

高效液相色谱法指纹图谱结合化学模式识别 对除湿丸质量控制研究

杨 薇¹ 龚 韬¹ 宋京美¹ 王 夏¹ 胡银燕¹ 严文利¹ 周德勇¹ 孙丽蕴²

1.首都医科大学附属北京中医医院北京市中医药研究所,北京 100035;

2.首都医科大学附属北京中医医院皮肤科,北京 100010

[摘要] 目的 建立除湿丸指纹图谱,为完善其质量控制提供参考。方法 采用高效液相色谱法(HPLC),色谱柱为 Luna Omega Polar C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相:乙腈-0.2%磷酸水溶液,流速为 1.0 ml/min,波长为 254 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μl。以黄芩素为参照,测定 29 批除湿丸的 HPLC 图谱,并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。结果 29 批除湿丸 HPLC 指纹图谱有 35 个共有峰,相似度均>0.95,并指认了 8 个色谱峰;聚类分析将 29 批除湿丸聚为 3 类;主成分分析中 7 个主要成分分别反映 32 个共有峰信息。结论 不同批次除湿丸存在一定的质量差异。所建立的除湿丸指纹图谱可全面评价除湿丸的质量。

[关键词] 除湿丸;指纹图谱;聚类分析;主成分分析

[中图分类号] R284.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-7210(2024)01(c)-0009-05

DOI:10.20047/j.issn1673-7210.2024.03.02

Study on quality control of Chushi Wan by high performance liquid chromatography fingerprint combined with chemical pattern recognition

YANG Wei¹ GONG Tao¹ SONG Jingmei¹ WANG Xia¹ HU Yinyan¹ YAN Wenli¹ ZHOU Deyong¹ SUN Liyun²

1.Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing Traditional Chinese Medicine Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100035, China; 2.Department of Dermatology, Beijing Traditional Chinese Medicine Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China

[Abstract] **Objective** To establish the fingerprint of Chushi Wan and to provide the reference for improving the quality control. **Methods** Luna Omega Polar C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used in this high performance liquid chromatography (HPLC), mobile phase: acetonitrile-0.2% phosphoric acid aqueous solution, flow rate was 1.0 ml/min, wavelength was 254 nm, column temperature was 30 ℃, injection volume was 10 μl. The HPLC chromatograms of 29 batches of Chushi Wan were determined and evaluated by the similarity evaluation system of traditional Chinese medicine chromatographic fingerprint (2012 edition) with the reference of baicalein. **Results** There were 35 common peaks in the HPLC chromatograms of 29 batches of samples, the similarity was above 0.95 and eight chromatographic peaks were identified. Cluster analysis grouped 29 batches of Chushi Wan into three groups. The seven main components in principal component analysis reflected 32 common peaks information. **Conclusion** There are some quality differences in different batches of Chushi Wan. The established fingerprint can be used to evaluate the quality of Chushi Wan.

[Key words] Chushi Wan; Fingerprint; Cluster analysis; Principal component analysis

除湿丸为首都医科大学附属北京中医医院院内制剂,由地黄、白鲜皮、茜草等中药组成,具有清热凉血,祛湿解毒的功效^[1-4]。口服,6 g/次,2 次/d。其所含的黄芩苷、黄芩素、栀子苷、连翘酯苷 A 等都具有抗炎

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81774309);北京市中医药研究所市财政专项资助课题(YJS-2022-20)。

[作者简介] 杨薇(1993-),女,硕士,主要从事中药新药制剂研发工作。

[通讯作者] 龚韬(1970-),女,硕士,副研究员;研究方向:中药新药制剂研发。孙丽蕴(1973-),女,博士,主任医师,北京中医医院皮肤科研究室主任;研究方向:日光性皮肤病、扁平苔藓、银屑病、痤疮、过敏性皮肤病。

抑菌作用^[5-13]。原质量标准仅收载了显微及薄层色谱鉴别,无法全面反映复方制剂内在质量。中药高效液相色谱法指纹图谱具有专属性高、整体性强等特点,能够弥补单一化学成分质量控制的弊端,从而对其进行质量控制^[14-20]。

1 仪器与材料

1.1 仪器

SHIMADZU SPD-M20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司);XP105DR 电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司);双量程:31/120 g,精度 0.01/0.1 mg);KX-2127QT 超声波清洗机(北京科玺世纪科技有限公司);ELGA LabWater 水纯化系统(法国威立雅水务集团)。

