

四季三黄片制剂-药材谱峰匹配指纹图谱研究

张海红, 王 树*, 薛贵平

河北北方学院 药理学系, 河北 张家口 075000

摘要: **目的** 建立四季三黄片制剂的 HPLC 指纹图谱, 对特征峰进行指认, 并与相同色谱条件下原药材 HPLC 指纹图谱进行谱峰匹配研究。**方法** 对 3 个厂家 10 个批次的样品进行 HPLC 指纹图谱相似性评价并与原药材进行谱峰匹配, 样品采用甲醇超声提取 (100 kHz, 30 min, 25 °C), 采用高效液相色谱法-二极管阵列检测, 检测波长 254 nm, 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量 0.8 mL/min, 柱温 25 °C, 以夹角余弦和相关系数为测度计算其相似度, 采用 SPSS 16.0 软件进行聚类分析。**结果** 10 批样品色谱图中有 19 个共有峰, 其中第 1、2、4、17、18 号峰分别是栀子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄素和大黄酚, 大黄、黄芩、栀子、黄柏与四季三黄片分别有 11、6、2、1 个色谱峰匹配, 9 号峰为大黄和黄芩所共有。各批样品的夹角余弦、相关系数均大于 0.9, 聚类分析表明四季三黄片样品可大致聚为 3 类。**结论** 建立的四季三黄片制剂及药材谱峰匹配指纹图谱为其鉴别和质量评价提供了有效的方法。

关键词: 四季三黄片; 指纹图谱; 高效液相色谱法; 相似度; 聚类分析; 质量控制

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)21-3087-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.21.010

Study on fingerprints of Siji Sanhuang Tablets-medicinal materials based on peak pattern matching

ZHANG Hai-hong, WANG Shu, XUE Gui-ping

Department of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

Abstract: Objective To establish high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints of Siji Sanhuang Tablets (SST) and study the characteristic peaks identification and preparations-medicinal materials peak pattern matching. **Methods** Similarity on 10 batches of SST from three manufacturers was estimated, and peak pattern matching of the original medicine was conducted. Sample extraction with methanol in ultrasonic condition (100 kHz, 30 min, 25 °C) was carried out. HPLC-Diode Array Detector methods were developed to determine, detection wave length was set at 254 nm, HPLC mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphoric acid aqueous solution (gradient elute), volume flow-rate was delivered at 0.8 mL/min, and column temperature was kept at 25 °C. Similarity measures such as included angle cosine and correlation coefficient were tested. Ten batches of samples were analyzed by SPSS 16.0. **Results** The results showed that 19 common peaks were defined, the peaks No. 1, 2, 4, 17, and 18 were geniposide, berberine hydrochloride, baicalin, emodin, and chrysophanol, respectively, and peak pattern matching showed that SST had 11, 6, 2, and 1 matching peaks with *Rhei Radix et Rhizoma*, *Scutellariae Radix*, *Gardeniae Fructus*, and *Phellodendri chinensis Cortex*, respectively. The peak No. 9 belonged to *Rhei Radix et Rhizoma* and *Scutellariae Radix*. The fingerprint similarity among the samples were all over 0.9. All the samples were classified into three categories. **Conclusion** Peak matching fingerprints of preparations-medicinal materials established provide the effective methods for the identification and the quality control of SST.

Key words: Siji Sanhuang Tablets; fingerprint; HPLC; similarity; cluster analysis; quality control

四季三黄片是由大黄、黄芩、栀子、黄柏加工而成的中药复方制剂, 具有消炎退热、通便利水的功能, 用于治疗口鼻生疮、咽疼牙痛、口干舌燥、

目眩头晕、大便秘结、小便赤黄^[1]。目前对于四季三黄片的质量控制主要采用针对指标成分的 HPLC 定量测定^[2-7], 但从中医理论来看, 所有成分均对药

收稿日期: 2014-05-28

基金项目: 河北省中医药管理局科研计划项目 (2013078); 张家口市科学技术研究与发展指导计划项目 (1021097D)

