

基于指纹图谱与多指标成分定量结合化学模式识别 分析的小儿热速清颗粒质量评价研究

周爱鲜¹, 廖正根¹, 勒孚仕², 刘慧星², 赵国巍¹, 梁新丽^{1*}

(1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004; 2. 江西倍肯药业有限公司, 宜春 336400)

摘要 **目的:** 采用指纹图谱、多指标成分含量测定与化学模式识别分析技术相结合的方法研究不同批次小儿热速清颗粒, 为其质量评价提供依据。**方法:** 采用 SuperLu C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇(A) - 0.1% 磷酸水(B), 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 280 nm, 对 15 批小儿热速清颗粒指纹图谱进行相似度评价, 指出 11 个特征成分, 并对葛根素、连翘酯苷 A、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素 7 个有效成分进行含量测定, 采用聚类分析(HCA)及主成分分析(PCA)对 15 批样品进行分类并进行正交最小偏二乘法 - 判别分析(OPLS - DA), 筛选出样品批次间差异成分。**结果:** 建立了小儿热速清颗粒 HPLC 指纹图谱及 7 个成分的含量测定方法, 且这 2 种方法学验证的结果均符合要求, 确定了 28 个共有峰, 并指出了 11 个色谱峰, 15 个批次相似度范围为 0.995 ~ 0.999; HCA 和 PCA 结果显示 15 个批次成分聚为 2 类, OPLS - DA 分析筛选出 13 个造成样品批次间差异的标志物; 多指标成分含量测定表明不同批次间小儿热速清颗粒中化学成分含量差异性较小。**结论:** 建立的小儿热速清颗粒 HPLC 指纹图谱及 7 个成分含量测定方法的专属性强, 准确、可靠, 结合化学模式识别可有效的用于小儿热速清颗粒的质量控制。

关键词: 小儿热速清颗粒; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 相似度评价; 化学模式识别; 主成分分析; 多成分含量测定; 质量评价; 相关性分析

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)06 - 1062 - 12

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024.06.18

Quality evaluation of Xiaoer Resuqing granules based on fingerprint and quantitative analysis of multi - index components combined with chemical pattern recognition analysis

ZHOU Ai - xian¹, LIAO Zheng - gen¹, LE Fu - shi²,
LIU Hui - xing², ZHAO Guo - wei¹, LIANG Xin - li^{1*}

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Jiangxi Beken Pharmaceutical Co., Ltd., Yichun 336400, China)

Abstract Objective: To study different batches of Xiaoer Resuqing granules by combining the method of fingerprint, multi - index component content determination and chemical pattern recognition analysis technology, and to provide the basis for its quality evaluation. **Methods:** The chromatographic SuperLu C₁₈ (250 mm × 4.6 mm,

* 通信作者 Tel: (0791) 87118658; E - mail: paln7@163.com

第一作者 Tel: 18720406827; E - mail: 1479063375@qq.com

5 μm) column was adopted with mobile phase composed of methanol (A) - 0.1% phosphoric acid (B) with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL \cdot min⁻¹. The column temperature was 30 $^{\circ}\text{C}$, and the detection wavelength was 280 nm. Eleven characteristic components were identified, and the contents of seven active components, including puerarin, forsythiaside A, phillyrin, baicalin, wogonoside, baicalein and wogonin were determined. Hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) were used to classify 15 batches of samples, and orthogonal least partial squares discriminant analysis (OPLS - DA) was performed. To screen out the difference components between batches of Xiaoer Resuqing granules.

Results: The HPLC fingerprint of Xiaoer Resuqing granules and the content determination method of 7 components were established, the results of the two methods met the requirements. Twenty - eight common peaks were identified, 11 chromatographic peaks were identified, and the similarities of 15 batches of samples ranged from 0.995 to 0.999. HCA and PCA results showed that 15 batches were clustered into two categories, and OPLS - DA screened out 13 markers that caused the differences among the 15 batches of samples. There was little difference in the contents of ingredients.

Conclusion: The established HPLC fingerprint of Xiaoer Resuqing granules and the determination method of 7 components are specific, accurate and reliable. Combined with chemical pattern recognition, it can be effectively used for the quality control of Xiaoer Resuqing granules.

