

羚羊清肺丸 HPLC 指纹图谱建立及 6 种成分测定

王凤丽, 针涛, 魏岚, 孙立新*
(沈阳药科大学药学院, 辽宁 本溪 117004)

摘要: 目的 建立羚羊清肺丸 HPLC 指纹图谱, 并测定黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、异绿原酸 A、丹皮酚的含量。方法 该药物 70% 甲醇提取液的分析采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相水 (含 0.1% 甲酸) -乙腈 (含 25% 甲醇), 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 260 nm。聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘判别分析进行化学模式识别。结果 22 批样品指纹图谱中有 30 个共有峰, 相似度均大于 0.970, 归属于 11 种药材, 指认出 14 个。各批样品聚为 2 类, 组间差异化合物有 11 个。6 种成分在各自范围内线性关系良好 ($r \geq 0.9994$), 平均加样回收率 96.9%~102.7%, RSD 1.8%~3.7%。结论 该方法简便, 重复性好, 可用于羚羊清肺丸的质量控制。

关键词: 羚羊清肺丸; HPLC 指纹图谱; 化学成分; 聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘判别分析

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2023)06-1781-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.006

Establishment of HPLC fingerprints and determination of six constituents for Lingyang Qingfei Pills

WANG Feng-li, ZHEN Tao, WEI Lan, SUN Li-xin*
(College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Benxi 117004, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the HPLC fingerprints for Lingyang Qingfei Pills, and to determine the contents of baicalin, baicalein, wogonoside, wogonin, isochlorogenic acid A, paeonol. **METHODS** The 70% methanol extract of this drug was performed on a 30 °C thermostatic Diamonsil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of water (containing 0.1% formic acid) -acetonitrile (containing 25% methanol) flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 260 nm. Cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis were adopted in chemical pattern recognition. **RESULTS** There were thirty common peaks in the fingerprints for twenty-two batches of samples with the similarities of more than 0.970, which belonged to eleven medicinal materials, and fourteen of them were identified. Various batches of samples were clustered into two categories, and eleven differential compounds between groups were found. Six constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.9994$), whose average recoveries were 96.9% - 102.7% with the RSDs of 1.8% - 3.7%. **CONCLUSION** This simple and reproducible method can be used for the quality control of Lingyang Qingfei Pills.

KEY WORDS: Lingyang Qingfei Pills; HPLC fingerprints; chemical constituents; cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares discriminant analysis

收稿日期: 2022-01-07

基金项目: 辽宁省教育厅“辽宁特聘教授滚动支持项目”(辽教函[2018]35号)

作者简介: 王凤丽(1997—),女,硕士,研究方向为药物分析。Tel: (024) 43520599, E-mail: wfl01252021@163.com

* 通信作者: 孙立新(1967—),女,博士,教授,研究方向为药物分析。Tel: (024) 43520599, E-mail: slx04@163.com

羚羊清肺丸为2020年版《中国药典》一部收载的中药复方制剂,由浙贝母、蜜桑白皮、黄芩、金银花、牡丹皮、羚羊角粉等24味中药组成,具有清肺利咽、清瘟止嗽之功效^[1],临床用于治疗咳嗽、咽喉肿痛、肺胃热盛等症,该制剂药味众多,成分复杂,但目前其质量标准比较简单,如翟卫民等^[2]采用TLC法对金银花、大黄进行定性鉴别,姜清华等^[3]建立容量分析法结合显微定量法对羚羊角所含成分进行含量测定;2020年版《中国药典》仅以金银花中绿原酸含量为指标。因此,本实验建立羚羊清肺丸HPLC指纹图谱,并同时测定黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、异绿原酸A、丹皮酚的含量,再采用聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘判别分析对指纹图谱数据信息进行挖掘,快速筛选质量差异成分,以期为该制剂批次间稳定性和质量评价研究提供参考^[4]。

1 材料

1.1 仪器 LC-20A型高效液相色谱仪(日本岛津公司);RPL-D2000型柱温箱(大连日普利科技仪器有限公司);TG332A型微量分析天平(湖南湘仪天平仪器设备有限公司);KQ5200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);TGL-16型高速离心机(江苏金坛市中大仪器厂)。

