

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.01.06

HPLC 波长切换法结合化学计量学对不同厂家四黄止痢颗粒中 5 种成分的比较分析

张子健¹, 杨楚虹², 罗璇², 陈亚军^{1*}, 徐诗强¹, 汪柱勇¹, 杨新²,
李亚威², 周波², 刘洁^{2*}, 潘源虎², 李硕²

(1. 武汉科技大学医学院, 武汉 430065; 2. 武汉回盛生物科技股份有限公司, 湖北省兽药工程技术研究中心, 武汉 430042)

[收稿日期] 2021-08-09 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 01-0035-11 [中图分类号] S859.79

[摘要] 建立一种四黄止痢颗粒中 (R,S)-告依春、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵、大黄素 5 个指标性成分的 HPLC 测定方法, 同时结合化学计量学评价四黄止痢颗粒的质量。采用 Inertsil ODS-3-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈 (A) - 0.3% 三氟乙酸水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 流速 1 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C; 采用波长切换检测 (0 ~ 10 min, 245 nm 测定 (R,S)-告依春; 10 ~ 22 min, 278 nm 测定黄芩苷; 22 ~ 25 min, 266 nm 测定盐酸小檗碱; 25 ~ 30 min, 249 nm 测定甘草酸铵; 30 ~ 45 min, 254 nm 测定大黄素)。采用聚类分析、偏最小二乘判别分析等方法对不同厂家的四黄止痢颗粒进行质量评价。(R,S)-告依春、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵、大黄素 5 个指标性成分在 45 min 内能够达到完全分离, 进样浓度分别在 0.071 ~ 0.71 μg · mL⁻¹、14.03 ~ 140.3 μg · mL⁻¹、3.11 ~ 31.1 μg · mL⁻¹、0.116 ~ 1.16 μg · mL⁻¹、0.0049 ~ 0.049 μg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好; 平均加样回收率分别为 102.7%、99.3%、101.1%、98.0%、97.3%。20 批四黄止痢颗粒聚为 4 类; 小檗碱、(R,S)-告依春和大黄素是影响不同厂家四黄止痢颗粒质量贡献较大的 3 种成分。该方法稳定性好, 重复性好, 精密度高, 可用于四黄止痢颗粒中 5 种指标成分的同时测定。

[关键词] 四黄止痢颗粒; (R,S)-告依春; 黄芩苷; 盐酸小檗碱; 甘草酸铵; 大黄素; 波长切换; 化学计量学

Comparative Analysis of 5 Components in Sihuangzhili Granules from Different Manufacturers by HPLC Wavelength Shift Combined with Chemometrics Analysis

ZHANG Zi-jian¹, YANG Chu-hong², LUO Xuan², CHEN Ya-jun^{1*}, XU Shi-qiang¹,
WANG Zhu-yong¹, YANG Xin², LI Ya-wei², ZHOU Bo², LIU Jie^{2*}, PAN Yuan-hu², LI Shuo²

(1. Medical College, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, China)

2. Wuhan HVSEN Biotech Co., Ltd, Hubei Province Veterinary Drug Engineering Technology Research Center, Wuhan 430042, China)

Corresponding author: CHEN Ya-jun, E-mail: 409345310@qq.com; LIU Jie, E-mail: 57651807@qq.com

基金项目: 国家重点研发计划政府间国际科技创新合作重点专项 (项目编号: 2018YFE0101600)

作者简介: 张子健, 硕士研究生, 主要从事药物研发方向研究。

通讯作者: 陈亚军, E-mail: 409345310@qq.com; 刘洁, E-mail: 57651807@qq.com

Abstract: An HPLC method was developed by using wavelength shift technique combined with chemometrics for simultaneous determination of the five components, including (R,S) - goitrin, baicalin, berberine hydrochloride, ammonium glycyrrhizinate and emodin in Sihuangzhili Granules. The separation was performed on an Inertsil ODS - 3 - C18 (4.6x250 mm, 5 μm) column with mobile phase of acetonitrile (A) - 0.3% trifluoroacetic acid solution (B) in gradient elution. The flow rate was 1 mL \cdot min⁻¹ and column temperature was 30 $^{\circ}\text{C}$. The detection wavelength was switched for (R,S) - goitrin at 245 nm within 0 ~ 10 min, baicalin at 278 nm within 10 ~ 22 min, berberine hydrochloride at 266 nm within 22 ~ 25 min, ammonium glycyrrhizinate at 249 nm within 25 ~ 30 min, and emodin at 254 nm within 30 ~ 45 min. In addition, cluster analysis and partial least square - discriminant analysis (PLS - DA) were utilized to evaluate the quality of Sihuangzhili Granules from different manufacturers based on the contents of the five components. The results showed that the five index components could be completely separated within 45 min with good linear ranges of 0.071 ~ 0.71 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 14.03 ~ 140.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 3.11 ~ 31.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0.116 ~ 1.16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0.0049 ~ 0.049 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for (R,S) - goitrin, baicalin, berberine hydrochloride, ammonium glycyrrhizinate and emodin, respectively. The average recoveries were 102.7%, 99.3%, 101.1%, 98.0% and 97.3%, respectively. 20 batches of Sihuangzhili Granules were clustered into four groups, and the results showed that berberine hydrochloride, (R,S) - goitrin and emodin, were major components that affected the quality of Sihuangzhili Granules. The method is reproducible and stable, with high precision, which could be used for simultaneous determination of the five index components in Sihuangzhili Granules.

