

1.4%, 酶解温度为 45 ℃。

2.3.3 验证试验: 分别按上述酶解最优提取工艺条件提取人参皂苷 R_{g1} , 重复进行 3 次平行试验。结果, 人参皂苷 R_{g1} 提取率为 (2.05 ± 0.047) mg/g, 与正交试验最大值 2.06 mg/g 接近。

3 讨论

本实验结果提示, 与传统水提和醇提相比, 采用纤维素酶酶解提取人参皂苷 R_{g1} 提取率更高, 溶剂用量减少, 对设备无特殊要求, 适合于工业化大生产。酶解法提取最佳工艺条件为, 酶解时间 60 min, 纤维素酶用量为 1.4%, 酶解温度为 45 ℃。酶解后用水回流提取 2 次, 每次 1 h。优化后的提取工艺稳定、可行。

参考文献

- [1] 黎阳, 张铁军, 刘素香, 等. 人参化学成分和药理研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(1): 164-166
- [2] 陈琳琳, 贾伟国, 苏华等. 人参用于治疗勃起障碍的最新机制及临床研究[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(2): 116-120
- [3] 陈栋, 周永传. 酶法在中药提取中的应用和进展[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(2): 99-101
- [4] 杨皓明, 齐巍, 何志敏, 等. 复合酶法提取丹参中丹参素的研究[J]. 中草药, 2008, 39(8): 1161-1164
- [5] 宋宏新, 刘静, 张彦娟. 半仿生酶法提取三七皂苷工艺研究[J]. 中草药, 2009, 40(6): 905-907
- [6] 孙艳, 张卫同, 陈海滨, 等. HPLC 法测定参芪颗粒中人参皂苷 R_{g1} 和 R_e [J]. 中草药, 2007, 38(7): 1009-1010
- [7] 郭建鹏, 张红梅. 高山红景天酶解工艺研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(17): 1817-1819
- [8] 李元波, 殷辉安, 唐明林, 等. 复合酶解法提取三七皂苷的实验研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(4): 488-492
- [9] 傅博强, 谢明勇, 周鹏, 等. 纤维素酶法提取茶多糖[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(7): 4

清咽滴丸极性成分的高效液相指纹图谱及其模式识别的研究

张铁军¹, 韩世柳², 田成旺¹, 朱宏吉^{2*}

(1 天津药物研究院, 天津 300193; 2 天津大学化工学院, 天津 300072)

摘要: 目的 研究清咽滴丸的质量控制方法。方法 采用高效液相色谱建立了清咽滴丸极性部分的 HPLC 的指纹图谱, 收集了不同批次的 12 批产品进行测定, 并使用主成分分析对指纹图谱进行了模式识别研究。采用 HPLC-DAD 技术进行了药材与制剂的相关性分析。结果 通过主成分分析可知, 甘草苷为其中比较重要的指标。相关性研究表明, 所确定的共有峰中有 6 个色谱峰来自甘草, 5 个色谱峰来自诃子。结论 此方法可较系统地用于清咽滴丸的质量控制。

关键词: 清咽滴丸; 指纹图谱; 主成分分析

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)08-1282-04

HPLC Fingerprint and chemical pattern recognition method of polar components in Qingyan Dropping Pill

ZHANG Tie-jun¹, HAN Shi-liu², TIAN Cheng-wang¹, ZHU Hong-ji²

(1 Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 2 School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for the quality control of Qingyan Dropping Pill. **Methods** An HPLC method was developed to establish the fingerprint of polar components in Qingyan Dropping Pill, and 12 samples from various batches were analyzed. Furthermore, principal component analysis (PCA) was used to differentiate and evaluate the whole fingerprints. The relationship between Qingyan Dropping Pill and their original herbs were investigated with HPLC-DAD method. **Results** The result showed that liquiritin was the key component of quality control. Among the chromatographic peaks, there were six chromatographic peaks coming from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; Five chromatographic peaks coming from *Chebulae Fructus*. **Conclusion** This method can be used as quality control for Qingyan Dropping Pill.