1.2 试剂与药物 黄芩苷(批号Z28S11X125952)、汉黄芩苷(批号A09GB144759)、黄芩素(批号C06M11Y112461)、汉黄芩素(批号T11J11R108209)、丹皮酚(批号L15D9D77791)、绿原酸(批号Y20A11K111541)、异绿原酸A(批号P11D11L134209)、橙皮苷(批号K09S11L123847)、川陈皮素(批号N07A11R120663)对照品均购自上海源叶生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$;5-羟甲基糠醛(批号HH248894198)对照品购自宝鸡市辰光生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$;尿苷(批号830F043,Em ≥ 10 100)对照品购自北京索莱宝生物科技有限公司;隐绿原酸(批号Y-067-180425)、獐牙菜苷(批号Z-009-180929)对照品均购自成都瑞芬思生物科技有限公司,纯度 $> 98\%$;栀子苷(批号110749-200714)对照品购自中国食品药品检定研究院,纯度 $\geq 98\%$ 。22批羚羊清肺丸收集于2个生产厂家,均为大蜜丸(6g/丸),其中12批来自厂家A,批号18010419、18010455、18010458、18010568、18013425、19010076、19010180、19010181、19010182、19010183、19010184、19010185,编号A1~A12;10批来自厂家B,批号

121030、121031、121032、121035、121036、121037、121038、121039、121040、121041,编号B1~B10。甲酸、乙腈、甲醇均为色谱纯;水为纯净水,购自杭州娃哈哈集团有限公司。

2 方法与结果

2.1 HPLC指纹图谱建立及化学模式分析

2.1.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相水(含0.1%甲酸)(A)-乙腈(含25%甲醇)(B),梯度洗脱(0~15 min, 4%~13% B; 15~35 min, 13%~20% B; 35~100 min, 20%~35% B; 100~133 min, 35%~53% B; 133~138 min, 53%~82% B; 138~150 min, 82%~85% B);体积流量1.0 mL/min;柱温30 $^{\circ}$ C;检测波长260 nm;进样量20 μ L。

2.1.2 供试品溶液制备 取本品约2.0 g,精密称定,加入2 g硅藻土,研细,置于50 mL具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇20 mL,称定质量,超声处理30 min,放冷,70%甲醇补足减失的质量,摇匀,离心,取上清液,0.45 μ m微孔滤膜过滤,即得。

2.1.3 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量,70%甲醇制成分别含尿苷3.28 μ g/mL、5-羟甲基糠醛12.2 μ g/mL、绿原酸22.5 μ g/mL、隐绿原酸8.25 μ g/mL、栀子苷18.0 μ g/mL、獐牙菜苷5.00 μ g/mL、异绿原酸A 7.50 μ g/mL、橙皮苷8.25 μ g/mL、黄芩苷34.2 μ g/mL、汉黄芩苷25.0 μ g/mL、丹皮酚14.2 μ g/mL、黄芩素17.5 μ g/mL、汉黄芩素17.8 μ g/mL、川陈皮素9.25 μ g/mL的溶液,即得。

2.1.4 单味药材溶液制备 将除羚羊角粉以外的23味药材粉碎成细粉,过筛,根据处方比例称取适量,按“2.1.2”项下方法制备,即得。

2.1.5 阴性样品溶液制备 按处方比例和制备工艺,分别制成缺黄芩、缺金银花、缺牡丹皮、缺栀子、缺陈皮、缺枇杷叶、缺石斛、缺大青叶和板蓝根、缺熟大黄、缺熟大黄和玄参,以及缺金银花、牡丹皮和枇杷叶的阴性样品,按“2.1.2”项下方法制备,即得。

2.1.6 参照峰选择 色谱图显示,保留时间69.5 min处的色谱峰分离度良好,峰面积较大,保留时间适中,与对照品比对后发现它为黄芩苷,也是君药黄芩的主要成分之一,故选择其作为参照峰。

2.1.7 精密度试验 取同一批样品(B7),按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1.1”

项色谱条件下进样测定6次,测得各共有峰相对保留时间RSD为0.04%~1.0%,相对峰面积RSD为0.39%~3.0%,表明仪器精密度良好。

2.1.8 重复性试验 取同一批样品(B7),按“2.1.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定,测得各共有峰相对保留时间RSD为0.08%~0.30%,相对峰面积RSD为0.82%~3.0%,表明该方法重复性良好。