Key words: Sihuangzhili Granules; (R,S) - goitrin; baicalin; berberine hydrochloride; ammonium glycyrrhizinate; emodin; wavelength shift; chemometrics analysis

四黄止痢颗粒收载于《中华人民共和国兽药典》2015 版二部,由黄芩、黄连、黄柏、大黄、板蓝根、甘草六味中药组成^[1]。临床用于治疗禽类、猪由湿热泻痢引起的疾病,如病毒性、细菌性和混合感染引起的猪泻痢,禽大肠杆菌病,鸡白痢,禽伤寒等疾病^[2]。但中草药制剂所含成分复杂,且质量标准不完善,加之中草药产地分散,生长环境、采收期、加工炮制工艺不同,以及制剂生产工艺等因素,造成不同厂家生产的同一品种中药产品及同一厂家不同生产批次的产品间存在着质量及临床疗效的差异^[3]。目前市场上还存在着非法添加的情况,严重影响了中兽药制剂的质量安全^[4]。因此,采用合理有效的方法来保证中兽药制剂的安全、有效、质量可控很有必要。

在《中华人民共和国兽药典》2015 版二部中,仅对四黄止痢颗粒中黄芩苷的含量进行定量分析,

而单一成分的质量控制难以全面的反应该复方的整体质量。多成分质量控制能全面反应中药复方制剂的整体质量,有助于生产企业和监管部门完善其质量控制标准,以达到产品质量的稳定性^[5]。

化学计量学是通过统计学或数学方法在化学体系的测量值与体系状态之间建立联系,在中药质量控制与评价中具有重要意义^[6]。模式识别法是化学计量学的重要组成部分^[7],根据有无训练可划分为无监督的模式识别和有监督的模式识别,其中无监督的模式识别方法包括聚类分析、主成分分析等,有监督的模式识别方法包括簇类独立软模式法、判别分析、偏最小二乘法判别分析、人工神经网络等^[8]。中药具有化学成分复杂、多成分协同合作等特点,使其分析方法过于复杂,利用化学计量学分析,可使复杂的多指标问题简单化,且结果准确,可解释性强。

在四黄止痢颗粒有关文献的报道中,熊玥等^[9]采用 HPLC 法只检测黄芩苷 1 个成分;贾纪萍等^[10]和王培等^[11]分别采用薄层色谱法和 HPLC 法同时检测黄芩苷和盐酸小檗碱 2 个成分;郑举等^[12]虽然采用 HPLC 法同时测定大黄素、大黄酸、黄芩苷、甘草酸铵、(R,S)-告依春 5 个成分,但并没有测定黄连、黄柏药材中共有成分盐酸小檗碱。目前尚未见到同时测定其中(R,S)-告依春、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵、大黄素 5 个成分的方法。

为了进一步优化四黄止痢颗粒的质量控制标准,本研究根据“君、臣、佐、使”中医配伍理论,结合中药质量标志物,以君药所含成分为主,兼顾臣佐使药所含成分的确证原则,采用 HPLC 法建立一种波长切换法同时测定四黄止痢颗粒中(R,S)-告依春、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵、大黄素 5 个指标性成分。同时结合聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)、偏最小二乘判别分析(PLS-DA)等化学计量学方法,评价不同厂家各批次样品之间的质量差异。为四黄止痢颗粒质量的全面控制研究提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1260 型高效液相色谱仪(自动进样器,四元泵,柱温箱,VWD 检测器);SQP 型电子天平(北京 Sartorius 科学仪器有限公司);ME204 型电子天平(Mettler Toledo 公司);UPC-III-10T 型超纯水机(四川优普超纯科技有限公司);KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);UV-2700 型紫外可见分光光度计(苏州岛津仪器有限公司)。

1.2 试剂 (R,S)-告依春对照品(批号 111753-202007,含量 100.0%)、黄芩苷对照品(批号 110715-201821,含量 95.4%)、盐酸小檗碱对照品(批号 110713-201814,含量 86.7%)、甘草酸铵对照品(批号 110731-202021,含量 96.2%)、大黄素对照品(批号 110756-201913,含量 96.0%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈(均为色谱纯)购自 Sigma-Aldrich 公司;水为 UPC-III-10T 型超纯水机制备的超纯水;磷酸(批

号 20190213,分析纯)、冰醋酸(批号 20190121,分析纯)、三氟乙酸(批号 20160531)均购自国药集团化学试剂有限公司。四黄止痢颗粒由河南省某兽药企业提供(批号 20190802、20190805、20190901、20190903、20191002,编号 S1~S5)、江西省某兽药企业提供(批号 1906901、1906903、1907901、1907904、1908903,编号 S6~S10)、天津市某兽药企业提供(批号 20190401、20190403、20190502、20190503、20190601,编号 S11~S15)湖北省某兽药企业提供(批号 20190309、20190410、20190513、20190602、20190703,编号 S16~S20)。

2 方法及结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液的制备 取(R,S)-告依春、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵、大黄素对照品各适量,精密称定,加甲醇超声处理(功率 250 W,频率 40 KHz)使溶解,配制成每 1 mL 分别含(R,S)-告依春 0.7 μg 、黄芩苷 147.1 μg 、盐酸小檗碱 35.9 μg 、甘草酸铵 1.2 μg 、大黄素 0.05 μg 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取四黄止痢颗粒约 10 g,研细。取细粉约 1.0 g,置 100 mL 具塞锥形瓶中,加甲醇 50 mL,密塞,超声处理(功率 250 W,频率 40 KHz)30 min,放冷至室温,过滤,用 10 mL 甲醇洗涤锥形瓶和滤纸上的残留物,洗涤 3 次,合并滤液至 100 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.1.3 阴性样品溶液的制备 按照四黄止痢颗粒处方配比,分别制备缺少黄芩、黄连和黄柏、大黄、板蓝根、甘草的阴性样品。将上述阴性样品按“2.1.2”项下方法制备成阴性样品溶液。

2.2 色谱条件 选用岛津 Inertsil ODS-3-C18 (4.6mm \times 250 mm,5 μm) 色谱柱,以乙腈(A)-0.3% 三氟乙酸水溶液(B)为流动相,按表 1 程序进行梯度洗脱,流速 1 mL \cdot min⁻¹,检测波长 245 nm (0~10 min,测定(R,S)-告依春)、278 nm (10~22 min,测定黄芩苷)、266 nm (22~25 min,测定盐

