

安宫牛黄丸 HPLC 指纹图谱及其多成分化学模式分析

徐 彤³, 黄萌萌^{1,2}, 刘丽芳^{3*}, 陈 彦^{1,2*}

1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028

2. 江苏省中医药研究院 中药组分与微生态研究中心, 江苏 南京 210028

3. 中国药科大学 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 江苏 南京 210009

摘要: **目的** 建立安宫牛黄丸 (ANP) HPLC 指纹图谱, 测定其中 6 种有效成分的量并进行化学模式分析。**方法** 采用 HPLC 法, 以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 检测波长为 230 nm, 对 4 个不同厂家生产的 12 批 ANP 样品进行测定, 并采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件进行相似度分析。对主要有效成分梔子苷、京尼平苷酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素进行了定量测定。并采用化学模式识别的方法对不同厂家产品进行分析。**结果** 4 个不同厂家生产的 12 批 ANP 的指纹图谱相似度均在 0.9 以上。对 6 种有效成分定量测定结果发现不同厂家产品仍存在一定差异, 尤其以黄芩所含成分差别较大, 说明 ANP 中黄芩原料药材差异较大, 其中 C 厂家产品中黄芩苷、汉黄芩苷及汉黄芩素的量较其他厂家更为稳定, 并且其量普遍高于其他厂家。通过主成分分析中的 *F* 综合评分, 进一步评价不同厂家样品质量的优劣。结果发现, C 厂家产品在综合排名中排名较靠前, 其结果与其定量测定结果基本吻合。**结论** 指纹图谱结合有效成分的化学模式分析能更全面地反映 ANP 的质量和优劣, 所建立的方法对进一步合理控制 ANP 的质量提供了实验依据。

关键词: 安宫牛黄丸; 指纹图谱; 相似度评价; 多成分测定; 模式识别; 梔子苷; 京尼平苷酸; 盐酸小檗碱; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 汉黄芩素

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)12-2448-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.12.013

HPLC fingerprint and multi-components determination combined with chemical pattern recognition of Angong Niu Huang Pills

XU Tong³, HUANG Meng-meng^{1,2}, LIU Li-fang³, CHEN Yan^{1,2}

1. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. Multi-component of Traditional Chinese Medicine and Microecology Research Center, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

3. The State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of Angong Niu Huang Pills (ANP) and determine the contents of six compounds with analysis of their quality by chemical pattern recognition. **Methods** The separation was performed with acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution as the mobile phase, and the detection wavelength was set at 230 nm. Twelve batches of samples were collected from four different companies and analyzed using the evaluation system of traditional Chinese medicine chromatographic fingerprint similarity, and chemometric methods. The content of the main effective components of geniposidic acid, geniposide, berberine hydrochloride, baicalin, wogonoside, and wogonin were determined. The samples of different companies were analyzed by chemical pattern recognition. **Results** The similarity of fingerprints was above 0.9, the content of six kinds of main effective components showed that there were some differences in the 12 batches of products, especially the composition of *Scutellaria baicalensis*. The results indicated that the quality of *S. baicalensis* was not stable. Among them, the contents of baicalin,

收稿日期: 2017-01-17

基金项目: 江苏省“333 高层次人才培养工程”项目 (BRA2016506)

作者简介: 徐 彤 (1993—), 女, 硕士在读。Tel: 15251757767 E-mail: 15251757767@163.com

*通信作者 陈 彦 (1968—), 女, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药新制剂、新剂型研究。

Tel: 13805157904 E-mail: ychen202@hotmail.com

刘丽芳, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药分析方法研究。Tel: (025)86185136 E-mail: liulifang69@126.com

wogonoside and wogonin of company were more stable than other companies, and even higher than other companies. The samples can be sorted according to their quality through the F score of the PCA. The results showed that the samples of C company in the comprehensive ranking ranked more forward, which were consistent with the quantitative results. **Conclusion** Fingerprints combined with chemical pattern recognition can comprehensively response the quality of ANP, providing the experiments basis of reasonable controlling the quality of preparation.

