

# HPLC / ELSD指纹图谱和星座图聚类法在清开灵注射液 质量评价中的应用

严诗楷<sup>1,2</sup>, 辛文锋<sup>2,3</sup>, 王义明<sup>2</sup>, 罗国安<sup>2</sup>, 程翼宇<sup>1\*</sup>

(1. 浙江大学 药学院 中药科学与工程学系, 浙江 杭州 300027; 2. 清华大学 药物研究所, 北京 100084;  
3. 江西中医学院, 江西 南昌 330006)

**摘要:** 目的 对清开灵注射液的质量进行科学评价, 为有效控制中药质量提供一种可靠方法。方法 采用 HPLC/ELSD 指纹图谱技术结合星座图聚类法, 测定不同厂家的 18 个批次清开灵注射液的指纹图谱, 并评价产品质量。结果 本法直观、准确地表达了产品的质量信息。结论 本法是中药质量评价的一种直观、合理、有效的技术手段。

**关键词:** 高效液相色谱; 蒸发光散射; 星座图聚类法; 指纹图谱; 清开灵注射液

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)09 - 0842 - 04

## Application of HPLC / ELSD fingerprint and constellation graphical clustering method applied to evaluate the quality of Qingkailing injection

YAN Shi-kai<sup>1,2</sup>, XIN Wen-feng<sup>2,3</sup>, WANG Yi-ming<sup>2</sup>, LUO Guo-an<sup>2</sup>, CHENG Yi-yu<sup>1\*</sup>

(1. Department of Chinese Medicine Science and Engineering, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 2. Institute of Materia Medica, Tsinghua University, Beijing 100084, China;  
3. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

**Abstract:** **Aim** To evaluate the quality of Qingkailing injections effectively, and to develop a credible method for the quality control of traditional Chinese medicine. **Methods** Fingerprints of 18 Qingkailing injection samples from various manufacturers were obtained by HPLC/ELSD, and quality evaluation was performed by constellation graphical clustering method. **Results** HPLC/ELSD and constellation graphical clustering method properly revealed the quality information apparently and accurately. **Conclusion** It was an apparent, credible and efficient method for quality evaluation of Chinese medicines.

**Key words:** high performance liquid chromatography; evaporative light scattering detector; constellation graphical clustering method; fingerprint; Qingkailing injection

清开灵注射液是由古方安宫牛黄丸经拆方改制而成, 临床上广泛用于治疗呼吸道感染、急慢性肝炎、高烧、脑出血等症。清开灵注射剂由板蓝根、栀子、金银花、黄芩苷、水牛角、珍珠母、牛胆酸和猪去氧胆酸等药材或提取物配伍而成, 化学成分复杂, 传

统方法往往难以有效控制质量, 临床上的不良反应时有发生<sup>[1]</sup>, 因此发展有效的中药质量控制方法, 对于清开灵注射液尤为重要。中药指纹图谱技术是一种表征中药所含成分与其质量关系的有效手段, 现已成为国内外广泛接受的中药质量评价模式<sup>[2-4]</sup>。指纹图谱最常见的建立方法是高效液相色谱-紫外检测器法 (HPLC/UV), 但清开灵注射剂中药效成分众多, 各成分的紫外特征吸收有较大差异, 特别是胆酸类物质仅在紫外末端 (190 nm 附近) 有微弱吸收<sup>[5,6]</sup>, 且受背景干扰严重, HPLC/UV 指纹

收稿日期: 2004-12-02.

基金项目: 国家 973 重点基础研究资助项目 (G1999054404);  
科技部重大专项资助项目 (2002BA906A29-3).

\* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 571 - 87951138,  
E-mail: Chengyy@zju.edu.cn

图谱往往无法准确表达该类物质的化学信息,因此用于质量控制存在着一定的局限性。蒸发光散射检测器(ELSD)作为一种通用型质量检测器,产生的响应只与分析成分的质量相关,而不依赖于其光学性质,梯度洗脱时流动相不产生背景干扰,克服了传统紫外检测方法的不足,在清开灵注射液的质量控制方面具有明显的优势。曹进等<sup>[7]</sup>进行了清开灵注射液 HPLC/ELSD指纹图谱的初步研究,并通过指标成分定量分析评价了产品质量。

星座图聚类法最早由 Wakimoto等<sup>[8]</sup>提出,是一种非参数聚类分析方法,具有特征损失少、分类细致、结果直观和使用方便等优点<sup>[9]</sup>。本文建立了清开灵注射液 HPLC/ELSD指纹图谱,结合星座图聚类法,无需对指标成分进行定量,即可正确评价产品质量,从而为中药的质量控制提供一种直观、简便、有效的质量评价手段。