Keywords: Xiaoer Resuqing granules; HPLC; fingerprint; similarity evaluation; chemical pattern recognition; principal component analysis; determination of multi - component content; quality evaluation; correlation analysis

我国儿童人群基数大,第七次全国人口普查数据显示,0 ~ 14 岁人口占 17.95%^[1],儿童作为特殊人群,免疫系统等发育尚未完善,患病率高,因此,安全有效的儿童用药需求迫切,而药物质量是儿童用药安全的有力保障。2020 年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)一部中收录中成药成方制剂和单味制剂 1 457 种,而儿科专用品种仅有 60 种^[2],可见儿科专用品种缺乏,而现有的儿科专用品种的质量显得尤为重要。小儿热速清颗粒为儿科专用中成药之一,现收录于 2020 年版《中国药典》一部^[2],其由金银花、柴胡、连翘、葛根、黄芩、大黄、板蓝根、水牛角 8 味中药组成,具有清热解毒、泻火利咽的功效,用于小儿外感风热所致感冒,症见高热、头痛、咽喉肿痛、鼻塞流涕、咳嗽、大便干结^[2]。同时临床研究表明小儿热速清颗粒对儿童甲型流感病毒肺炎^[3],小儿急性化脓性扁桃体炎^[4],小儿急性上呼吸道感染伴发热^[5],手足口病^[6]等病症具有辅助治疗的效果。

中药制剂具有多组分、多靶点、多途径相互作用的特点^[7],中药指纹图谱能够表征中药及制剂多成分的整体特性,是评价中药材及中药制剂质量的有效方法^[8-9]。化学模式识别技术可以对指纹图谱中的信息进行表达、识别和处理^[10]。将中药指纹图谱、

多成分含量测定与化学模式识别技术结合,可以更加全面、系统地评价中药材以及中药制剂的质量。

产品批间质量稳定是临床等效性和有效性的重要前提^[11],现行小儿热速清颗粒质量评价标准仅对黄芩苷、连翘苷 2 个化学成分进行控制,而多成分协同增效是中药复方发挥作用的特点,因此有必要建立小儿热速清颗粒多成分质量控制标准。小儿热速清颗粒尚无 HPLC 指纹图谱及化学模式识别相关研究,难以体现制剂整体质量^[12-13]。因此,本研究采用高效液相色谱法(HPLC)建立 15 批小儿热速清颗粒指纹图谱及 7 个成分的含量测定,在指纹图谱相似度评价的基础上,同时结合聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)及正交最小偏二乘法 - 判别分析(OPLS - DA)等化学模式识别方法对其进行整体性评价,为全面控制小儿热速清颗粒批次间的稳定性提供了方法,为该制剂建立更系统、全面的质量控制标准提供借鉴与参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent1260 型高效液相色谱仪(安捷伦公司);BSA124S 万分之一分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);实验室级超纯水机(南京易普易达有限公司);KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪

器有限公司);CF1524R 台式高速冷冻型微量离心机(SIGMA 公司);DZTW 型调温电热套(北京市光明医疗仪器有限公司);RE-5210A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);循环水式多用真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);D2010W 电动搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司);DZF-6050 型真空干燥箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);GZX-9070MBE 数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);BT100S 调速型智能蠕动泵(河北保定雷弗流体科技有限公司)。

1.2 试药

对照品:黄芩苷(批号 21051301,质量分数 98.42%)、汉黄芩苷(批号 21102106,质量分数 99.79%)、黄芩素(批号 21090101,质量分数 98.18%)、汉黄芩素(批号 21051406,质量分数 98.04%)、连翘酯苷 A(批号 21022605,质量分数 98.61%)、葛根素(批号 21061603,质量分数 98.61%)、3-羟基葛根素(批号 18102401,质量分数 98.6%)、3-甲氧基葛根素(批号 21022610,质量分数 98.5%),均购于成都普菲生物科技有限公司;连翘苷(批号 BCTG-0232,质量分数 $\geq 98\%$),购于江西本草天工科技有限公司;新绿原酸(批号 RDD-XO1402112013,质量分数 $> 98\%$)、异绿原酸 B(批号 RDD-Y06911801005,质量分数 $> 98\%$),购于成都瑞芬思生物科技有限公司。

