

复方斯亚旦生发油的 HPLC 指纹图谱研究

王萍¹, 董文杰¹, 孟玲²(1.新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐 830000; 2.新疆医科大学中医学院, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 建立复方斯亚旦生发油的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 为评价该制剂的整体质量提供依据。方法 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012年版)对复方斯亚旦生发油的 HPLC 指纹图谱进行相似度评价, 并使用 SPSS 19.0 软件进行聚类分析。结果 选取了 8 个色谱峰作为指纹图谱共有峰, 10 批样品的相似度计算结果均>0.95; 通过聚类分析可将 10 批样品聚为 4 类。结论 建立的复方斯亚旦生发油 HPLC 指纹图谱方法稳定可行。

关键词: 复方斯亚旦生发油; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 聚类分析; 质量评价

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)04-0403-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.04.004

引用本文: 王萍, 董文杰, 孟玲. 复方斯亚旦生发油的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(4): 403-405.

Study on HPLC Fingerprint of Fufang Siyadan Oil

WANG Ping¹, DONG Wenjie¹, MENG Ling²(1.Traditional Medical Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China; 2.College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish high performance liquid chromatography(HPLC) fingerprints of Fufang Siyadan Oil to provide a reference for evaluation of the overall quality of this preparation. **METHODS** The similarity of the HPLC fingerprint of Fufang Siyadan Oil analyzed with "Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Chinese Materia Medica 2012A", and hierarchical clustering analysis(HCA) was performed by SPSS 19.0. **RESULTS** There were 8 common peaks, and the similarity degrees of 10 batches of samples were >0.95, and showed that all the samples were of good consistency. The samples were divided into 4 clusters by HCA. **CONCLUSION** Establishment of fingerprint can provide more comprehensive reference for the quality control of Fufang Siyadan Oil. The established HPLC fingerprint method is stable and feasible.

KEYWORDS: Fufang Siyadan Oil; HPLC; fingerprint; cluster analysis; quality evaluation

复方斯亚旦生发油收载于 1998 年版《中华人民共和国卫生部药品标准-维吾尔药分册》^[1], 全方由黑种草子、桃仁、石榴子等常用维吾尔药材组成, 具有温肤生发, 止痒祛屑之功, 用于秃头、斑秃、头皮瘙痒等症^[1], 具有良好的治疗效果。但现行质量标准仅仅只有性状、鉴别、检查 3 项。

中药复方制剂具有组成药材多、组成成分复杂等特点, 很难用其中 1 种或几种化学成分的含量来衡量中药制剂的整体质量。而 HPLC 指纹图谱技术具有整体、宏观、模糊分析的特点, 因此适用于药效物质基础未得到有效阐明的中药材的质量评价^[2-3]。目前关于复方斯亚旦生发油的指纹图谱研究尚未见文献报道, 为保障生产工艺的稳定性、提高制剂质量标准及促进临床用药安全提供科学依据, 同时间接反映出原药材的质量优劣, 从源头上更好地保障复方斯亚旦生发油的质量, 本实验拟建立复方斯亚旦生发油的 HPLC 指纹图

谱, 并结合相似度评价、聚类分析等模式识别方法, 为该制剂质量的全面控制提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪(Waters 2996 二极管阵列检测器, 美国 Waters 公司); AL 204 电子天平、AG 135 电子天平均来自梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; Direct-QTM 超纯水仪(Millipore)。

1.2 试剂

复方斯亚旦生发油由新疆维吾尔药业有限责任公司生产, 批号: 0150910, 0151020, 0160321, 0160405, 0160411, 0160520, 0160521, 0160740, 0160741, 0160927(下文分别简称为样品 S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10)。

苦杏仁苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110820-201305; 供含量测定用, 含量以 85.8%计); 水为超纯水; 甲醇为色谱纯试剂; 实验

基金项目:《中国药典》药品标准提高项目(6)

作者简介: 王萍, 女, 硕士, 主任药师 Tel: (0991)5587891

E-mail: 1436799756@qq.com

中所用其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[4-8]

色谱柱为 Symmetry C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相为甲醇(A)-水(B), 梯度洗脱, 线性洗脱程序为 0~10 min, 10%→20%A; 10~20 min, 20%→39%A; 20~45 min, 39%→45%A; 45~70 min, 45%~55%A; 70~72 min, 55%→10%A; 检测波长 210 nm, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

取苦杏仁苷对照品适量, 精密称定, 用甲醇制成每 1 mL 含苦杏仁苷 0.49 mg 的对照品溶液, 作为储备液。

2.3 供试品溶液的制备

精密吸取本品 5 mL, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 称定质量, 超声处理 1 h, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 冷冻(-15~-18 °C)2 h, 取出, 迅速滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 5 mL 使溶解, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 HPLC 指纹图谱的建立

