

复方黄白胶囊的多波长融合 HPLC 指纹图谱

方芳¹, 王晶¹, 方舟¹, 雷力力¹, 孟繁颖², 方洪壮^{2*}

(1. 佳木斯大学附属第一医院, 黑龙江 佳木斯 154003;

2. 佳木斯大学药学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

[摘要] **目的:**建立复方黄白胶囊的高效液相指纹图谱,为其质量控制提供新的方法。**方法:**运用主成分分析法获取多波长融合色谱指纹图谱。Agilent Zorbax SB-C₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.2% 磷酸梯度洗脱,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 35 °C,检测波长 210~400 nm。通过复方黄白胶囊与药材阴性样品图谱比对,判别色谱峰的来源,采用窗口目标检测因子分析法确定色谱峰化学成分的归属。**结果:**10 批复方黄白胶囊样品的融合指纹图谱与共有模式间的相似度 > 0.9。融合指纹图谱中识别出药材来源的共有峰共计 25 个,其中 13 个色谱峰化学成分的归属得到了确认。**结论:**建立的多波长融合指纹图谱可用于复方黄白胶囊的质量控制。

[关键词] 复方黄白胶囊; 高效液相色谱; 多波长融合指纹图谱; 窗口目标检测因子分析法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0113-05

[doi] 10.11653/syfy2013170113

Multi Wavelength Fusion HPLC Fingerprint of Compound Huangbai Capsules

FANG Fang¹, WANG Jing¹, FANG Zhou¹, LEI Li-li¹, MENG Fan-ying², FANG Hong-zhuang^{2*}

(1. First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154003, China;

2. College of Pharmaceutical, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC fingerprint of Compound Huangbai Capsules (CHC) and elucidate main components in CHC. **Method:** The multi wavelength fusion fingerprint (MWFF) was established by mean principal component analysis. HPLC analysis was performed on an Agilent Zorbax SB-C₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.2% phosphoric acid as mobile phase by gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, column temperature was maintained at 35 °C, and the wavelength detection range was 210-400 nm. The origin of chromatographic peaks was distinguished by comparing chromatographic profile of CHC with negative samples. The chemical attribution of chromatographic peak was recognized by window target-testing factor analysis technique. **Result:** The similarity is more than 0.9 between the correlation coefficients of 10 samples and the common pattern. In the common peaks of MWFF, there were of 25 peaks identified the material source, among which chemical attribution of 13 peaks were confirmed. **Conclusion:** The establishment of MWFF can be helpful for the quality control of CHC.

[Key words] compound Huangbai Capsule; HPLC; multi wavelength fusion fingerprint; window target-testing factor analysis algorithm

[收稿日期] 20130220(010)

[基金项目] 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12521547)

[第一作者] 方芳, 硕士, 主管药师, 从事临床药物分析研究, Tel: 0454-8223391, E-mail: fafa317@163.com

[通讯作者] * 方洪壮, 教授, 从事药物分析教学与研究, Tel: 0454-8611265, E-mail: fhz-chjms@sohu.com

复方黄白胶囊(怡康灵胶囊)为佳木斯大学附属第一医院的院内中药复方制剂,主治由肝郁气滞、脾胃实热、肝胆湿热等症引起的急、慢性胰腺炎及重症胰腺炎。该制剂由黄芩、白芍、桅子、大黄、茵陈、厚朴、玄明粉 7 味药材组成^[1]。其现行的质量标准中,仅测定主要成分黄芩苷的含量^[2]。该制剂组方药材较多并且成分复杂,单一成分测定不能全面、综合的评价其质量。色谱指纹图谱是中药质量控制的有效技术手段,其研究的广度和深度在不断扩展^[3]。其中,多波长融合技术将多个波长的数据通过整合或主成分提取等方式进行融合,提供了更多的指纹图谱信息^[4-9]。基于复方黄白胶囊的质量标准的现状,本研究采用主成分分析方法建立其多波长融合指纹图谱^[10],并通过图谱的比对和化学计量学中的窗口目标检测因子分析法^[11],确认指纹图谱中共有峰的来源和化学成分的归属,为复方黄白胶囊的制备工艺改进和质量标准提升提供依据。