样品:小儿热速清颗粒,均由江西倍肯药业有限公司提供,共 15 批(规格:6 g·袋⁻¹,批号分别为 20210905、20210916、20210917、20210918、20210919、20210922、20210924、20210925、20211010、20211022、20211023、20211024、20211025、20211026、20211027,编号 S1~S15)。

甲醇(色谱纯,湖北弗顿科学技术有限公司);甲醇、磷酸(分析纯,西陇科学股份有限公司);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 SuperLu C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm) 色谱柱,以甲醇为流动相 A,0.1% 磷酸溶液为流动相 B,梯度洗脱(0~25 min,15% A→37% A;25~38 min,37% A→45% A;38~43 min,45% A;43~56 min,45% A→71% A;56~65 min,71% A→90% A;65~75 min,90% A),检测波长为 280 nm,柱温为 30 ℃,流速为

1.0 mL·min⁻¹,进样量为 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取样品适量,研细,取约 3 g,精密称量,置具塞锥形瓶中,精密加入 75% 甲醇 25 mL,密塞,称量,超声(功率 250 W,频率 25 kHz)处理 30 min,放冷,再称量,用 75% 甲醇补足失去的量,摇匀,以 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,0.22 μm 的微孔滤膜过滤,即得。

2.2.2 混合对照品溶液 分别精密称取黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、连翘苷、连翘酯苷 A、葛根素、3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素、新绿原酸、异绿原酸 B 的对照品适量,加甲醇配制成母液,精密吸取各母液适量,加 50% 甲醇制成每 1 mL 分别含以上成分 20、30、10、30、50、50、20、30、30、20、20 μg 的混合对照品溶液。

2.2.3 阴性供试品溶液 按照 2020 年版《中国药典》一部小儿热速清颗粒制法,分别制备缺金银花、连翘、柴胡、大黄、黄芩、葛根、板蓝根、水牛角的阴性颗粒。各阴性颗粒再按“2.2.1”项下方法制备,即得。

2.3 HPLC 指纹图谱研究

2.3.1 共有峰的指认 取“2.2”项下的混合对照品溶液及供试品溶液(S1),分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,通过与色谱峰的保留时间及紫外吸收光谱图进行对比分析,见图 1。结果指认出 11 个特征峰,分别是 3 号峰新绿原酸、7 号峰 3'-羟基葛根素、9 号峰葛根素、10 号峰 3'-甲氧基葛根素、15 号峰连翘酯苷 A、16 号峰异绿原酸、18 号峰连翘苷、20 号峰黄芩苷、24 号峰汉黄芩苷、25 号峰黄芩素、27 号峰汉黄芩素。

2.3.2 共有峰的归属 取“2.2”项下的供试品溶液(S1)及各阴性供试品溶液,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,将供试品溶液的色谱峰与 8 个阴性供试品溶液的色谱峰进行重叠比较,结合色谱峰的保留时间以及紫外吸收光谱图,对指纹图谱的 28 个共有峰进行归属,见图 2。结果指纹图谱中有 26 个特征峰可以在原药材中找到具体归属(其中 2、19 号峰来源大黄,3、16~17 号峰来源金银花,4~5、14~15、18 号峰来源连翘,6~12 号峰来源葛根,20~28 号峰来源黄芩;另外 2 个峰为多药材共有峰,其中 1 号峰为 8 味药材的共有峰,13 号峰同时归属于葛根、连翘 2 味原药材)。