作者简介: 张海红 (1981—), 女, 讲师, 硕士, 从事中药药理学研究。E-mail: zhanghaihongzh@163.com

*通信作者 王 树, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药理学研究。E-mail: wangshu388@163.com

效有贡献,因此指标成分的控制无法全面反映中药复方制剂的内在质量。中药指纹图谱能较全面反映中药中所含化学成分的种类与数量,当今已经成为国际公认的中药质量控制有效方法之一。目前尚无四季三黄片指纹图谱的研究报道,本研究收集市售的四季三黄片10批,采用HPLC-DAD建立其指纹图谱,将指纹图谱中特征峰进行指认,并与原药材指纹图谱进行谱峰匹配研究,为有效评价四季三黄片的质量提供了研究基础。

1 仪器与试药

Waters600 高效液相色谱仪,Empower 化学工作站,2996 DAD 检测器,美国 Waters 公司;KS—6000 超声波清洗机,宁波科生仪器厂。

对照品栀子苷(批号 110749-200714,质量分数 99.7%)、黄芩苷(批号 110715-200212,质量分数 98.8%)、盐酸小檗碱(批号 110713-200911,质量分数 86.8%)、大黄素(批号 110756-200110,质量分数 100.0%)和大黄酚(批号 110796-200310,质量分数 99.5%),均购于中国食品药品检定研究院;大黄、黄芩、栀子、黄柏药材购于张家口市华佗药房。市售商品四季三黄片10批来源见表1,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

表1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号	批号	厂家
S1	100722	江西华太药业有限公司
S2	110315	江西华太药业有限公司
S3	110434	江西华太药业有限公司
S4	111040	江西华太药业有限公司
S5	20110801	昆明圣火药业有限公司
S6	20120201	昆明圣火药业有限公司
S7	20120202	昆明圣火药业有限公司
S8	20120203	昆明圣火药业有限公司
S9	20110601	吉林百姓堂药业有限公司
S10	20120101	吉林百姓堂药业有限公司

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Diamonsil-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm);流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液,梯度洗脱程序为0~5 min, 40%甲醇,直线;5~10 min, 40%~60%甲醇,线性;10~20 min, 60%~80%甲醇,线性;20~40 min, 80%~90%甲醇,线性;40~50 min,

90%~100%甲醇,线性;50~60 min, 100%甲醇,直线。检测波长 254 nm;体积流量 0.8 mL/min,进样量 20 μL。

2.2 混合对照品溶液制备

精密称取对照品栀子苷 5.2 mg、盐酸小檗碱 5.6 mg、黄芩苷 5.6 mg、大黄素 4.8 mg 和大黄酚 6.0 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解,定容,作为混合对照品溶液,其中栀子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄素和大黄酚质量浓度分别为 52、56、56、48、60 μg/mL。

2.3 四季三黄片样品溶液的制备

取四季三黄片 10 片,去包衣,研细,取细粉约 0.3 g,精密称定后置具塞锥形瓶中,加入 25 mL 甲醇,称定质量,25 ℃超声 30 min 取出,放冷,称定质量,加甲醇补足减失的质量,0.45 μm 滤膜滤过,取滤液 2 mL 置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀得四季三黄片样品溶液。

2.4 药材样品溶液的制备

将各药材粉成细粉,取黄芩、栀子细粉适量,加 20 倍量的水煎煮 2 次,2 次滤液蒸干。取黄柏细粉适量用 60%乙醇渗漉,渗漉液蒸干备用。分别精密称取约相当于 0.3 g 制剂所含原药材的浸膏量,大黄取原药材细粉,置具塞锥形瓶中,按“2.3”项下方法进行处理,得药材样品溶液。