酸小檗碱)、249 nm (25 ~ 30 min, 测定甘草酸铵)、254 nm (30 ~ 45 min, 测定大黄素), 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间/min	乙腈/%	0.3% 三氟乙酸水/%
0	20	80
10	20	80
40	80	20
45	20	80

2.3 系统适应性试验 取混合对照品溶液按“2.2”项色谱条件进样测定, 重复进样 6 次, 取(编号 S16)样品, 按“2.1.2”项方法制备供试品溶液, 按“2.2”项色谱条件进样测定。混合对照品溶液和供试品溶液色谱图如图 1。结果显示 (R,S) - 告依春、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵、大黄素 5 个指标性成分的保留时间的 *RSD* 依次为 0.15%、0.11%、0.09%、0.06%、0.08%; 峰面积的 *RSD* 依次为 1.44%、0.24%、0.42%、1.57%、1.39%; 各组分峰分离度均大于 1.5、对称因子均在 0.8 ~ 1.2 之间、理论塔板数均大于 5000。表明系统适应性良好。

2.4 专属性试验 取混合对照品溶液、编号 S16 的供试品溶液及 5 种阴性样品溶液, 按“2.2”项色谱条件分别进样, 验证阴性是否有干扰。5 种阴性样品色谱图如图 2。结果显示, 供试品溶液与混合对照品溶液在相同的保留时间均有各指标性成分的色谱峰, 且缺少黄芩的阴性样品溶液中无黄芩苷色谱峰、缺少黄连和黄柏的阴性样品溶液中无盐酸小檗碱色谱峰、缺少板蓝根的阴性样品溶液中无 (R,S) - 告依春色谱峰、缺少甘草的阴性样品溶液中无甘草酸铵色谱峰、缺少大黄的阴性样品中无大黄素色谱峰。说明四黄止痢颗粒样品中无干扰峰, 该方法测定四黄止痢颗粒专属性符合要求。

2.5 稳定性试验 取同一批样品(编号 S16), 按“2.1.2”项方法制备供试品溶液, 按“2.2”项色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 依次进样。供试

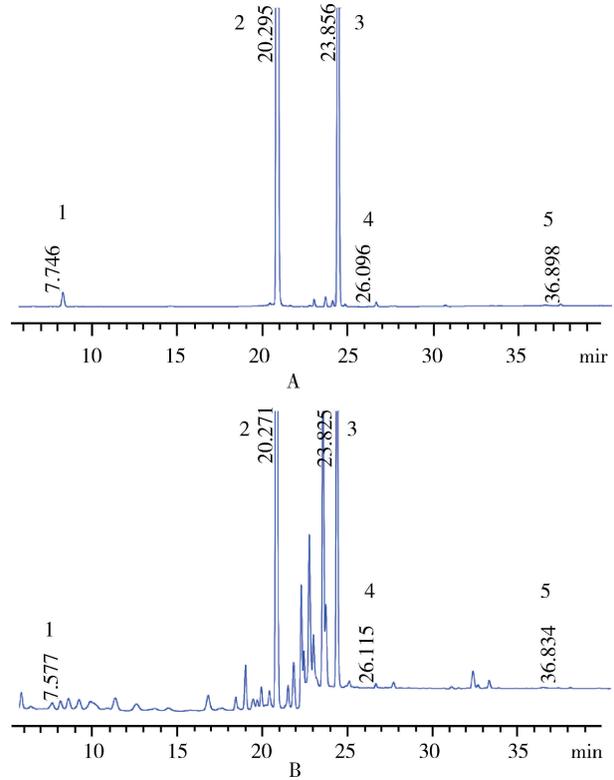


图 1 混合对照品色谱图 (A) 及供试品色谱图 (B)

1. (R,S) - 告依春; 2. 黄芩苷; 3. 盐酸小檗碱;
4. 甘草酸铵; 5. 大黄素

Fig 1 Chromatogram of mixed reference substance (A) and chromatogram of test substance (B)

1. (R,S) - goitrin; 2. Baicalin; 3. Berberine hydrochloride;
4. Ammonium glycyrrhizinate; 5. Emodin

品溶液中 (R,S) - 告依春、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵、大黄素的保留时间 *RSD* 分别为 0.1%、0.04%、0.06%、0.06%、0.04%, 峰面积 *RSD* 分别为 1.48%、1.02%、1.12%、1.21%、1.59%。表明四黄止痢颗粒供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6 精密度试验 取同一批样品(编号 S16), 按“2.1.2”项供试品制备方法制备供试品溶液, 在“2.2”项色谱条件下连续进样 6 次。(R,S) - 告依春、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵、大黄素保留时间的 *RSD* 分别为 0.14%、0.05%、0.05%、0.02%、0.04%, 峰面积的 *RSD* 分别为 1.28%、0.27%、0.32%、0.84%、1.29%。表明系统精密度良好。