Key words: Angong Niu Huang Pills; fingerprint; similarity evaluation; multi-component determination; pattern recognition; geniposidic acid; geniposide; berberine hydrochloride; baicalin; wogonoside; wogonin

安宫牛黄丸 (Angong Niu Huang Pills, ANP) 是我国传统药物中治疗高热病的代表药物, 收录于《中国药典》2015 年版。该药是由牛黄、水牛角浓缩粉、麝香或人工麝香、栀子、黄连、黄芩等 11 味药材组成, 具有清热解毒、镇惊开窍的作用, 临床上主要用于治疗脑炎、脑出血、脑缺血性损伤等脑病所致的高热昏迷^[1], 具有较好的临床疗效^[2-4]。《中国药典》2015 年版只对 ANP 中胆红素、黄芩苷、盐酸小檗碱的量进行了限定。但由于该制剂药物组成较为复杂, 检测这 3 种指标成分还不能反映其所体现的整体疗效^[5-6]。ANP 中除黄芩苷、盐酸小檗碱外仍含有多重有效成分共同作用发挥药效, 如黄芩中除所含的汉黄芩苷具有抗菌、抗病毒、抗凝血的作用外^[7], 所含的汉黄芩素还具有抗炎、解热的作用^[8]; 栀子中所含的栀子苷具有抗炎、解热等作用^[9], 其所含的京尼平苷酸也具有抗氧化的作用^[10]。因此, 有必要建立指纹图谱并结合多成分测定质量评价系统, 对其质量从整体到局部进行全面控制^[11]。此外, ANP 为多厂家生产品种, 只有建立了客观科学的评价系统, 才能比较不同厂家 ANP 质量差异, 为产品的优质优价提供依据。因此本研究选取市售 4 个厂家 12 批产品进行测定, 建立不同厂家 ANP 的 HPLC 指纹图谱, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (国家药典委员会 2004 A 版)”对其进行相似度评价, 并采用 SPSS 软件的聚类分析及主成分分析 (PCA) 的 *F* 综合评分, 对所测定的 6 种有效成分量进行分析, 以期 ANP 质量标准的提升提供一定的参考。

1 仪器与材料

LC-2030 日本岛津色谱仪系统, 包括二元高压梯度泵、在线真空脱气机、自动进样装置、紫外检测器、柱温箱, Lab Solutions 色谱工作站, 岛津公司; KQ-300DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 电子天平, 赛多利斯科学技术有限公司; MT-5 型精密天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司。

对照品栀子苷 (批号 110749-201316, 质量分数 97.5%)、京尼平苷酸 (批号 111828-201403, 质量分数 94.6%)、盐酸小檗碱 (批号 110713-201212, 质量分数 86.7%)、黄芩苷 (批号 110715-201318, 质量分数 93.3%)、汉黄芩苷 (批号 112002-201501, 质量分数 98.8%) 均购于中国食品药品检定研究院; 对照品汉黄芩素 (批号 150803, 质量分数 $\geq 98\%$) 购于北京科量技术有限公司; 以上对照品均供定量测定用。市售 ANP 购于药店, 共收集到 4 个厂家不同批号 ANP 共 12 批, 分别为 A 厂家, 批号 160603、151001、150801, 编号为 S1~S3; B 厂家, 批号 130617、150706、160114, 编号为 S4~S6; C 厂家, 批号 150916、150409、160229, 编号为 S7~S9; D 厂家, 批号 150313、150515、160218, 编号为 S10~S12; 每丸均 3 g。乙腈为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~2 min, 10%乙腈; 2~25 min, 10%~23%乙腈; 25~35 min, 23%乙腈; 35~55 min, 23%~35%乙腈; 55~60 min, 35%~45%乙腈; 60~70 min, 45%~55%乙腈; 70~80 min, 55%~90%乙腈; 80~85 min, 90%~95%乙腈; 85~105 min, 95%乙腈; 体积流量 0.8 mL/min; 检测波长 230 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L。