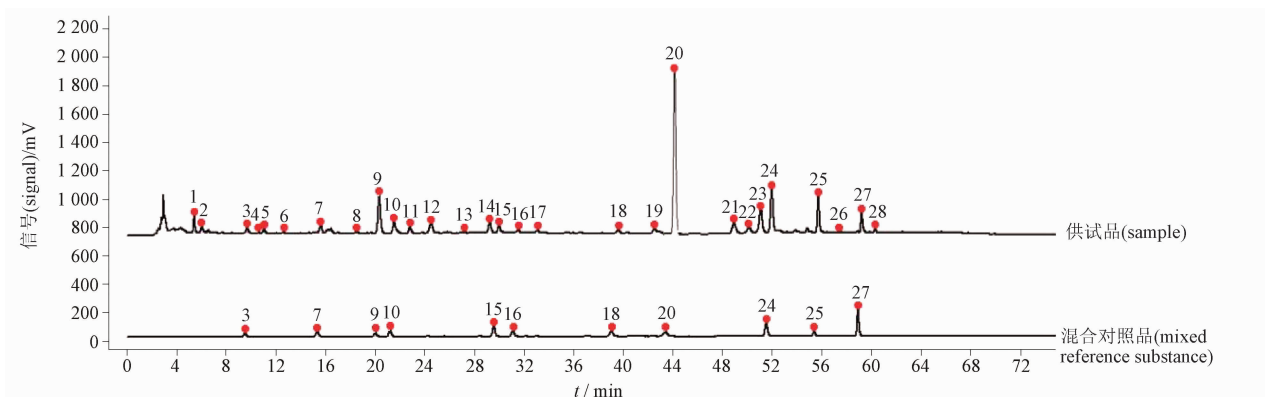


图1 供试品及混合对照品叠加 HPLC 图

Fig. 1 Overlay HPLC chromatograms of sample and mixed reference standards

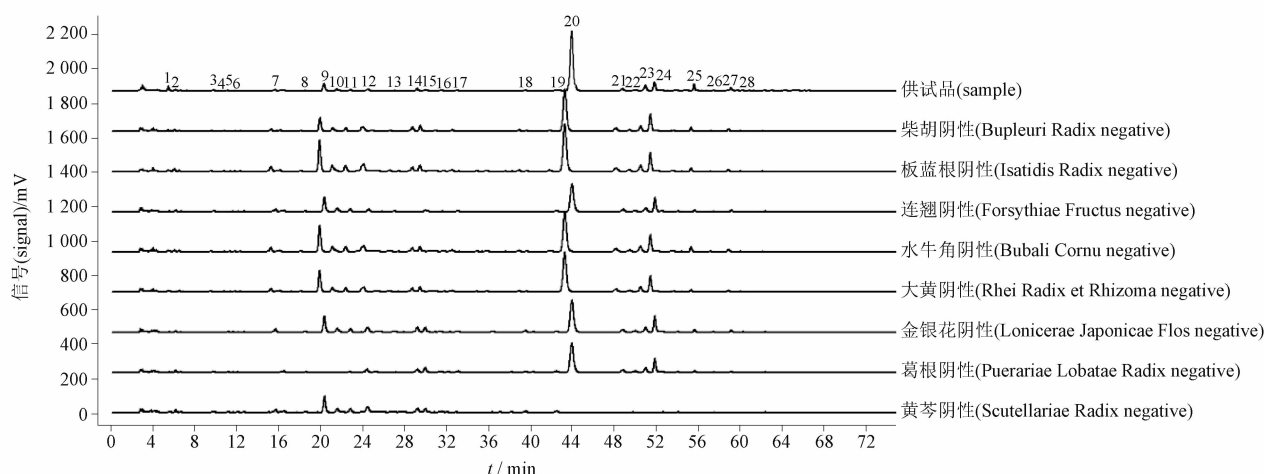


图2 供试品溶液及阴性溶液叠加 HPLC 图

Fig. 2 Overlay HPLC chromatograms of sample and negative sample

2.3.3 稳定性试验 称取样品 (S1) 适量, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件于 0、2、4、8、12、24 h 后进样测定, 以 9 号峰 (葛根素) 作为参照峰, 结果测得各共有峰相对保留时间 RSD 均 < 0.27%, 相对峰面积 RSD 均 < 2.8%, 表明供试品溶液在 24 h 稳定。

2.3.4 精密度试验 取同一份样品 (S1), 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 以 9 号峰 (葛根素) 作为参照峰, 结果测得各共有峰相对保留时间 RSD 均 < 1.0%, 相对峰面积 RSD 均 < 2.6%, 表明仪器精密度良好。

2.3.5 重复性试验 称取样品 (S1) 适量, 按“2.2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 以 9 号峰 (葛根素) 作为参照峰, 结果测得各共有峰相对保留时间 RSD 均 < 0.12%, 相对峰面积 RSD 均 < 2.9%, 表明该方法重