Key words: Qingyan Dropping Pill; fingerprint; principal component analysis (PCA)

清咽滴丸由甘草、诃子、青黛、人工牛黄、薄荷脑、冰片 6 味药材组成, 具有疏风清热、解毒利咽之功效。目前清咽滴丸的质量控制主要是以靛蓝、靛玉红、冰片和薄荷脑的薄层色谱鉴别和胆红素的测定来实现的。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, 现已成为国内外广泛接受的中药质量控制评价模型^[1-4]。为了全面控制其质量, 本实验对清咽滴丸的指纹图谱进行了研究, 建立了清咽滴丸极性部分的 HPLC 指纹图谱, 采用 HPLG-DAD 技术进行了药材与制剂的相关性分析, 同时结合主成分分析, 为中药的质量控制提供了一种直观、简便、有效的手段。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 配置自动进样器、柱温箱、UV 监测器、Agilent 1100 色谱工作站; Waters2695 高效液相色谱仪, Waters996PDA 检测器, Empower Waters 色谱工作站; AB204-N 电子天平; (Mettler Toledo); Autoscience AS3120 超声仪。

乙腈(色谱纯, 天津市天河化学试剂厂); 甲醇(色谱纯, 天津市康科德科技有限公司); 乙醇(分析纯, 天津市天河化学试剂厂); 磷酸(分析纯, 天津市天河化学试剂厂); 样品来源于天津中药六厂, 见表 1。

表 1 样品来源

Table 1 Source of samples

编号	批号	编号	批号	编号	批号
S1	627027	S5	627032	S9	627037
S2	627029	S6	627033	S10	627040
S3	627030	S7	627035	S11	627055
S4	627031	S8	627036	S12	627058

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈 0.1% 磷酸溶液; 进样量 10 μL; 波长 260 nm; 体积流量 1 mL/min; 柱温 25 °C; 洗脱梯度见表 2。

表 2 洗脱梯度

Table 2 Gradient elution

时间/min	乙腈/%	0.1% 磷酸/%
0	2	98
10	12	88
20	15	85
35	28	72
60	48	52
65	60	40
85	69	31

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 没食子酸对照品溶液的制备: 精密称取没食

子酸对照品 3.25 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 超声 20 min, 冷却后补足质量, 过 0.45 μm 滤膜, 即得。

2.2.2 甘草酸对照品溶液的制备: 精密称取甘草酸对照品 2.58 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 超声 20 min, 冷却后补足质量, 过 0.45 μm 滤膜, 即得。

2.2.3 甘草苷对照品溶液的制备: 精密称取甘草苷对照品 0.54 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 超声 20 min, 冷却后补足质量, 过 0.45 μm 的滤膜, 即得。

2.2.4 混合对照品溶液的制备: 分别量取 1 mL 没食子酸对照品溶液、甘草酸对照品溶液、甘草苷对照品溶液, 组成混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 将清咽滴丸置于研钵中研成粉末状, 称取 1.000 g 药粉, 置于 100 mL 圆底烧瓶, 加入 25 mL 70% 乙醇水溶液, 称定质量, 回流提取 2 h, 冷却后称定质量, 用 70% 乙醇溶液补足失重, 滤过, 作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

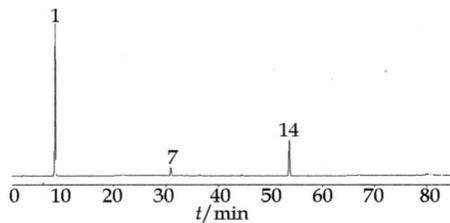
2.4.1 精密度试验: 取供试品溶液, 连续进样 5 次, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比值的一致性, 结果显示各共有峰的相对保留时间 RSD 值为 0.49% ~ 1.52%, 相对峰面积比值的 RSD 值为 0.41% ~ 3.28%, 均小于 5%, 表明该方法的精密度良好。

