

清热解毒颗粒的 HPLC 指纹图谱建立及聚类分析

洪挺¹, 张昆艳^{1,2}, 许妍¹, 王栋³, 杨毅生^{1*} (1.江西省药品检验检测研究院, 江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心, 南昌 330029; 2.江西中医药大学, 南昌 330004; 3.江西省食品检验检测研究院, 江西国家果蔬产品及加工食品质量监督检验中心, 南昌 330001)

摘要: 目的 建立清热解毒颗粒的 HPLC 指纹图谱, 并进行聚类分析。方法 色谱柱为 Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.1%磷酸溶液为流动相梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 325 nm。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)进行相似度评价, 采用 SPSS 21.0 软件对 15 批样品进行聚类分析。结果 建立了清热解毒颗粒的 HPLC 指纹图谱, 确定了 22 个共有峰, 指认了 4 个峰, 相似度均≥0.916。15 批样品可聚为 3 大类, S1~S7 聚为 I 类、S8~S10 聚为 II 类, S11~S15 聚为 III 类。结论 采用 HPLC 建立的指纹图谱方法简单, 重复性好, 可用于清热解毒颗粒的质量控制和工艺评价。

关键词: 清热解毒颗粒; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 聚类分析

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)24-3056-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.24.010

引用本文: 洪挺, 张昆艳, 许妍, 等. 清热解毒颗粒的 HPLC 指纹图谱建立及聚类分析[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(24): 3056-3060.

Establishment of HPLC Fingerprint of Qingre Jiedu Granules and Cluster Analysis

HONG Ting¹, ZHANG Kunyan^{1,2}, XU Yan¹, WANG Dong³, YANG Yisheng^{1*} (1.Jiangxi Institute for Drug Control, Jiangxi Provincial Engineering Research Center for Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China; 2.Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 3.Jiangxi Provincial Institute for Food Control, Jiangxi National Fruit and Vegetable Products and Processed Food Quality Supervision and Inspection Center, Nanchang 330001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the HPLC fingerprint chromatogram of Qingre Jiedu granules, and to conduct cluster analysis. **METHODS** HPLC was performed on Phenomenex C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphoric acid solution in gradient mode. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ under the temperature of 30 ℃, with a detection wavelength of 325 nm. The similarity evaluation was carried out by *Similarity Evaluation System for TCM Chromatographic Fingerprint* (2012 Edition). Cluster analysis was carried out by using SPSS 21.0 statistical software. **RESULTS** The HPLC fingerprint of Qingre Jiedu granules with 22 commons peaks, and four of them were identified by comparing with reference substances. The similarity was ≥0.916. Fifteen batches of samples were divided into 3 categories. S1~S7 could be grouped into category I; S8~S10 could be grouped into category II; S11~S15 could be grouped into category III. **CONCLUSION** The established method is simple and reproducible. The fingerprint and cluster analysis results can be used for the quality control and process evaluation.

KEYWORDS: Qingre Jiedu granules; HPLC; fingerprint; cluster analysis

清热解毒颗粒具有多个同名异方品种, 其中中国药典 2015 年版一部中收载的清热解毒系列品种^[1-2]和另外 2 个医院制剂品种^[3-4]处方均与本研究不同, 本研究清热解毒颗粒执行标准为《中药成方制剂》第十三册(WS3-B-2618-97), 处方由黄连、水牛角、玄参、金银花、地黄、大青叶、连翘、知母、石膏九味药组成^[5], 具有清热解毒、养阴生津、泻火之功效, 主要用于风热型感冒、流行性腮腺炎及轻、中型乙型脑炎等。清热解毒颗

粒成分复杂, 生产厂家众多, 但现行标准简单, 仅有【性状】、【鉴别】理化鉴别、【检查】项。目前该处方质量标准研究较少^[6-7]。中药指纹图谱能较全面、系统的反映中成药的特征化学信息, 是现行公认的中药及天然药物最有效的控制技术之一^[8-10]。本研究采用 HPLC 梯度洗脱对清热解毒颗粒进行指纹图谱研究^[11], 对共有的 22 个色谱峰进行了归属, 并对其结果进行聚类分析, 为其全面的质量控制和工艺评价提供参考。

