

清喉利咽颗粒的UPLC指纹图谱建立及主成分分析

牛小花*,陈洪源*(重庆三峡医药高等专科学校,重庆 404100)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)06-0826-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.03.29

摘要 目的:建立清喉利咽颗粒的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱,并结合主成分分析法(PCA)为其质量控制提供参考。方法:采用UPLC法。色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C₁₈,流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)(梯度洗脱),流速为0.4 mL/min,检测波长为280 nm,柱温为30 ℃,进样量为2 μL。以鞣花酸为参照物,分析12批清喉利咽颗粒样品,采用“中药指纹图谱相似度评价系统”软件进行相似度分析,并根据对照品对其中的共有峰进行指认,同时对共有峰进行主成分分析。结果:12批清喉利咽颗粒指纹图谱标定了18个共有峰,指认了6个主要色谱峰(没食子酸、鞣花酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷);12批样品与对照指纹图谱相似度均≥0.984。经主成分分析,18个共有峰可综合为3个主成分,累计方差贡献率为78.277%;黄芩苷和16号峰为清喉利咽颗粒指纹图谱中影响比较大的指标。结论:该方法可为清喉利咽颗粒的质量评价提供参考。

关键词 清喉利咽颗粒;超高效液相色谱法;指纹图谱;主成分分析

Establishment of the UPLC Fingerprint and Analysis of Principal Component of Qinghou Liyan Granule

NIU Xiaohua, CHEN Hongyuan (Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404100, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the UPLC fingerprint for Qinghou liyan granule, and provide reference for its quality control by combining with principal component analysis (PCA). METHODS: UPLC was performed on the column of ACQUITY UPLC BEH C₁₈ with mobile phase of acetonitrile (A)-0.1% aqueous phosphoric acid solution (B) (gradient elution) at a flow rate of 0.4 mL/min, the detection wavelength was 280 nm, column temperature was 30 ℃, and injection volume was 2 μL. Using ellagic acid as a reference, 12 batches of samples were analyzed. "Similarity Evaluation Software for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine" was used for the similarity analysis and identification of the common peaks, and the PCA was used for common peaks. RESULTS: There were 18 common peaks in the fingerprints of 12 batches of samples, and 6 principal peaks (gallic acid, ellagic acid, naringin, hesperidin, neohesperidin and baicalin) were identified; the similarity degree of 12 batches and reference fingerprints were no less than 0.984. According to PCA, the 18 peaks can be integrated into 3 principal components, with cumulative contribution rate of principal component of 78.277%; baicalin and 16 peaks were the discriminating factors of the fingerprint of Qinghou liyan granule. CONCLUSIONS: The method can provide reference for the quality control of Qinghou liyan

笔者采用HPLC测定制剂中5种蒽醌类成分的含量时,流动相的磷酸溶液设置范围为0.1%~0.4%。结果,磷酸溶液体积分数为0.1%时色谱峰的对称度较好。笔者曾比较了不同比例的乙腈-水、甲醇-水、甲醇-水-磷酸等多种溶剂系统作为流动相,结果以甲醇-0.1%磷酸溶液作为流动相时,色谱峰形好,保留时间适宜,分离效果较好。

综上所述,本研究所建标准可用于蒙药益肾散的质量控制。

参考文献

- [1] 任伟光,王琦,黄林芳.大黄类药材的质量评价进展[J].中南药学,2014,12(4):354-356.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:57-57.