2.4.2 稳定性试验: 取同一批号的供试品溶液, 分别在 0、3、6、9、12、24 h 进样, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比值的一致性, 结果显示相对保留时间的 RSD 值为 0.41% ~ 1.55%, 相对峰面积的 RSD 值为 0.27% ~ 4.75%, 二者均小于 5%, 表明该方法的稳定性良好。

2.4.3 重现性试验: 取同一批号的供试品溶液 5 份, 进行测定, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比值的一致性, 结果显示相对保留时间的 RSD 值为 0.07% ~ 0.66%, 相对峰面积的 RSD 值为 0.29% ~ 4.33%, 二者均小于 5%, 表明该方法的重现性较好。

2.5 样品测定: 取不同批次的 12 批样品分别制备供试品溶液, 测定, 确定 17 个共有峰。用《中药色谱图的指纹图谱评价系统》软件(2004A)进行色谱峰的匹配, 对照品色谱图见图 1, 以没食子酸(S)为参照物的标准指纹图谱见图 2, 12 批样品的叠加图见图 3。

2.6 主成分分析: 主成分分析是将原来众多具有一定相关性的指标重新组合成一组相互无关的综合指标来代替原来指标的统计方法, 也是数学上处理降



1-没食子酸 7-甘草苷 14-甘草酸
1-gallic acid 7-liquiritin 14-glycyrrhizic acid

图 1 对照品的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of reference substances

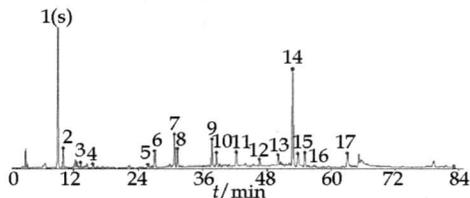


图 2 清咽滴丸的高极性部分的标准指纹图谱

Fig. 2 Standard fingerprint of high polar components in Qingyan Dropping Pill

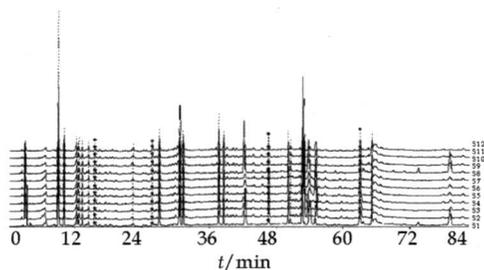


图 3 12 批样品 HPLC 色谱图叠加

Fig. 3 HPLC Chromatographic overlap of 12 batches of samples

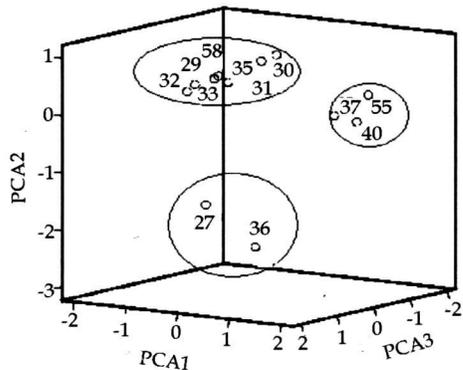


图 4 主成分得分图

Fig. 4 PCA Figure

表 2 初始因子载荷矩阵

Table 2 Initial factor loading matrix of PCA

峰号	主成分		
	1	2	3
2	0.894 1	-0.183 7	0.019 3
3	0.557 0	-0.206 0	-0.146 0
4	0.957 8	-0.088 0	-0.198 5
5	0.912 9	-0.282 0	-0.253 6
6	0.655 9	-0.128 9	-0.528 7
7	0.964 3	-0.080 8	-0.177 2
8	0.830 9	-0.129 9	0.146 8
9	-0.176 8	0.978 4	0.052 2
10	0.951 5	0.098 9	-0.196 8
11	-0.078 5	-0.992 2	0.003 4
12	-0.670 1	0.681 9	0.177 0
13	-0.258 0	0.952 0	-0.060 0
14	-0.537 5	0.830 1	0.106 1
15	-0.207 6	-0.959 9	0.151 7
16	-0.389 2	0.916 8	0.062 7
17	-0.190 1	-0.080 8	0.951 6