复性较好。

2.3.6 小儿热速清颗粒 HPLC 指纹图谱的生成 取 15 批样品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 得到 15 批样品的 HPLC 色谱图, 导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723 版本)”软件进行分析评价, 设定样品 S1 的图谱为参照指纹图谱 (R), 时间窗宽度为 0.1, 采用中位数法, 结合多点校正并进行 Mark 峰匹配, 生成小儿热速清颗粒特征图谱 (见图 3) 及 15 批样品 HPLC 叠加指纹图谱 (见图 4), 共确定 28 个共有峰。其中 9 号峰 (葛根素) 峰面积较大, 与相邻色谱峰分离效果好且保留时间稳定, 可设为参照峰。结果测得 28 个共有峰的相对保留时间 RSD 均 < 0.21%, 相对峰面积 RSD 在 2.4%~53%, 说明 15 批样品中 28 个共有峰的相对保留时间稳定, 相对峰面积具有一定的差异。

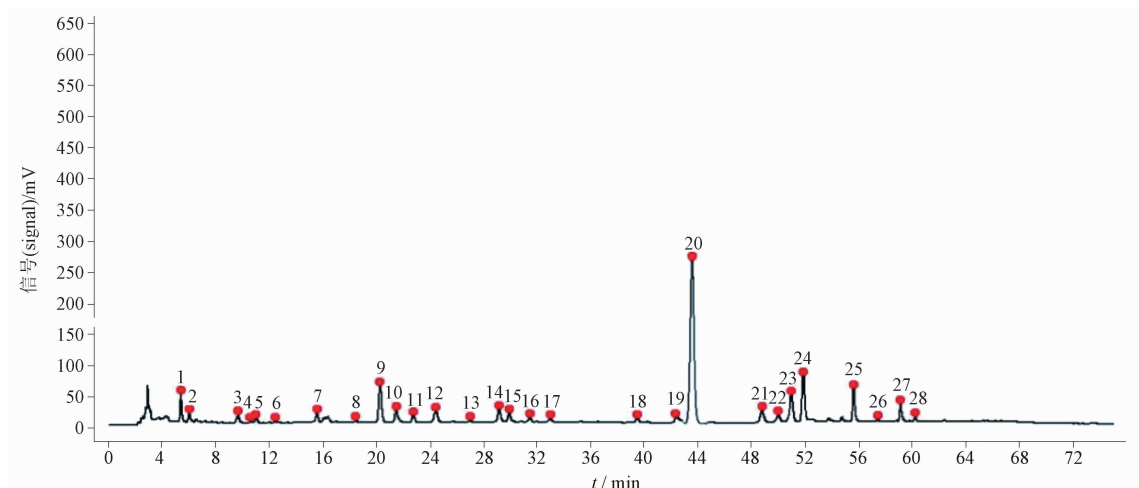


图3 小儿热速清颗粒特征图谱

Fig. 3 HPLC characteristic chromatogram of Xiaoer Resuqing granules

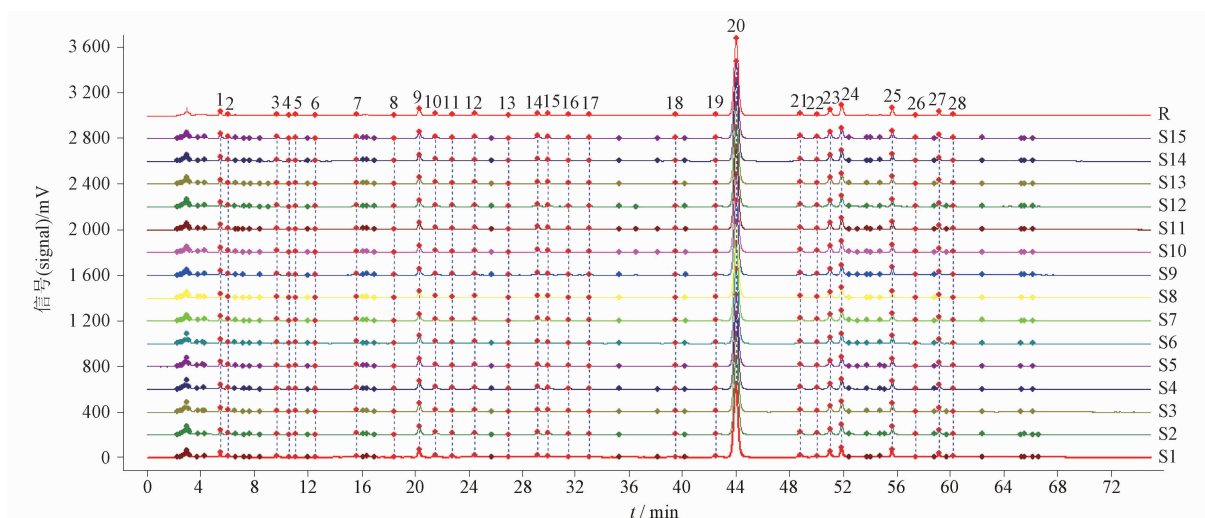


图4 15批小儿热速清颗粒 HPLC 叠加指纹图谱

Fig. 4 Overlay fingerprints of 15 batches of Xiaoer Resuqing granules

2.3.7 相似度评价 将15批小儿热速清颗粒 HPLC 相关数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版本)”软件,以样品 S1 色谱图作为对照图谱,计算相似度。由于黄芩苷色谱峰面积较大且峰高过高,与其他色谱峰相比差异太大,以致于其在指纹图谱相似度评价中占据了主导作用,使相似度结果均为1。为了不影响计算指纹图谱相似度的准确性,故考虑将黄芩苷色谱峰去除后重新计算相似度^[11,14],得15批颗粒指纹图谱相似度分别为0.996、0.996、0.997、0.997、0.996、0.995、0.999、0.998、0.999、0.998、0.997、0.998、0.998、0.997、0.998,说明各批次间具有高度相似

性,各批次颗粒工艺制备相对较稳定,质量一致性较好。