基金项目: 江西省食品药品监督管理局科研项目(2017YX04); 国家药典委员会 2017 年国家药品标准提高项目(488); 江西省 2018 年度研究生创新专项资金项目(YC2018-S286)

作者简介: 洪挺, 男, 硕士, 主管药师 Tel: 13257008805 E-mail: 174635475@qq.com *通信作者: 杨毅生, 男, 主任中药师 Tel: 18170815599 E-mail: 1020115850@qq.com

1 仪器与试剂

LC-20AD 高效液相色谱仪(日本 SHIMADZU, 四元泵, PDA 检测器, LC solution 色谱工作站, 自动进样器); BSA 124S-CW 型电子天平(德国赛托利斯公司); KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

甲醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 甲醇(色谱纯, Sigma 公司); 磷酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 水为超纯水; 金银花对照药材(批号: 121060-201608)、知母对照药材(批号: 121070-200503)、黄连对照药材(批号: 120913-201310)、大青叶对照药材(批号: 121367-200602)、连翘对照药材(批号: 120908-201216)、地黄对照药材(批号: 121180-201506)、玄参对照药材(批号: 121008-201609)、盐酸小檗碱对照品(批号: 120913-201310, 含量以 86.8%计)、连翘酯苷 A 对照品(批号: 111802-201102, 含量以 93.2%计)、绿原酸对照品(批号: 110753-201817, 含量以 96.8%计)、芒果苷对照品(批号: 111607-200402, 含量以 99.0%计)均由中国食品药品检定研究院提供; 清热解毒颗粒[北京东升制药有限公司, 批号: 17430502, 17430503, 17430504; 河南辅仁堂制药有限公司, 批号: 20170302, 20170901, 20170902; 江西济民可信金水宝制药有限公司, 批号: 171201; 江西铜鼓仁和制药有限公司, 批号: 171201, 171202, 171203; 河北万岁药业有限公司, 批号: 170501, 170502, 161002, 170501(无蔗糖)、171001(无蔗糖)]均为市售品, 编号依次为 S1~S15。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇(A)-0.1%磷酸溶液(B); 梯度洗脱(0~20 min, 16%→23%A; 20~30 min, 23%→30%A; 30~40 min, 30%→27%A; 40~55 min, 27%→41%A; 55~65 min, 41%A; 65~75 min, 41%→42%A; 75~85 min, 42%→48%A; 85~95 min, 48%→45%A; 95~105 min, 45%→55%A; 105~115 min, 55%A), 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL; 检测波长 325 nm。

2.2 供试品溶液的制备

取装量差异项下的清热解毒颗粒适量, 研细,

取约 2 g 或 1 g(无糖), 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50%甲醇 15 mL, 密塞, 称定质量, 超声 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 50%甲醇补足减失的重量, 摇匀, 离心, 取上清液, 即得。

2.3 对照品和对照药材溶液的制备

精密称取绿原酸、连翘酯苷 A、芒果苷、盐酸小檗碱对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含绿原酸 12.18 μg、连翘酯苷 A 11.04 μg、芒果苷 12.24 μg、盐酸小檗碱 13.02 μg 的混合对照品溶液, 摇匀, 即得。再取金银花、知母、黄连、大青叶、连翘、地黄、玄参各 1 g, 按处方工艺制备, 再按“2.2”项下制备方法, 分别制成各药材的对照药材溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 仪器精密度试验 取清热解毒颗粒(批号: 17430502), 按“2.2”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 4 号峰为参照, 记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰相对保留时间 RSD 均<0.1%(n=6), 相对峰面积 RSD 均<2.0%(n=6), 表明仪器精密度良好, 符合指纹图谱的技术要求。

