

基于 HPLC 指纹图谱的浙贝母质量评价

秦建平，李家春，吴建雄，吴素素，黄文哲，王振中，萧伟*

(江苏康缘药业股份有限公司，中药制药过程新技术国家重点实验室，江苏 连云港 222001)

〔摘要〕 目的:建立浙贝母药材 HPLC 指纹图谱,为其质量控制提供比较全面的评价方法。方法:Welch Xtimate™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相乙腈-10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵溶液(氨水调 pH 至 10.0),梯度洗脱;流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 25 ℃,蒸发光散射检测器。利用化学计量学方法,包括相似度分析、聚类分析、主成分分析,对色谱数据进行分析。结果:该方法精密度、稳定性、重复性良好。测定了 16 批浙贝母药材,提取 7 个色谱峰作为指纹图谱共有峰,采用相似度评价、聚类分析和主成分分析等方法,对所收集的 16 批样品进行系统比较与归类,16 批样品分为 2 类。结论:该法重复性好,简便可靠,可以为浙贝母的质量控制和评价提供依据。

〔关键词〕 浙贝母; 高效液相色谱-蒸发光散射; 指纹图谱; 化学计量学; 质量评价
〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2015)19-0034-03
〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfjx.2015190034

Quality Evaluation of Fritillariae Thunbergii Bulbus by HPLC Fingerprint QIN Jian-ping, LI Jia-chun, WU Jian-xiong, WU Su-su, HUANG Wen-zhe, WANG Zhen-zhong, XIAO Wei* (State Key Laboratory of New Pharmaceutical Process for Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222001, China)

〔Abstract〕 Objective: To establish an HPLC fingerprint of Fritillariae Thunbergii Bulbus to provide a comprehensive evaluation for its quality control. Method: Welch Xtimate™ C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was used and eluted with a mobile phase of acetonitrile-10 mmol·L⁻¹ ammonium acetate solution (pH 10.0) in a gradient mode, the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, the column temperature was 25 ℃. An evaporated light scattering detector was used to determine the fingerprint. The fingerprint was further evaluated by chemometric methods, including similarity analysis (SA), hierarchical clustering analysis (HCA) and principal component analysis (PCA). Result: The precision, stability and repeatability of the method were favorable. Seven chromatographic peaks were extracted as the common peaks of fingerprint, and 16 batches of samples were compared and classified with such methods as SA, HCA and PCA, and then divided into 2 clusters by their quality difference. Conclusion: The method is reproducible, simple and reliable and can be used for the quality control and evaluation of Fritillariae Thunbergii Bulbus.

〔Key words〕 Fritillariae Thunbergii Bulbus; HPLC-ELSD; fingerprint; chemometrics; quality evaluation

浙贝母^[1]具有清热化痰止咳,解毒散结消癰之功效,用于风热咳嗽、痰火咳嗽、肺癰、乳癰、瘰癧、疮毒。目前,对于浙贝母的质量控制研究主要是采用滴定法测定总生物碱^[2-5]或应用高效液相色谱等方法对其一种和几种成分进行含量测定^[6-8],对多批次浙贝母进行质量评价,数据处理较为简单。

本文采用 HPLC-ELSD 结合化学计量学方法,包括相似度分析(SA),主成分分析(PCA)及聚类分析(HCA),建立浙贝母指纹图谱方法,用于表征和评价浙贝母的质量。

〔收稿日期〕 20141021(005)
〔基金项目〕 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09201-201-20)
〔第一作者〕 秦建平,高级工程师,从事中药质量标准研究,Tel:0518-81152321,E-mail:qinjianping111@126.com
〔通讯作者〕 *萧伟,研究员级高级工程师,博士,从事中药制剂和创新中药的研究与开发,Tel:0518-81152367,E-mail:kanionlunwen@163.com

1 材料

Dionex Ultimate3000 型高效液相色谱仪,ELSD 检测器(迪马公司);AE240 型电子分析天平(德国梅特勒公司),BP211D 型电子分析天平(德国赛多利斯公司),Milli-Q Academic 纯水机(美国密理博)。

贝母素甲(批号 110750-200609),贝母素乙(批号 110751-200504)对照品均购自中国食品药品检定研究院,含量测定用;乙腈(色谱纯,美国天地公司),乙酸铵、氨水(色谱纯,Fluka 试剂公司),其他分析纯试剂均购自南京化学试剂有限公司,水(超纯水)。浙贝母药材共 16 批,经江苏康缘药业股份有限公司质量部鉴定为为百合科植物浙贝母 *Fritillaria thunbergii* 的干燥鳞茎。来源见表 1。