- [3] 张幸福,才毛,骆桂法,等.藏药十味诃子丸的质量控制[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(9):51-53.
- [4] 李洋,吴剑坤,黄健,等.清肺丸显微与薄层色谱鉴别研究[J].北京中医药,2013,32(6):457-460.
- [5] 杜连平,袁发荣.藏成药青鹏胶囊质量标准研究[J].中成药,2010,32(8):1450-1452.
- [6] 魏艳婷,张静宜,张华潭.HPLC法同时测定三黄滴丸中5种蒽醌类成分的含量[J].中国药房,2015,26(27):3867-3869.
- [7] 白玉霞,散丹,吴双英.HPLC法测定蒙药给喜古纳-6中大黄酸、大黄素及大黄酚的含量[C]//世界中医药联合会中药化学专业委员会第二届学术年会暨胡杨林论坛论文集,2013:178-180.
- [8] 许乾丽,茅向军,宋晓宁,等.HPLC法同时测定六味安消胶囊中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量[J].药物分析杂志,2010,30(10):1841-1843.

(收稿日期:2016-02-23 修回日期:2016-05-08)

(编辑:张静)

* 讲师,硕士。研究方向:中药提取纯化。电话:023-58567305。
E-mail: Xiaohua_206@163.com

通信作者:讲师,硕士。研究方向:中药化学成分分析。电话:
023-58556066。E-mail: Chyuan123@163.com

granule.

KEYWORDS Qinghou liyan granule; UPLC; Fingerprint; Principal component analysis

清喉利咽颗粒是由黄芩、西青果、桔梗、竹茹、胖大海、橘红、枳壳等药材组成,具有清热利咽、宽胸润喉的功效;常用于外感风热所致咽喉发干、声音嘶哑,急慢性咽炎、扁桃体炎等见上述证候者,长期使用有保护声带的作用^[1]。相关研究表明,其主要含有没食子酸^[2]等有机酸类及柚皮苷^[3-4]、橙皮苷^[3-4]、黄芩苷^[4-5]等黄酮类成分。现有相关文献仅针对清喉利咽颗粒中所含的柚皮苷、橙皮苷、黄芩苷等成分进行含量测定^[3-5],未见指纹图谱的相关研究;且2015年版《中国药典》仅将黄芩苷含量作为其质量控制指标。清喉利咽颗粒成分复杂,只采用上述成分作为质量控制指标较为局限,远不能满足现代制剂质量控制要求。指纹图谱是评价多成分样品整体质量的有效手段^[6]。美国、英国等国外药典早已经将指纹图谱作为质量控制重要指标^[7],2015年版《中国药典》中部分药材也将指纹图谱作为质量控制指标之一。但指纹图谱也存在信息量过大,不利于统计分析及筛选关键指标等缺点;而主成分分析法(Principal component analysis, PCA)作为数据挖掘的一种方法,通过降维方法,可在不损失或较少损失原有指标信息特征的情况下,将多个具有相关性的指标转换成少数几个相互独立的综合指标(即主成分),从而简化控制指标。目前该法多应用于指纹图谱数据的统计分析,以挖掘其关键控制指标^[8-9]。超高效液相色谱法(UPLC)相比普通液相系统具有分析时间短,灵明度、分辨率高的特点,在中药注射液等制剂质量控制方面应用广泛^[10-11]。因此,本试验以鞣花酸为参照物,采用UPLC指纹图谱法并结合PCA法研究清喉利咽颗粒的质量控制方法,为其后续研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY UPLC H-CLASS 型 UPLC 仪,包括 QSM 四元溶剂管理器、PDA eλ 二极管阵列检测器、SM-FTN 样品管理器、CH-A 型柱温箱、Empower3 色谱工作站(美国 Waters 公司);BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司);KQ-100DE 型超声波清洗器(昆山舒美超声仪器有限公司,功率:100 W,频率:40 kHz);DISCOVER-III/IV 型实验室专用超纯水机(成都唐氏康宁科技发展有限公司)。

1.2 药品与试剂

清喉利咽颗粒(桂龙药业有限公司,编号:S1~S12,规格:5 g/袋);没食子酸对照品(批号:20140412,纯度:≥98.0%)、鞣花酸对照品(批号:20141008,纯度:≥98.0%)购自上海金穗生物科技有限公司;柚皮苷对照品(批号:MUST-12030914,纯度:≥98.0%)、橙皮苷对照品(批号:MUST-11030701,纯度:≥98.0%)、新橙皮苷对照品(批号:MUST-12040812,纯度:≥98.0%)、黄芩苷对