1 材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),包括 G1311A 四元泵, G1322 真空脱气机, G1329 自动进样器, G1315 二极管阵列检测器(DAD);复方黄白胶囊(佳木斯大学第一附属医院制剂室,批号 20090708, 20090725, 20090813, 20090829, 20090911, 20090930, 20091026, 20091103, 20091127, 20091211);黄芩、白芍、桅子、大黄、茵陈、厚朴、玄明粉等药材均购自佳木斯市金天药店,经佳木斯大学生药教研室宗希明高级实验师鉴定为正品;黄芩苷(批号 110715-201016)、黄芩素(批号 111595-200604)、汉黄芩素(批号 111514-200815)、芍药苷(批号 110736-200933)、桅子苷(批号 110749-200714)、芦荟大黄素(110795-200806)、大黄酚(批号 110756-200110)、大黄素(批号 110756-200110)、大黄酸(批号 110757-200206)、大黄素甲醚(批号 110756-200408)、和厚朴酚(批号 110730-200609)、厚朴酚(批号 110729-200411)对照品均购自中国药品生物制品检定所,汉黄芩苷对照品(批号 201004、上海融禾医药科技有限公司);乙腈(色谱纯、天津科密欧试剂有限公司)、磷酸(分析纯、天津科密欧试剂有限公司)。

数据处理在 MATLAB7.0 上完成,色谱仪输出数据先转化成 M 数据格式,指纹图谱融合、窗口目标检测因子分析、色谱保留时间的校正及有关计算均借助 MATLAB 内部函数以自编程序完成。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 ZORBAX Eclipse SB-C₈ 分析柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)和 ZORBAX Eclipse SB-C₈ 保护柱(4.6 mm × 12.5 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)0.2% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 5 min, 5% A; 5 ~ 65 min, 5% ~ 25% A; 65 ~ 80 min, 25% ~ 40% A; 80 ~ 89 min, 40% A; 89 ~ 90 min, 40% ~ 60% A; 90 ~ 105 min, 60% A; 105 ~ 110 min, 60% ~ 100% A; 110 ~ 120 min, 100% A),流速 1.0 mL · min⁻¹,柱温 35 °C,检测波长范围 210 ~ 400 nm,波长间隔 1 nm,进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 供试溶液制备 取复方黄白胶囊内容物约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入甲醇 25 mL,称定质量。加热回流,提取时间为 1 h,放冷,称重,用甲醇补足失重,摇匀,滤过,弃去初滤液,取续滤液过 0.45 μm 滤膜作为供试溶液。

2.2.2 阴性溶液制备 取各味药材和辅料,按复方黄白胶囊处方与生产工艺,分别制备不含单味药黄芩、白芍、桅子、大黄、茵陈、厚朴各的阴性样品,按 2.2.1 项的供试溶液制备方法,分别制备缺单味药的阴性溶液。

2.2.3 对照品溶液制备 分别称取黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、芍药苷、桅子苷、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、和厚朴酚、厚朴酚对照品各 5 mg,分别置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制成 0.1 g · L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 指纹图谱获取

2.3.1 光谱波长范围的选取 DAD 设定为 200 ~ 500 nm 全波长扫描(1 nm · set⁻¹)。取供试溶液,按设定的色谱条件进样测定。用所得的二维色谱-光谱数据,绘制色谱响应等强度线图(图 1)。由图 1 可知,复方黄白胶囊的色谱信号以紫外光区为主,考虑到紫外末端的吸收及色谱基线的影响,选取供试溶液的色谱波长测定范围为 210 ~ 400 nm。