表 1 浙贝母批号和产地

Table 1 Batch number and origin of <i>Fritillaria Thunbergii</i> Bulbus					
No.	批号	产地	No.	批号	产地
S1	120602	江苏南通	S9	120301	浙江龙观
S2	120603	浙江宁波	S10	120502	浙江鄞江
S3	120604	浙江磐安	S11	130408	浙江宁波
S4	120605	浙江宁波	S12	130502	浙江磐安
S5	120706	江苏海安	S13	130503	浙江宁波
S6	121101	浙江磐安	S14	130504	浙江章水
S7	114018	浙江宁波	S15	130505	浙江宁波
S8	120105	浙江章水	S16	130208	浙江东阳

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Welch Xtimate™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为乙腈(A)-10 mmol·L⁻¹乙酸铵溶液(氨水调 pH 至 10.0)(B)梯度洗脱(0~30 min,30%~70% A;30~45 min 70%~95% A),流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 25℃,蒸发光散射检测器检测,进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 取贝母素甲、贝母素乙对照品适量,精密称定,加甲醇制成含贝母素甲 0.2 g·L⁻¹,贝母素乙 0.15 g·L⁻¹的混合溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取样品粉末约 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加浓氨试液 4 mL 浸润 1 h,精密加入三氯甲烷-甲醇(4:1)的混合溶液 40 mL,80℃水浴回流提取 2 h,放冷,滤过,用相应的溶剂洗涤锥形瓶和滤纸,滤液蒸干,残渣加甲醇使溶解并转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.4 指纹图谱方法学考察

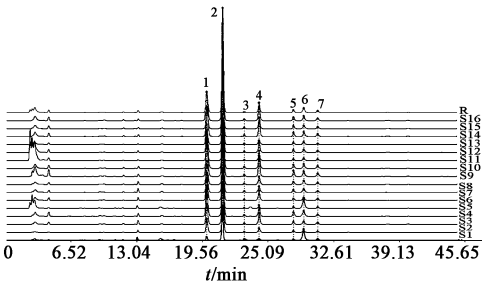
2.4.1 精密度试验 取 3 号浙贝母供试品溶液,连续进样 6 次进行测定。以贝母素甲为参照峰。结果 6 个共有峰的相对保留时间 RSD < 0.5%,峰面积对数比的 RSD < 1.8%,6 次测定的色谱图相似度 > 0.998,说明仪器精密度高。

2.4.2 稳定性试验 取 3 号浙贝母供试品溶液,分别于 0,2,4,8,12,16,24 h 测定指纹图谱。以贝母素甲为参照峰。结果表明,6 个共有峰的相对保留时间 RSD < 0.6%,峰面积对数比值的 RSD < 1.7%,7 个时间点测定的色谱图相似度 > 0.996,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 3 号浙贝母 6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定。以贝母素甲为参照峰。结果表明,6 个共有峰的相对保留时间 RSD < 0.7%,峰面积对数比的 RSD < 2.8%,6 份样品的色谱图相似度 > 0.996,表明该方法重复性良好。

2.5 指纹图谱的建立及分析

2.5.1 指纹图谱的建立及相似度评价 取 16 批不同产地的浙贝母药材,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定。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”2004A 版进行分析,经数据匹配,以中位数法建立对照指纹图谱,标定 7 个共有峰,指认 4 号峰为贝母素甲,6 号峰为贝母素乙,见图 1。16 批所测供试品色谱图与对照指纹图谱相似度分别为 0.882,0.988,0.999,0.996,0.897,0.999,0.958,0.961,0.999,0.989,0.968,0.997,0.973,0.998,0.999,0.998。结果 1 号和 5 号样品的相似度 < 0.9,其他产地浙贝母药材的相似度均 > 0.95。



4. 贝母素甲;6. 贝母素乙

图 1 不同产地浙贝母药材指纹谱

Fig. 1 Fingerprint of *Fritillaria Thunbergii* Bulbus from different habitats

2.5.2 浙贝母样品聚类分析 运用 SPSS 20.0 软件对本试验 16 批浙贝母样品的 HPLC 指纹图谱进行聚类分析。其中数据源为 7 个共有峰的峰面积,所有数据经过标准化处理,聚类方法采用组间连接法及平方欧式距离,结果见图 2。16 批样品被划分为 2 大类,S2,S3,S4,S6,S7,S8,S9,S10,S11,S12,S13,S14,S15,S16 为第一类,S1,S5 为第二类。