2.4.2 重复性试验 取清热解毒颗粒(批号: 17430502)6 份, 分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以 4 号峰为参照, 记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果相对保留时间 RSD 均<0.1%(n=6), 相对峰面积 RSD 均<2.8%(n=6), 表明本方法重复性良好, 符合指纹图谱的技术要求。

2.4.3 稳定性试验 取清热解毒颗粒(批号: 17430502), 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以 4 号峰为参照, 记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果相对保留时间 RSD 均<0.7%(n=6), 相对峰面积 RSD 均<2.9%(n=6), 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.5 结果与分析

2.5.1 清热解毒颗粒指纹图谱的建立与分析 取 15 批药材按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件测定, 得到 15 批清热解毒颗粒的液相色谱图, 再采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)对 15 批药材样品的 HPLC 图谱进行分析, 得到 HPLC 叠加指纹图谱, 见图 1。经过谱峰多点校正生成共有模式的对照指纹图谱, 见图 2, 确定 22 个共有峰。

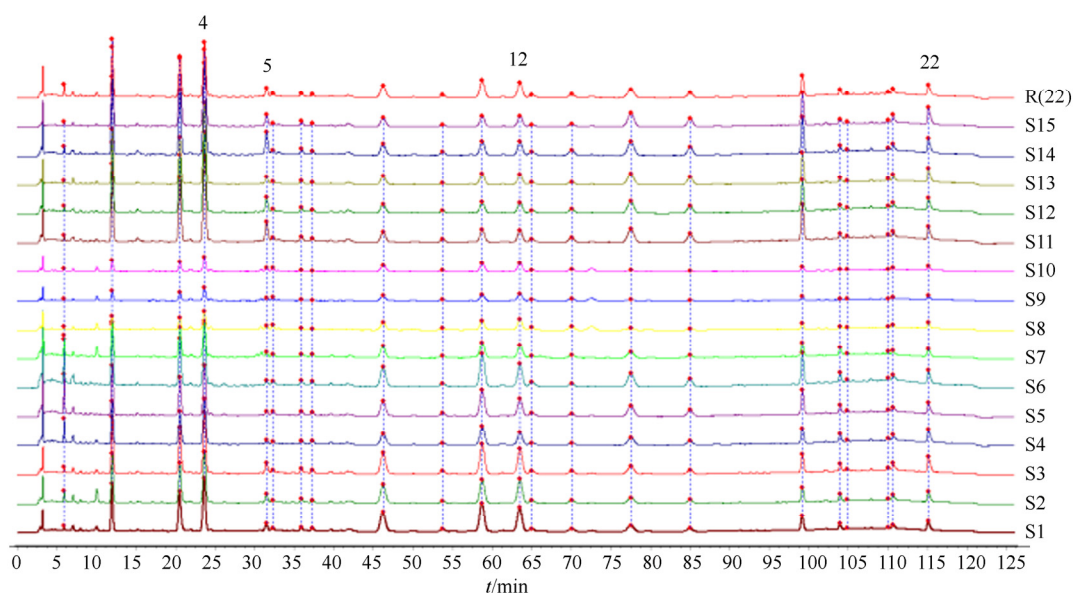


图1 15批清热解毒颗粒 HPLC 叠加指纹图谱

4-绿原酸; 5-芒果苷; 12-连翘酯苷 A; 22-盐酸小檗碱。

Fig. 1 HPLC fingerprints overlap of 15 batches of Qingre Jiedu granules

4-chlorogenic acid; 5-mangiferin; 12-forsythoside A; 22-berberine hydrochloride.