1.2 药品与试剂

1.2.1 对照品 连翘酯苷 A(批号:111810-201707)、黄芩苷(批号:110715-201821)、丹皮酚(批号:110708-201407)、汉黄芩苷(批号:112002-201501)、大叶茜草素(批号:110884-200604)、汉黄芩素(批号:111514-201706)对照品购自中国食品药品检定研究院;栀子苷(批号:110749-200410)、羟基茜草素(批号:111898-201101)对照品购自中国药品生物制品检定所。

1.2.2 样品 所用饮片及 29 批除湿丸样品均由首都医科大学附属北京中医医院提供,除湿丸样品批号见表 1。

1.2.3 试剂 甲醇(分析纯,北京市通广精细化工品公司);乙腈(色谱纯,赛默飞世尔科技有限公司);磷酸(色谱纯,天津市光复科技发展有限公司);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Luna Omega Polar C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.2%磷酸(B),梯度洗脱:0%~5 min, 99%B;5~70 min, 99→65%B;70~90 min, 65%→45%B;90~110 min, 45%→10%B;110~120 min, 10%B;120~130 min, 10%→99%B;130~140 min, 99%B;流速 1.0 ml/min;柱温 30 ℃;检测波长 254 nm;进样量 10 μl。

2.2 溶液的制备

精密称定除湿丸(批号:2007007)粉末 0.25 g,置 50 ml 具塞锥形瓶中,精密加入 80%甲醇 15 ml,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 30 kHz)30 min,取出,放冷,用 80%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度实验 取“2.2”项下供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件下进样 6 针,以 23 号黄芩素为参照峰(S),计算共有峰的相对保留时间和相对保留面积 $RSD \leq$

4.60%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性实验 取“2.2”项下供试品溶液,分别于 0、4、8、12、24 h 进样,以 23 号黄芩素为参照峰(S),计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积 $RSD \leq 4.56\%$,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.3 重复性实验 取同一批样品(批号:2007007)6份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定。以 23 号黄芩素为参照峰(S),计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积 $RSD \leq 3.61\%$,表明该方法重复性良好。