2.1.9 稳定性试验 取同一批样品(B7),按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,室温下于0、3、6、9、12、24 h在“2.1.1”项色谱条件下进样测定,测得各共有峰相对保留时间RSD为0.03%~0.54%,相对峰面积RSD为1.1%~3.0%,表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.1.10 聚类分析 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定,建立22×30共有峰峰面积矩阵,导入SPSS 22.0软件中,先进行数据标准化处理,再采用Ward连接法,以平方欧式距离为测度进行聚类分析,结果见图1。由此可知,当类间距为15时,22批样品聚为2类,第1类为A1~A12、B1~B7,共19批;第2类为B8~B10,共3批,而为10时,第1类又可聚为2类,分别为A1~A5、A11及A6~A10、A12、B1~B7,表明同一厂家样品之间有所差异,但不同厂家样品之间差异不明显,即不能以厂家为分类方式。

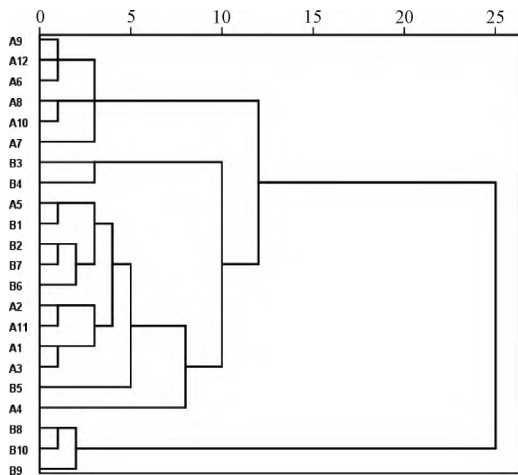
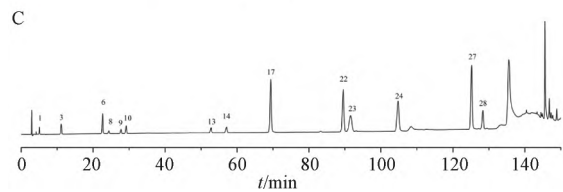
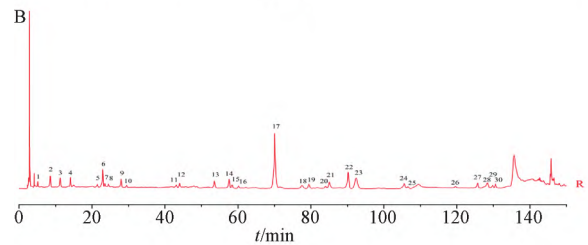
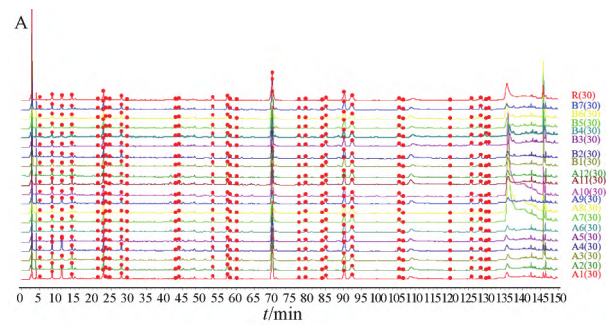


图1 聚类分析图

Fig. 1 Cluster analysis diagram

2.1.11 图谱生成和共有峰指认 根据聚类分析结果,将第1类19批样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”,采用中位数法,设定时间窗为0.1 min, A1为参照图谱,构建共有模式图

谱,共标定30个共有峰,经多点校正后生成对照指纹图谱,见图2A、2B。取“2.1.3”项下对照品溶液适量,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定,共指认出14个化合物,分别为尿苷、5-羟甲基糠醛、绿原酸、隐绿原酸、栀子苷、獐牙菜苷、异绿原酸A、橙皮苷、黄芩苷、汉黄芩苷、丹皮酚、黄芩素、汉黄芩素、川陈皮素,见图2C。



1. 尿苷 3. 5-羟甲基糠醛 6. 绿原酸 8. 隐绿原酸 9. 栀子苷
10. 獐牙菜苷 13. 异绿原酸A 14. 橙皮苷 17. 黄芩苷
22. 汉黄芩苷 23. 丹皮酚 24. 黄芩素 27. 汉黄芩素 28. 川陈皮素
1. uridine 3. 5-hydroxymethylfurfural 6. chlorogenic acid
8. cryptochlorogenic acid 9. geniposide 10. sweroside
13. isochlorogenic acid A 14. hesperidin 17. baicalin
22. wogonoside 23. paeonol 24. baicalein 27. wogonin
28. nobiletin