2.4 化学模式识别分析

2.4.1 聚类分析 以15批样品中28个共有峰的相对峰面积为变量,导入 SPSS 21 软件,采用组间联接、平方欧式距离法进行系统聚类分析(HCA),见图5。当平方欧式距离介于10时,结果显示样品可聚为2类,即样品 S1 ~ S6 聚为第1类,样品 S7 ~ S15 聚为第2类。结果表明15批样品,在制备工艺相同的条件下,不同批次间28个共有峰的相对峰面积存在一定差异,且与相似度结果一致。

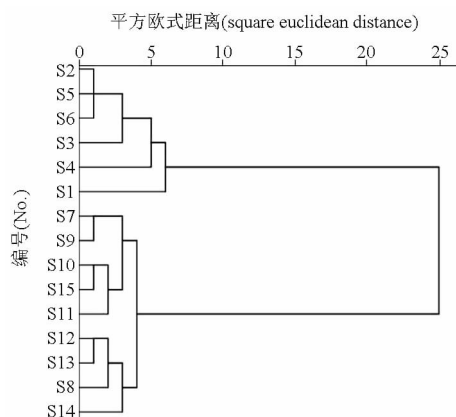


图5 15批小儿热速清颗粒的HCA树状图

Fig. 5 HCA dendrogram of 15 batches of Xiaoe Resuqing granules

2.4.2 主成分分析 以15批小儿热速清颗粒指纹图谱的28个共有峰的峰面积为变量,导入SPSS 21.0统计软件进行主成分分析(PCA)。以特征值 >1 作为筛选标准,得到5个主成分因子,其累计方差贡献率为93.969%(表1),说明这5个主成分因子可代表小儿热清颗粒指纹图谱28个共有峰的基本特征与绝大部分信息。成分载荷矩阵反映了各主成分与28个共有峰即原始变量之间的相关系数,载荷的绝对值越大,对主成分的贡献越大^[15-16],结果由表2可知,主成分1主要反映了峰2、4、5、7~10、13、15、17、19、21~27的信息,主成分2主要反映了峰1、3、6、11、12、14、16、18的信息,主成分3主要反映了峰20的信息,主成分4主要反映了峰1的信息,主成分5主要反映了峰28的信息。将5个主成分的得分分别记为 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 、 Y_5 ,以各主成分对应的贡献率作为权重系数,建立主成分综合得分模型:

$$Y_{\text{综}} = 0.5109Y_1 + 0.2748Y_2 + 0.0762Y_3 + 0.0416Y_4 + 0.0362Y_5$$

得分结果见表3。得分反映各批次小儿热速清颗粒的质量情况,质量越好,则分数越高。综合得分较高的前7位分别为S11、S10、S14、S15、S8、S7、S12,其综合得分均 >1 ,说明这7个批次的样品质量较好。将15批样品中的28个共有峰的峰面积导入SIMCA 14.1软件进行PCA处理,PCA得分图见图6。结果发现15批样品能分成2类,其中样品S1~S6分为第1类,样品S7~S15分为第2类,与HCA结果一致,指纹图谱相似度结果相符。进一步表明15批样品批次间质量稳定、可靠。