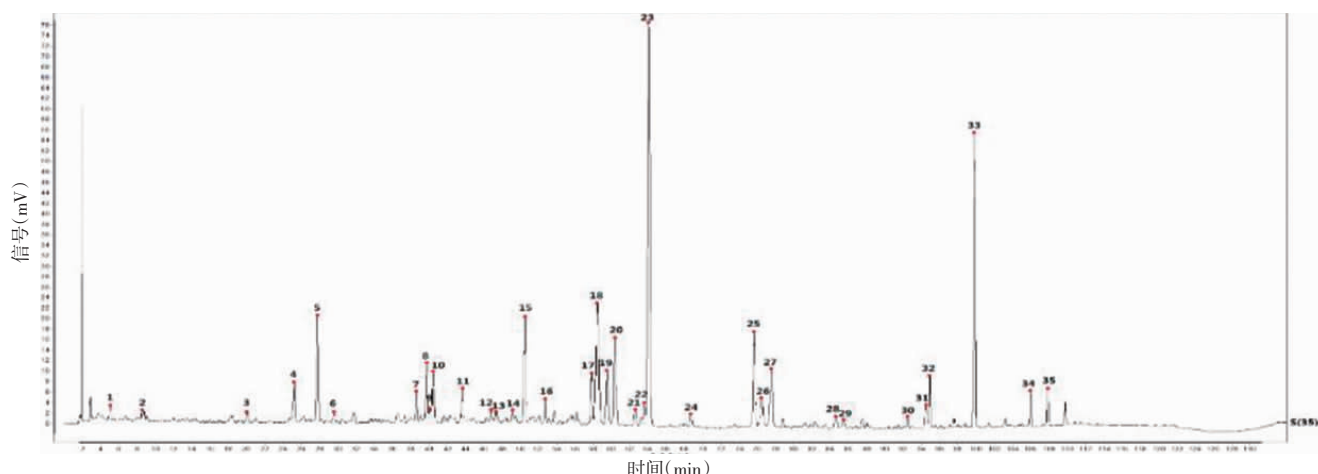
2.4 高效液相色谱法指纹图谱建立及相似度评价

将 29 批除湿丸样品按“2.2”项下方法制备,按“2.1”项下色谱条件进行色谱分析。将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”,共确定了 35 个共有峰(图 1)。29 批除湿丸样品(S1~S29)高效液相色谱法指纹图谱见图 2, S1~S29 对应批号见表 1。29 批除湿丸样品的指纹图谱相似度均 ≥ 0.973 ,表明不同批次除湿丸中主要物质群差异性小,制备工艺较稳定,形成的对照图谱能够作为衡量除湿丸制剂的标准参照物,结果见表 2。

2.5 除湿丸共有峰的归属研究及化学计量统计分析

2.5.1 共有峰的归属研究 按照“2.2”项下方法分别制备各单味药材供试品溶液,按照“2.1”项下色谱条件进行分析,对除湿丸指纹图谱进行色谱峰归属。结果显示,除湿丸指纹图谱的 35 个共有峰中 9、10、12、13、16、18、19、20、22、26、31、33 号峰来自茜草;7、10、14、15、17、18、23、25、26、27 号峰来自黄芩;2、3、4、10、11、18 号峰来自牡丹皮,18、30~35 号峰来自茯苓皮;4、5、13、18 号峰来自炒栀子;8、28、29 号峰来自连翘;18、24 号峰来自威灵仙;18、28、32 号峰来自紫草;28 号峰来自当归;18 号峰来自猪苓,结果见图 3。