照品(批号:MUST-12040812,纯度:≥98.0%)均购自成都曼斯特生物科技有限公司;乙腈、磷酸均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~2 min, 5% A; 2~3 min, 5%→12% A; 3~11 min, 12%→30% A; 11~15 min, 30%→70% A);流速:0.4 mL/min;检测波长:280 nm;柱温:30 °C;进样量:2 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷对照品各适量,精密称定,置于同一50 mL量瓶中,用60%甲醇定容,制成每1 mL含没食子酸0.10 mg、鞣花酸0.10 mg、柚皮苷0.05 mg、橙皮苷0.05 mg、新橙皮苷0.05 mg、黄芩苷0.10 mg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品约0.5 g,精密称定,置于25 mL量瓶中,加60%甲醇适量,超声处理15 min,用60%甲醇定容,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学验证

2.3.1 精密度试验 取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以鞣花酸的峰为参照,计算各色谱峰相对保留时间与相对峰面积。结果,各色谱峰相对保留时间的RSD≤2.0% (n=6),相对峰面积的RSD≤2.0% (n=6),表明仪器精密良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S1)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、16、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,以鞣花酸的峰为参照,计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各色谱峰相对保留时间的RSD≤2.0% (n=6),相对峰面积的RSD≤2.50% (n=6),表明供试品溶液在室温条件下24 h内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S1)适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,以鞣花酸的峰为参照,计算各色谱峰相对保留时间与相对峰面积。结果,各色谱峰相对保留时间的RSD≤1.50% (n=6),相对峰面积的RSD≤2.0% (n=6),表明本方法重复性良好。

2.4 指纹图谱的建立及相似度分析

2.4.1 指纹图谱建立及共有峰指认 将12批样品指纹图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”(2004A版),剪切掉前2 min色谱溶剂峰,取2~15

min数据进行分析,以S1号样品的图谱为校正参照,时间窗宽度设为0.20 s,得到12批样品共有峰UPLC图(详见图1),共确定18个主要色谱峰为各批次样品所共有;同时,指认了6个共有峰,分别为没食子酸(1号峰)、鞣花酸(7号峰)、柚皮苷(11号峰)、橙皮苷(12号峰)、新橙皮苷(13号峰)、黄芩苷(14号峰)。以7号峰(鞣花酸)为参照峰(S),计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,详见表1、表2。结果表明,12批样品的18个共有峰的相对峰面积的RSD为0~41.98%。

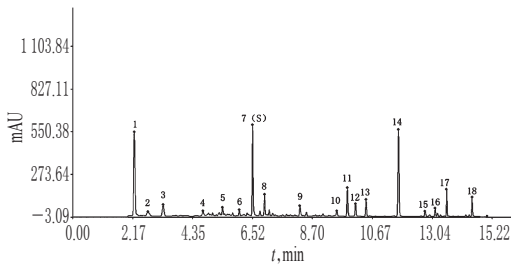


图1 12批样品共有峰超高效液相色谱图

Fig 1 UPLC chromatograms of the common peaks of 12 batches of samples

2.4.2 相似度分析 以12批样品共有峰UPLC图为标准,进行相似度评价,各批次药材与对照指纹图谱的相似度分别为0.992、0.984、0.997、0.987、0.995、0.998、

0.996、0.996、0.997、0.998、0.994、0.997,12批样品的叠加指纹图谱见图2。由图2可知,各批次样品与对照指纹图谱的相似度均 ≥ 0.984 ,表明各批次样品质量稳定性较好。

