

蒙药山川柳的HPLC指纹图谱建立、相似度评价和聚类分析[△]

钮松召^{1*}, 崔颖¹, 卢菲¹, 徐鹏程¹, 孙超^{2#} (1. 内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古医科大学第二附属医院小儿骨科, 呼和浩特 010030)

中图分类号 R931.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)08-1091-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.08.15

摘要 目的: 建立蒙药山川柳的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 并进行相似度评价和聚类分析。方法: 采用HPLC法, 色谱柱为Agilent ODS C₁₈, 流速为1.0 mL/min, 流动相为甲醇-水(梯度洗脱), 检测波长为335 nm, 柱温为30 ℃, 进样量为10 μL。以槲皮素峰为参照, 生成10批药材样品的HPLC指纹图谱; 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A版)进行相似度评价, 确定共有峰; 采用SPSS 17.0软件对10批药材样品进行聚类分析。结果: 10批药材样品的HPLC指纹图谱有13个共有峰, 相似度大于0.95, 并指认了槲皮素和山柰酚这2个共有峰。聚类分析结果显示, 10批药材样品可聚为两类, S8聚为一类, 其余批次聚为一类。结论: 所建HPLC指纹图谱、相似度评价和聚类分析结果可为山川柳药材的质量控制提供依据。

关键词 山川柳; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 相似度; 聚类分析

Establishment of HPLC Fingerprint of Mongolian Medicine *Ramulus Tamarix* and Similarity Evaluation and Cluster Analysis

NIU Songzhao¹, CUI Ying¹, LU Fei¹, XU Pengcheng¹, SUN Chao² (1. College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 2. Dept. of Pediatric Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprint of Mongolian medicine *Ramulus Tamarix*, and to conduct similarity evaluation and cluster analysis. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent ODS C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-water (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 335 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μL. Using quercetin peak as reference, HPLC fingerprint of 10 batches of medicinal sample were drawn. Similarity evaluation was conducted by using *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM* (2004 A) so as to confirm common peak. SPSS 17.0 software was used for cluster analysis of those samples. RESULTS: There were 13 common peaks in HPLC fingerprint of 10 batches of samples, and the similarities of them were all greater than 0.95; 2 common chromatographic peaks of quercetin and kaempferol were identified. Results of cluster analysis showed that 10 batches of samples were classified into 2 classes. S8 was clustered into one class; other were clustered into another class. CONCLUSIONS: Established HPLC fingerprint and results of similarity evaluation and cluster analysis can provide reference for quality control of *R. Tamarix*.

KEYWORDS *Ramulus Tamarix*; HPLC; Fingerprint; Similarity; Cluster analysis

山川柳(*Ramulus Tamarix*)系柽柳科(*Tamaricaceae*)植物, 蒙药名为苏海, 别名为奥恩布, 其药用部位为嫩枝叶。山川柳作为蒙药传统药材, 性凉, 味涩、甘, 具有清热、透疹、敛毒等作用^[1]。其主要含柽柳酚、柽柳酮、柽柳醇、总黄酮二甲醚、三十二烷醇己酸酯等化学成分^[2-3], 临床上用于治疗小便不通畅、麻疹不透、皮肤痒疹、慢性风湿病等^[2,4]。

山川柳又称西河柳^[5], 在2015年版《中国药典》(一部)中西河柳质量标准仅有理化鉴别、薄层色谱鉴别及水分、灰分检查等项目^[6]。在《蒙药质量标准化研究》中也仅记载了其来源、名称、性状、水分、灰分及浸出物

测定等^[7], 但鲜见对其质量标准的进一步研究, 也未见其指纹图谱研究的报道。为此, 本研究采用高效液相色谱法(HPLC)建立了10批山川柳药材样品的指纹图谱, 以完善其质量标准, 为该药材的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪, 包括四元泵洗脱系统、自动进样系统、柱温箱、二极管阵列检测器(美国Agilent公司); R-1001N型旋转蒸发器(郑州长城科工贸有限公司); AB135-S型十万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; JA5003N型千分之一电子天平(上海菁华科技仪器有限公司)。

1.2 试剂

槲皮素对照品(批号: 100081-201608, 纯度: 98%)、山柰酚对照品(批号: 110861-201610, 纯度: 98%)均由

△基金项目: 内蒙古自治区科技计划项目(No.201502101)