2.5.2 主要色谱峰的指认 在标定的 35 个色谱峰中指认出 8 个色谱峰,其中 5 号峰为栀子苷,8 号峰为连



5: 栀子苷;8: 连翘酯苷 A;15: 黄芩苷;17: 汉黄芩苷;18: 丹皮酚;23: 黄芩素;25: 汉黄芩素;26: 羟基茜草素;33: 大叶茜草素。

图 1 除湿丸共有模式

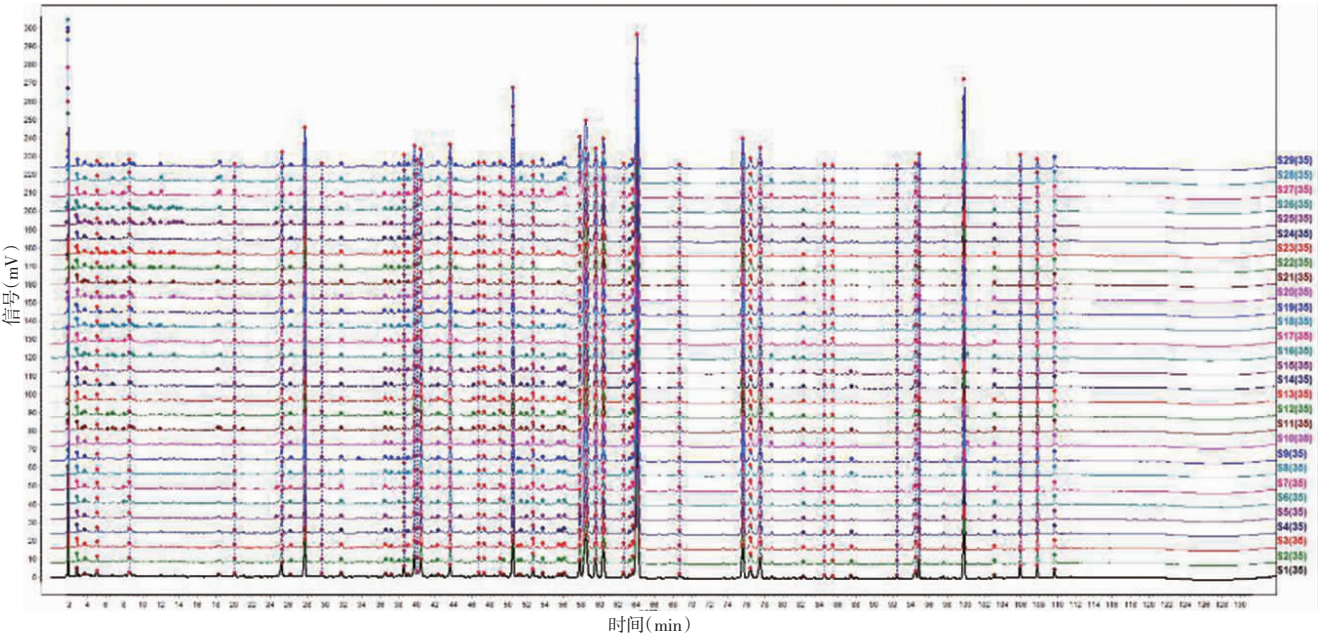


图 2 29 批除湿丸样品的高效液相色谱指纹图谱

表 1 29 批除湿丸样品批号

序号	批号	序号	批号	序号	批号	序号	批号
S1	1901054	S7	1902030	S13	1903061	S19	1904012
S2	1901057	S8	1902035	S14	1903072	S20	1904013
S3	1901061	S9	1902047	S15	1903073	S21	1904031
S4	1902012	S10	1903036	S16	1903074	S22	1904032
S5	1902018	S11	1903053	S17	1904010	S23	1904033
S6	1902019	S12	1903054	S18	1904011	S24	1904039
						S25	1904046
						S26	1904047
						S27	1912007
						S28	2007007
						S29	2007008

表 2 29 批除湿丸样品的相似度

样品号	相似度	样品号	相似度	样品号	相似度
S1	1.000	S11	0.993	S21	0.988
S2	0.999	S12	0.993	S22	0.985
S3	0.999	S13	0.989	S23	0.992
S4	0.998	S14	0.996	S24	0.987
S5	0.996	S15	0.996	S25	0.990
S6	0.996	S16	0.996	S26	0.989
S7	0.996	S17	0.986	S27	0.979
S8	0.998	S18	0.989	S28	0.974
S9	0.998	S19	0.989	S29	0.978
S10	0.996	S20	0.989		

翘酯苷 A,15 号峰为黄芩苷,17 号峰为汉黄芩苷,18 号峰为丹皮酚,23 号峰为黄芩素,25 号峰为汉黄芩素,26 号峰为羟基茜草素,33 号峰为大叶茜草素(图 4)。并选定 23 号峰为参照峰。

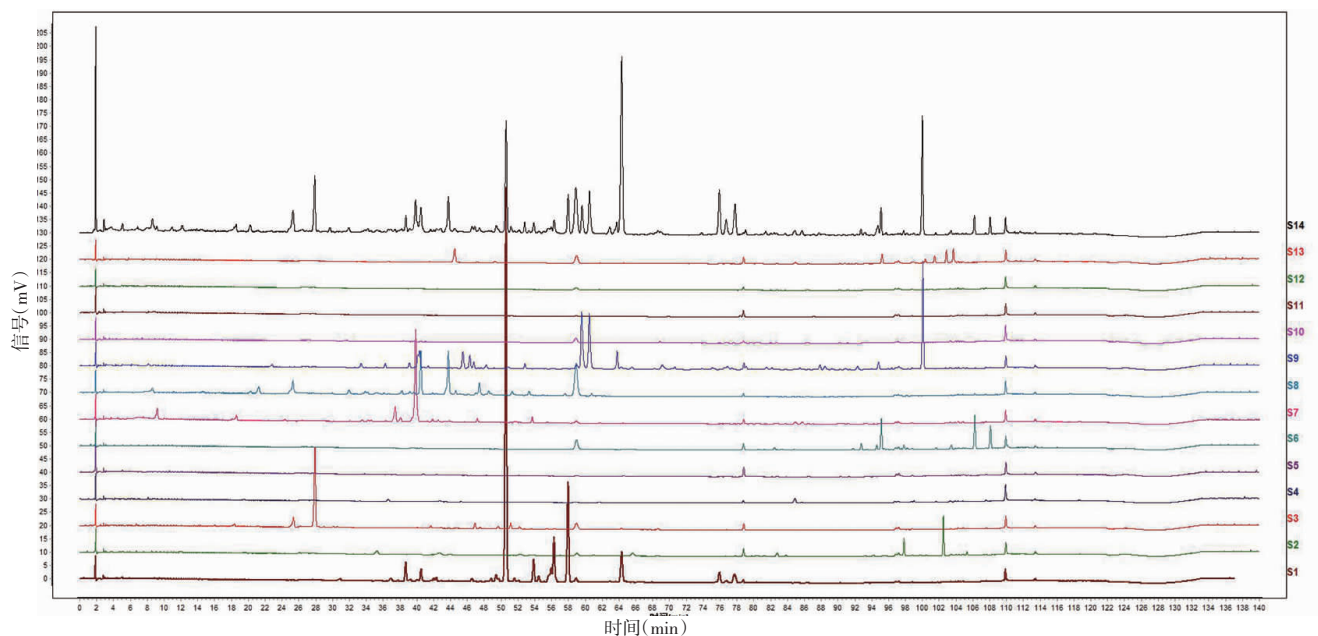
2.5.3 聚类分析 将 29 批除湿丸样品 35 个共有峰的相对峰面积输入 SPSS 22.0 软件,对样品进行系统聚类,采用组建连接法,以欧式距离为分类依据。当欧氏距离>15 时,29 批样品聚为 3 类,其中 S1~S16 聚为一类、S17~S26 聚为一类、S27~S29 聚为一类,见图 5。由聚类分析结果可以看出,除湿丸整体质量较为稳定,但不同批次除湿丸间存在差异,并与生产日期有明显相关性。