## 材料与方 法

**仪器与试剂** Dionex P580型高效液相色谱仪(美国 Dionex公司);Alltech 2000型 ELSD检测器(美国 Alltech公司);Mill-Q超纯水系统(法国 Millipore公司)。

**对照品:** 栀子苷(Geniposide,批号 110749-200309)、黄芩苷(Baicalin,批号 110715-200212)、腺苷(Adenosine,批号 879-200001)、熊去氧胆酸(Ursodeoxycholic acid,批号 0755-9003)购于中国药品生物制品检定所;牛胆酸(Cholic acid,批号 102K0035)、猪去氧胆酸(Hyodeoxycholic acid,批号 031K1489)购于美国 Sigma公司。试剂:甲醇(美国 Fisher公司,色谱纯)、乙腈(德国 Merck公司,色谱纯)、甲酸(北京第二化工厂,分析纯)。样品:18个批号的清开灵注射液成品(样品 1~8,9~13和 14~18分别由 A、B和 C厂 3家中药生产企业提供)。

**色谱分析条件** 色谱柱:Phenomenex Luna RP C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm);保护柱:Alltech C<sub>18</sub>(7.5 mm × 4.6 mm × 30 mm, 5 μm);柱温:35℃;流动相:流动相 A为含 0.1%甲酸的水溶液,流动相 B为甲醇-乙腈(4:1);洗脱梯度:0 min, 100% A;33 min, 40% A;60 min, 12% A;流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;进样量:20 μL。

**ELSD条件** 漂移管温度:110℃;载气(N<sub>2</sub>)流速:1.4 L·min<sup>-1</sup>;不分流模式。

**供试液制备** 精密吸取样品液 1 mL,置于 5 mL 量瓶内,加超纯水稀释至刻度,混匀,用 4.5 μm 微

孔滤膜过滤,即得。

**星座图聚类法** 星座图聚类分析的相关程序参照文献<sup>[10]</sup>方法,用 MATLAB 5.3(Mathworks Inc.)编写,步骤如下:

(1) 设各样本指纹峰的峰面积值组成矩阵  $X$ , 进行极差标准化变换,即

$$\xi_{ij} = \frac{X_{ij} - \min X_{ij}}{R_j} \cdot \pi, \text{ 其中 } R_j = \max X_{ij} - \min X_{ij};$$

(2) 取一组权值  $W$ , 使  $W_j \geq 0, j=1, 2, \dots, n$ ,

$$\sum_{j=1}^n W_j = 1, n \text{ 为变量数};$$

(3) 计算  $n$  个点集中了  $j$  个特征后在极坐标中的位置

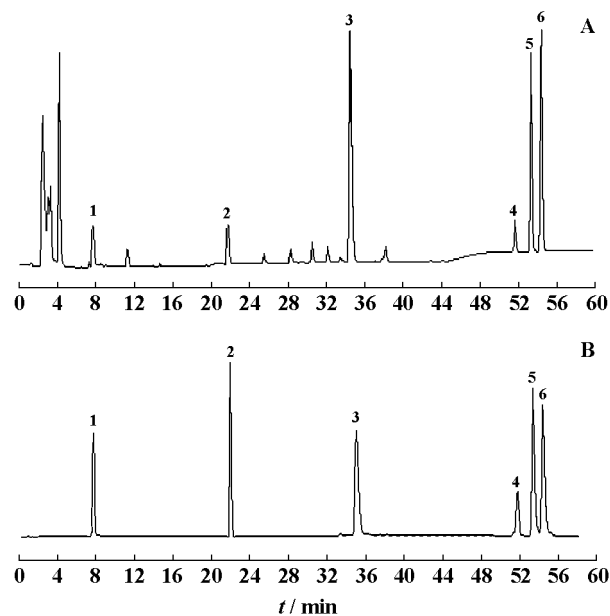
$$O_{ij} = \left[ \sum_{j=1}^n W_j \cos(\xi_{ij}), \sum_{j=1}^n W_j \sin(\xi_{ij}) \right], j=1, 2, \dots, n;$$

(4) 过原点依次连接每个样品的  $n$  个位置点,最后一个位置点对应于该样品的星位置,所得折线对应于星的路径。

## 结果与讨论

### 1 指纹图谱的测定

按上述方法处理样品并获取 HPLC/ELSD 指纹图谱如图 1A 所示,6 种对照品混合物的 HPLC/ELSD 图谱如图 1B。在此条件下,指纹图谱中共存物质干扰少,基线平稳,胆酸、猪去氧胆酸、熊去氧胆