2.5 PCA

用SPSS 19.0统计分析软件对12批样品的原始数据进行标准化处理后,再进行PCA,计算相关系数、主成分特征值、方差贡献率。

2.5.1 成分相关性分析 指纹图谱中各成分相关系数矩阵见表3($F_1 \sim F_{18}$ 为18个共有峰对应的化学成分)。由表3可知,成分 F_1 (没食子酸)与成分 F_2 、 F_7 (鞣花酸)、 F_{17} 有较大正相关性;成分 F_{11} (柚皮苷)与成分 F_{13} (新橙皮苷)有较大正相关性;成分 F_{14} (黄芩苷)与成分 F_{16} 、 F_{18} 有较大正相关性。

2.5.2 主成分特征值、方差贡献率 以主成分的特征值(λ)及方差贡献率作为选取主成分的依据,选取主成分对应的 $\lambda > 1$ 的前几个主成分,共提取到5个主成分(见表4),其中第一主成分 $\lambda_1 = 7.850$,方差贡献率为43.609%,第二主成分 $\lambda_2 = 3.757$,方差贡献率为20.874%;第三主成分 $\lambda_3 = 2.483$,方差贡献率为13.790%;第四主成分 $\lambda_4 = 1.282$,贡献率为7.120%;第五主成分 $\lambda_5 = 1.241$,方差贡献率为6.896%,这5个主成分累计方差贡献率(即方差贡

表1 12批清喉利咽颗粒指纹图谱的相对保留时间

Tab 1 Relative retention time in fingerprint of 12 batches of Qinghou liyan granule

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
1	0.343	0.343	0.342	0.342	0.342	0.342	0.342	0.342	0.342	0.342	0.342	0.342
2	0.421	0.420	0.419	0.418	0.418	0.418	0.417	0.418	0.417	0.417	0.417	0.417
3	0.504	0.503	0.502	0.502	0.502	0.502	0.501	0.502	0.502	0.502	0.502	0.502
4	0.724	0.724	0.723	0.724	0.723	0.723	0.723	0.723	0.723	0.723	0.723	0.723
5	0.832	0.832	0.832	0.832	0.832	0.833	0.833	0.832	0.832	0.833	0.833	0.833
6	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926
7(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
8	1.066	1.066	1.066	1.067	1.066	1.066	1.066	1.066	1.066	1.066	1.066	1.066
9	1.264	1.263	1.263	1.263	1.263	1.263	1.263	1.263	1.263	1.263	1.263	1.263
10	1.467	1.467	1.466	1.468	1.467	1.468	1.468	1.468	1.468	1.468	1.468	1.469
11	1.526	1.526	1.525	1.527	1.526	1.527	1.527	1.527	1.527	1.527	1.527	1.528
12	1.571	1.572	1.570	1.572	1.572	1.572	1.573	1.572	1.573	1.573	1.572	1.573
13	1.630	1.629	1.628	1.630	1.630	1.631	1.631	1.630	1.631	1.631	1.631	1.631
14	1.809	1.809	1.808	1.811	1.810	1.811	1.812	1.811	1.811	1.811	1.811	1.812
15	1.957	1.958	1.956	1.959	1.959	1.959	1.960	1.959	1.961	1.960	1.960	1.961
16	2.011	2.012	2.011	2.015	2.015	2.015	2.016	2.015	2.017	2.016	2.016	2.017
17	2.074	2.075	2.074	2.078	2.079	2.079	2.080	2.078	2.081	2.081	2.081	2.081
18	2.215	2.216	2.215	2.219	2.220	2.220	2.221	2.220	2.223	2.222	2.223	2.223

献率累计值)可达92.293%,涵盖了主要成分的大部分信息。

初始因子载荷矩阵中,每一个载荷量(数据)表示主成分与对应变量的相关系数,详见表5。由表5可知,第一主成分主要反映成分 F_3 、 F_4 、 F_5 、 F_7 、 F_9 、 F_{10} 、 F_{11} (柚皮苷)、 F_{13} (新橙皮苷)、 F_{14} (黄芩苷)、 F_{15} 、 F_{16} 、 F_{17} 、 F_{18} 的信息,第二主成分主要反映成分 F_1 (没食子酸)、 F_2 、 F_{12} (橙皮苷)的信息,第三主成分主要反映成分 F_6 、 F_8 的信息。第四、第五