2.5.4 主成分分析 为进一步比较不同批次除湿丸质

量差异,将指纹图谱中所得的 35 个共有峰的相对峰面积导入 SPSS 22.0 软件中进行主成分分析,共 7 个成分特征值>1,具体数值分别为 13.745、5.447、5.037、3.005、2.077、1.580、1.197,是影响除湿丸质量评价的主要因子;7 个主成分因子的累计方差贡献率为 89.133%,结果见表 3。提示新变量综合信息能力强,可以在损失较少信息的前提下,减少变量,达到降维目的。旋转成分矩阵分析结果表明,第一主成分主要反映色谱峰 6、7、10、21、23~27、35 的信息;第二主成分主要反映色谱峰 5、7、8、14、15、17、24 的信息;第三主成分主要反映色谱峰 1、4、9、11、12、14、19 的信息;第四主成分主要反映色谱峰 19、20、22、28、33 的信息;第五主成分主要反映色谱峰 30、32、34 的信息;第六主成分主要反映色谱峰 31 的信息;第七主成分主要反映色谱峰 13、18 的信息。

3 讨论

共有峰归属研究中发现除湿丸制剂中黄芩苷与黄芩素在黄芩饮片中占比不同。黄芩苷作为黄芩中主要的有效成分,其含量对药效具有重要意义^[21-23]。为防止黄芩素被水解,饮片加工厂通常会进行杀酶保苷,对黄芩杀酶保苷不彻底、硫熏等都会导致黄芩素的水解^[24-27]。聚类分析结果可以明显看出不同批次除湿丸样品的分类与生产时间的相关性有密切关系,表明除湿丸的化学成分随着储存时间的长短在整体变化,需