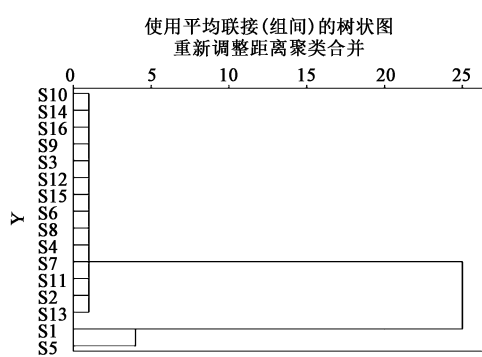


图 2 样品聚类分析树状
Fig.2 Dendrogram for samples

2.5.3 浙贝母样品主成分分析 对 16 批浙贝母样品指纹图谱中 7 个共有峰的峰面积做标准化处理后导入 SPSS 20.0 软件进行 PCA 分析,结果见图 3。在 PCA1-PCA2 得分分布平面图中,16 批浙贝母药材非常清楚地被划分为 2 组,其中 S1 和 S5 为 1 组,其余 14 个样本为一组。

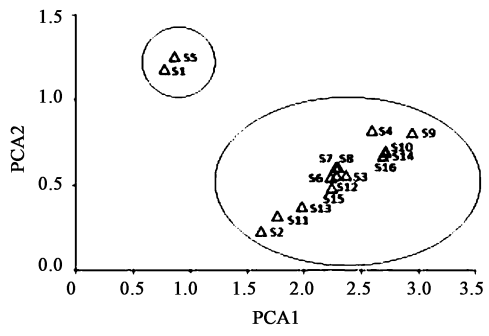


图 3 PCA1-PCA2 得分分布
Fig.3 PCA1-PCA2 scores plots

3 讨论

试验比较了甲醇、三氯甲烷和三氯甲烷-甲醇混合溶液作为提取溶剂,又比较了超声和回流两种提取方式,结果三氯甲烷-甲醇混合溶液回流提取的样品色谱峰较多,适用于指纹图谱分析。

比较了乙腈-0.1% 二乙胺^[9],乙腈-10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵溶液、乙腈-水(含 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵,0.1% 甲酸)^[10] 和乙腈-10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵溶液(氨水调 pH 至 10.0)系统对本品指纹图谱的影响,结果流动相系统为乙腈-10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵溶液(氨水调 pH 至 10.0)时所得指纹图谱中各色谱峰的分离情况和峰形较好,在试验过程中比较了柱温 25,30,35,40℃,流速 0.8,1.0,1.2 mL·min⁻¹,流动相 B 的 pH 9.8,10.0,10.2,结果柱温 25℃,流速 0.8 mL·min⁻¹ 时所得指纹图谱中各色谱峰分离较好,而流动相 B 的 pH 小范围的变化对浙贝母指纹图谱分析无影响。

16 批不同产地浙贝母药材中,14 批浙江产药材的指纹图谱相似度 >0.95,2 批江苏产的浙贝母药材指纹图谱相似度 <0.90,说明浙江产的浙贝母药材质量总体较为稳定,而江苏产的浙贝母药材与浙江产的浙贝母整体化学成分的种类和数量差异较小,但单个化学成分的含量存在一定的差异,造成指纹图谱相似度存在明显差异。聚类分析和主成分分析结果显示,16 批不同产地浙贝母药材中,14 批浙江产药材为一类,2 批江苏产的浙贝母药材为一类,与相似度评价结果一致。

本试验采用指纹图谱相似度结合聚类分析和主成分分析方法对不同批次浙贝母进行质量综合评价,从整体上反映和控制浙贝母药材的质量,为浙贝母的质量控制提供了比较直观简便全面的评价方法。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:274.

[2] 黄梦娴. 三蛇胆川贝糖浆中总生物碱含量测定[J]. 广西医学, 2001, 23(4):757-759.

[3] 王安行, 胡梅素. 酸性染料两相滴定法测定浙贝母总生物碱的含量[J]. 中国现代应用药学, 1998, 15(3):50-51.

[4] 李萍, 曾令杰, 李松林. 无紫外吸收的贝母总生物碱定量分析方法研究[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(8):614-617.

[5] 董洁, 朱会敏, 胡凯文, 等. 大孔树脂纯化浙贝母中总生物碱工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14):18-22.

[6] 赵霞, 陆阳, 陈泽乃. 毛细管电泳法定量分析贝母中几种生物碱[J]. 中草药, 2001, 32(2):116-118.

[7] 姜艳, 李萍. HPLC-ELSD 测定浙贝母中贝母素甲、贝母素乙的含量[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(16):1257-1259.

[8] 薛燕, 王峰. 不同产地浙贝母药材中 3 种活性成分的分析研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(16):1628-1630.

[9] Zhou J L, Li P, Li H J, et al. Development and validation of a liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry method for relative and absolute quantification of steroidal alkaloids in *Fritillaria* species[J]. J. Chromatogr A, 2008, 1177(1):126-137.

[10] Zhou J L, Xin G Z, Shi Z Q, et al. Characterization and identification of steroidal alkaloids in *Fritillaria* species using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(45):7109-7122.

[责任编辑 顾雪竹]