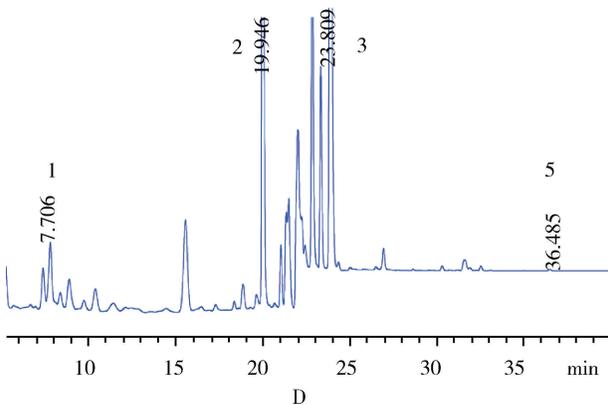
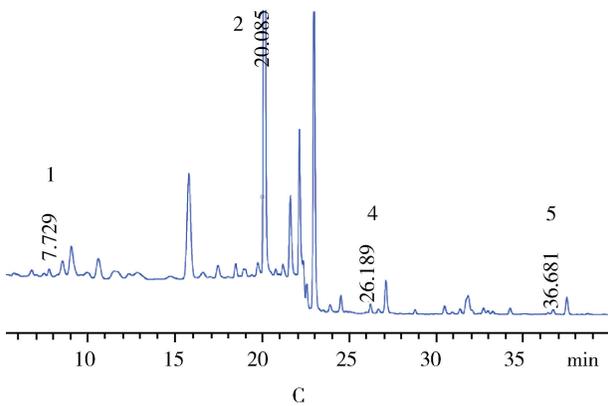
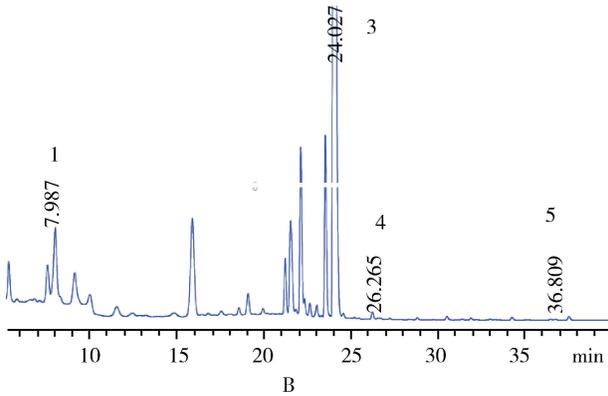
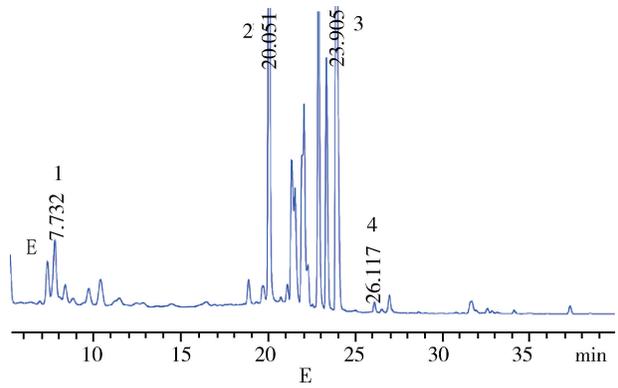
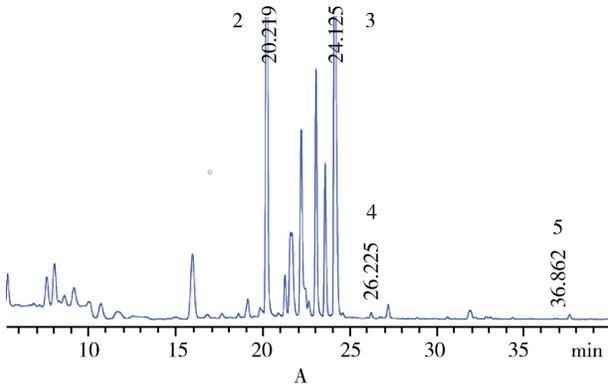


图 2 板蓝根阴性样品色谱图 (A)、黄芩阴性样品色谱图 (B)、黄连同黄柏阴性样品色谱图 (C)、甘草阴性样品色谱图 (D)、大黄阴性样品色谱图 (E)

1. (R,S) - 告依春; 2. 黄芩苷; 3. 盐酸小檗碱; 4. 甘草酸铵; 5. 大黄素

Fig 2 chromatogram of negative sample of isatidis (A), chromatogram of negative sample of scutellaria (B), chromatogram of negative sample of coptis and phellodendron chinense (C), chromatogram of negative sample of licorice (D), chromatogram of negative sample of rhubarb (E)

1. (R, S) - goitrin; 2. Baicalin; 3. Berberine hydrochloride; 4. Ammonium glycyrrhizinate; 5. Emodin

2.7 重复性试验 取同一批样品(编号 S16),按“2.1.2”项供试品制备方法,平行制备 6 份供试品溶液。按“2.2”项下色谱条件进样测定,根据峰面积计算各待测组分的含量及其 *RSD* 值。结果 (R, S) - 告依春、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵、大黄素含量的 *RSD* 值分别为 1.45%、1.01%、1.11%、1.41%、1.62%。表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取样品(编号 S16)细粉约 1.0 g,共 9 份,精密称定,分别按 80%、100%、120%精密加入 5 种对照品适量,按“2.1.2”项下方法平行制备供试品溶液,在“2.2”项色谱条件下进样测定,计算回收率。结果见表 2。(R,S) - 告依春、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵、大黄素的平均回收率分别为 102.7%、99.3%、101.1%、98.0%、97.3%,*RSD* 分别为 1.56%、0.72%、0.97%、1.33%、1.10%。说明该方法准确度较高。

表 2 加样回收率试验 ($n=3$)Tab 2 Sample recovery test ($n=3$)

成分	加入量 $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	样品量 $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	测得量 $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	回收率 $/\%$	RSD $/\%$	平均回收率 $/\%$	RSD $/\%$
(R,S) - 告依春	0.38		0.81 ± 0.01	101.0	1.43		
	0.47	0.43	0.92 ± 0.01	103.1	1.34	102.7	1.56
	0.56		1.02 ± 0.01	104.2	1.78		
黄芩苷	71.07		160.51 ± 0.15	99.5	0.21		
	88.83	89.81	178.56 ± 1.35	99.9	1.39	99.3	0.72
	106.60		194.83 ± 1.05	98.5	0.97		
盐酸小檗碱	17.14		39.37 ± 0.18	102.2	0.85		
	21.43	21.86	43.34 ± 0.21	100.2	0.91	101.1	0.97
	25.71		47.82 ± 0.19	100.9	0.70		
甘草酸铵	0.89		2.02 ± 0.01	99.4	1.41		
	1.11	1.13	2.21 ± 0.01	96.9	0.40	98.0	1.33
	1.33		2.43 ± 0.01	97.7	0.81		
大黄素	0.01		0.02 ± 0.001	97.1	1.64		
	0.01	0.01	0.03 ± 0.001	98.5	1.37	97.3	1.10
	0.02		0.03 ± 0.001	96.4	1.75		