2.5 参照物的选择

通过对不同厂家四季三黄片 HPLC 图谱系统考察,所有色谱峰中 18 号峰即大黄酚的色谱峰最为稳定,而且大黄酚是四季三黄片的指标成分,因此选取 18 号峰作为参照峰(S)。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 取 S1 样品按“2.3”项制备样品溶液,按“2.1”项色谱条件连续进样 6 次,以大黄酚峰为参照,计算各峰相对保留时间(t_R)及相对峰面积,色谱图中各主要色谱峰的 t_R 的 RSD 为 0.02%~0.64%,相对峰面积的 RSD 为 0.96%~2.25%,结果表明精密度良好。

2.6.2 稳定性试验 取 S1 样品按“2.3”项制备样品溶液,按“2.1”项色谱条件分别在 0、2、4、6、12、24 h 依次进行检测,色谱图中各主要色谱峰的 t_R 的 RSD 为 0.09%~1.68%,相对峰面积的 RSD 为 1.98%~3.08%,结果表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.6.3 重复性实验 取 S1 样品按“2.3”项制备样品溶液 6 份,按“2.1”项色谱条件进样,色谱图中

各主要色谱峰的 t_R 的 RSD 为 1.26%~2.03%，相对峰面积的 RSD 为 1.80%~3.45%，结果表明重复性良好。

2.7 指纹图谱的建立及相似性评价

10 批 (S1~S10) 四季三黄片按照“2.3”项制备样品溶液，按照“2.1”项色谱条件测定混合对照品溶液和样品溶液，并记录色谱图，结果见图 1，将 10 批样品色谱图进行叠加，见图 2。10 批样品共有 19 个共有峰，其中 1、2、4、17、18 号峰分别为

栀子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄素和大黄酚。以大黄酚峰为参照，计算 10 批指纹图谱共有峰的 t_R 、相对峰面积，结果见表 2、3。以各样品的夹角余弦 (cosa) 和相关系数 (r) 作为测度^[8]，以 10 批共有峰峰面积均值做模板，分别计算各样本的相似度。结果 10 批样品的 cosa 相似度计算结果分别为 0.985、0.988、0.981、0.985、0.980、0.982、0.985、0.980、0.984、0.982，r 相似度计算结果分别为 0.974、0.982、0.970、0.975、0.966、0.969、0.974、0.966、

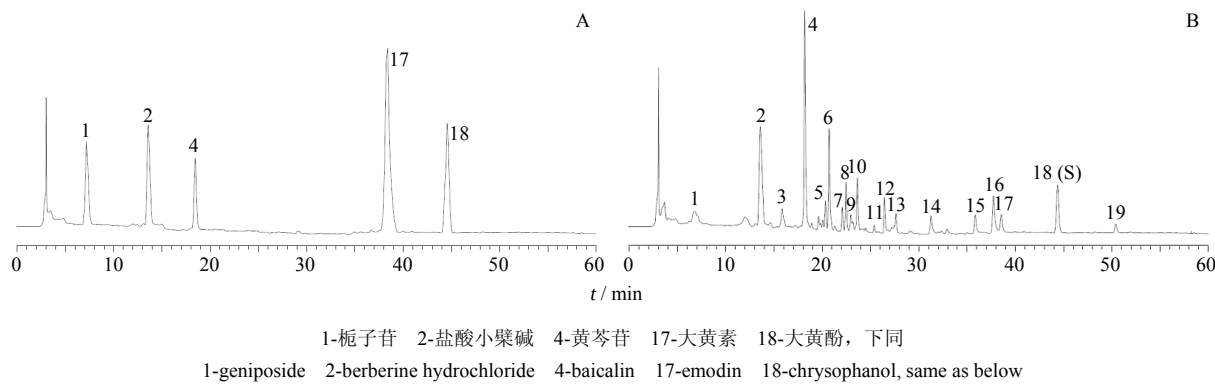


图 1 混合对照品溶液 (A) 和四季三黄片指纹图谱共有峰 (B) 比较色谱图

Fig. 1 Comparison on chromatograms between mixed reference solution (A) and fingerprint of common peaks of SST (B)