* 讲师, 硕士研究生。研究方向: 中药提取分析。电话: 0471-6653153。E-mail: 502957473@qq.com

通信作者: 主治医师, 博士研究生。研究方向: 用药安全评价。电话: 0471-6653144。E-mail: 805438014@qq.com

中国食品药品检定研究院提供;甲醇(色谱纯,美国Fisher公司);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

10批山川柳药材(内蒙古天立药业公司,批号:20150408、20150509、20160308、20160609、20160808、20161009、20161208、20170209、20170508、20170708,编号:S1~S10),经内蒙古医科大学药用植物教研室乔俊缠教授鉴定为柽柳科(*Tamaricaceae*)柽柳属(*Tamarix* Linn.)山川柳(*Ramulus Tamarix.*)的枝叶。药材经粉碎后过20目筛,于干燥阴凉处保存。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-水(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 mL/min;检测波长:335 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL;洗脱时间:75 min。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间, min	A, %	B, %
0	15	85
12	30	70
40	45	55
46	48	52
65	65	35
75	75	25

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取槲皮素对照品1.06 mg、山柰酚对照品1.51 mg,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,得单一对照品贮备液。分别精密量取上述各单一对照品贮备液3、2 mL,置于同一10 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,即得混合对照品溶液,避光保存。

2.2.2 供试品溶液 取药材样品粉末2.0 g,精密称定,置于鸡心瓶中,加90%乙醇40 mL、3%盐酸10 mL,于70 ℃回流提取1.5 h。取出,放至室温,滤过,加90%乙醇定容于50 mL量瓶中,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S5)适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以槲皮素峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,13个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3%(n=6),表明本方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S5)适量,分别于室温下放置0、3、6、9、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,以槲皮素峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰

面积。结果,13个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3%(n=6),表明供试品溶液于室温下放置24 h内基本稳定。

2.3.3 重复性试验 精密称取药材样品粉末(编号:S5)适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,以槲皮素峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,13个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.4 HPLC指纹图谱的生成与相似度、共有峰相关分析

2.4.1 HPLC指纹图谱的生成 取10批药材样品粉末适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A版)对10批药材样品的HPLC指纹图谱进行分析,得HPLC指纹图谱,详见图1、图2。

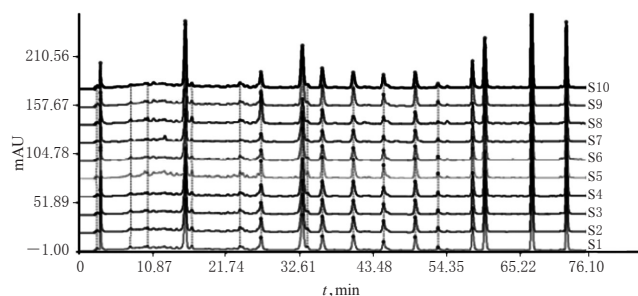


图1 10批药材样品的HPLC叠加指纹图谱

Fig 1 HPLC superimposed fingerprints of 10 batches of samples

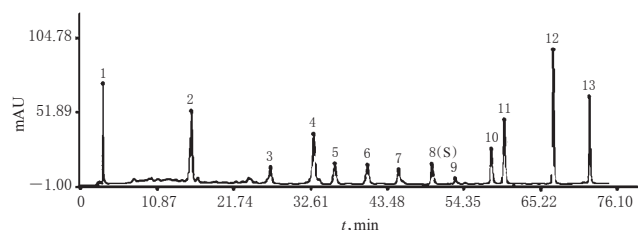


图2 药材样品的HPLC对照指纹图谱

Fig 2 HPLC control fingerprints of samples

2.4.2 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A版),以样品的HPLC对照指纹图谱为对照,进行整体相似度评价。结果显示,10批药材样品相似度在0.951~1之间,均大于0.95,表明药材样品化学成分一致性较高,稳定性较好,详见表2。

2.4.3 共有峰的指认及相关分析 10批药材样品共有13个共有峰,其峰面积合计占色谱峰总面积的90%以上,详见表3。通过与混合对照品的HPLC图(见图3)对比,指认8号峰为槲皮素,10号峰为山柰酚。由于槲皮素(8号峰)色谱峰的峰面积稳定、保留时间适中,且峰形较好,故以槲皮素峰的保留时间和峰面积为参照,计算其他峰的相对保留时间、相对峰面积,详见表4、表5。