2.4.1 仪器精密度试验 精密吸取同一供试品(批号: 0160411)溶液 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱峰。以 8 号峰为参照峰, 结果各共有峰的相对保留时间 RSD<2.6%, 相对峰面积的 RSD<4.9%, 说明该方法仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 分别于 0, 1, 4, 8, 12, 24 h 取同一供试品(批号: 0160411)溶液, 依法测定。以 8 号峰为参照峰, 结果各共有峰的相对保留时间 RSD<2.4%, 相对峰面积的 RSD<4.7%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批样品(批号: 0160411), 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 8 号峰为参照峰, 结果各共有峰的相对保留时间 RSD<0.9%, 相对峰面积的 RSD 值均<4.8%, 表明该方法重复性良好。

2.4.4 指纹图谱的建立及共有峰的标定 分别取 10 批样品按“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, 记录色谱图。采用国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012 年版进行分析, 标定出 8 个共有色谱峰, 且 8 个共有峰的总面积占总峰面积

的 90%以上。

经与对照品溶液色谱图比对后, 确认样品图谱中 1 号峰是苦杏仁苷, 是复方斯亚旦生发油中桃仁的主要活性成分, 从图 1 中可以看出 8 号峰的色谱峰分离度较好, 峰面积所占比例较大且相对稳定, 因此选择 8 号峰为参照峰, 建立复方斯亚旦生发油的对照指纹图谱, 见图 1。结果样品各色谱图共有峰的相对保留时间 RSD 值均<3.0%; 而相对峰面积的 RSD 值相差较大, 其中 1, 3, 4, 6, 7 号峰 RSD 值较大。结果见表 1。

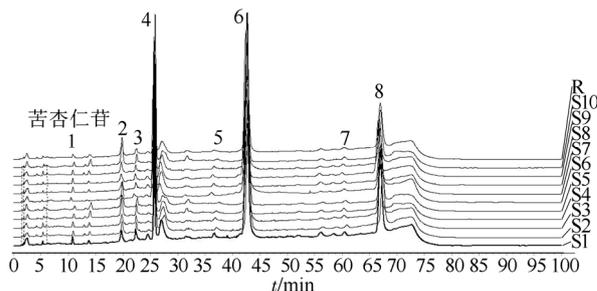


图 1 10 批复方斯亚旦生发油指纹图谱及对照指纹图谱(R)
Fig. 1 HPLC fingerprints of 10 batches of Fufang Siyadan Oil and control fingerprint(R)

2.4.5 相似度评价 各批次样品与生成的对照指纹图谱进行相似度分析, 结果显示 10 批样品的指纹图谱与对照指纹图谱的相似度分别为 0.979, 0.978, 0.974, 0.982, 0.961, 0.980, 0.985, 0.951, 0.990, 0.974, 各批之间的相似度均>0.95, 表明该厂家的多批次样品化学成分整体一致性较好, 可以用于综合评价复方斯亚旦生发油的整体质量。

2.5 聚类分析

将 10 批样品的 HPLC 指纹图谱的 8 个共有峰的峰面积为特征, 得到 10×8 阶原始数据矩阵, 运用 SPSS 19.0 分析软件对其进行聚类分析, 采用组间连接法, 以欧式平方距离为测度, Z 标准化, 对样品进行聚类分析。当类间距离为 5 时, 10 批样品可以聚为 4 类, 由结果可知, 在指纹图谱相似度较好的情况下, 该厂家产品质量存在一定差异。结果见图 2。

3 讨论

复方斯亚旦生发油的制备方法是黑种草子、桃仁清炒后, 立即与石榴子混合, 用榨压法取油, 滤过, 静置, 取上清液 1 000 mL, 加防腐剂适量, 分装, 即得^[1]。在参考中国药典 2015 年版和大量文献的基础上, 采用了多种供试品溶液的处理方法, 并对多种色谱条件进行研究, 结果均未能得