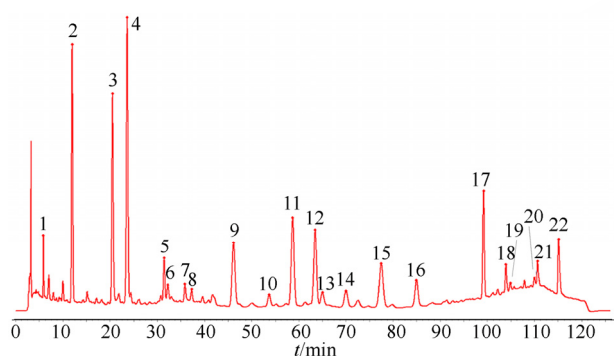


图2 清热解毒颗粒对照指纹图谱

4-绿原酸; 5-芒果苷; 12-连翘酯苷 A; 22-盐酸小檗碱。

Fig. 2 HPLC standard fingerprint chromatogram of Qingre Jiedu granules

4-chlorogenic acid; 5-mangiferin; 12-forsythoside A; 22-berberine hydrochloride.

2.5.2 共有峰的标定与指认 分别依次精密吸取“2.3”项下制备的 7 味药材的对照药材溶液各 10 μ L, 注入高效液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 测得 7 味药材 HPLC 色谱图, 见图 3。根据色谱峰的保留时间和光谱图对其进行归属, 得出 1~4, 15~17 号色谱峰归属为金银花药材; 5, 6 号色谱峰归属为知母药材; 7, 20~22 号色谱峰归属为黄连药材; 8, 18~19 号色谱峰归属为玄参药材; 9, 11~12 号色谱峰归属为连翘药材; 10 号色谱峰归属为大青叶药材; 13~14 号色谱峰归属为地黄药材。根据已确认的 22 个共有峰, 通过与

对照品溶液的保留时间和光谱图比对, 指认了其中的 4 个峰, 分别为绿原酸(4 号峰)、芒果苷(5 号峰)、连翘酯苷 A(12 号峰)、盐酸小檗碱(22 号峰), 在色谱图中选择归一化峰面积最大的 4 号峰作为参照峰(S)。

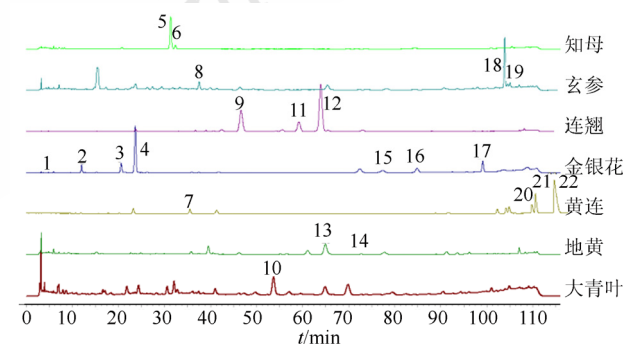


图3 7味药材 HPLC 图

Fig. 3 HPLC chromatograms of seven herbal pieces

2.5.3 相似度计算 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)对 15 批样品的指纹图谱数据进行分析, 计算 15 批清热解毒颗粒与对照指纹图谱之间的相似度。结果显示, 15 批样品相似度分别为 0.960, 0.970, 0.976, 0.990, 0.977, 0.977, 0.991, 0.925, 0.933, 0.916, 0.967, 0.967, 0.964, 0.973, 0.957, 均 ≥ 0.916 。

2.6 聚类分析

以 15 批样品 22 个共有峰的相对峰面积为原

始数据,应用 SPSS 21.0 软件,采用组间平均数联结法进行聚类分析,结果见图 4。由图 4 可知,15 批样品可聚为 3 大类: S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 聚为Ⅰ类, S8, S9, S10 聚为Ⅱ类, S11, S12, S13, S14, S15 聚为Ⅲ类。