主成分的相关系数显示没有突出反映哪个成分峰。综合表4和表5数据分析:3个主成分包含了18个共有峰信息,其累计方差贡献率为78.277%,第四、第五主成分由于方差贡献率低,可以忽略。因此,分别以第一、第二、第三主成分来建立坐标系进行投影,即可得到所有样本的PCA三维投影图,详见图3;图中每个点对应1个共有峰,18个共有峰可分为3类。

将初始因子矩阵中的数据除以主成分相对应的特

表2 12批清喉利咽颗粒指纹图谱的相对峰面积

Tab 2 Relative peak area of fingerprint of 12 batches of Qinghou liyan granule

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
1	1.246	1.197	1.197	1.781	1.214	1.300	1.229	1.503	1.406	1.302	1.541	1.196
2	0.174	0.173	0.173	0.257	0.197	0.169	0.184	0.224	0.206	0.188	0.226	0.192
3	0.289	0.235	0.235	0.357	0.258	0.280	0.295	0.304	0.316	0.279	0.321	0.282
4	0.138	0.133	0.133	0.175	0.125	0.126	0.136	0.144	0.137	0.138	0.147	0.135
5	0.185	0.194	0.194	0.177	0.163	0.191	0.212	0.182	0.198	0.164	0.202	0.215
6	0.120	0.120	0.120	0.141	0.108	0.109	0.084	0.126	0.118	0.119	0.123	0.112
7(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
8	0.459	0.562	0.562	0.185	0.311	0.192	0.190	0.374	0.307	0.295	0.202	0.280
9	0.175	0.221	0.221	0.235	0.128	0.190	0.194	0.216	0.173	0.182	0.213	0.186
10	0.138	0.151	0.151	0.182	0.139	0.167	0.141	0.149	0.142	0.145	0.172	0.132
11	0.404	0.416	0.416	0.250	0.378	0.427	0.335	0.328	0.425	0.401	0.328	0.343
12	0.167	0.173	0.173	0.241	0.141	0.210	0.157	0.217	0.184	0.160	0.205	0.146
13	0.208	0.215	0.215	0.201	0.196	0.221	0.183	0.206	0.231	0.214	0.206	0.184
14	1.043	1.040	1.040	1.129	1.132	1.101	1.092	1.067	1.180	1.163	1.114	1.111
15	0.133	0.097	0.097	0.123	0.130	0.146	0.148	0.125	0.156	0.100	0.125	0.142
16	0.239	0.245	0.245	0.267	0.256	0.263	0.251	0.251	0.268	0.268	0.255	0.254
17	0.175	0.193	0.193	0.251	0.181	0.207	0.180	0.217	0.213	0.206	0.220	0.188
18	0.211	0.236	0.218	0.245	0.259	0.232	0.247	0.226	0.248	0.237	0.255	0.243