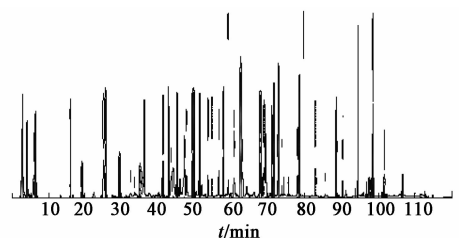


图 1 复方黄白胶囊的色谱等强度线图

2.3.2 多波长的融合 按 2.1 项的色谱条件测定供试溶液,记录二维数据。规定 DAD 的量测数据矩

阵的行为保留时间,列为检测波长。奇异值分解量测数据矩阵,提取得分矩阵的第一列作为多波长融合指纹图谱。所获取的指纹图谱为 201~400 nm 单个波长下的 200 个指纹图谱信息的线性组合,融合了 DAD 量测矩阵的光谱信息和色谱信息。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密性试验 取批号为 20090708 的复方黄白胶囊供试溶液,连续进样 6 次。测得的多波长融合指纹图谱全谱与它们中位值的相关系数分别为 0.999 7,0.997 0,0.999 1,0.993 7,0.998 4,0.995 0,相关系数均 >0.99 ,相对应的 RSD 0.24%。各图谱能够很好的重合,表明仪器的精密性较好。

2.4.2 重复性试验 取批号为 20090708 的样品,按 2.2.1 项下方法平行制备 6 份供试溶液,分别测定。不同供试溶液测得的图谱与其均值间的相关系数分别为 0.996 9,0.999 7,0.995 6,0.989 9,0.986 6,0.999 1,相关系数均 >0.98 ,RSD 0.53%。表明方法重复性良好,符合指纹图谱的要求。

2.4.3 稳定性试验 取批号为 20090708 的复方黄白胶囊供试溶液,分别在 0,4,8,12,18,24 h 进样。不同时间测得的图谱与其均值相关系数分别为 0.990 9,0.999 6,0.983 6,0.991 1,0.999 7,0.984 2,均 >0.98 。相对应的 RSD 0.71%,供试溶液在 24 h 内较稳定。

2.5 指纹图谱的建立 取 10 批复方黄白胶囊供试溶液,按 2.1 色谱条件进行测定,经主成分分析计算获取多波长融合指纹图谱(图 2)。对 10 批样品的融合指纹图谱按全谱方式以均值法建立共有模式(图 3)。10 批样品指纹图谱与其共有模式的相似度分别为,0.921 0,0.9410,0.965 4,0.984 2,0.996 0,0.922 1,0.995 6,0.984 1,0.965 1,0.940 3,均 >0.92 。

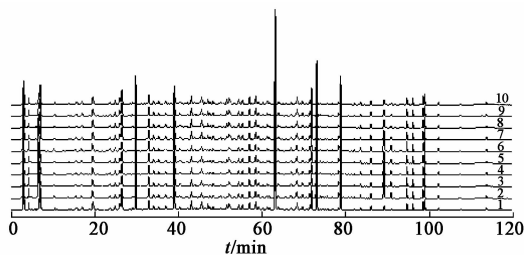


图 2 10 批复方黄白胶囊的多波长融合指纹图谱

2.6 指纹图谱色谱峰的确定

2.6.1 色谱峰的药材来源 取各缺单味药的阴性溶液,分别按 2.1 色谱条件测定,经主成分分析计算获取各缺单味药的样品融合指纹图谱。分别将缺单

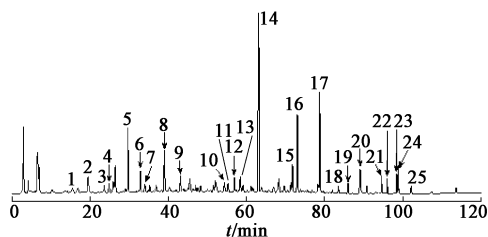
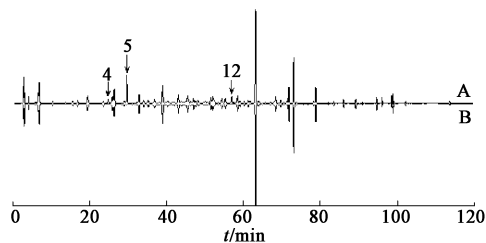