2.2 对照品溶液的制备

分别称取栀子苷、京尼平苷酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素对照品适量, 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 制成质量浓度分别为 120、16.8、228、341、146、27 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取 ANP 0.5 g, 剪碎, 加硅藻土分散并研匀, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 加入甲醇 25 mL,

超声 30 min, 放置至室温, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液即为供试品溶液。

2.4 HPLC 指纹图谱的建立

2.4.1 精密度试验 取 ANP 样品 S1, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 以 18 号峰 (盐酸小檗碱) 为参照峰, 考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 $\text{RSD} < 3\%$, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取 ANP 样品 S1, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 按照“2.1”项下色谱条件进样测定。以 18 号峰 (盐酸小檗碱) 为参照峰, 考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果显示各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 $\text{RSD} < 3\%$, 表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批 ANP 样品 S1, 按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样测定。以 18 号峰 (盐酸小檗碱) 为参照峰, 考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果显示各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 $\text{RSD} < 3\%$, 表明方法重复性良好。

2.4.4 ANP 指纹图谱的建立及共有峰的标定 将 4 个不同厂家 12 批 ANP 样品按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记

录 HPLC 色谱图。将样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (国家药典委员会 2004 A 版)”, 选择 ANP 中分离度较好的色谱峰作为特征峰, 标定出 25 个共有色谱峰, 选择中位数法生成对照图谱, 采用多点校正法建立指纹图谱, 见图 1。选取峰面积较大、出峰时间较稳定的 18 号色谱峰 (盐酸小檗碱) 作为参照峰 (S), 计算其余 24 个色谱峰与同一色谱图中参照峰的峰面积的比值, 结果见表 1。

采用化学对照品确认出其中的 6 种成分, 分别为 3 号峰京尼平苷酸、6 号峰栀子苷、16 号峰黄芩苷、18 号峰盐酸小檗碱、21 号峰汉黄芩苷、23 号峰汉黄芩素, 混合对照品 HPLC 见图 2。各样品 S1~S12 与生成的对照指纹图谱进行相似度分析, 结果显示 12 批样品的指纹图谱与对照指纹图谱的相似度分别为 0.983、0.992、0.971、0.976、0.976、0.988、0.989、0.990、0.980、0.996、0.994、0.996, 各批之间的相似度均大于 0.9, 表明不同厂家的多批次样品化学成分整体一致性较好。

2.5 ANP 中 6 种成分的定量测定

2.5.1 线性关系考察 精密吸取混合对照品适量, 用甲醇稀释, 分别制备含栀子苷质量浓度为 120、60、48、30、24、15、12、6 $\mu\text{g/mL}$, 京尼平苷酸质量浓度为 16.80、8.40、4.20、2.10、1.68、0.84 $\mu\text{g/mL}$, 盐酸小檗碱质量浓度为 228.0、114.0、91.2、57.0、45.6、28.5、22.8、11.4 $\mu\text{g/mL}$, 黄芩苷质量浓度为