2.5 聚类分析

以各共有峰峰面积为变量,采用SPSS 17.0软件,以

表2 10批药材样品相似度评价结果

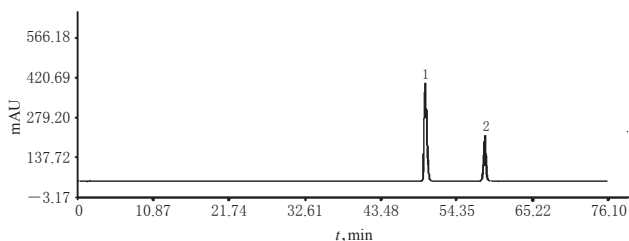
Tab 2 Similarity evaluation of 10 batches of samples

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1	0.999	0.998	0.998	0.994	0.998	0.995	0.951	0.997	0.998
S2	0.999	1	0.976	0.984	0.993	0.986	0.993	0.960	0.993	0.997
S3	0.998	0.976	1	0.984	0.982	0.978	0.985	0.972	0.987	0.965
S4	0.998	0.984	0.984	1	0.995	0.992	0.967	0.987	0.992	0.989
S5	0.994	0.993	0.982	0.995	1	0.973	0.974	0.956	0.965	0.977
S6	0.998	0.986	0.978	0.992	0.973	1	0.986	0.973	0.976	0.996
S7	0.995	0.993	0.985	0.967	0.974	0.986	1	0.968	0.994	0.981
S8	0.951	0.960	0.972	0.987	0.956	0.973	0.968	1	0.965	0.998
S9	0.997	0.993	0.987	0.992	0.965	0.976	0.994	0.965	1	0.982
S10	0.998	0.997	0.965	0.989	0.977	0.996	0.981	0.998	0.982	1

表3 10批药材样品13个共有峰合计占色谱峰总面积的百分比(%)

Tab 3 Percentage of 13 common peaks of 10 batches of samples in total area of chromatographic peak(%)

编号	占色谱峰总面积的百分比, %
S1	92.43
S2	93.57
S3	93.12
S4	93.46
S5	94.85
S6	92.71
S7	93.62
S8	94.36
S9	92.81
S10	94.62



注:1.槲皮素;2.山柰酚
Note: 1. quercetin; 2. kaempferol

图3 混合对照品的HPLC图

Fig 3 HPLC chromatogram of mixed control

Ward法结合平方欧式距离对10批药材样品进行聚类分析,详见图4。由图4可知,10批药材样品可聚为两类,S8聚为一类,其余批次聚为一类。

3 讨论

笔者前期参考相关文献^[8-14],比较了以甲醇-0.1%磷酸水溶液、甲醇-0.1%醋酸水溶液、甲醇-水为流动相时的色谱峰情况,结果发现酸的浓度及种类对色谱峰形和出峰个数等影响不大。以甲醇-水为流动相时,色谱峰形尖锐对称,基线较平稳,不易漂移,出峰个数多且稳定,有利于指纹图谱的分析,故选择甲醇-水为流动相进行梯度洗脱。笔者又通过考察260、295、335、340、355 nm等不同检测波长下的色谱图,结果发现检测波长为335 nm时,色谱峰的分度度大于1.0,出峰个数多,故选择335 nm为检测波长。

表4 10批药材样品HPLC图谱共有峰的相对保留时间

Tab 4 Relative retention time of common peaks in HPLC chromatograms of 10 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD, %
1	0.063	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.063	0.064	0.064	0.064	0.538
2	0.316	0.316	0.316	0.317	0.317	0.317	0.317	0.317	0.317	0.316	0.073
3	0.540	0.542	0.541	0.542	0.542	0.542	0.542	0.542	0.542	0.542	0.095
4	0.663	0.665	0.665	0.665	0.665	0.665	0.665	0.665	0.665	0.664	0.069
5	0.723	0.724	0.724	0.724	0.724	0.724	0.724	0.724	0.724	0.723	0.053
6	0.815	0.816	0.816	0.816	0.816	0.816	0.816	0.817	0.816	0.815	0.069
7	0.905	0.905	0.905	0.905	0.905	0.905	0.905	0.905	0.905	0.905	0.027
8(S)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
9	1.477	1.473	1.474	1.474	1.475	1.474	1.473	1.473	1.475	1.476	0.098
10	1.620	1.614	1.615	1.615	1.616	1.615	1.615	1.615	1.617	1.619	0.123
11	1.671	1.665	1.666	1.666	1.667	1.666	1.666	1.666	1.668	1.670	0.131
12	1.865	1.856	1.857	1.857	1.859	1.858	1.857	1.857	1.861	1.863	0.162
13	2.010	1.998	2.000	2.000	2.002	2.001	2.000	2.000	2.004	2.007	0.178