图2 19批样品共有模式色谱图(A)、对照指纹图谱(B)、对照品色谱图(C)

Fig. 2 Common pattern chromatogram (A), control fingerprint (B) and reference substance chromatogram (C) of nineteen batches of samples

2.1.12 相似度评价 第1类19批样品A1~A12、B1~B7与对照指纹图谱的相似度分别为0.993、0.997、0.996、0.991、0.997、0.994、0.991、0.995、0.997、0.995、0.997、0.994、0.996、0.993、0.994、0.992、0.998、0.998、0.997;第

2类3批样品 B8、B9、B10 有所降低,分别为 0.979、0.972、0.971,总体上均大于 0.97,表明不同批次样品质量稳定均一。

2.1.13 药味归属 取“2.1.4”项下单味药材溶液、“2.1.5”项下阴性样品溶液各 20 μL ,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定,通过比对保留时间、最大吸收波长来对共有峰进行药味归属,结果见图 3。由此可知,30 个共有峰归属于 11 种药材,其中峰 11、12、17 (黄芩苷)、19、20、21、22 (汉黄芩苷)、24 (黄芩素)、27 (汉黄芩素)、29、30 为黄芩特有成分,对共有峰的贡献最大;峰 8 (隐绿原酸)、10 (獐牙菜苷)、13 (异绿原酸 A)、15、16 为金银花特有成分;峰 2、5、23 (丹皮酚) 为牡丹皮特有成分;峰 7、9 (栀子苷) 为栀子特有成分;峰 14 (橙皮苷)、28 (川陈皮素) 为陈皮特有成分;峰 3 (5-羟甲基糠醛)、4 为蜜枇杷叶特有成分;峰 25 为石斛特有成分;峰 26 为熟大黄特有成分;峰 1 (尿苷) 为大青叶、板蓝根共有成分;峰 18 为熟大黄、玄参共有成分;峰 6 (绿原酸) 为金银花、牡丹皮、蜜枇杷叶共有成分,表明各成分均具有可溯源性。

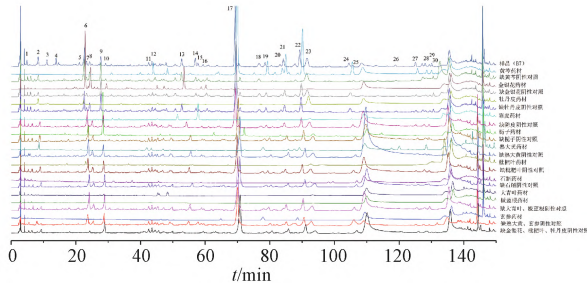


图 3 各药材 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of various medicinal materials

2.1.14 主成分分析 测定 22 批样品 HPLC 指纹图谱共有峰的相对保留时间、相对峰面积,发现除了参照峰以外前者 RSD 为 0.1%~1.8%,后者 RSD 为 4.8%~61.8%。为了观察引起组间差异的成分,首先采用无监督模式的主成分分析使样品自由聚集,以共有峰峰面积为变量,建立 22 \times 30 数据矩阵,导入 SIMCA14.1 软件,结果见图 4,可知 22 批样品均在 95% 置信区间内,其中 A1、A5、B1~B7 分布相对集中,B8~B10 分布相对集中,A2~A4、A6~A12 分布相对集中,与聚类分析结果基本一致。载荷图见图 5,可知峰 4、5、16、13 (异绿原酸 A)、8 (隐绿原酸) 对主成分 1 的贡献较大,色谱峰 14、25 (黄芩素)、28 (川陈皮素)