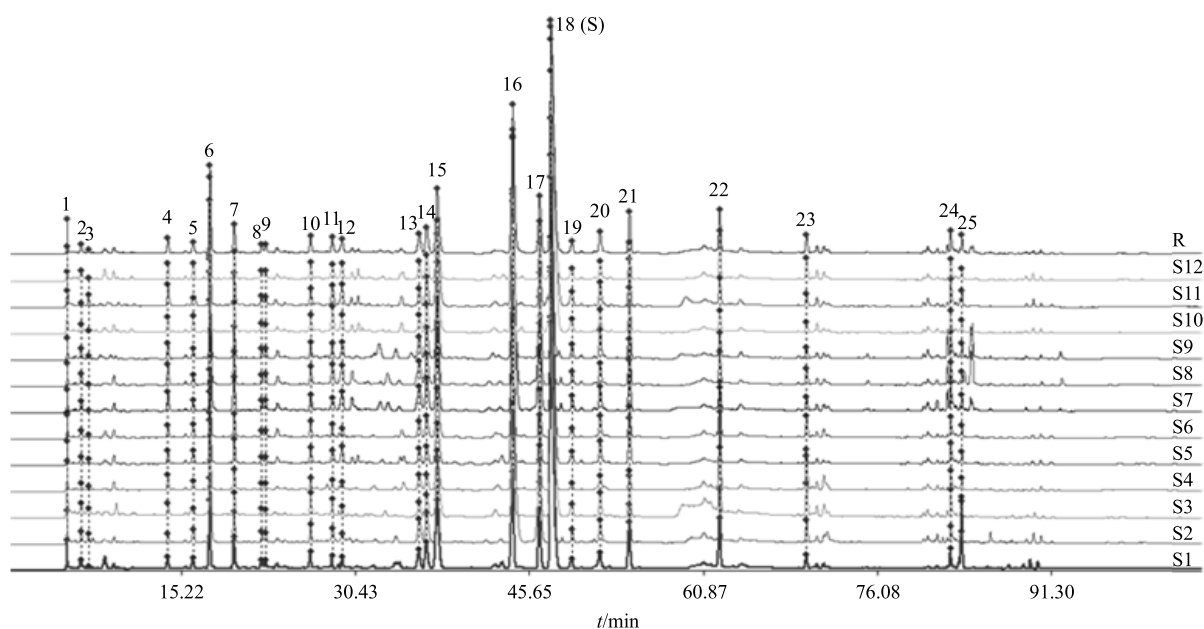
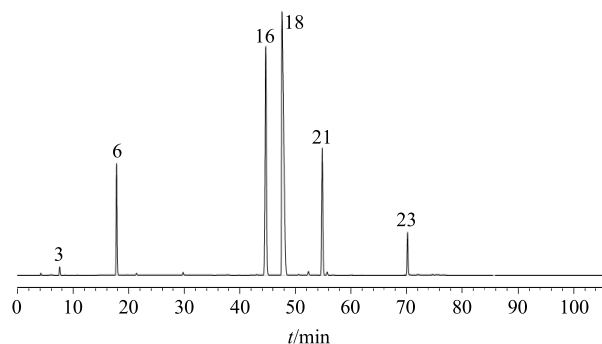


图 1 12 批次 ANP 样品 HPLC 指纹图谱及对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC fingerprints for 12 batches of ANP and control fingerprint (R)

表 1 12 批 ANP 指纹图谱共有峰相对峰面积
Table 1 Relative peak area of common peaks of 12 batches of ANP

峰号	相对峰面积												RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	
1	0.03	0.03	0.03	0.05	0.04	0.05	0.02	0.02	0.02	0.06	0.03	0.04	34.15
2	0.03	0.03	0.02	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.04	17.84
3	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	42.67
4	0.03	0.02	0.02	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.06	0.05	25.21
5	0.03	0.04	0.04	0.04	0.05	0.06	0.03	0.02	0.03	0.05	0.03	0.05	28.52
6	0.17	0.17	0.14	0.26	0.22	0.25	0.25	0.24	0.24	0.21	0.24	0.25	17.45
7	0.08	0.07	0.07	0.07	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	5.11
8	0.02	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	13.34
9	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	11.11
10	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	9.17
11	0.03	0.03	0.04	0.04	0.06	0.06	0.05	0.06	0.05	0.06	0.05	0.05	19.29
12	0.02	0.04	0.02	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.05	0.03	0.06	0.05	35.46
13	0.09	0.08	0.08	0.08	0.07	0.08	0.10	0.10	0.07	0.07	0.06	0.08	14.49
14	0.11	0.11	0.10	0.08	0.09	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.10	9.03
15	0.30	0.29	0.29	0.24	0.24	0.28	0.31	0.31	0.29	0.31	0.31	0.28	8.76
16	0.61	0.36	0.45	0.41	0.80	0.59	0.69	0.65	0.75	0.47	0.55	0.54	23.69
17	0.21	0.21	0.20	0.20	0.22	0.21	0.22	0.21	0.20	0.20	0.20	0.21	4.09
18	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
19	0.03	0.04	0.04	0.03	0.05	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.04	17.35
20	0.07	0.06	0.07	0.08	0.11	0.10	0.07	0.07	0.09	0.08	0.09	0.07	17.42
21	0.14	0.11	0.11	0.07	0.18	0.12	0.14	0.13	0.15	0.13	0.13	0.11	19.39
22	0.27	0.10	0.12	0.28	0.07	0.26	0.08	0.09	0.08	0.06	0.08	0.14	59.74
23	0.06	0.03	0.05	0.13	0.02	0.07	0.03	0.04	0.03	0.02	0.03	0.06	62.36
24	0.03	0.04	0.04	0.06	0.07	0.07	0.06	0.05	0.06	0.05	0.06	0.05	20.12
25	0.16	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	0.02	111.43