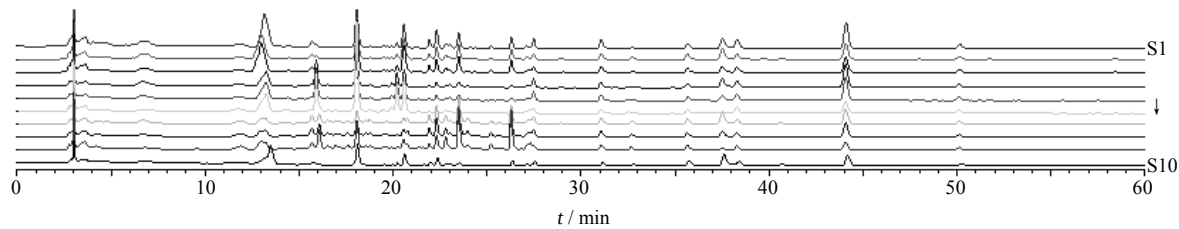


图 2 10 批四季三黄片样品的指纹图谱叠加图

Fig. 2 Fingerprints of 10 batches of SST

表 2 10 批样品的 t_R

Table 2 t_R of 10 batches of samples

样品	t_R																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18 (S)	19
S1	0.153	0.306	0.357	0.410	0.458	0.467	0.497	0.506	0.517	0.532	0.572	0.596	0.623	0.704	0.808	0.851	0.869	1.000	1.136
S2	0.153	0.307	0.358	0.410	0.459	0.467	0.499	0.507	0.519	0.534	0.576	0.598	0.624	0.707	0.809	0.853	0.871	1.000	1.139
S3	0.153	0.305	0.357	0.409	0.458	0.466	0.498	0.500	0.517	0.532	0.570	0.596	0.621	0.705	0.802	0.851	0.867	1.000	1.137
S4	0.155	0.306	0.357	0.409	0.457	0.466	0.496	0.505	0.516	0.531	0.570	0.595	0.621	0.703	0.806	0.849	0.867	1.000	1.133
S5	0.154	0.306	0.359	0.410	0.460	0.469	0.498	0.504	0.516	0.530	0.569	0.595	0.621	0.704	0.808	0.848	0.868	1.000	1.135
S6	0.153	0.307	0.356	0.409	0.458	0.466	0.497	0.506	0.516	0.531	0.571	0.594	0.620	0.702	0.808	0.851	0.869	1.000	1.132
S7	0.152	0.306	0.357	0.408	0.458	0.467	0.498	0.507	0.518	0.533	0.572	0.596	0.624	0.705	0.809	0.851	0.869	1.000	1.133
S8	0.153	0.306	0.358	0.410	0.459	0.468	0.498	0.507	0.518	0.533	0.573	0.597	0.624	0.706	0.809	0.852	0.870	1.000	1.134
S9	0.153	0.306	0.357	0.410	0.458	0.467	0.497	0.506	0.517	0.532	0.572	0.596	0.623	0.705	0.808	0.851	0.869	1.000	1.134
S10	0.152	0.307	0.358	0.411	0.460	0.469	0.500	0.509	0.520	0.535	0.575	0.599	0.626	0.708	0.808	0.856	0.869	1.000	1.135