表 1 共有峰相对保留时间和相对峰面积

Tab. 1 Relative retention times and relative areas of common peaks

批号	相对保留时间								相对峰面积							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
S1	0.172 3	0.298 2	0.336 4	0.384 2	0.519 1	0.645 9	0.898 1	1.000 0	0.026 1	0.068 2	0.068 4	0.776 6	0.021 6	1.293 7	0.048 2	1.000 0
S2	0.171 6	0.297 8	0.336 9	0.386 7	0.524 3	0.644 6	0.902 5	1.000 0	0.025 9	0.072 6	0.059 1	0.707 8	0.020 8	1.244 3	0.043 1	1.000 0
S3	0.167 0	0.295 9	0.335 8	0.385 4	0.518 7	0.639 6	0.901 4	1.000 0	0.026 0	0.066 9	0.058 1	0.702 2	0.020 8	1.241 7	0.045 4	1.000 0
S4	0.164 3	0.295 3	0.335 4	0.385 5	0.553 6	0.636 9	0.901 9	1.000 0	0.023 4	0.068 1	0.063 4	0.744 8	0.020 7	1.211 6	0.046 2	1.000 0
S5	0.161 3	0.293 7	0.333 0	0.383 6	0.549 8	0.636 3	0.902 9	1.000 0	0.024 0	0.067 5	0.062 5	0.796 3	0.021 9	1.289 3	0.046 9	1.000 0
S6	0.161 2	0.294 2	0.333 1	0.383 6	0.547 0	0.637 2	0.902 3	1.000 0	0.025 2	0.068 2	0.061 0	0.724 8	0.021 9	1.202 4	0.048 1	1.000 0
S7	0.161 2	0.295 2	0.333 3	0.383 2	0.545 8	0.635 5	0.899 2	1.000 0	0.027 3	0.071 9	0.058 7	0.704 8	0.020 5	1.350 2	0.048 1	1.000 0
S8	0.169 7	0.295 0	0.332 8	0.382 2	0.544 9	0.636 4	0.896 3	1.000 0	0.025 5	0.069 2	0.060 1	0.792 2	0.020 6	1.200 1	0.047 5	1.000 0
S9	0.168 2	0.294 6	0.331 8	0.381 0	0.543 5	0.636 9	0.951 6	1.000 0	0.024 6	0.068 3	0.059 9	0.718 3	0.021 9	1.310 7	0.046 5	1.000 0
S10	0.169 9	0.292 4	0.328 0	0.379 2	0.539 3	0.634 9	0.901 6	1.000 0	0.025 0	0.067 9	0.060 8	0.763 7	0.021 6	1.314 9	0.044 9	1.000 0
\bar{x}	0.166 7	0.295 2	0.333 6	0.383 5	0.538 6	0.638 4	0.905 8	1.000 0	0.025 3	0.068 9	0.061 2	0.743 1	0.021 2	1.265 9	0.046 5	1.000 0
RSD/%	2.62	0.60	0.79	0.59	2.41	0.60	1.79	0	4.46	2.73	4.93	4.94	2.79	4.18	3.54	0

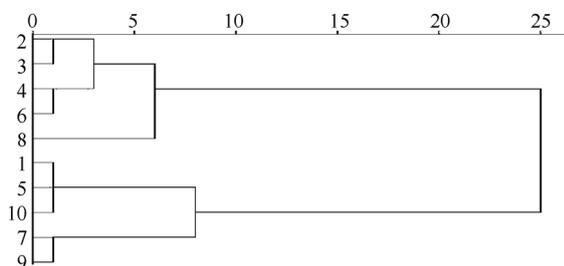


图 2 10 批复方斯亚旦生发油指纹图谱的聚类分析树状图
Fig. 2 Hierarchical cluster analysis for 10 batches of Fufang Siyadan Oil

到黑种草子中的主要有效成分常春藤皂苷元的 HPLC 测定方法, 因此也未能在复方斯亚旦生发油的指纹图谱中反映出来。前期笔者在薄层色谱研究中也曾采用多种供试品溶液的处理方法, 并对多种色谱条件进行研究, 也未能得到黑种草子的薄层鉴别方法, 因此笔者认为在复方斯亚旦生发油中存在大量的油脂类成分, 而常春藤皂苷元等成分含量极低, 故未能检测到。

桃仁的主要成分有脂肪油类、苷类、蛋白质和氨基酸、挥发油、甾体及其糖苷等。苦杏仁苷是桃仁的有效成分之一, 在桃仁的质量控制方面, 国内文献多以苦杏仁苷的量作为评价桃仁质量的指标, 现代药理学研究表明桃仁中的有效成分不仅仅为苦杏仁苷, 因此通过中药指纹图谱从整体上反映桃仁成分的多重指标, 有望为桃仁提供更加有效的质量及药效综合评价方法^[8]。

目前国内只有新疆维吾尔药业有限责任公司一家生产复方斯亚旦生发油, 实验结果表明, 该厂家不同批次产品指纹图谱相似度高, 提示其整

体一致性较好。但从聚类分析结果来看, 该厂家产品质量存在一定差异。由于复方斯亚旦生发油的制备工艺相对简单, 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, 一定要控制原药材质量的均一与稳定。

致谢: 感谢新疆医科大学附属中医医院李媛媛为本研究提供了统计咨询。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 中华人民共和国卫生部药品标准—维吾尔药分册[S]. 1998: 172.
- [2] XU T, HUANG M M, LIU L F, et al. HPLC fingerprint and multi-components determination combined with chemical pattern recognition of Angong Niuhuang Pills [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48(12): 2448-2454.
- [3] NIE W, ZHU P L, FANG H L, et al. Quality evaluation of *Callicarpa kwangtungensis* from different origins by HPLC coupled with chemometrics [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48(1): 185-191.
- [4] 中国药典. 一部[S]. 2015: 345.
- [5] YUN Q, LIU Q W, MA X H, et al. Quality assessment and classification of Persicae Semen based on HPLC-UV fingerprint [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2014, 39(5): 860-866.
- [6] ZHANG Y, ZHANG Y P, HE F. Fingerprint chromatography of shuganning injection by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(7): 824-827.
- [7] 徐芳, 刘亚婷, 赵军, 等. 瘤果黑种草子高效液相指纹图谱研究[J]. 中药材, 2011, 34(4): 531-534.
- [8] XU X H, LI T, WANG Y T, et al. Research progress in Persicae Semen [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2015, 46(17): 2649-2655.

收稿日期: 2018-04-13
(本文责编: 李艳芳)