表5 10批药材样品HPLC图谱共有峰的相对峰面积

Tab 5 Relative peak area of common peaks in HPLC chromatograms of 10 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD, %
1	0.752	0.779	1.063	1.002	0.338	0.694	0.732	0.867	0.418	0.507	33.153
2	3.051	3.125	2.979	2.723	2.778	2.752	1.991	3.339	2.628	3.178	13.299
3	0.970	0.954	0.878	0.820	0.697	0.778	0.667	0.793	0.637	1.023	16.212
4	2.729	2.648	2.515	2.659	2.842	2.357	2.384	2.025	2.732	2.858	10.050
5	1.133	1.197	1.151	1.085	1.072	1.119	0.877	1.249	1.091	1.281	9.948
6	1.238	1.202	1.172	1.193	1.128	1.083	1.024	0.900	1.091	1.183	9.051
7	0.788	0.631	0.614	0.750	0.509	0.606	0.512	0.373	0.739	0.700	20.823
8(S)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
9	0.194	0.245	0.245	0.203	0.205	0.247	0.196	0.073	0.202	0.284	26.957
10	1.317	1.311	1.342	1.286	1.227	1.287	1.055	1.178	1.251	1.338	7.002
11	2.537	2.488	2.464	2.437	2.440	2.427	2.062	3.464	2.420	2.459	14.125
12	4.440	4.411	4.390	4.236	4.241	4.261	3.479	5.561	4.212	4.384	11.564
13	2.543	2.534	2.638	2.513	2.407	2.510	1.960	2.651	2.469	2.554	7.887

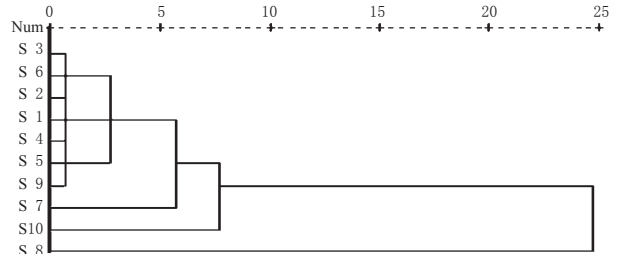


图4 10批药材样品聚类分析树状图

Fig 4 Dendrogram of cluster analysis of 10 batches of samples

笔者通过比较超声提取和回流提取两种提取方式对提取效果的影响,结果发现回流提取时的分离效果较好,峰形对称,峰面积较大,分离度适中,故选择回流提取。此外,笔者还比较了以乙醇、甲醇为提取溶剂时对峰形的影响,结果发现以两种提取溶剂所获峰形差别不大,但考虑到乙醇毒性更小,故选择乙醇为提取溶剂;同时也发现,90%乙醇与无水乙醇无明显差异,为了节省成本,故最终选择90%乙醇为提取溶剂。

10批药材样品共有13个共有峰,并指认了其中2个共有峰,分别为槲皮素、山柰酚。相似度评价结果显示,

我国采用伊伐布雷定治疗心力衰竭对医保基金的预算影响分析

胡善联^{1,2*}, 何江江^{1,2}, 孙恬³, 杨燕¹, 康琦¹[1.上海市卫生和健康发展研究中心/上海市医学科学技术情报研究所, 200040; 2.复旦大学公共卫生学院, 上海 200031; 3.施维雅(天津)制药有限公司公共事务部, 天津 100020]

中图分类号 R956;R972 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)08-1094-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.08.16