S1~S14 依次为黄芩、白鲜皮、炒栀子、当归、地黄、茯苓、连翘、牡丹皮、茜草、威灵仙、泽泻、猪苓、紫草、除湿丸样品。

图3 单味饮片及除湿丸物质基准相关性色谱图

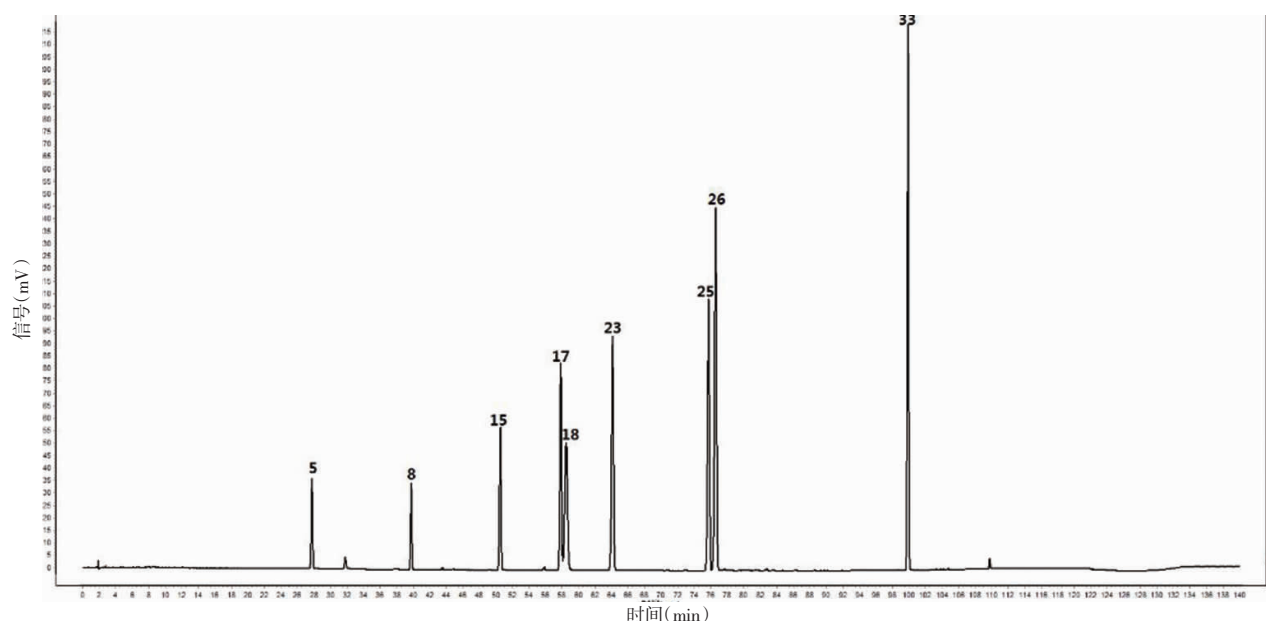


图4 混合对照品色谱图

对其贮存的时间、温度、湿度等条件进行进一步研究。指纹图谱结合聚类分析、主成分分析等方法可全面评价除湿丸的质量,为除湿丸质量控制提供参考依据。

利益冲突声明: 本文所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 北京中医医院.赵炳南临床经验集[M].北京:人民卫生出版社,1975:298.
- [2] 曾祖平,王宏,钱珊,等.除湿丸的质量标准研究[J].中国药房,2015,26(24):3395-3398.
- [3] 周德勇,龚韬,杨薇,等.除湿丸质量评价方法研究[J].中国药业,2021,30(20):57-60.
- [4] 毕武,吴姣娇,王彦超,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定黄芩组方化妆品中黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素含量[J].香料香精化妆品,2023,(2):50-53,84.
- [5] 龚发萍,郑鸣.黄芩的化学成分及药理作用[J].临床合理用药杂志,2021,14(34):176-178.
- [6] 王昀,汤倩,齐丹.炮制方法对黄芩中黄芩苷及黄芩素含量的影响[J].临床合理用药,2023,16(22):130-133.
- [7] 邵鸿基.中药炮制与用法在临床应用对治疗效果的影响[J].中医临床研究,2019,11(27):137-138.
- [8] 周晓鹰,陈洁,金柳,等.白鲜皮的药理作用及抗炎活性成分研究进展[J].常州大学学报(自然科学版),2018,30(1):82-86.
- [9] 卜妍红,陆婷,吴虹,等.栀子化学成分及药理作用研究进展[J].安徽中医药大学学报,2020,39(6):89-93.
- [10] 刘晓金,李子静,房绍龙,等.连翘化学成分及药理作用的研究[J].山东医学高等专科学校学报,2021,43(4):