2.9 线性与范围考察 将混合对照品溶液分别按 10%、40%、60%、80%、100% 逐级稀释,得到系列质量浓度混合对照品溶液,样品(编号 S16)中各成分的含量均为混合对照品的 60%。按“2.2”项色谱条件,进样测定,记录色谱图。以进样浓度(X , $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)为横坐标/峰面积(Y)为纵坐标,绘制 5

个组分的标准曲线,进行线性回归,计算回归方程和相关系数,结果表明 5 个成分在设定的线性范围内线性关系良好。将混合对照品溶液用甲醇逐步稀释,以信噪比(S/N)约为 10 时的混合对照品溶液浓度为定量限(LOQ)。标准曲线、线性范围、相关系数及定量限结果见表 3。

表 3 线性关系考察

Tab 3 Investigation of linear relationship

成分	标准曲线	R^2	线性范围/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	定量限(LOQ)/ $(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$
(R,S) - 告依春	$Y = 70.632X + 0.3008$	0.9998	0.0713 ~ 0.713	0.357
黄芩苷	$Y = 38.282X - 215.85$	0.9999	14.033 ~ 140.33	0.702
小檗碱	$Y = 49.401X + 2.9707$	0.9995	3.114 ~ 31.14	0.311
甘草酸铵	$Y = 9.5808X - 1.0182$	0.9997	0.116 ~ 1.16	29.125
大黄素	$Y = 98.198X + 0.3261$	0.9997	0.0049 ~ 0.049	0.198

2.10 样品含量测定 取 20 批样品,每一批样品平行取三份,按“2.1.2”项的方法制成供试品溶液,按“2.2”项色谱条件进样测定,计算(R,S) - 告依春、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵、大黄素的含量。结果见表 4。

3 化学计量学分析

3.1 聚类分析(CA) 聚类分析是一种通过数据建模简化数据的方法,根据研究对象的某些特征加以分类,建立样本间的相似关系,现已广泛应用于中药及其制剂的质量评价中^[13]。以 20 批不同厂

家不同批次的四黄止痢颗粒中 5 个指标性成分的含量为变量,采用 SPSS 26.0 软件组间联接系统聚类法,以 Euclidean 距离为测度进行聚类分析,结果见图 3。当类间距为 5 时,20 批样品可分为 4 类,S16、S19、S17、S18、S20 为第 I 类;S11、S15、S13、S14、S12 为第 II 类;S3、S5、S4、S2、S1 为第 III 类;S6、

S7、S10、S9、S8 为第 IV 类。当类间距为 15 时,20 批样品可分为 2 类,上述 I、II 类聚为一类,III、IV 类聚为一类。表明四黄止痢颗粒中 5 种指标性成分的含量与生产厂家有关,造成明显聚类的原因可能与不同厂家生产时所用的原药材质量差异以及生产工艺差异有关。

表 4 样品含量测定结果 (n=3)

Tab 4 Sample content determination results

批号	(R,S) - 告依春		黄芩苷		盐酸小檗碱		甘草酸铵		大黄素	
	平均值 /(mg · g ⁻¹)	RSD /%								
S1	0.007	0.46	4.63	0.29	4.47	0.88	0.462	1.17	0.0172	1.09
S2	0.008	0.54	4.93	0.15	4.72	0.58	0.503	0.66	0.0182	1.12
S3	0.007	0.73	4.82	1.09	4.65	0.49	0.488	0.71	0.0179	0.93
S4	0.007	0.61	4.77	0.24	4.62	0.91	0.471	0.67	0.0176	0.78
S5	0.006	0.47	4.84	0.37	4.69	0.40	0.495	0.68	0.0182	0.23
S6	0.010	0.32	5.38	0.59	2.00	0.73	0.870	0.21	0.2403	0.23
S7	0.010	1.25	5.39	0.72	2.01	0.49	0.857	0.97	0.2407	1.13
S8	0.006	0.36	5.14	0.88	1.93	0.55	0.808	0.31	0.2266	0.52
S9	0.008	0.54	5.49	0.46	2.04	0.68	0.880	0.64	0.2440	0.58
S10	0.008	0.98	5.41	0.96	2.02	0.95	0.881	0.62	0.2435	0.34
S11	0.005	0.56	6.98	0.41	0.09	0.76	0.017	0.12	0.0049	0.42
S12	0.003	0.81	6.80	0.10	0.08	0.67	0.015	0.80	0.0049	1.10
S13	0.005	0.65	6.65	0.54	0.08	0.23	0.014	0.79	0.0044	0.62
S14	0.005	0.62	6.60	0.93	0.08	0.62	0.013	0.17	0.0046	0.61
S15	0.005	0.87	7.00	1.03	0.09	1.12	0.013	0.60	0.0048	0.87
S16	0.060	0.26	8.18	0.49	2.01	0.19	0.087	0.52	0.0011	0.60
S17	0.063	0.51	8.17	0.26	2.02	0.62	0.107	0.56	0.0011	0.74
S18	0.058	0.36	8.27	0.36	2.04	0.58	0.100	0.40	0.0012	1.18
S19	0.058	0.41	8.18	0.44	1.99	0.21	0.101	0.38	0.0011	0.91
S20	0.051	1.16	8.24	0.41	2.08	0.77	0.103	0.36	0.0012	0.73

3.2 Hotelling's T2 和 DModX 控制限的建立 Hotelling's T2 和 DModX 控制图是 2 个互补的多变量分析手段,用于监测不同批次的产品质量^[14]。Hotelling's T2 表示的是每个选定观察点与模型平面中原点的距离,为模型的内部变化量,代表样品与主成分模型中其他样品的差异;DModX 表示数据在变量 X 空间到主成分模型的距离,代表样品中未被模型解释的变化。通常认为在控制限以下的产