对主成分 2 的贡献较大,即为影响组间差异的主要成分。

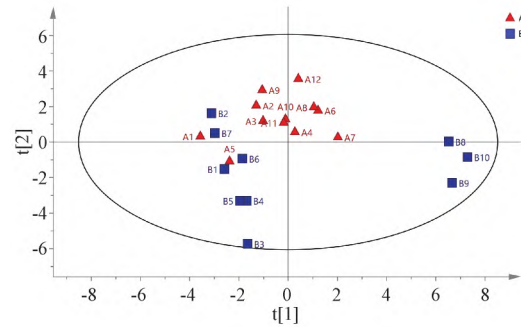


图 4 主成分分析得分图

Fig. 4 Score plot for principal component analysis

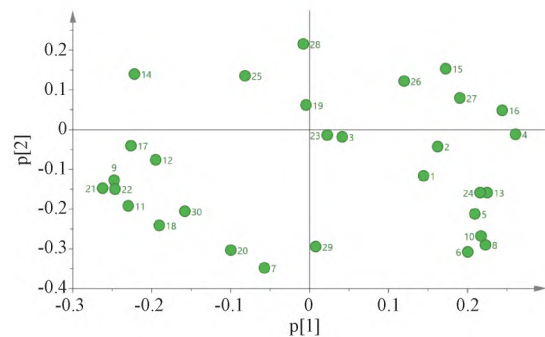


图 5 主成分分析载荷图

Fig. 5 Loading plot for principal component analysis

2.1.15 正交偏最小二乘判别分析 为了进一步找出影响组间差异的成分,建立有监督的正交偏最小二乘判别分析,发现模型参数 ($R^2X = 0.904$, $R^2Y = 0.922$, $Q^2 = 0.516$) 均大于 0.5,表明其预测能力、稳定性均较好,结果见图 6,可知 22 批样品可分为 2 类,与聚类分析结果基本一致。再采用变量重要性投影值 (VIP 值) 筛选差异成分,以 VIP 值 > 1 为条件共筛选出 11 个化合物,见图 7,按数值大小排序依次为 6 号峰 (绿原酸)、8 号峰 (隐绿原酸)、3 号峰 (5-羟甲基糠醛)、17 号峰 (黄芩苷)、24 号峰 (黄芩素)、29 号峰 (未知)、28 号峰 (川陈皮素)、13 号峰 (异绿原酸 A)、18 号峰 (未知)、9 号峰 (栀子苷)、14 号峰 (橙皮苷),均为引起不同厂家样品质量差异的主要成分,故在生产过程中应控制其含量以保证产品安全有效。

2.2 各成分含量测定

2.2.1 色谱条件 同“2.1.1”项。

2.2.2 供试品溶液制备 同“2.1.2”项。

2.2.3 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量,置于 10 mL 棕色量瓶中,甲醇溶解,70% 甲醇定容

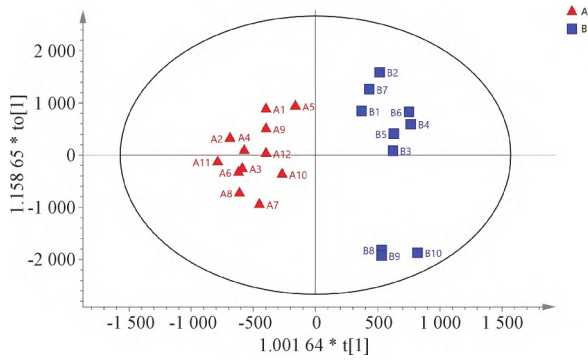


图6 正交偏最小二乘判别分析得分图

Fig. 6 Score plot for orthogonal partial least squares-discriminant analysis

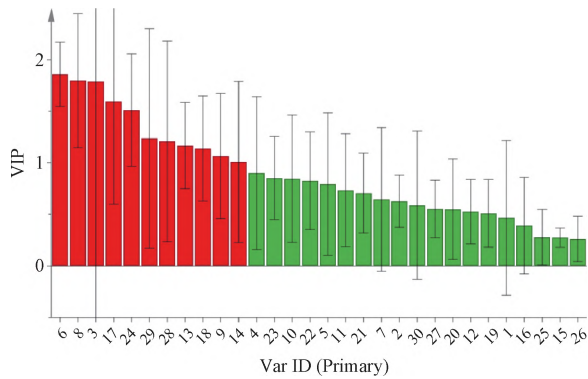


图7 正交偏最小二乘判别分析VIP图

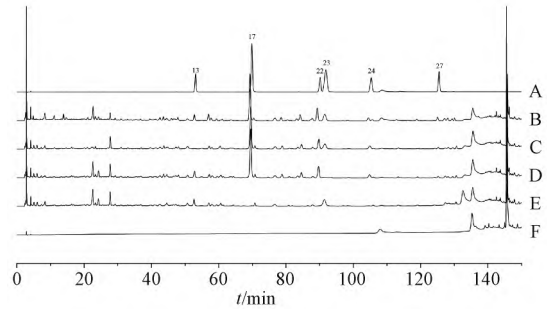
Fig. 7 VIP plot for orthogonal partial least squares-discriminant analysis