3-京尼平苷酸 6-栀子苷 16-黄芩苷 18-盐酸小檗碱 21-汉黄芩苷 23-汉黄芩素
3-geniposidic acid 6-geniposide 16-baicalin 18-berberine hydrochloride 21-wogonoside 23-wogonin

图 2 混合对照品的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of reference substances

341.0、170.5、136.4、85.2、68.2、42.6、34.1、17.0 $\mu\text{g/mL}$, 汉黄芩苷质量浓度为 146.00、73.00、58.40、36.50、29.20、18.25、14.60、7.30 $\mu\text{g/mL}$, 汉黄芩素质量浓度为 27.00、13.50、10.80、6.75、5.40、3.38、2.70、1.35 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。吸取上述混合对照品溶液各 10 μL , 按“2.1”项下色谱条件分别进样, 记录峰面积。以峰面积积分值为纵坐标 (Y), 进样质量浓度为横坐标 (X), 进行线性回归。回归方程分别为栀子苷 $Y=16\ 692.723\ X+2\ 734.905$, $r=0.999\ 6$, 线性范围 6~120 $\mu\text{g/mL}$; 京尼平苷酸 $Y=9\ 066.371\ X+1\ 483.630$, $r=0.999\ 1$, 线性范围 0.84~16.80 $\mu\text{g/mL}$; 盐酸小檗碱 $Y=50\ 986.242\ X+32\ 050.392$, $r=0.999\ 4$, 线性范围 11.4~228 $\mu\text{g/mL}$; 黄芩苷 $Y=19\ 399.255\ X-$

53 186.465, $r=0.999\ 3$, 线性范围 17.0~341 $\mu\text{g/mL}$; 汉黄芩苷 $Y=20\ 779.773\ X-12\ 604.234$, $r=0.999\ 5$, 线性范围 7.3~146.0 $\mu\text{g/mL}$; 汉黄芩素 $Y=32\ 834.715\ X-312.055$, $r=0.999\ 5$, 线性范围 1.4~27.0 $\mu\text{g/mL}$; 结果表明 6 种有效成分在上述质量浓度范围内线性关系良好。

2.5.2 精密度试验 取同一混合对照品溶液按“2.1”项下色谱条件连续进样 5 次, 记录色谱峰面积, 计算栀子苷、京尼平苷酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素峰面积的 RSD 值分别为 0.6%、1.0%、0.4%、0.4%、0.4%、0.3%; 连续 3 d, 每天取上述混合对照品溶液连续进样 2 次, 计算栀子苷、京尼平苷酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素 6 个成分峰面积的 RSD 值分别为 1.52%、1.38%、1.11%、1.69%、1.72%、1.49%, 日内精密度与日间精密度 RSD 值均小于 2%, 表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 取同一样品 S1, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别于配制后 0、2、4、8、12、24 h 进样, 测定峰面积, 计算得栀子苷、京尼平苷酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素峰面积的 RSD 值分别为 1.5%、2.0%、1.0%、2.0%、1.6%、0.8%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.4 重复性试验 取同一批样品 S1, 按“2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按照“2.1”项下条件测定, 记录峰面积, 测定结果栀子苷、京尼平苷

酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素质量分数的 RSD 值分别为 1.8%、1.6%、2.0%、2.3%、1.8%、1.8%。表明本方法重复性良好。

2.5.5 加样回收率试验 取同一批样品 S1 ANP 6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 分别加入混合对照品溶液适量, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下条件测定, 记录色谱峰峰面积, 计算回收率。结果栀子苷、京尼平苷酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素平均回收率分别为 104.88%、96.79%、99.09%、103.19%、106.58%、101.54%, RSD 值分别为 2.02%、2.99%、2.66%、3.27%、3.77%、5.62%, 均符合《中国药典》2015 年版要求, 结果表明本方法准确可靠。

2.5.6 样品定量测定 取 4 个厂家 12 批次 ANP, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别取 10 μL 进样, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 各样品测定结果见表 2。

2.6 化学模式识别

2.6.1 聚类分析 将 4 个厂家 12 批样品共有峰峰面积导入到 SPSS 19.0 软件, 对其进行聚类分析, 以组间均连法及欧式平方距离作为样品测度。由图 3 可见, 当类间距离为 15 时, 12 批样品分为 3 类, A、D 厂家产品聚为一类, B、C 厂家产品各自聚为一类。由结果可知, 在指纹图谱相似度较好的情况下, 仍发现不同厂家产品质量存在一定差异。

2.6.2 PCA^[12] 为进一步比较不同批次 ANP 样品

表 2 样品测定结果

Table 2 Content determination results of samples

样品	厂家	指标成分/(mg·丸 ⁻¹)					
		栀子苷	京尼平苷酸	盐酸小檗碱	黄芩苷	汉黄芩苷	汉黄芩素
S1	A	3.20	0.24	7.28	12.50	2.30	0.68
S2	A	5.58	0.57	10.38	10.30	2.96	0.55
S3	A	4.96	0.52	11.04	13.53	3.01	0.97
S4	B	6.14	0.46	7.80	9.00	1.53	1.61
S5	B	5.36	0.19	7.93	16.43	3.56	0.30
S6	B	6.06	0.29	8.03	13.06	2.45	0.84
S7	C	8.73	0.28	11.44	21.29	3.96	0.62
S8	C	8.29	0.21	11.35	20.06	3.61	0.66
S9	C	7.93	0.59	10.94	22.22	4.11	0.50
S10	D	6.93	0.54	10.84	14.00	3.50	0.40
S11	D	8.30	0.09	11.07	16.48	3.60	0.47
S12	D	7.71	0.40	9.89	14.61	2.89	0.86