**Figure 1** HPLC/ELSD fingerprint of Qingkailing injection (A) and chromatogram of reference compounds (B). 1: Adenosine; 2: Geniposide; 3: Baicalin; 4: Ursodeoxycholic acid; 5: Cholic acid; 6: Hyodeoxycholic acid

酸等无紫外吸收和仅存在紫外末端吸收的物质达到了基线分离,且有较强的响应,同时,其他主要药效成分如栀子苷、黄芩苷和腺苷等也有适当的响应强度和较理想的分离度。

### 2 方法学考察

同一供试品溶液,在上述条件下连续测定 5 次,以腺苷、栀子苷、黄芩苷、熊去氧胆酸、胆酸和猪去氧胆酸等 6 种指标成分的峰面积值为指标计算 RSD%,考察方法的精密度;平行配制 5 份供试品溶液,分别测定,计算各指标成分峰面积值的 RSD%,考察方法的重复性;取供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 8, 16 和 24 h 测定其指纹图谱,计算各指标成分峰面积值的 RSD%,考察样品的稳定性。精密度、重复性及稳定性结果见表 1,结果表明本指纹图谱获取方法科学可行。

**Table 1** Results of method validation (n = 5)

Peak No.	Compound	RSD / %		
		Precision	Repeatability	Stability
1	Adenosine	4.05	3.95	3.95
2	Geniposide	5.12	5.48	3.96
3	Baicalin	3.50	4.15	5.04
4	Ursodeoxycholic acid	3.21	3.48	4.39
5	Cholic acid	4.79	4.80	2.28
6	Hyodeoxycholic acid	4.94	4.90	3.10

### 3 权值的选择

测定各样本的指纹图谱后,积分获取峰面积值,并按保留时间进行峰匹配,得到大小为 18 × 31 的数据矩阵;矩阵按列取均值后归一化,即得到各指纹峰的相对平均峰面积,本文以此作为相应的权值绘制星座图。由于 ELSD 的响应特点是不依赖于被测物的光学性质及官能团特征,只与被测物的质量相关<sup>[11]</sup>,因此本文事实上是根据各药效组分的相对含量大小设定相应权值,该方法显然是合理的。

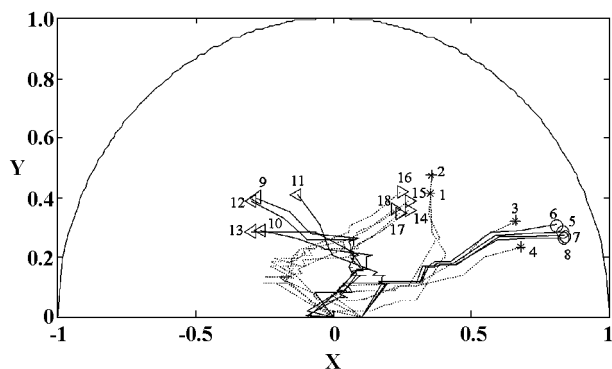
### 4 质量评价

根据测定的 HPLC/ELSD 指纹图谱,在极坐标上绘出各样本的星座图(图 2),图中共有 18 条路径和 18 颗星,分别对应于 1~18 号样品。从图中星的位置和路径看,全部样品按照样品 1~2, 3~4, 5~8, 9~13 和样品 14~18 分为 5 大类别。

样品 1~8 同属于 A 厂的产品,但在星座图上却分散成 3 类,说明产品的质量有明显差异,这主要是因为该厂前后的生产工艺有了很大的改变。样品 1~4 生产于 2003 年(批号 030607, 031025, 031026 和 031028),在星座图上分布零散,表明按照传统的

工艺条件不能保证产品质量的稳定均一;该厂于 2004 年初改进了清开灵生产工艺,并强化了生产管理,在药材、中间品和成品等多环节实施了严格的质量控制,这一改进是有成效的,反映在星座图上,后期样品(样品 5~8,批号 040618, 040627, 040704 和 040712)在星座图上的位置和路径都非常接近,表明工艺改进后 A 厂产品质量的稳定性有了明显的提高。

样品 9~13(批号 040506, 040503, 040520, 040507, 040531)和样品 14~18(批号 0213411A, 0310309A, 0311010, 0410201A, 0410202A)分别由 B 和 C 两个厂家提供,在星座图上的明显聚为两类,尽管 C 厂产品的生产日期跨度较大,但相对应的星分布更集中,路径更接近,表明 C 厂的工艺相对稳定,产品质量更稳定、可靠。