至刻度, 即得 (含黄芩苷 0.997 mg/mL、汉黄芩苷 0.205 mg/mL、黄芩素 0.240 mg/mL、汉黄芩素 0.197 mg/mL、丹皮酚 0.588 mg/mL、异绿原酸 A 0.633 mg/mL)。

2.2.4 阴性样品溶液制备 按照处方比例及制备工艺, 分别制成缺黄芩、缺牡丹皮、缺金银花的阴

性样品, 按“2.1.2”项下方法制备, 即得。

2.2.5 专属性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液、“2.2.3”项下对照品溶液、“2.2.4”项下阴性样品溶液、空白溶剂适量, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定, 结果见图8。由此可知, 阴性样品溶液、空白溶剂无干扰, 表明该方法专属性良好。



注: A~F 分别为对照品溶液、供试品溶液 (B7)、缺金银花阴性样品溶液、缺牡丹皮阴性样品溶液、缺黄芩阴性样品溶液、空白溶剂。

13. 异绿原酸 A 17. 黄芩苷 22. 汉黄芩苷 23. 丹皮酚
24. 黄芩素 27. 汉黄芩素

13. isochlorogenic acid A 17. baicalin 22. wogonoside

23. paeonol 24. baicalein 27. wogonin

图8 各成分HPLC色谱图

Fig. 8 HPLC chromatograms of various constituents

2.2.6 线性关系考察 精密量取“2.2.3”项下对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.0、1.5 mL, 置于 5 mL 棕色量瓶中, 70% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定。以各成分质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归, 并以信噪比 $S/N \geq 10$ 为定量限, 结果见表1, 可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
异绿原酸 A	$Y=8.280 \times 10^5 X - 6.975 \times 10^4$	0.999 8	12.66~189.9	1.421
黄芩苷	$Y=1.619 \times 10^6 X - 1.367 \times 10^5$	0.999 8	19.94~299.1	0.645 7
汉黄芩苷	$Y=2.689 \times 10^6 X - 3.069 \times 10^4$	0.999 7	4.100~61.50	0.368 0
丹皮酚	$Y=2.390 \times 10^6 X - 6.135 \times 10^4$	0.999 8	11.76~176.4	0.608 7
黄芩素	$Y=2.942 \times 10^6 X - 1.465 \times 10^5$	0.999 4	4.800~72.00	0.635 8
汉黄芩素	$Y=3.453 \times 10^6 X - 3.502 \times 10^4$	0.999 9	3.940~59.10	0.217 7

2.2.7 精密度试验 取“2.2.6”项下对照品溶液 (异绿原酸 A、黄芩苷、汉黄芩苷、丹皮酚、黄芩素、汉黄芩素质量浓度分别为 25.32、39.88、8.20、23.52、9.60、7.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 适量, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得异绿

原酸 A、黄芩苷、汉黄芩苷、丹皮酚、黄芩素、汉黄芩素峰面积 RSD 分别为 0.60%、0.96%、0.84%、1.1%、1.4%、1.1%, 表明仪器精密度良好。

2.2.8 重复性试验 取本品 (B7) 适量, 按

“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,在“2.2.1”项色谱条件下进样测定,测得异绿原酸A、黄芩苷、汉黄芩苷、丹皮酚、黄芩素、汉黄芩素含量RSD分别为3.9%、1.8%、2.0%、1.8%、3.9%、3.3%,表明该方法重复性良好。

2.2.9 稳定性试验 取供试品溶液(B7)适量,于0、3、6、9、12、24 h在“2.2.1”项色谱条件下进样测定,测得异绿原酸A、黄芩苷、汉黄芩苷、丹皮酚、黄芩素、汉黄芩素峰面积RSD分别为3.3%、1.4%、1.3%、0.94%、1.9%、0.99%,表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.2.10 加样回收率试验 取各成分含量已知的本品(B7)约1.0 g,共6份,精密称定,按100%

水平加入对照品溶液4 mL(含异绿原酸A 0.342 4 mg、黄芩苷 1.368 mg、汉黄芩苷 0.211 2 mg、丹皮酚 0.326 4 mg、黄芩素 0.110 4 mg、汉黄芩素 0.006 4 mg),再加入70%甲醇16 mL,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.2.1”项色谱条件下进样测定,计算回收率。结果,异绿原酸A、黄芩苷、汉黄芩苷、丹皮酚、黄芩素、汉黄芩素平均加样回收率分别为99.8%、97.0%、96.9%、102.7%、98.5%、98.0%,RSD分别为2.3%、1.8%、2.4%、2.4%、2.3%、3.7%。