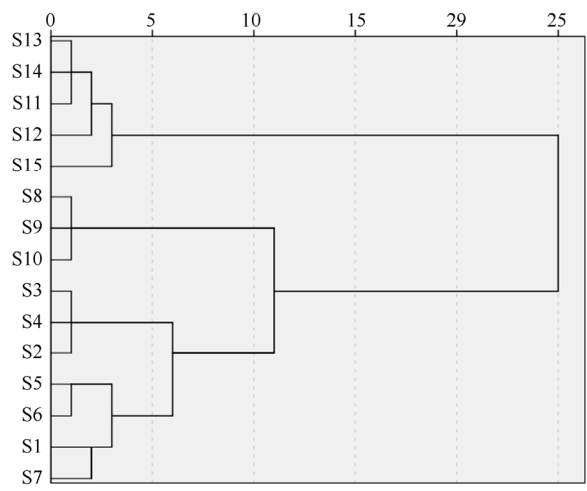


图 4 15 批样品聚类分析树状图
Fig. 4 Result of cluster analysis of 15 batches

2.7 主成分分析

以 15 批指纹图谱 22 个共有峰面积为原始数据,导入 SPSS 21.0,进行主成分分析,提取了一个主成分,以编号为 X 轴,样品得分为 Y 轴,绘制散点图,见图 5。由图 5 可知,样品 S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 聚为Ⅰ类, S8, S9, S10 聚为Ⅱ类, S11, S12, S13, S14, S15 聚为Ⅲ类,与“2.6”项下聚类分析考察结果一致。

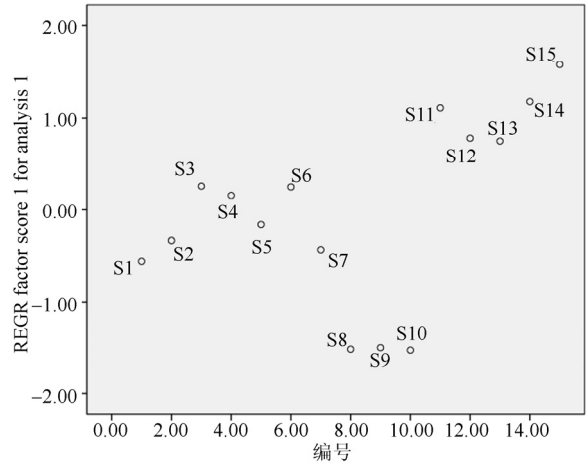


图 5 15 批样品主成分分析
Fig. 5 Result of principal component analysis in 15 batches sample

2.8 4 种成分含量测定

对 15 批样品进行了绿原酸、芒果苷、连翘酯

苷 A、盐酸小檗碱 4 种成分的含量测定,结果见表 1。

表 1 每袋样品中 4 种成分含量
Tab 1 Contents of four components in one bag of samples

编号	绿原酸	芒果苷	连翘酯苷 A	盐酸小檗碱
S1	9.12	1.23	7.40	0.95
S2	8.60	1.39	7.18	1.29
S3	10.53	1.70	7.54	2.04
S4	13.15	0.93	8.10	2.24
S5	11.96	0.78	7.60	1.94
S6	13.07	0.97	6.07	2.35
S7	6.65	0.67	3.86	0.83
S8	3.25	0.57	3.49	0.61
S9	3.51	0.62	3.39	0.60
S10	3.29	0.63	3.74	0.62
S11	12.89	2.88	3.31	1.41
S12	15.78	2.18	3.71	1.40
S13	16.40	3.34	3.85	1.52
S14	19.69	3.40	4.56	1.74
S15	18.53	1.51	4.12	2.42

3 讨论

3.1 供试品溶液制备的考察

考察了不同的提取溶剂[甲醇、乙醇、50%甲醇、50%甲醇-盐酸(100:1)]对色谱峰的影响,结果以 50%甲醇提取特征峰最丰富;考察了加热回流、超声 2 种提取方式,结果表明超声提取方式特征峰面积更大,这可能是因为特征峰含有绿原酸、连翘酯苷 A 类似结构的化合物,而这类化合物不是很稳定,加热回流会加剧其分解;另外还考察了提取时间(15, 30, 50 min)的提取效率,结果表明提取 30 min 效果最佳。