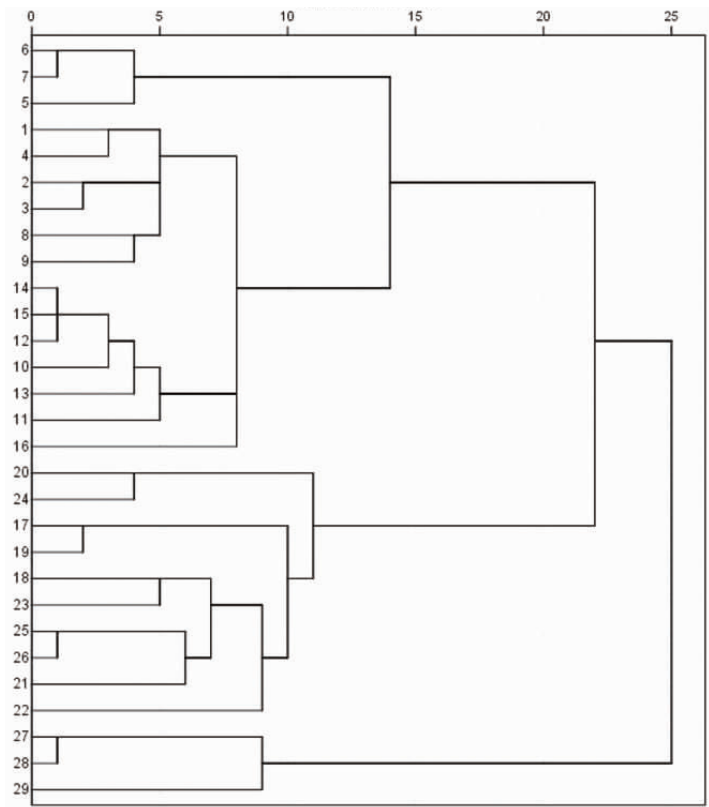


图 5 29 批除湿丸聚类分析树状图

表 3 特征值和累积贡献率

序号	合计	方差(%)	累积(%)
1	13.745	38.181	38.181
2	5.447	15.130	53.311
3	5.037	13.991	67.302
4	3.005	8.346	75.648
5	2.077	5.769	81.418
6	1.580	4.390	85.808
7	1.197	3.326	89.133

308–309.

[11] 景奉堂,李峰,张天屹,等.连翘的化学成分与生物活性的最新研究进展[J].中药材,2023,46(1):242–251.

[12] 翟春梅,孟祥瑛,付敬菊,等.牡丹皮的现代药学研究进展[J].中医药信息,2020,37(1):109–114.

[13] 张树蓉,赵宏苏,佟沫儒,等.牡丹皮化学成分、药理作用及其质量标志物(Q–Marker)的预测分析[J].中草药,2022,53(16):5215–5224.

[14] 于颖超,倪健,高利利,等.芪箭颗粒的高效液相色谱指纹图谱研究[J].中南药学,2020,18(2):231–234.

[15] 巨珊珊,李耀磊,林志健,等.中药质量控制模式的现状分析与思考[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(18):269–274.

[16] 涂兴明,吴涵,吴康郁.中药指纹图谱的研究与应用[J].海峡药学,2016,28(5):1–3.

[17] 李强,李超.中药指纹图谱研究综述[J].齐鲁药事,2010,29(3):158–161.

[18] 刘小瑜,吕圭源,俞景华.指纹图谱在中药研究中的应用概况[J].天津药学,2006,18(1):46–48.

[19] Haoran D,Hui C,Bing X,*et al.* Citric Acid Changes the Fingerprint of Flavonoids and Promotes Their Accumulation in *Phellinus igniarius* (L.) Quél [J]. Life,2022,13(1):68.

[20] Chunlu L,Furong X,Zhitian Z,*et al.* Network pharmacology and fingerprint for the integrated analysis of mechanism, identification and prediction in *Panax notoginseng* [J]. Phytochem Anal,2023,34(7):772–787.

[21] 李伟,徐伟.黄芩苷药理作用研究进展[J].中西医结合研究,2022,14(3):193–196.

[22] 吴缠婷,周良良,邹婉清,等.黄芩苷的药理特性及其作用机制研究进展[J].中华中医药学刊,2022,40(2):63–67.

[23] 朱亚南,杨七妹,张硕,等.黄芩苷与黄芩素药理作用及机制研究进展[J].时珍国医国药,2020,31(4):921–925.

[24] 文晋,朱永红,李换丽,等.黄芩产量和质量的关键影响因素研究进展[J].南方农业,2023,17(3):122–125,129.

[25] 韩喜桃,唐雅楠,刘子琴,等.不同加工方法的“杀酶保苷”作用及对黄芩片质量的影响[J].中华中医药杂志,2022,37(1):120–124.

[26] 孙倩男,张建平,渠晓艳,等.粘毛黄芩质量标准提高研究[J].中国医药导报,2023,20(3):24–28.

[27] 葛秀允,辛华,武卫红,等.Box–Behnken 设计 – 效应面法优选黄芩饮片产地炮制加工关键技术研究[J].中国医药科学,2021,11(21):75–78.

(收稿日期:2023–05–18)