表3 10批样品的相对峰面积
Table 3 Relative peak areas of 10 batches of samples

样品	相对峰面积																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18 (S)	19
S1	0.499	2.673	0.188	2.935	0.305	1.419	0.279	0.582	0.123	0.643	0.080	0.408	0.157	0.255	0.269	0.669	0.281	1.000	0.130
S2	0.550	3.098	0.189	3.026	0.315	1.504	0.292	0.664	0.124	0.567	0.080	0.410	0.158	0.256	0.274	0.515	0.282	1.000	0.131
S3	0.436	2.594	0.184	2.909	0.278	1.358	0.231	0.501	0.114	0.557	0.079	0.404	0.157	0.255	0.267	0.660	0.279	1.000	0.149
S4	0.504	2.691	0.194	2.920	0.307	1.419	0.277	0.578	0.122	0.638	0.080	0.405	0.156	0.253	0.267	0.664	0.279	1.000	0.129
S5	0.608	2.643	0.203	3.090	0.283	1.449	0.304	0.788	0.106	0.669	0.077	0.418	0.180	0.244	0.242	0.745	0.302	1.000	0.115
S6	0.577	2.738	0.201	3.145	0.327	1.521	0.299	0.712	0.119	0.690	0.086	0.438	0.169	0.273	0.288	0.717	0.301	1.000	0.140
S7	0.504	2.685	0.187	2.952	0.312	1.445	0.284	0.595	0.126	0.652	0.082	0.416	0.161	0.261	0.279	0.688	0.288	1.000	0.128
S8	0.532	2.709	0.186	3.126	0.299	1.394	0.296	0.592	0.128	0.688	0.091	0.431	0.186	0.266	0.281	0.716	0.296	1.000	0.139
S9	0.575	3.029	0.213	3.327	0.346	1.608	0.317	0.660	0.140	0.729	0.091	0.463	0.178	0.289	0.305	0.759	0.319	1.000	0.148
S10	0.510	3.145	0.228	3.429	0.375	1.563	0.334	0.706	0.149	0.732	0.098	0.543	0.191	0.309	0.326	0.716	0.345	1.000	0.152

0.973、0.971。10批样品的夹角余弦和 r 均大于0.9，结果说明从内在成分整体上来看四季三黄片质量相对稳定。

2.8 样品的系统聚类分析

10批样品的19个共有峰相对于参照峰的面积比得到 10×19 阶原始数据矩阵，运用统计分析软件SPSS 16.0，采用组间均连法（average linkage between groups），利用欧氏距离（Euclidean）作为样品的测度，对其进行聚类分析，聚类分析结果见图3。由图3可以看出，10批样品可以分为3类，S1、S3~S8被聚为第1类，S2被聚为第2类，S9~S10被聚为第3类。

2.9 制剂与药材谱峰匹配

按照“2.1”项色谱条件测定各药材样品溶液，记录色谱图，并与四季三黄片样品色谱图进行叠加，见图4，根据四季三黄片样品指纹图谱参数，比较各药材样品色谱峰的 t_R ，在允许的波动范围内寻找