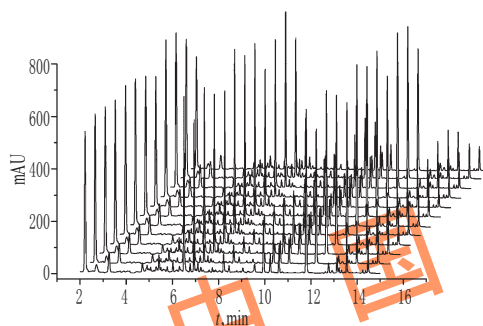


图2 12批样品UPLC叠加图

Fig 2 The overlapped UPLC chromatogram of 12 batches of samples

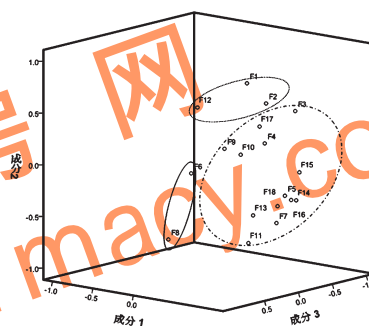


图3 PCA 3D 投影

Fig 3 3D projection of PCA

表3 相关系数矩阵

Tab 3 The matrix of correlation coefficient

成分	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀	F ₁₁	F ₁₂	F ₁₃	F ₁₄	F ₁₅	F ₁₆	F ₁₇	F ₁₈
F ₁	1.000	0.830	0.687	0.604	0.098	0.293	0.904	-0.488	0.478	0.498	-0.253	0.627	0.110	0.244	0.082	0.272	0.849	0.115
F ₂	0.830	1.000	0.728	0.623	0.218	0.292	0.750	-0.354	0.267	0.226	-0.182	0.168	0.084	0.417	0.266	0.370	0.707	0.271
F ₃	0.687	0.728	1.000	0.566	0.475	-0.083	0.227	-0.605	0.280	0.213	0.017	0.165	0.209	0.529	0.668	0.480	0.637	0.224
F ₄	0.604	0.623	0.566	1.000	0.596	0.339	0.584	-0.002	0.731	0.523	0.054	0.185	0.234	0.583	0.153	0.620	0.654	0.590
F ₅	0.098	0.218	0.475	0.596	1.000	0.027	0.813	0.141	0.569	0.419	0.506	0.005	0.485	0.704	0.666	0.715	0.339	0.714
F ₆	0.293	0.292	-0.083	0.339	0.027	1.000	0.207	0.453	0.368	0.263	0.270	0.195	0.440	0.256	-0.337	0.293	0.565	0.127
F ₇	0.904	0.750	0.227	0.584	0.813	0.207	1.000	0.335	0.415	0.500	0.713	-0.127	0.665	0.880	0.454	0.211	0.763	0.108
F ₈	-0.488	-0.354	-0.605	-0.002	0.141	0.453	0.335	1.000	0.217	-0.105	0.455	-0.234	0.339	0.050	-0.332	0.077	-0.205	0.168
F ₉	0.478	0.267	0.280	0.731	0.569	0.368	0.415	0.217	1.000	0.636	0.108	0.586	0.298	0.248	-0.031	0.350	0.572	0.282
F ₁₀	0.498	0.226	0.213	0.523	0.419	0.263	0.500	-0.105	0.636	1.000	0.281	0.608	0.458	0.445	0.071	0.561	0.663	0.531
F ₁₁	-0.253	-0.182	0.017	0.054	0.506	0.270	0.713	0.455	0.108	0.281	1.000	-0.159	0.925	0.715	0.408	0.721	0.252	0.500
F ₁₂	0.627	0.168	0.165	0.185	0.005	0.195	-0.127	-0.234	0.586	0.608	-0.159	1.000	0.119	-0.148	-0.107	-0.016	0.564	-0.137
F ₁₃	0.110	0.084	0.209	0.234	0.485	0.440	0.665	0.339	0.298	0.458	0.925	0.119	1.000	0.754	0.367	0.776	0.574	0.479
F ₁₄	0.244	0.417	0.529	0.583	0.704	0.256	0.880	0.050	0.248	0.445	0.715	-0.148	0.754	1.000	0.601	0.984	0.587	0.818
F ₁₅	0.082	0.266	0.668	0.153	0.666	-0.337	0.454	-0.332	-0.031	0.071	0.408	-0.107	0.367	0.601	1.000	0.549	0.223	0.391
F ₁₆	0.272	0.370	0.480	0.620	0.715	0.293	0.211	0.077	0.350	0.561	0.721	-0.016	0.776	0.984	0.549	1.000	0.632	0.835
F ₁₇	0.849	0.707	0.637	0.654	0.339	0.565	0.763	-0.205	0.572	0.663	0.252	0.564	0.574	0.587	0.223	0.632	1.000	0.338
F ₁₈	0.115	0.271	0.224	0.590	0.714	0.127	0.108	0.168	0.282	0.531	0.500	-0.137	0.479	0.818	0.391	0.835	0.338	1.000