**Figure 2** Constellation graph of 18 samples of Qingkailing injection. Samples 1-4: Manufacturer A, prepared in initial procedure; 5-8: Manufacturer A, prepared in improved procedure; 9-13: Manufacturer B; 14-18: Manufacturer C

主成分分析 (PCA) 是一种常用的中药指纹图谱质量评价手段。本文对各样本的 HPLC/ELSD 指纹图谱进行了主成分分析,结果如图 3 所示,图中显示的两个主成分共解释了全部变量 83.7% 的方差。比较发现,星座图聚类法与 PCA 法对清开灵成品的质量评价结果一致,并与实际情况完全相符,即各样本完全按照厂家来源和生产工艺的不同呈现出不同的质量特征,表明了这两种方法都准确地表达中药产品的质量信息,可用作中药质量评价和质量控制手段。但 PCA 分析过程中往往不可避免地会损失部分信息,如果损失信息大到不能忽略时,PCA 法就难以给出正确的评价结果,而星座图聚类法基本上不损失信息,在一定程度上克服了 PCA 方法的不足。

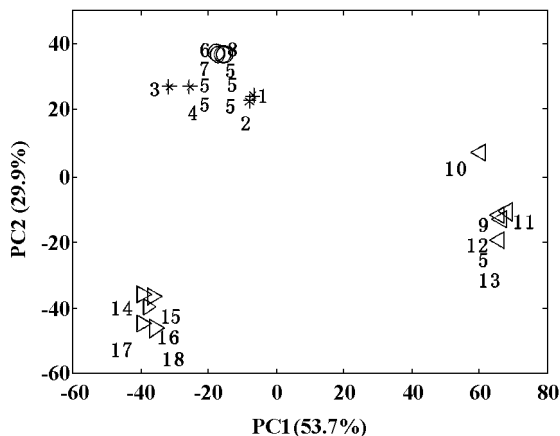


Figure 3 Plot of the samples on the plane of PC1-PC2

## 结论

本文运用 HPLC/ELSD 测定了不同批次清开灵注射液的指纹图谱,并结合星座图聚类法评价产品质量,结果发现无需进行指标成分的定量分析,即可准确表达出产品的质量信息。该方法具有特征损失少、表达直观、使用方便的优点,有望发展成为一种新的中药质量评价和质量控制手段。

## References

- [ 1 ] Zhang YM, Zhou J, Wu XY. Analysis of adverse effects associated traditional Chinese medicines in 193 cases [ J ]. *China New Med (中国新医药)*, 2004, 3(7): 66 - 67.
- [ 2 ] Cao J, Rao Y, Shen Q. Fingerprint analysis for the injections of traditional Chinese medicine [ J ]. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med (世界科学技术—中药现代化)*, 2001, 3(4): 20 - 24.
- [ 3 ] Cheng YY, Chen MJ, Willian JW. Fractal fingerprinting of chromatographic profiles based on wavelet analysis and its application to characterize the quality grade of medicinal herbs [ J ]. *J Chem Inf Comput Sci*, 2003, 43(6): 1959 - 1965.
- [ 4 ] Cheng YY, Chen MJ. An approach to comparative analysis of chromatographic fingerprints for assuring the quality of botanical drugs [ J ]. *J Chem Inf Comput Sci*, 2003, 43(3): 1068 - 1076.
- [ 5 ] Xu Y, Cao J, Wang YM, et al. Simultaneous determination of 3 kinds of components in *Gardenia* by high performance liquid chromatography under different uv-vis wave length [ J ]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2003, 38(7): 543 - 546.
- [ 6 ] Nie L, Luo GA, Cao J. Pattern recognition applied to the fingerprint of traditional Chinese medicine characterized by two-dimensional information data [ J ]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2004, 39(2): 136 - 139.
- [ 7 ] Cao J, Xu Y, Zhang YZ. Fingerprint chromatogram by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection of Qingkailing injection and its relationship with quality control [ J ]. *Chin J Anal Chem (分析化学)*, 2004, 4(4): 469 - 473.
- [ 8 ] Wakimoto K, Taguri M. Constellation graphical method for representing multi-dimensional data [ J ]. *Ann Inst Statist Math*, 1978, 30(1): 77 - 84.
- [ 9 ] Luo X. *Chemstatistics (化学统计学)* [ M ]. Beijing: Science Press, 2004. 384 - 387.
- [ 10 ] Fang KT. Graph analysis method for multi-variable samples [ J ]. *Math Pract Theory (数学的实践与认识)*, 1981, 3(2): 63 - 68.
- [ 11 ] Huang YZ, Wang NS. Application of HPLC/ELSD in the analysis of nature pharmaceutical [ J ]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理)*, 2001, 12(6): 444 - 448.