到 3 个主成分中每个指标所对应的系数, 经计算可得主成分的模型为:

$$F_1 = 0.1006 X_2 + 0.0627 X_3 + 0.1078 X_4 + 0.1027 X_5 + 0.0738 X_6 + 0.1085 X_7 + 0.0935 X_8 - 0.0199 X_9 + 0.1071 X_{10} - 0.0088 X_{11} - 0.0754 X_{12} - 0.0290 X_{13} - 0.0605 X_{14} - 0.0234 X_{15} - 0.0438 X_{16} - 0.0214 X_{17}$$

$$F_2 = -0.0418 X_2 - 0.0469 X_3 - 0.020 X_4 - 0.0642 X_5 - 0.0293 X_6 - 0.0184 X_7 - 0.0296 X_8 + 0.2227 X_9 + 0.0225 X_{10} - 0.2259 X_{11} + 0.1552 X_{12} + 0.2167 X_{13} + 0.1890 X_{14} - 0.2185 X_{15} + 0.2087 X_{16} - 0.0184 X_{17}$$

$$F_3 = 0.0180 X_2 - 0.1363 X_3 - 0.1851 X_4 - 0.2365 X_5 - 0.4931 X_6 - 0.1653 X_7 + 0.1369 X_8 + 0.0487 X_9 - 0.1836 X_{10} + 0.0031 X_{11} + 0.1651 X_{12} - 0.0561 X_{13} + 0.0990 X_{14} + 0.1414 X_{15} + 0.0585 X_{16} + 0.8875 X_{17}$$

F_1, F_2, F_3 分别表示 3 个主成分, X_2, X_3, \dots, X_{17} 分别表示各个色谱峰的相对于标准峰(峰 1)的相对峰面积经标准化后的数据。

3 个主成分中, F_1 是特征值最大的, 即是“信息

维的一种方法^[5]。实验采用 SPSS 统计分析软件对此 12 个样本进行了主成分分析, 即将它们投影至低维空间来看它们之间的微细差别, 先将 12×17 的原始数据矩阵经标准化处理, 再对其进行运算, 主成分个数提取原则为主成分对应的特征值大于 1 的前 m 个主成分。结果 3 个主成分的累计贡献率就可以达到 89.695%, 包含了大部分信息, 故提取前 3 个特征值。其中, 第一主成分为 $\lambda = 8.886$, 方差贡献率为 55.539%, 贡献率最大, 包含的信息最多, 影响也最大; 第二主成分为 $\lambda = 4.393$, 方差贡献率为 27.454%, 第三主成分为 $\lambda = 1.0722$, 方差贡献率为 6.7014%。取前 3 个得分矢量来做图, 见图 4。图中每个点对应 1 个样本, 12 个样本分为 3 类。

表 2 为初始因子载荷矩阵, 每一个载荷量表示主成分与对应变量的相关系数。将主成分载荷矩阵中的数据除以主成分相对应的特征值开平方根便得

最多”的指标,而第一主成分中系数最大的为 X_7 ,即为峰 7 相对于峰 1 的面积经标准化数值,从对照品色谱图可知,峰 7 为甘草苷,证明甘草苷在清咽滴丸的质量控制中起着相对比较重要的作用。

2.7 色谱峰归属的初步判断:采用 HPLC-DAD 技术进行了药材与制剂的相关性分析。通过色谱保留时间和紫外吸收光谱图鉴定了清咽滴丸中色谱峰的生药来源,通过阴性对照进一步对其色谱峰进行确认。共确定了 11 个色谱峰的药材来源,其中,5、7—11 号 6 个色谱峰来自甘草,1~4、6 号 5 个色谱峰来自诃子(见图 5、6),这为追踪成药质量与生药质量的相关性和建立可行的质量标准提供了依据。