征值开平方根,便得到各个主成分中每个指标所对应的系数,经计算可得主成分的模型为: $x_1=0.181f_1+0.191f_2+0.216f_3+0.274f_4+0.278f_5+0.131f_6+0.298f_7+0.009f_8+0.213f_9+0.213f_{10}+0.205f_{11}+0.079f_{12}+0.259f_{13}+0.323f_{14}+0.183f_{15}+$

表4 主成分特征值和方差贡献率

Tab 4 Eigenvalue and variance contribution rate of principal component

主成分	初始特征值			主因子贡献率		
	λ	方差贡献率, %	方差贡献率累计值, %	λ	方差贡献率, %	方差贡献率累计值, %
第一主成分	7.850	43.609	43.609	7.850	43.609	43.609
第二主成分	3.757	20.874	64.483	3.757	20.874	64.483
第三主成分	2.483	13.794	78.277	2.483	13.794	78.277
第四主成分	1.282	7.120	85.398	1.282	7.120	85.398
第五主成分	1.241	6.896	92.293	1.241	6.896	92.293

表5 初始因子载荷矩阵

Tab 5 Load matrix of initial factors

化合物	主成分				
	1	2	3	4	5
F ₁	0.508	0.835	0.040	0.138	-0.028
F ₂	0.536	0.604	-0.208	0.250	-0.405
F ₃	0.605	0.484	-0.555	0.101	-0.005
F ₄	0.767	0.297	0.088	-0.286	-0.421
F ₅	0.780	-0.254	-0.195	-0.403	0.003
F ₆	0.368	0.052	0.695	0.444	-0.290
F ₇	0.834	-0.479	-0.006	-0.197	-0.095
F ₈	0.026	-0.645	0.625	-0.035	-0.269
F ₉	0.598	0.286	0.479	-0.458	0.017
F ₁₀	0.679	0.216	0.337	-0.257	0.354
F ₁₁	0.575	-0.691	0.099	0.281	0.293
F ₁₂	0.221	0.625	0.427	-0.149	0.547
F ₁₃	0.727	-0.384	0.212	0.381	0.318
F ₁₄	0.905	-0.283	-0.212	0.175	-0.080
F ₁₅	0.513	-0.150	-0.727	0.018	0.262
F ₁₆	0.936	-0.257	-0.100	0.099	-0.003
F ₁₇	0.795	0.482	0.196	0.298	0.088
F ₁₈	0.771	-0.339	-0.096	-0.239	-0.198

$0.334f_{16} + 0.284f_{17} + 0.275f_{18}$; $x_2 = 0.431f_1 + 0.312f_2 + 0.250f_3 + 0.153f_4 - 0.131f_5 + 0.027f_6 - 0.247f_7 - 0.333f_8 + 0.148f_9 + 0.111f_{10} - 0.356f_{11} + 0.322f_{12} - 0.198f_{13} - 0.146f_{14} - 0.077f_{15} - 0.133f_{16} + 0.249f_{17} - 0.175f_{18}$; $x_3 = 0.025f_1 - 0.132f_2 - 0.352f_3 + 0.056f_4 - 0.124f_5 + 0.441f_6 - 0.004f_7 + 0.397f_8 + 0.304f_9 + 0.214f_{10} + 0.063f_{11} + 0.271f_{12} + 0.135f_{13} - 0.135f_{14} - 0.461f_{15} - 0.063f_{16} + 0.124f_{17} - 0.061f_{18}$ 。式中, x_1 、 x_2 、 x_3 分别表示 3 个主成分, f_1 、 f_2 、 \dots 、 f_{18} 分别表示各个色谱峰的相对峰面积经标准化的数据。3 个主成分中 x_1 的特征值最大, 所涵盖信息最多, 而第一主成分中系数较大的为 f_{14} (0.323) 和 f_{16} (0.334)。从图 2 可知, 14 号峰为黄芩苷, 表明黄芩苷和 16 号峰成分在质量控制中起着相对重要的作用。