2.2.11 样品含量测定 取22批样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.2.1”项色谱条件下进样测定,结果见表2。

表2 各成分含量测定结果(mg/g)

Tab. 2 Results of content determination of various constituents (mg/g)

编号	异绿原酸 A	黄芩苷	汉黄芩苷	丹皮酚	黄芩素	汉黄芩素
A1	0.295 7	1.394 7	0.257 1	0.263 6	0.100 8	0.052 1
A2	0.320 5	1.328 0	0.233 5	0.285 5	0.081 7	0.057 5
A3	0.330 8	1.251 8	0.218 0	0.282 9	0.097 2	0.054 1
A4	0.267 5	1.157 7	0.205 1	0.242 1	0.063 4	0.051 1
A5	0.327 5	1.411 0	0.267 4	0.267 4	0.074 7	0.053 7
A6	0.293 7	1.228 1	0.217 0	0.318 9	0.091 5	0.068 8
A7	0.331 1	1.343 0	0.225 1	0.395 8	0.151 5	0.074 8
A8	0.341 6	1.372 6	0.226 1	0.339 2	0.152 9	0.074 1
A9	0.286 1	1.317 9	0.230 2	0.300 7	0.093 1	0.063 2
A10	0.326 8	1.346 4	0.236 4	0.269 8	0.144 5	0.064 8
A11	0.317 3	1.3730	0.243 3	0.260 6	0.106 4	0.064 6
A12	0.298 5	1.244 9	0.211 7	0.346 1	0.093 5	0.067 7
B1	0.337 2	1.420 7	0.269 5	0.273 7	0.098 6	0.052 1
B2	0.298 8	1.240 8	0.244 5	0.267 5	0.076 3	0.060 1
B3	0.311 1	1.327 3	0.261 0	0.327 2	0.134 4	0.063 3
B4	0.355 7	1.240 6	0.226 3	0.311 9	0.115 9	0.051 1
B5	0.334 7	1.528 3	0.272 1	0.321 0	0.144 7	0.066 0
B6	0.350 6	1.259 2	0.229 7	0.301 0	0.103 3	0.050 4
B7	0.335 3	1.363 0	0.258 2	0.305 4	0.105 4	0.054 3
B8	0.419 6	1.100 5	0.199 7	0.271 1	0.156 1	0.065 8
B9	0.398 6	1.116 9	0.202 4	0.276 8	0.158 0	0.068 6
B10	0.428 7	1.105 8	0.200 8	0.294 2	0.185 6	0.068 2

3 讨论

3.1 样品提取方式、色谱条件考察 本实验分别考察了不同提取溶剂、提取方式、提取时间、料液比、流动相体系、水相添加剂、检测波长、柱温对色谱峰数量、分离情况的影响,最终确定样品提取方式为20 mL 70%甲醇超声处理30 min,以乙腈(含25%甲醇)-水(含0.1%甲酸)为流动相,梯度洗脱,检测波长260 nm,柱温30 ℃,此时各成分色谱峰分离度、峰形良好,基线平稳。

3.2 HPLC 指纹图谱建立和化学模式识别分析

22批羚羊清肺丸HPLC指纹图谱中有30个共有峰,可分为2类,第1类为全部A厂家样品A1~A12和部分B厂家样品B1~B7,共19批;第2类为B厂家样品B8~B10,共3批,表明同一厂家样品之间有差异,而不同厂家样品之间差异不明显。各批样品相似度均大于0.97,表明其质量较稳定均一。经对照品比对,指认出14种成分,覆盖处方中君药、臣药、佐药,均具有良好的解热、抗炎作用^[5-14],可能是药效物质。另外,30个共有峰归属于11种药材,表明成分溯源性良好。