摘要 目的:评估我国采用伊伐布雷定治疗心力衰竭对医保基金的预算影响,为医保部门解决该药在医院门诊的报销准入以及医院制定进药目录提供相关经济学评价的支持证据。方法:采用Excel决策树模型,基于国内历年来的文献报道数据进行药物经济学分析。首先根据中国心衰患病率估算患病人数,并估算符合纽约心脏病协会(NYHA)心功能Ⅱ~Ⅳ级、收缩压功能失常、符合伊伐布雷定适应证的心衰患者人数,进而估算出患者使用伊伐布雷定而产生的药品费用;其次,估算住院总人次以及因心衰住院所产生的住院医疗费用;然后综合考虑伊伐布雷定的药品费用与因使用该药而使患者避免再次住院从而节省的治疗费用,并进行静态预算影响分析,以评估该药的使用对医保基金预算产生的影响。结果:2013年我国心衰患病率已上升到1.3%,全国35~75岁心衰患者人数估算为约851万,年总住院次数为约432万次。全国心衰患者住院的直接经济负担约为1 689.40亿元。因使用伊伐布雷定治疗后可避免18%患者再次住院从而可节省住院费用约304.10亿元,而服用该药的总药费约为175.25亿元,因此该药的使用可节省隐性医疗费用预算约128.86亿元,具有非常明显的成本-效益。静态预算影响分析结果显示,到2019—2020年,期望伊伐布雷定覆盖心衰患者的比例将增至8.70%,其销售总金额将达到约17.97亿元。增量病例节省费用比值(ICSCR)显示,每增加1例采用伊伐布雷定治疗的心衰患者,则可以节省住院费用约11 951元,扣除伊伐布雷定药品费用6 240元后,还可节约约5 711元。结论:采用伊伐布雷定治疗心衰患者节约下来的住院成本不仅足以抵消伊伐布雷定本身的药费,而且还有溢价的效果;该药在我国治疗心衰患者具有一定经济性。

关键词 伊伐布雷定;心力衰竭;医保基金;预算影响分析;成本-效益

10批药材样品的化学成分整体上一致性较高,但峰面积RSD差异较大,各批药材样品含量存在一定的波动性。聚类分析结果显示,10批药材样品可聚为两类,S8聚为一类,其余批次聚为一类,但考虑到相似度均大于0.95,可认为S8药材样品的化学成分与其他9批药材样品的化学成分有较高的一致性,只是受产地、气候、生长环境和采收时间等因素影响而产生一定的波动。

综上所述,本文所建立HPLC指纹图谱、相似度评价和聚类分析结果可为山川柳药材的质量控制提供参考。

参考文献

[1] 李怀斌,乌仁图雅,侯建平,等.蒙药山川柳质量标准研究[J].内蒙古医科大学学报,2013,35(3):225-228.
[2] 王响元,刘珍伶,马志刚,等.多枝怪柳中的查尔酮和黄烷酮类化学成分研究[J].兰州大学学报(自然科学版),2015,51(4):587-590.
[3] 崔颖,孙超,任书玉,等.蒙药怪柳属植物化学成分、药理作用研究现状[J].内蒙古医科大学学报,2017,39(4):362-365.
[4] 孙雅颖,周凤琴.西河柳种质遗传多样性的ISSR分析[J].中国海洋药物,2016,35(4):60-64.

[5] 刘会,姜海荣,刘洪超,等.中药西河柳的本草考证[J].中药材,2009,32(7):1151-1154.
[6] 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,2015:130.
[7] 娜仁图雅,林燕,包顺茹,等.蒙药质量标准现状调研分析[J].中国药事,2015,29(12):1245-1249.
[8] 刘刚,丁志山,刘育辰,等.白及药材的HPLC指纹图谱建立及聚类分析[J].中国药房,2018,29(22):3050-3053.
[9] 洪博,刘军,张杰,等.甘遂半夏汤的UPLC-DAD指纹图谱研究[J].中国药房,2018,29(17):2373-2375.
[10] 孙紫薇,翁丽丽,张楠,等.龙胆中当药苷和獐牙菜苦苷的含量测定及指纹图谱研究[J].长春中医药大学学报,2018,34(5):864-867.
[11] 魏茂陈,易琴,张杰.大风藤根与茎的HPLC指纹图谱研究[J].中草药,2017,48(12):2522-2526.
[12] 郑彩霞,郑文青,魏屹,等.甘青乌头的HPLC指纹图谱研究[J].华西药学杂志,2017,32(4):408-410.
[13] 陈秋谷,孙冬梅,江洁怡,等.布渣叶HPLC指纹图谱的建立和5种成分含量的同时测定[J].中药材,2018,41(2):373-377.
[14] 贺友安,胡辉,严玲,等.穿心莲配方颗粒的质量标准及指纹图谱研究[J].中国药房,2018,29(21):2925-2930.

(收稿日期:2018-11-12 修回日期:2019-02-23)

(编辑:陈宏)

*教授,硕士。研究方向:卫生政策与卫生经济。E-mail:hushanlian@hotmail.com