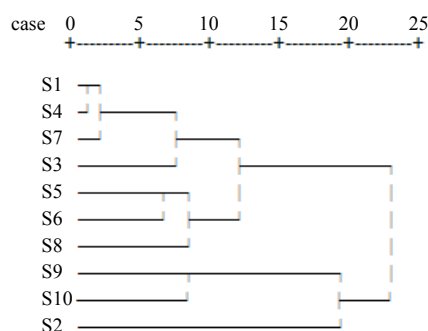


图3 10批样品的聚类分析

Fig. 3 Hierarchical cluster analysis of 10 batches of samples

匹配峰。结果大黄、黄芩、栀子、黄柏与四季三黄片分别有11、6、2、1个色谱峰匹配，9号峰为大黄和黄芩所共有。

3 讨论

中药特征图谱技术是目前公认的鉴别和评价中药质量的有效手段，其优点在于可全面反映中药复

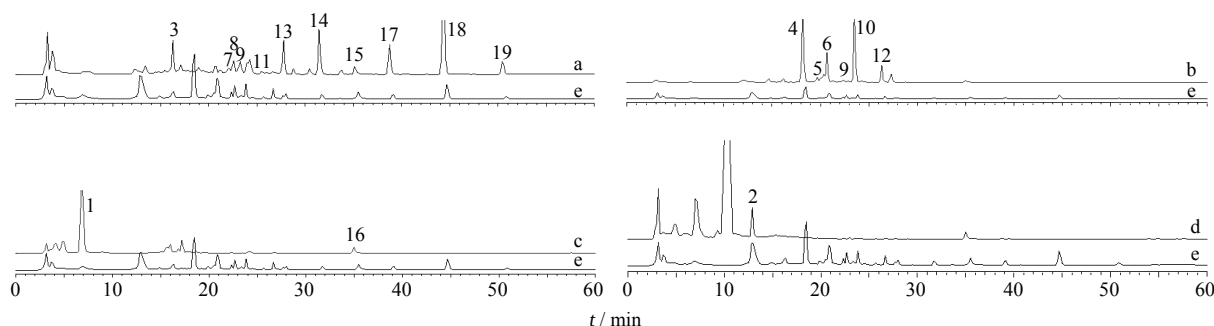


图4 大黄(a)、黄芩(b)、栀子(c)、黄柏(d)与四季三黄片(e)谱峰匹配图

Fig. 4 Peak matching fingerprints of *Rhei Radix et Rhizoma* (a), *Scutellariae Radix* (b), *Gardeniae Fructus* (c), *Phellodendri chinensis Cortex* (d), and SST (e)

杂的化学成分及其相对比例,在有效成分尚未完全阐明的情况下,可有效地表征中药质量^[9]。本实验建立了四季三黄片指纹图谱检测方法,3个不同厂家的10批四季三黄片特征图谱有19个共有特征峰,并对主要的特征峰进行了指认,栀子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄素和大黄酚峰分别为1、2、4、17、18号峰,18号大黄酚峰最稳定,选作为S峰。本研究将为后期四季三黄片质量标准的建立提供基础研究数据,亦为其他复方中药制剂建立HPLC-DAD指纹图谱分析方法提供参考。

通过对10批样品HPLC指纹图谱的相似度计算和聚类分析,发现市售四季三黄片化学成分稳定,质量较为一致。10批样品相似度均大于0.9,根据共有峰面积比可被聚为3类,第1类,S1(来自江西华太药业有限公司)、S3~S8(来自江西华太药业有限公司和昆明圣火药业有限公司);第2类,S2(来自江西华太药业有限公司);第3类,S9~S10(来自吉林百姓堂药业有限公司)。不同厂家的样品图谱无明显差别,主要成分十分接近,这种在共性特征基础上存在的个体差异是常见的现象。

本研究除了采用色谱图整体面貌来表征样品的整体特征外,还采用以 $\cos\alpha$ 和 r 为测度的相似度来量化描述指纹图谱的相似性,后者是特征变量上变化模式的相似性,在样品鉴别真伪上提供样品间亲疏程度的相似性是有优势的^[8],两者结合使评价结

果更加客观真实。四季三黄片化学成分指纹图谱与药理作用的相关性尚缺乏研究,如能结合血清指纹图谱研究其药效性,会使指纹图谱的内涵更加丰富。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准. 中药成方制剂(第二十册)[S]. 1998.
- [2] 冯源,张德全,周浓,等. HPLC测定四季三黄片中5种蒽醌类衍生物的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 96-99.
- [3] 张海红,王树,张丹参,等. RP-HPLC法同时测定四季三黄片中5种指标成分[J]. 中成药, 2012, 34(10): 1915-1918.
- [4] 吴晓勇,许江红,张若良. 高效液相色谱法测定四季三黄片中盐酸小檗碱含量[J]. 中国药业, 2010, 19(16): 32.
- [5] 彭文,刘兆雄. 四季三黄片中黄芩苷和盐酸小檗碱含量的同时测定[J]. 中国药业, 2011, 20(17): 35-36.
- [6] 冯看,杨黎. HPLC测定四季三黄片中大黄素和大黄酚的含量[J]. 广西中医学院学报, 2008, 11(2): 50-52.
- [7] 卞艳晶,高延甲,王建. 四季三黄片质量控制方法的研究[J]. 齐鲁药事, 2010, 29(1): 20-22.
- [8] 王玺,王文宇,张克荣,等. 中药HPLC指纹图谱相似性研究的探讨[J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(5): 360-366.
- [9] 陈文霞,武静莲,马东,等. 小柴胡颗粒制剂-药材谱峰匹配指纹图谱研究[J]. 中草药, 2013, 44(22): 3154-3161.