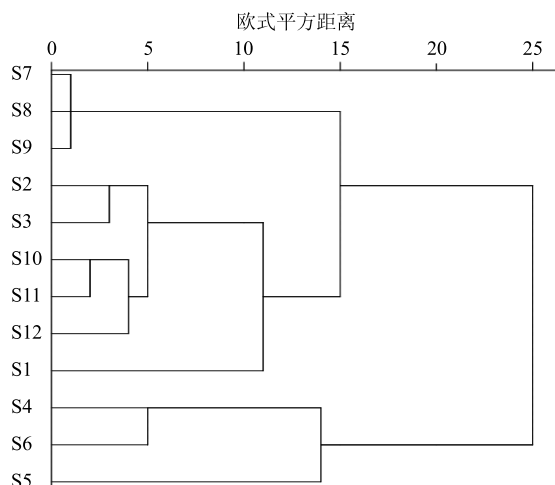


图 3 12 批 ANP 聚类分析树状图

Fig. 3 Dendrogram of cluster analysis of 12 batches of ANP

的质量差异,运用 SPSS 19.0 软件进行 PCA。选取 梔子、黄连与黄芩中的特征活性成分(梔子苷、京尼平苷酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素)为指标,将其量作为变量导入到 SPSS 软件中,运用因子分析对原始数据进行标准化处理。选取其中特征值大于 1 的前 2 个因子作为第 1、2 主成分,对总方差的累积贡献率达 77.6% (表 3),可用这 2 个主成分新变量代替原有变量(表 4)。将表 5 (因子得分系数矩阵)中的数据除以主成分相对应的特征值开平方根得到两个主成分中每个指标所对应的系数。根据主成分计算公式可以得到前 2 个主成分与原有指标的线性组合: $F_1 = 0.120 x_1 - 0.024 x_2 + 0.125 x_3 + 0.141 x_4 + 0.152 x_5 - 0.107 x_6$; $F_2 = 0.186 x_1 + 0.637 x_2 + 0.349 x_3 - 0.089 x_4 - 0.037 x_5 + 0.308 x_6$ (x 代表各成分的量),计算综合得分 $F = 0.737 F_1 + 0.263 F_2$ 。

12 批样品的综合得分 F 见表 5。综合排名越靠前,说明以此 6 个成分量为指标,其样品质量越好。相比较而言,C 厂家产品质量较好。

表 3 特征值和累积贡献率

Table 3 Eigenvalue and contribution

主成分	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%
1	3.433	57.216	57.216
2	1.226	20.436	77.653
3	0.854	14.235	91.887
4	0.298	4.959	96.846
5	0.173	2.879	99.725
6	0.016	0.275	100.000

表 4 因子得分系数矩阵

Table 4 Coefficient matrix of factor scores

有效成分	主成分	
	1	2
梔子苷 (x_1)	0.222	0.205
京尼平苷酸 (x_2)	-0.044	0.705
盐酸小檗碱 (x_3)	0.232	0.386
黄芩苷 (x_4)	0.261	-0.098
汉黄芩苷 (x_5)	0.282	-0.041
汉黄芩素 (x_6)	-0.197	0.341

表 5 主成分值及综合主成分值

Table 5 Principal component values and comprehensive principal component values

厂家	样品编号	F_1	F_2	F	综合排序
C	S9	0.647	0.857	0.702	1
C	S7	0.688	0.025	0.514	2
C	S8	0.535	-0.228	0.334	3
D	S10	0.205	0.652	0.323	4
D	S11	0.466	-0.831	0.125	5
A	S3	-0.208	0.943	0.095	6
D	S12	-0.038	0.431	0.085	7
A	S2	-0.212	0.753	0.042	8
B	S5	0.037	-1.616	-0.398	9
B	S6	-0.422	-0.535	-0.452	10
B	S4	-1.017	0.877	-0.519	11
A	S1	-0.680	-1.328	-0.850	12

3 讨论

ANP 作为中药大品种产品之一,疗效显著。中康 CMH 数据显示,2014 年 ANP 在中国零售药店渠道市场年销售总额达 7.35 亿元。CFDA 数据显示,ANP 的生产厂家达 122 家。由于 ANP 具有临床应用价值大、科学研究价值强、市场效应价值高的特点,使得对其质量标准的提升工作具有较重大的意义。只有保证了产品质量的均一与稳定,才能进一步保证其安全性与有效性,从而最终达到优质产品能够优价并占领市场^[13]。

《中国药典》2015 年版规定 ANP 每丸 (3 g/丸) 含黄芩以黄芩苷计,不得少于 5.0 mg; 含黄连以盐酸小檗碱计,不得少于 2.3 mg。本实验收集得到的 12 批 ANP 均符合《中国药典》2015 年版要求,且其量均高出药典规定。指纹图谱结果表明不同厂家不同批次产品的整体一致性还是比较好的,但从聚

类分析结果及各有效成分量来看,不同产品质量仍存在一定差异。4 个厂家栀子苷、京尼平苷酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素量范围分别为 3.20~8.73、0.09~0.59、7.28~11.44、9.00~22.22、1.53~4.11、0.30~1.61 mg/丸,栀子苷、盐酸小檗碱的量最高与最低相差接近 3 倍,但黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素的量差异则相对较大,最高与最低量相差达到 5 倍。由表 3 可知,C 厂家产品黄芩苷、汉黄芩苷及汉黄芩素的量较其他厂家更为稳定,且其量普遍高于其他厂家。进一步采用 PCA 中的综合得分 F ,将不同批次产品进行排名。根据综合排名结果,亦见 C 厂家产品相对较好,其结果与定量测定结果基本吻合。由于 ANP 的制备工艺为打粉处理,其制备工艺相对简单,所以其原药材的质量是决定产品质量最关键的因素,也是不同厂家产品质量存在差异的主要原因。因此在保证产品工艺一致性的情况下,一定要控制原药材的质量,尤其是控制黄芩药材质量的均一与稳定。