图 3 复方黄白胶囊的共有模式图

味药样品的融合指纹图谱与复方黄白胶囊融合指纹图谱的共有模式图进行直观比较,判别各单味药材对复方黄白胶囊指纹图谱共有峰的贡献。例如,由不含桅子药材的阴性样品的指纹图谱与黄白胶囊共有模式的直观比较图(图 4)可知,共有峰中的 4,5,12 号色谱峰来源于桅子。复方黄白胶囊融合指纹图谱共有峰中,识别出药材来源的色谱峰共计 25 个(图 3),除来自于桅子的 3 个色谱峰外,另外的 22 个色谱峰分别为,9,14,15,16,17,20 号峰来自于黄芩;2,6 号峰来自于白芍;3,18,19,21,24,25 号峰来自于大黄;1,10,11,13 号峰来自于茵陈;7,8,22,23 号峰来自于厚朴。

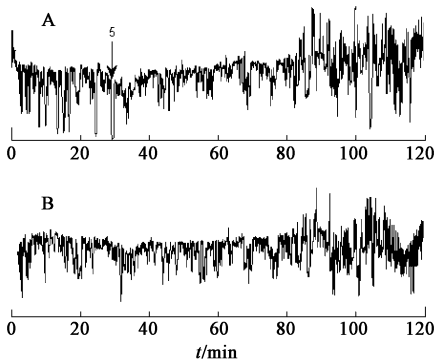


A. 复方黄白胶囊;B. 缺桅子药材

图 4 复方黄白胶囊与缺桅子样品的指纹图谱

2.6.2 色谱峰的化学归属 按 2.1 色谱条件,分别测定批号为 20090708 的复方黄白胶囊供试溶液、各缺单味药材阴性样品溶液及各对照品溶液。在对照品溶液的色谱光谱数据中提取色谱峰处的光谱数据,令其为目标光谱数据矢量 s ,并令各种样品溶液的色谱光谱矩阵数据为 X ,按窗口目标检测因子分析法,设定窗口宽度为 5,计算 s 在 X 各移动窗口奇异值分解后的抽象光谱子空间中的投影光谱矢量 s_p ,并计算矢量 s 与各移动窗口下 s_p 矢量间的夹角 θ ;以各夹角 θ 对保留时间作图,按文献建议的上限 ($\theta = 0.1$)^[11] 来判定目标化合物在各样品中的有无及目标化合物存在于复方黄白胶囊中时相对应的色谱保留时间,从而确定样品融合指纹图谱相应色谱峰的化学成分归属。以对照品桅子苷为例,当将其光谱设为目标矢量后,按窗口目标检测因子分析方法获取了桅子苷对复方黄白胶囊样品及不含桅子阴性样品的计算分析结果(图 5)。图 5A 显示,复方

黄白胶囊在不同保留时间处有多个目标化合物投影前后矢量间的夹角值接近或 < 0.1 , 而不含桅子阴性样品的图 5B 中矢量间的夹角值均 > 0.1 ; 由图 5 最小夹角值处局部放大(图 6)可知, 在保留时间 29.4 min 左右, 目标化合物光谱对复方黄白胶囊的投影夹角基本为零, 而相应不含桅子的阴性样品的投影夹角 > 0.6 , 由此判断, 黄白胶囊融合指纹图谱中, 保留时间 29.4 min 处的色谱峰与桅子苷有关。结合图 4 的结果可以断定, 来源于桅子药材的共有峰中 5 号色谱峰为桅子苷。按上述方法, 在黄白胶囊融合指纹图谱与单味药材有关的 25 个色谱峰中, 得到 13 个色谱峰的化学归属。除了 5 号峰外, 其余结果是 6 号峰与芍药苷有关, 14, 16, 17 号峰分别为黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素, 18, 19 号峰为芦荟大黄素与大黄酸, 20 号峰为汉黄芩素, 21 号峰为大黄酚, 22, 23 号峰分别为厚朴酚与厚朴酮, 24, 25 号峰分别为大黄酚与大黄素甲醚。