3 讨论

中药制剂成分复杂, 采用常规高效液相色谱法建立指纹图谱, 一般需要较长时间 (60~120 min)^[12], 而本试验采用 UPLC 法建立清喉利咽颗粒指纹图谱, 分析时间仅为 15 min, 且各色谱峰分离度较好, 基本达到基线分离, 相比传统分析方法, 节约了时间和流动相。

本研究考察了不同体积分数 (0、20%、40%、60%、80%、100%) 甲醇对指纹图谱中色谱峰吸收强度的影

响, 结果表明 60% 甲醇作为提取溶剂时, 指纹图谱中各色谱峰吸收强度值均较高, 因此本试验选择 60% 甲醇作为提取溶剂。本试验还考察了流动相组成、柱温、检测波长和流速对色谱图的影响。结果显示, 乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 280 nm, 流速为 0.4 mL/min 时, 色谱图中各色谱峰分离度较好且平均吸收强度较高。

12 批清喉利咽颗粒指纹图谱相似度分析结果显示, 所有批次样品与对照图谱相似度均 ≥ 0.984 , 说明该制剂生产工艺成熟, 不同批次产品质量稳定。利用 PCA 法中的降维模式分类方法, 将反映清喉利咽颗粒制剂指纹图谱的多维特征参数用 5 个主成分来描述, 可实现对该复方制剂指纹图谱数据的快速分析, 为该制剂质量控制提供一种直观、科学、全面的评价方法。将其与本研究前期的指标性成分含量测定相结合, 可更加全面、科学地评价制剂质量^[13]。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1562.
- [2] 赵建平. 西青果中没食子酸的含量测定[J]. 广西中医学院学报, 2003, 6(4): 53-55.
- [3] 陈江涛, 林冬杰. HPLC 法测定清喉利咽颗粒中柚皮苷、橙皮苷的含量[J]. 中国药师, 2010, 13(9): 1275-1276.
- [4] 林冬杰. HPLC 法测定清喉利咽颗粒中柚皮苷、橙皮苷、黄芩苷的含量[J]. 亚太传统医药, 2010, 6(7): 25-27.
- [5] 刘凡泽. HPLC 法测定清喉利咽颗粒中黄芩苷的含量[J]. 中医药导报, 2008, 14(6): 112-113.
- [6] 孙国祥, 张静娴. 系统指纹定量法鉴别龙胆泻肝丸质量[J]. 分析化学, 2009, 39(8): 1183-1187.
- [7] 许怀勇. 中药指纹图谱在药品质量控制中的应用[J]. 医药导报, 2009, 28(2): 218-220.
- [8] 张茹萍, 何昱, 石森林, 等. HPLC 指纹图谱结合主成分分析评价不同产地雷公藤药材质量[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(11): 1338-1344.
- [9] 郑孟凯, 唐映红, 陈建真, 等. 基于 HPLC 指纹图谱及主成分分析、聚类分析研究不同地区市售麻黄药材的质量差异[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(4): 1420-1426.
- [10] 李耿, 史载祥, 杨洪军, 等. 丹参类注射剂中主要成分含量的比较分析[J]. 中国药房, 2009, 20(3): 207-209.
- [11] 吴莎, 王雪, 吴亚男, 等. UPLC 用于热毒宁注射液中 11 种成分测定及其指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(24): 4804-4810.
- [12] 程红, 姚志红, 戴毅, 等. 中药复方制剂仙灵骨葆胶囊 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(10): 772-776.
- [13] 牛小花, 陈洪源, 段玉平, 等. UPLC 法同时测定清喉利咽颗粒中 5 种成分的含量[J]. 中国药房, 2016, 27(30): 4282-4284.

(收稿日期: 2016-02-28 修回日期: 2016-08-16)

(编辑: 刘柳)