本研究采用指纹图谱结合多成分定量测定及化学模式识别的分析方法较好地反映了 ANP 的质量,区分出产品的优劣等级,为产品的优质优价提供了科学依据^[14-21]。但由于 ANP 中成分相对复杂,除含有植物药、矿物药外,还含有贵重动物药(麝香),本研究只对其植物药成分差异进行了考察,如何更好地建立能同时反映动物药及矿物药成分差异的评价系统还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 周 纯. 安宫牛黄丸联合康复治疗对重型颅脑损伤疗效研究 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2016.
- [3] 崔爱瑛. 安宫牛黄丸的药理及临床研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 341-344.
- [4] 张伟骏, 黄 燕. 安宫牛黄丸治疗急性脑中风的现状概述 [J]. 中成药, 2015, 37(9): 2019-2022.
- [5] 丰加涛, 金 郁, 王金成, 等. 基于定量指纹图谱技术的中药质量控制 [J]. 色谱, 2008, 26(2): 180-185.
- [6] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [7] 申云富, 范小青. 汉黄芩苷的药理活性研究进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2016, 30(4): 98-101.
- [8] Lu Y, Joerger R, Wu C. Study of the chemical composition and antimicrobial activities of ethanolic extracts from roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(20): 10934-10942.
- [9] 王恩力, 董 方, 姚景春. 栀子苷药理学和毒理学研究进展 [J]. 中国药房, 2015, 26(19): 2730-2733.
- [10] Wu X, Zhou Y, Yin F, et al. Quality control and producing areas differentiation of *Gardeniae Fructus* for eight bioactive constituents by HPLC-DAD-ESI/MS [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(4): 551-559.
- [11] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.
- [12] 李淑娇, 李伟霞, 唐于平, 等. 基于主成分分析和多指标综合指数法的当归-红花不同配比活血化瘀作用比较 [J]. 药学学报, 2014, 49(9): 1304-1309.
- [13] 王永炎, 杨洪军. 中小型中药企业大品种培育策略与路径分析 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(5): 755-758.
- [14] 秦建平, 林 夏, 潘有智, 等. 基于指纹图谱分析和多成分同时定量的龙血通络胶囊质量评价研究 [J]. 中草药, 2015, 46(20): 3028-3033.
- [15] 刘 瞳. 北刘寄奴的指纹图谱分析与主要成分含量测定 [D]. 北京: 中央民族大学, 2016.
- [16] 刘筱筱, 夏忠庭, 何 毅, 等. 远志 UPLC 多指标成分的测定及指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2167-2174.
- [17] 古力齐曼·阿布力孜. 野蔷薇中齐墩果酸和熊果酸的测定、提取及指纹图谱研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆师范大学, 2016.
- [18] 汪 悦, 邵 青, 瞿海斌, 等. 丹红注射液多元指纹图谱及多成分定量分析研究 [J]. 中草药, 2014, 45(4): 490-497.
- [19] 向楚兵, 刘友平, 陈鸿平, 等. 赤芍二基源药材的 HPLC 指纹图谱鉴别及质量评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 43-48.
- [20] 徐瑞超, 董自亮, 余佳文. 基于聚类分析与主成分分析的赤芍指纹图谱研究 [J]. 食品与药品, 2015, (6): 381-385.
- [21] 秦建平, 林 夏, 潘有智, 等. 基于指纹图谱分析和多成分同时定量的龙血通络胶囊质量评价研究 [J]. 中草药, 2015, 46(20): 3028-3033.