 种缺味制剂的数据点与洁尔阴洗液的数据点有明显区分,说明各种缺味制剂样品与洁尔阴洗液的化学成分不同;同时,4 种缺味制剂的数据点之间不同,距离洁尔阴洗液样品数据点的距离也各不相同,说明 4 种缺味制剂彼此之间的化学成分也不同。

3 讨论

本实验中的洁尔阴洗液样品来自 29 批次 58 个样本,其生产时间跨度一年(2007 年 1 月至 2007 年 12 月),能比较充分地代表生产实际;以其中 28 批 56 个样本进行 $^1\text{H-NMR-PCA}$ 分析,结果显示这 28 批次 56 个样本中,除 1 个样本外,其他样本均集中在 95% 置信区间内;追踪该游离点来源可知其来自样本 J30,而取自同一批号的样本 J29 其散点在置信区间内,说明洁尔阴的生产工艺比较稳定,造成样本

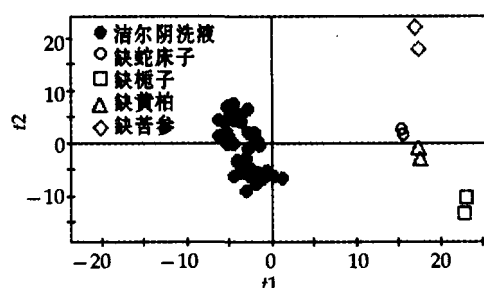


图 8 PCA 主成分 1 对主成分 2 得分散点图 (J1~58, QS1、2, QH1、2, QZ1、2, QK1、2)

Fig. 8 Score scatter plot of PC1/PC2 through PCA (J1—58, QS1—2, QH1—2, QZ1—2, and QK1—2)

游离的原因来自实验过程中的误差;从实验结果来看,此种误差远小于样本类别间的差异,不会对实验结果造成影响。

以建立的洁尔阴洗液¹H-NMR-PCA法为基准,对新生产的洁尔阴洗液样品(验证样品)进行分析,结果显示验证样品与洁尔阴洗液样品之间基本相同,说明验证样品也是合格品(对验证样品按现有标准检验也为合格品)。以建立的洁尔阴洗液¹H-NMR-PCA法为基准,对其部分缺味(缺蛇床子、栀子、黄柏或苦参)制剂、缺辅料制剂以及缺全药材制剂进行分析,结果显示该方法能有效地区分洁尔阴洗液与各缺味制剂。

本实验不仅建立了一种新的洁尔阴洗液质量控

制方法,同时也建立了洁尔阴洗液的¹H-NMR-PCA的标准品(合格)数据库。当需要对新生产的洁尔阴洗液产品进行质量判断时,仅需按照本实验方法操作,获取样本的数据,导入数据库进行比较,即可判断新生产的洁尔阴洗液是否合格。同时,对于合格品的数据又可纳入数据库,使数据库中的样本数不断增加,从而使其代表性更强,判断的准确性不断提高。

传统的质量控制方法是对药材有效成分进行定性和定量,¹H-NMR-PCA法是基于中成药全成分(包括药材和辅料)的分析法,所以两者结果必然有相关性,即经传统方法检验不合格的样本,经本法检验同样不合格。¹H-NMR-PCA法的结果比单独检测一种或一类成分更能全面地反映中成药的实际情况,较传统方法更能避免人为向样本中添加指标有效成分以次充好的情况,并且该方法操作简便、重现性高,是比现有方法更为理想的质量控制方法。本方法的难点在于前期的基础工作,一旦数据库建立,则可对产品进行比较全面的监控。

参考文献:

- [1] 赵剑宇, 颜贤忠. 基于核磁共振的代谢组学研究进展 [J]. 国外医学: 药学分册, 2004, 31(5): 308-313.
- [2] 新药转正标准 [S]. 第十二册. 1996.
- [3] 徐亚敏, 肖正达, 徐赛红, 等. 洁尔阴洗液中蛇床子素的 HPLC 测定 [J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(4): 176-178.
- [4] 王龙星, 肖红斌. 一种评价中药色谱指纹谱相似性的新方法: 向量夹角法 [J]. 药学学报, 2002, 37(9): 713-717.
- [5] 张小确, 高枝荣, 夏云贵. 主成分分析方法及其在各仪器分析中的应用 [J]. 河北工业科技, 2007, 24(6): 345-354.

千里光总黄酮的分离纯化研究

郝建生, 杨冰

(铜仁职业技术学院, 贵州 铜仁 554300)

摘要:目的 研究大孔吸附树脂分离纯化千里光总黄酮的工艺。方法 以千里光总黄酮质量浓度、回收率等为考察指标, 选用大孔吸附树脂对千里光总黄酮进行分离纯化, 分别采用静态试验、动态试验考察大孔树脂对千里光总黄酮的分离纯化效果及影响因素。结果 AB-8 型大孔吸附树脂为最佳树脂, 洗脱剂为 70% 乙醇, 洗脱剂用量为 4 倍树脂体积, 体积流量 3~4 mL/min; 上柱总黄酮质量与树脂质量比为 1:9.4, 上柱液总黄酮质量浓度为 17.86 mg/mL, 体积流量 2~3 mL/min; 冲洗杂质用水体积 2~3 BV, 体积流量 2~3 mL/min; 上柱液 pH 4~5; 径高比 1.5:21.6。AB-8 型大孔吸附树脂对千里光总黄酮静态饱和吸附量为 111.25 mg/g, 洗脱率 91.53%, 动态饱和吸附量为 96.8 mg/g, 洗脱率为 93.40%, 总黄酮回收率、质量分数均在 90% 以上。结论 采用大孔吸附树脂对千里光中的总黄酮进行纯化可行, 可以为合理的开发利用千里光提供参考。

关键词: 千里光; 总黄酮; 大孔吸附树脂; 分离; 纯化

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2009)12-1911-05

收稿日期: 2009-03-12

基金项目: 贵州省“十一五”农业科技攻关项目(黔科合 NY 字[2006]3020); 贵州省高层次人才科研条件特助经费项目(TZJF-2007-64)

作者简介: 郝建生(1954—), 男, 贵州铜仁人, 教授, 硕士, 长期从事天然药物有效成分提取分离教学、科研、生产工作。

Tel: (0856)8986256 E-mail: yujiansheng@sohu.com