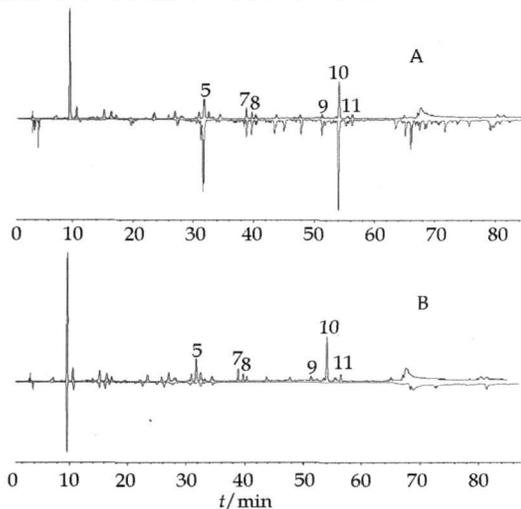


图 5 清咽滴丸高极性部分与甘草(A)和缺甘草阴性(B)色谱指纹图谱镜像图

Fig 5 Fingerprint of shared peaks between high polar components in Qingyan Dropping Pill with *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (A) and negative sample without *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (B)

3 讨论

流动相的选定:选用不同比例的甲醇-水-磷酸、乙腈-水-磷酸等流动相体系进行试验对比,以确定最佳流动相的组成及洗脱梯度。结果表明,使用甲醇-水-磷酸系统时,制剂中组分分离不理想。使用乙腈-水-磷酸系统时,各组分均可基线分离,故选择

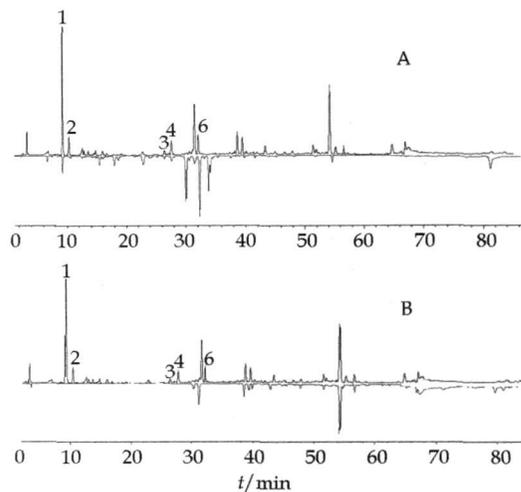


图 6 清咽滴丸高极性部分与诃子色谱指纹图谱镜像图

Fig 6 Fingerprint of shared peaks between high polar components of Qingyan Dropping Pill with *Chebulae Fructus* (A) and negative sample without *Chebulae Fructus* (B)

乙腈-水-磷酸系统为流动相。

检测波长的选择:取供试品溶液,进样 10 μ L,进行 210~400 nm 全波长扫描,并各波长下的色谱图进行分析比较。结果表明,在 260 nm,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,因此选择 260 nm 作为检测波长。

提取方式的选定:比较了水、30%乙醇、50%乙醇、50%甲醇、70%乙醇提取,结果表明 70%乙醇相比其他几种溶剂提取的成分多,故选用 70%乙醇作为提取溶剂。另外,比较了超声提取与回流提取,发现回流提取出的峰较多,提取率较高,因此,样品采用回流提取。

参考文献:

- [1] 易伦朝,谢培山,梁逸曾,等.液相色谱特定(指纹)图谱分析用于陈皮的质量考察[J].药物分析杂志,2006,26(7):918-922
- [2] 王文燕,赵强,张铁军,等.决明子的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J].中草药,2009,40(10):1638-1641
- [3] 郑晓珂,魏悦,冯卫生.不同采收期连翘的 HPLC 指纹图谱研究[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(3):1-4
- [4] 黎阳,刘素香,张铁军,等.枳实的高效液相色谱指纹图谱研究[J].中草药,2009,40(9):1469-1474
- [5] 许禄.化学计量学[M].北京:科学出版社,2004