A. 复方黄白胶囊; B. 缺桅子药材

图 5 桅子苷投影夹角图

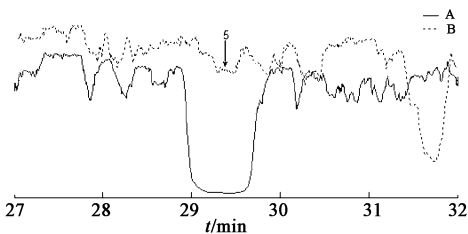


图 6 桅子苷投影夹角局部放大

3 讨论

3.1 共有模式方式 中药指纹图谱的共有模式有峰方式和全谱方式。多波长融合指纹图谱虽然可采用峰方式建立共有模式及进行相似度比较, 但不能直接从色谱工作站下输出融合指纹图谱峰面积, 需利用有关软件对经融合变换得到色谱峰重新积分。而以全谱方式, 仅需将色谱进行保留时间对齐后直接建立共有模式, 相对简单, 故本研究采用了全谱方

式建立共有模式及比较相似度。

3.2 色谱峰的来源判定 指认复方中药指纹图谱有关色谱峰的来源时, 通常可以用单味药材相应的指纹图谱与复方的指纹图谱进行比对。考虑到复方中药在制备过程中, 组方中的单味药材间可能会发生作用, 本研究采用了缺单味药的阴性模拟制剂与复方黄白胶囊的指纹图谱进行比较, 来确认各单味药对融合指纹图谱色谱峰来源的贡献。

3.3 单味药玄明粉 复方黄白胶囊融合指纹中, 未见与玄明粉药材有关的色谱峰。另外, 缺玄明粉的阴性样品与复方黄白胶囊的指纹图谱比对时, 也未见玄明粉的有无对复方黄白胶囊融合指纹图谱的影响。其原因在于, 玄明粉为芒硝经风化干燥所得, 成分为无机化合物硫酸钠, 在紫外检测器下无信号。

3.4 色谱柱的选择 实验中采用了 C_8 色谱柱进行色谱分离测定。这是由于复方黄白胶囊组成的药味较多、成分复杂, 使用 C_{18} 色谱柱时, 受样品中极性较大成分的影响, 指纹图谱保留时间的前半段分离效果不理想, 而以 C_8 色谱柱可达到较满意的结果。

[参考文献]

- [1] 黄展. 怡康灵胶囊主药药效学实验研究 [J]. 黑龙江医药科学, 2007, 30(3):47.
- [2] 董丽华, 张志国, 于春艳. 高效液相色谱法测定怡康灵胶囊中黄芩苷的含量 [J]. 中国药师, 2006, 9(8):777.
- [3] 詹雪艳, 史新元, 段天璇, 等. 色谱指纹图谱相似度方法研究的进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7):248.
- [4] 聂磊, 胡震, 罗国安, 等. 中药指纹图谱的融合技术 [J]. 分析化学, 2005, 33(6):898.
- [5] Fan X H, Cheng Y Y, Ye Z L, et al. Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines [J]. Anal Chim Acta, 2006, 555(2):217.
- [6] Lucio-Gutiérrez J R, Coello J, Maspocho S. Enhanced chromatographic fingerprinting of herb materials by multi-wavelength selection and chemometrics [J]. Anal Chim Acta, 2012, 710(1):40.
- [7] 孙国祥, 车磊, 李闫飞. 一种评价多波长中药色谱指纹图谱新方法-均谱法 [J]. 中南药学, 2011, 9(7):533.
- [8] 任培培, 孙国祥, 孙丽娜. 附子理中丸多波长融合 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(3):411.