品为正常批次产品。Hotelling's T2 和 DModX 统计量作为批次间差异性评价指标,两者具有不同的监控作用,互为补充^[15]。

Hotelling's T2 和 DModX 的控制图如图 4、图 5,图中的 T2Crit(99%) 和 DCrit 为控制限,其控制上限分别为 17.385 和 0.05;T2Crit(95%) 为警戒限,上限为 10.7186。这 20 批样品均在控制限以下,均为正常批次产品。

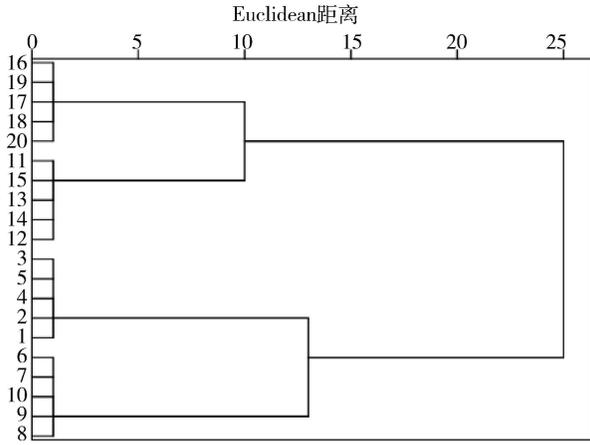


图 3 20 批四黄止痢颗粒样品聚类树状图

Fig 3 Dendrogram of 20 batches of Sihuangzhili Granules

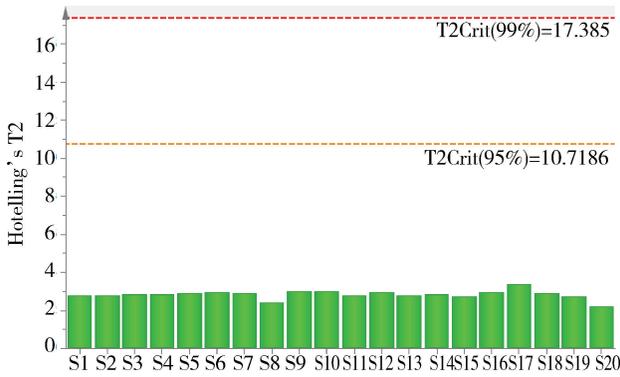


图 4 20 批四黄止痢颗粒样品 Hotelling's T2 控制图

Fig 4 Hotelling's T2 control chart of 20 batches of Sihuangzhili Granules

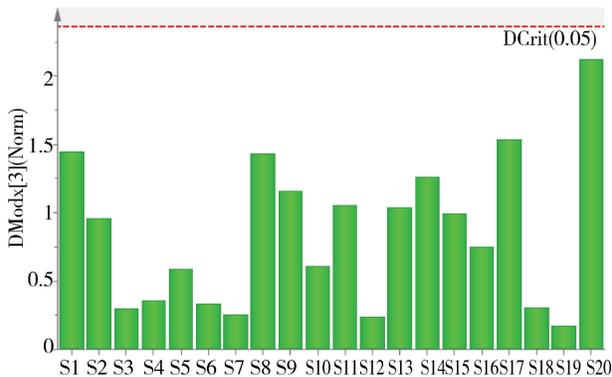


图 5 20 批四黄止痢颗粒样品 DModX 控制图

Fig 5 DModX control chart of 20 batches of Sihuangzhili Granules

3.3 偏最小二乘判别分析(PLS-DA) 偏最小二

乘判别分析是一种通用算法,可用于预测和描述性建模以及判别变量选择^[16]。同时,也是一种监督算法,是化学计量学中常用于特征提取和判别分析的技术^[17]。为评价不同厂家不同批次四黄止痢颗粒样品间的差异,采用 PLS-DA 模型进行分析。以 5 种指标性成分的含量为 X 变量,以样品 S1 ~ S20 为 Y 变量,利用 SIMCA 13.0 软件进行 PLS-DA 处理,结果见图 6、图 7。发现在置信区间 95% 内,20 批样品存在一定差异性,根据分布可将 20 批样品分为 4 类,样品 S1 ~ S5 为一类;S6 ~ S10 为一类;S11 ~ S15 为一类;S16 ~ S20 为一类,与聚类分析结果一致。表明这 5 种指标性成分在评价不同厂家的产品质量上具有重要参考价值。在 PLS-DA 模型中,某一成分的变量重要性投影(VIP)越大,表示这一成分对样品分类的贡献度越大^[18]。其中 VIP 值 >1 的有 3 种成分,分别为小檗碱、(R,S)-告依春和大黄素,说明这三种成分是影响不同厂家样品之间质量差异贡献较大的成分。

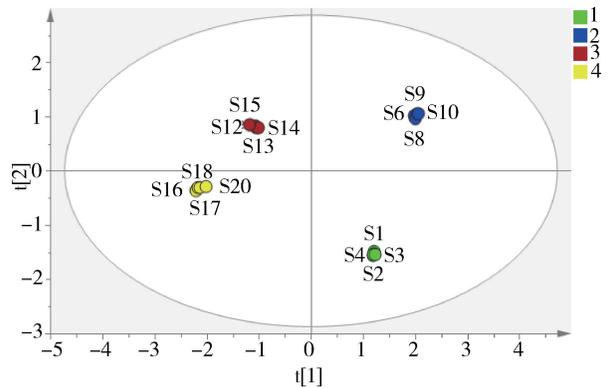


图 6 20 批四黄止痢颗粒样品 PLS-DA 得分图

Fig 6 PLS-DA score plot chart of 20 batches of Sihuangzhili Granules

4 讨论与结论

4.1 指标成分的选择 《中华人民共和国兽药典》2015 版二部中收录的四黄止痢颗粒,只对其中的黄芩苷进行含量测定。郑举等虽然测定了大黄素等 5 个成分,但并没有对小檗碱进行含量测定。小檗碱作为黄连、黄柏药材中共有的指标性成分,有必要对主成分小檗碱进行质量研究。本实验同时选定