3.2 色谱条件的选择

对清热解暑颗粒样品在 190~400 nm 内的 3D 光谱图进行分析,结果在 325 nm 处色谱峰较集中,大小适中,分离度好,故选择 325 nm 作为检测波长。实验还考察了乙腈(甲醇)-水,乙腈(甲醇)-0.1%磷酸水系统,结果显示甲醇-0.1%磷酸水系统分离效果好,峰型最佳。

3.3 相似度分析

15 批样品中有 12 批次相似度>0.95,即使相似度最低的 S8~S10 批样品也没有峰缺失情况,且都能归属到处方中 7 味药材的特征峰,说明本次收集到的清热解暑颗粒具有较好的相关性,工艺稳定性良好,整体质量较稳定。但来自同一企业的 3 批(S8~S10)样品相似度均<0.95,从含量测定结果也得出,这 3 批次样品中 4 种成分含量最低,表明该企业所用原料较差,经计算,其 22 号峰盐

酸小檗碱含量也低于理论值,因此将 0.95 作为相似度评价的阈值,可有效地对样品质量优劣进行评价。

3.4 聚类分析

聚类分析结果表明,15 批样品可聚为 3 大类。I 类为北京东升制药有限公司、河南辅仁堂制药有限公司和江西济民可信金水宝制药有限公司 3 家企业样品,II 类为江西铜鼓仁和制药有限公司样品,III 类为河北万岁药业有限公司样品,各企业批次间差异较小,但不同企业峰面积差异较大,各成分间的含量比例差异较大,这可能是由于所用原药材或者生产工艺差异所致,I 类为 3 个企业样品,其具体原因有待进一步探究。

综上所述,本实验所建立的清热解毒颗粒 HPLC 指纹图谱分析方法,精密度高、专属性强、稳定性和分离度好。通过比较确定了 22 个共有峰,指认了 4 个峰,并将各特征峰归属到处方中药材,体现了药材与清热解毒颗粒的相关性,可以有效地评价清热解毒颗粒的质量。

REFERENCES

[1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 1552-1553.

- [2] ZHANG X H, XIE W M, YANG Y J. Discussion on the standard of heat-clearing and detoxifying granules [J]. West J Tradit Chin Med(西部中医药), 2014, 27(6): 18-19.
- [3] 谭文超. 反相液相色谱法测定清热解毒颗粒中靛玉红含量 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2007, 9(3): 204.
- [4] JIA Y G, LIU Y, YAN M M, et al. Content determination of berberine hydrochloride in Qingrejiedu granule by HPLC [J]. China Pharm(中国药业), 2007, 16(15): 27-28.
- [5] 中药成方制剂. 第十三册[S]. 1997, 45: 195.
- [6] 冯香萍, 高保栓. HPLC 测定清热解毒颗粒中绿原酸的含量 [J]. 河北中医药学报, 2004, 19(4): 23-27.
- [7] 文志云, 陆国寿. 清热解毒颗粒中绿原酸的含量测定[J]. 医学文选, 2005(6): 892-894.
- [8] ZHOU J, MO C L, CHEN G, et al. Study on the HPLC fingerprint chromatogram of Cimicifugae Rhizoma and Cimicifuga species root formula granules [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(2): 252-255.
- [9] WANG C S, LIU Y L, FENG L. Study on UPLC fingerprint of Zhibai Dihuang pills [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 34(10): 1432-1436.
- [10] HOU X H, GE M, ZHANG Y C, et al. HPLC fingerprint study and cluster analysis of *Paeonia suffruticosa* [J]. China Pharm(中国药房), 2018, 29(24): 3354-3358.
- [11] GUO Q, YAN Y, WANG H B, et al. Determination of eight components in Qingrejiedu granules by HPLC with UV switch [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2015, 35(9): 1061-1605.

收稿日期: 2019-02-19

(本文责编: 曹粤锋)