黄白止痢颗粒质量标准

丁兆朋, 郝智慧*, 杨芬芳, 逢丽萍

(青岛农业大学化学与药学院农用生物制药实验室, 山东 青岛 266109)

[摘要] **目的:**建立黄白止痢颗粒的质量标准。**方法:**采用薄层色谱法对黄白止痢颗粒中黄连、大黄炭、白头翁进行定性鉴别,并采用高效液相色谱法测定盐酸小檗碱含量。Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.3% 磷酸水溶液(32:68),检测波长 348 nm,柱温 25 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。**结果:**在薄层鉴别中黄连、大黄炭、白头翁有良好的鉴别特征有效成分盐酸小檗碱含量在 0.008 8~0.11 g·L⁻¹具有良好的线性关系($r=0.999\ 1$),平均加样回收率为 98.58%,RSD 1.05%。**结论:**使用薄层色谱法对黄连、大黄炭、白头翁进行定性鉴别,操作简便、重复性好,且阴性对照无干扰;盐酸小檗碱的含量测定方法简便、快速、准确,具有良好的重复性和回收率,可作为黄白止痢颗粒的质量控制方法。

[关键词] 黄白止痢颗粒; 质量标准; 盐酸小檗碱; 大黄; 白头翁皂苷 B₄; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0117-04

[doi] 10.11653/syjf2013170117

Quality Standard of Huangbaizhili Granules

DING Zhao-peng, HAO Zhi-hui*, YANG Fen-fang, PANG Li-ping

(College of Chemistry and Pharmaceutical Sciences of Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quality standard of Huangbaizhili Granules. **Method:** The *Coptis chinensis*, *Rhubarb charcoal* and *Pulsatilla chinensis* were identified by TLC and the content of berberine hydrochloride was detected by HPLC. The separation was carried out on an Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile-0.3% phosphoric acid (32:68). The detective wavelength was set at 348 nm. The column temperature was kept at 25 °C. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the injection volume was 10 μL. **Result:** The *C. chinensis*, *R. charcoal* and *P. chinensis* could be identified by TLC and the calibration curve of berberine hydrochloride showed a good linearity in the range of 0.008 8-0.11 g·L⁻¹ ($r=0.999\ 1$). The average recovery was 98.58% with RSD 1.05%. **Conclusion:** This method to identify three main ingredients in Huangbaizhili Granules by TLC is simple and has a great repeatability. The negative control sample has no interference. The method to determine the content of berberine hydrochlorid in

[收稿日期] 20120917(003)

[基金项目] 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201303040-X)

[第一作者] 丁兆朋, 硕士研究生, 从事药学、质量标准、方法学研究, Tel:15194274115, E-mail: dzp1989211@163.com

[通讯作者] * 郝智慧, 博士研究生, 副教授, 从事药学、质量标准、方法学研究, Tel:0532-86080346, E-mail: haotiger@126.com

[9] Ni Y N, Lai Y H, Brandesc S, et al. Multi-wavelength HPLC fingerprints from complex substances: An exploratory chemometrics study of the Cassia seed example [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 647(2):149.

[10] Yan S K, Xin W F, Luo G A, et al. An approach to develop two-dimensional fingerprint for the quality control of Qingkailing injection by high-performance liquid chromatography with diode array detection [J]. *J*

Chromatogr A, 2005, 1090(1/2):90.

[11] Lohnes M T, Guy R D, Wentzell P D. Window target-testing factor analysis: Theory and application to the chromatographic analysis complex mixtures with multiwavelength fluorescence detection [J]. *Anal Chim Acta*, 1999, 389(1/3):95.

[责任编辑 顾雪竹]