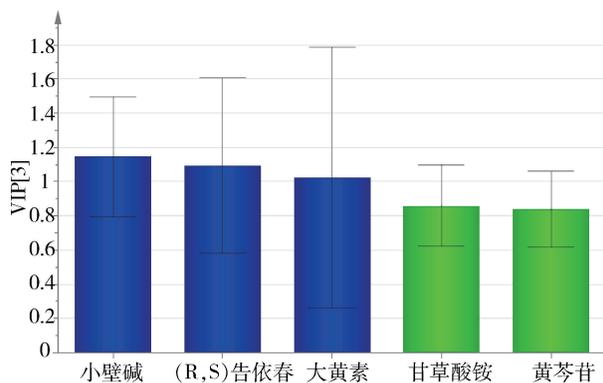


图 7 四黄止痢颗粒中 5 种成分的 VIP 值

Fig 7 VIP value of 5 components of Sihuangzili Granules

四黄止痢颗粒处方中每一味药材的指标性成分作为质量研究对象,更加严谨的评价四黄止痢颗粒的质量。

4.2 流动相的选择 本实验比较了多种流动相系统。有机相比较了甲醇和乙腈,水相比较了磷酸水溶液、冰醋酸水溶液和三氟乙酸水溶液。分别采用甲醇-0.05%磷酸水溶液、甲醇-0.5%冰醋酸水溶液、甲醇-0.3%三氟乙酸水溶液、乙腈-0.05%磷酸水溶液、乙腈-0.5%冰醋酸水溶液、乙腈-0.3%三氟乙酸水溶液。结果表明,在乙腈-0.3%三氟乙酸水溶液的流动相中,各指标成分色谱峰的分布、峰形和分离度均良好。因此,选择乙腈-0.3%三氟乙酸水溶液作为四黄止痢颗粒含量测定的流动相。

4.3 检测波长的选择 本实验使用紫外可见分光光度计在 190~400 nm 范围内对 5 个指标性成分进行全波长扫描,结果显示 (R,S)-告依春、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵、大黄素分别在 244.5、277.5、229.5、248.5、221 nm 处存在最大吸收,5 个指标性成分的最大吸收波长存在较大差异,难以实现同一波长下同时检测 5 种指标成分。最终选择分段波长切换法测定 5 个指标成分的含量。

4.4 结果分析 本研究利用 HPLC 波长切换法测定了四黄止痢颗粒中 5 种指标性成分的含量,并在此基础上首次结合化学计量学方法对不同厂家不同批次的四黄止痢颗粒进行了差异分析。在 PCA 模型的基础上设定了 Hotelling's T2 和 DModX 控

制限,对不同厂家不同批次的产品进行了监测,4 个厂家的 20 批样品均为正常批次样品。通过聚类分析及 PLS-DA 得分图可以看出,同一厂家生产的不同批次的样品质量一致性较好,但不同厂家之间样品的质量一致性存在明显差异。不同厂家的样品差异在指标性成分的含量上体现出来,进一步通过 PLS-DA 中的 VIP 值可以判断出,小檗碱、(R,S)-告依春和大黄素是造成明显差异的主要原因。以上 3 种成分的差异可能与不同厂家的生产工艺及设备有关,也可能与各厂家所使用的黄连、黄柏、大黄和板蓝根药材的产地、采收条件及炮制方法等因素有关。提示生产企业关注所用原药材的质量控制,加强原药材内控质量标准的管理,优化生产过程中的工艺及设备参数,确保产品质量与临床疗效的一致性。

4.5 结论 中兽药制剂成分复杂,而中兽药复方制剂发挥疗效,不是一种或一类成分的作用,也不是所有有效成分药效作用的简单加和,是多组分作用于机体的综合效应。单一的化学分析评价方法不能充分判断中兽药质量的一致性^[19]。对于企业来说,多成分含量测定不仅可以作为企业的内控标准,用于产品的批次间质量一致性评价研究,也可反映一段时期内用于生产的原料药材的质量变化,有助于进一步固定产地、厂家等,对更好的控制和保证药品质量具有重要意义;且多成分含量测定还可以用于不同企业之间药品质量的横向对比研究^[20]。