将PCA、OPLS-DA与指纹图谱数据结合后,快速筛选出绿原酸、隐绿原酸、5-羟甲基糠醛、黄芩苷、黄芩素、川陈皮素、异绿原酸A、栀子苷、橙皮苷等组间差异成分,其中22批样品中异绿原酸A、黄芩苷、黄芩素含量变化范围分别为1.6、1.4、2.9倍,印证模型预测的可靠性,可用于组间差异成分的分析。但除了羚羊角粉外,羚羊清肺丸中另一味君药蜜桑白皮特征成分桑皮苷A在色谱图中未找到对应峰,可能与其含量较低有关。另外,使药甘草成分众多,前期曾以甘草苷、甘草素对照品进行比对,但仍未成功指认出,可能是因为处方中该药材比例较小所致,后期可对提取方式进一步改进或采用LC-MS法作进一步研究。

3.3 含量测定成分选择 羚羊清肺丸由24味中药组成,具有清热润肺、止咳化痰之功效^[15]。本实验基于HPLC指纹图谱中各成分色谱峰的分离情况,对分离度满足定量要求者进行含量测定,发现合格的有6种,其中黄芩苷、异绿原酸A、黄芩素为OPLS-DA预测出的差异成分,汉黄芩苷、汉黄芩素为君药黄芩中成分,丹皮酚为臣药牡丹皮中成分,均具有良好的解热、抗炎作用。另外,方中干扰成分较多,9种差异成分中黄芩苷、异绿原酸A、黄芩素的分离度均大于1.5,而其余均小于1.5,故未进行含量测定。最终,以黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、异绿原酸A、丹皮酚为羚羊清肺丸质量控制指标。

4 结论

本实验建立羚羊清肺丸HPLC指纹图谱,并同时测定黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、异绿原酸A、丹皮酚的含量,再采用化学模式分析筛选出不同批次样品之间的差异成分,该方法准确可靠,重复性好,可用于该制剂的质量评价。今后,将进一步优化色谱条件来对羚羊清肺丸组间差异成分进行含量测定。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1648.
- [2] 翟为民, 张学著. 采用薄层色谱法用于羚羊清肺丸定性鉴别[J]. 中国药品标准, 2000, 1(1): 40-41.
- [3] 姜清华, 翟延君, 王荣祥. 羚羊清肺丸中羚羊角的显微定量研究[J]. 中药材, 2004, 27(2): 90-91.
- [4] 张艳欣, 吴佩颖, 王丹丹. 中药指纹图谱中常用的数理统计方法[J]. 上海医药, 2019, 40(9): 74-77.
- [5] 姜希红, 刘树民. 黄芩药理作用及其化学物质基础研究[J]. 中国药师, 2020, 23(10): 2004-2010.
- [6] 曾安琪, 华桦, 陈朝荣, 等. 金银花、山银花抗炎药理作用研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(16): 3938-3944.
- [7] 刘征辉, 徐石勇, 赵琳琳, 等. 金银花中抗炎活性成分獐牙菜苷和獐牙菜苦苷定量方法的研究[J]. 中国现代中药, 2016, 18(3): 321-325.
- [8] 赵燕, 杨扶德. 栀子苷药理作用及其作用机制研究进展[J]. 甘肃中医药大学学报, 2021, 38(4): 89-92.
- [9] 黄潇, 刘婧, 吴建华, 等. 基于灰色关联法分析栀子提取物抗炎作用谱效关系[J]. 中成药, 2020, 42(1): 233-237.
- [10] 闫文莉. 陈皮中黄酮类有效成分的提取方法分析[J]. 河南医学研究, 2018, 27(12): 2188-2190.
- [11] 杨雪竹, 张浩, 崔西玉, 等. 川陈皮素抑制胃癌SGC-7901细胞侵袭能力的机制探讨[J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(18): 3099-3104.
- [12] 蒋丽丽, 张彦龙, 王春杰, 等. 牡丹皮中有效成分丹皮酚的药理活性研究进展[J]. 现代诊断与治疗, 2016, 27(22): 4223-4224.
- [13] Evaldsson C, Rydén I, Uppugunduri S. Anti-inflammatory effects of exogenous uridine in an animal model of lung inflammation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(8): 1025-1032.
- [14] 顾海, 江亚兵, 姜海英, 等. 5-羟甲基糠醛对过氧化氢诱导的凋亡海马神经细胞BCL-2、NF- κ B表达的影响[J]. 中药材, 2011, 34(11): 1753-1756.
- [15] 陈开娟, 董雪芬. 羚羊清肺丸联用头孢呋辛治疗呼吸道感染的疗效观察[J]. 海峡药学, 2013, 25(2): 168-169.