实验建立了 HPLC 波长切换法同时测定四黄止痢颗粒中 (R,S)-告依春、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵、大黄素 5 种成分的分析方法。相较于药典与文献已有报道的方法,增加了检测指标,且检测药材更全面,对四黄止痢复方中 6 味药材的指标性成分都进行了检测。并首次结合化学计量学对 20 批不同厂家不同批次的样品进行分析,发现了不同厂家之间产品质量有明显差异及造成差异的 3 种成分。该方法简便快速,准确度高,重复性好,可更全面的控制四黄止痢颗粒的质量,为四黄止痢颗粒的质量评价提供了依据。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典: 2015 年版. 二部[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016: 632-633.
China Veterinary Pharmacopoeia Committee. Chinese Veterinary Pharmacopoeia: 2015 edition. Part two[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2016: 632-633.
- [2] 孙嘉一. 四黄止痢复方中药提取物抗禽致病性大肠杆菌作用效果研究[D]. 锦州: 锦州医科大学, 2019.
Sun J Y. Study on effect of against APEC of extract from compound Chinese medicine[D]. Jinzhou: Jinzhou Medical University, 2019.
- [3] 侯湘梅, 岳洪水, 张磊, 等. 中药质量一致性评价探讨[J]. 药物评价研究, 2016, 39(01): 38-45.
Hou X M, Yue H S, Zhang L, *et al.* Study on quality consistency of Chinese materia medica[J]. Drug Evaluation Research, 2016, 39(01): 38-45.
- [4] 李树纲, 金录胜, 汪洋, 等. 我国兽药处方外非法添加物质现状分析[J]. 甘肃畜牧兽医, 2016, 46(015): 24-27.
Li S G, Jin L S, Wang Y, *et al.* Analysis on the status quo of illegally added substances outside the prescription of veterinary drugs in my country[J]. Gansu Animal Husbandry and Veterinary, 2016, 46(015): 24-27.
- [5] 冯婉红, 马灵珍. HPLC 多指标成分定量与化学计量学相结合的搜风理肺丸质量评价[J]. 中国药物应用与监测, 2021, 18(02): 92-96.
Feng W H, Ma L Z. Quality evaluation of Soufeng Lifei pills based on high performance liquid chromatography quantitative analysis of multi-components and chemometrics[J]. Chinese Journal of Drug Application and Monitoring, 2021, 18(02): 92-96.
- [6] 张慧, 汪佳楠, 陈燕, 等. 化学计量学在中药配方颗粒制备工艺与质量评价中的应用[J]. 中药材, 2019, 42(02): 474-478.
Zhang H, Wang J N, Chen Y, *et al.* Application of chemometrics in the preparation process and quality evaluation of traditional Chinese medicine prescription granules[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2019, 42(02): 474-478.
- [7] 张彤. 化学计量学在分析化学中的应用[J]. 合肥师范学院学报, 2014, 32(06): 59-60+71.
Zhang T. Application of Chemometrics in Analytical Chemistry[J]. Journal of Hefei Normal University, 2014, 32(06): 59-60+71.
- [8] 孙立丽, 王萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展[J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345.
Sun L L, Wang M, Ren X L. Application progress on chemical pattern recognition in quality control of Chinese materia medica[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(20): 4339-4345.
- [9] 熊玥, 宋慧敏, 贾纪萍, 等. 四黄止痢颗粒质量标准研究[J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(06): 45-48.
Xiong Y, Song H M, Jia J P, *et al.* Studies on Quality Standard of Sihuangzhili Granules[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2015, 49(06): 45-48.
- [10] 贾纪萍, 熊玥, 宋慧敏, 等. 四黄止痢颗粒中几种有效成分的薄层鉴别研究[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(04): 1233-1238.
Jia J P, Xiong Y, Song H M, *et al.* Study on the TLC Identification of Effective Components in the Sihuangzhili Granules[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(04): 1233-1238.
- [11] 王培, 钟文诗, 孙嘉一, 等. HPLC 方法同步测定四黄止痢复方中黄芩苷和小檗碱的含量[J]. 中国饲料, 2019(09): 84-86.
Wang P, Zhong W S, Sun J Y, *et al.* Simultaneous determination of baicalin and berberine in compound Chinese medicine Sihuangzhili by HPLC[J]. China Feed, 2019(09): 84-86.
- [12] 郑举, 刘红云, 陈静, 等. HPLC 波长切换法同时测定四黄止痢颗粒中 5 种成分的含量[J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(03): 58-62.
Zheng J, Liu H Y, Chen J, *et al.* Simultaneous determination of five constituents in Sihuangzhili granules by HPLC with switching wavelength[J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2020, 39(03): 58-62.
- [13] 高森, 王苹, 唐铖, 等. 基于 HPLC 指纹图谱、多指标成分含量测定及化学计量学的湿热痹片质量评价[J]. 中草药, 2020, 51(21): 5454-5461.
Gao S, Wang P, Tang C, *et al.* Quality evaluation of Shirebi Tablets based on combinative methods of HPLC fingerprint, quantitative analysis of multi-components and chemometrics analysis[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 51(21): 5454-5461.
- [14] Xiong H, Qi X, Qu H. Multivariate analysis based on chromatographic fingerprinting for the evaluation of batch-to-batch reproducibility in traditional Chinese medicinal production[J]. Anal. Methods, 2013, 5(2): 465-473.
- [15] 董自亮, 李红亮, 原欢欢, 等. UPLC 测定经典名方金水六君煎中 11 种成分[J]. 中草药, 2021, 52(03): 711-717.

- Dong Z L, Li H L, Yuan H H, *et al.* Determination of 11 components in Jinshui Liuju Decoction of classical prescriptions by UPLC[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2021, 52(03): 711 – 717.
- [16] Lee L C, Liong C Y, Jemain A A. Partial least squares – discriminant analysis (PLS – DA) for classification of high – dimensional (HD) data: a review of contemporary practice strategies and knowledge gaps [J]. *Analyst*, 2018, 143 (15): 3526 – 3539.
- [17] Aminu M, Ahmad N A. Complex Chemical Data Classification and Discrimination Using Locality Preserving Partial Least Squares Discriminant Analysis[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(41): 26601 – 26610.
- [18] Cai Z, Wang C, Chen C, *et al.* Quality evaluation of Lonicerae Japonicae Flos and Lonicerae Flos based on simultaneous determination of multiple bioactive constituents combined with multivariate statistical analysis[J]. *Phytochemical Analysis*, 2021, 32; 129 – 140.
- [19] 孙 昱. 符合中医药特点的中药新药评价思路探讨[J]. *中国药事*, 2020, 34(07): 749 – 753.
- Sun Y. Discussion on the Evaluation of New Traditional Chinese Medicine in Line with the Characteristics of TCM[J]. *Chinese Pharmaceutical Affairs*, 2020, 34(07): 749 – 753.
- [20] 雷晓晴, 王亚丹, 乔三洋, 等. UHPLC 法同时测定并比较不同厂家、不同剂型益心舒制剂中 7 种成分含量[J]. *中草药*, 2021, 52(03): 692 – 701.
- Lei X Q, Wang Y D, Qiao S Y, *et al.* Simultaneous determination and comparison of seven components in Yixinshu preparations with different dosage forms conducted by different manufacturers using UHPLC[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2021, 52(03): 692 – 701.

(编辑:陈 希)