表1 PCA特征值及贡献率

Tab. 1 PCA eigenvalue and contribution rate

主成分 (component)	特征值 (eigenvalue)	方差贡献率 (variance contribution rate)/%	累计方差贡献率 (cumulative varianc contribution rate)/%
1	14.306	51.091	51.091
2	7.693	27.476	78.567
3	2.133	7.617	86.183
4	1.166	4.164	90.347
5	1.014	3.621	93.969

2.4.3 正交最小偏二乘法-判别分析 为进一步分析不同批次小儿热速清颗粒之间化学成分的差异,以15批样品中的28个共有峰的峰面积为变量,导入SIMCA 14.1软件进行正交最小偏二乘法-判别分析(OPLS-DA)处理。该模型稳定性参数 $R^2Y=0.989$,模型预测参数 $Q^2=0.972$,均 >0.5 ,表明建立的OPLS-DA模型具有较高的稳定性与较好的预测能力^[17]。为验证该模型没有过拟合现象,随机排列200次做置换检验,得置换检验图,见图7(A), R^2 回归线在Y轴截距为0.481、 Q^2 回归线在Y轴截距为-0.896,均小于原始值,说明所建立的模型不存在过拟合现象^[18],可用于判别分析15批样品的批次间差异。由图7(B)可知,根据OPLS-DA得分,15批样品可聚为2类,其中样品S1~S6聚为1类,S7~S15聚为另1类,与PCA和HCA结果一致,也与去除黄芩苷色谱峰后所得指纹图谱相似度结果相符。VIP能够反映每个共有峰的贡献程度,以VIP >1 作为判定标准,筛选造成样品批次间差异的标志性成分^[19-20]。结果筛选出13个色谱峰,见图7(C),按VIP大小排序分别为峰7(3'-羟基葛根素)、2、10(3'-甲氧基葛根素)、9(葛根素)、5、4、19、22、27(汉黄芩素)、12、17、21、23。即上述13个色谱峰是引起批次间差异的主要化学成分,即为潜在差异标志物。其中1个来源金银花,2个来源大黄,2个来源连翘,4个来源葛根,4个来源黄芩,进一步说明严格控制黄芩、葛根、大黄、连翘、金银花药材质量是确保小儿热速清颗粒批次间质量稳定的关键。在载荷散点图中,距离原点越远,权重值越大,说明该成分的变化对区分样品各批次间的作用越大^[21],作为批次间质量差异性成分的可能性越大。15批样品共有峰载荷散点图见图7(D),结果显示

表 2 15 批小儿热速清颗粒的成分载荷矩阵

Tab. 2 Component load matrix of 15 batches of Xiaoer Resuqing granules

峰号 (peak No.)	共有峰 (common peak)	主成分载荷(component matrix)				
		1	2	3	4	5
1	未指认(unspecified)	-0.043	0.630	-0.509	-0.483	0.077
2	未指认(unspecified)	-0.825	0.540	0.022	-0.026	-0.124
3	新绿原酸(neochlorogenic acid)	0.525	0.754	0.071	-0.040	0.192
4	未指认(unspecified)	-0.926	0.169	0.294	0.130	-0.059
5	未指认(unspecified)	-0.914	0.240	0.300	-0.038	-0.084
6	未指认(unspecified)	-0.428	0.783	-0.063	-0.269	-0.213
7	3-羟基葛根素(3-hydroxy puerarin)	-0.930	0.329	0.041	0.113	-0.070
8	未指认(unspecified)	0.681	0.489	-0.275	0.395	0.087
9	葛根素(puerarin)	-0.872	0.441	0.089	0.138	-0.117
10	3-甲氧基葛根素(3-methoxy puerarin)	-0.868	0.456	0.042	0.167	-0.076
11	未指认(unspecified)	-0.389	0.728	-0.343	0.294	-0.209
12	未指认(unspecified)	-0.596	0.774	0.031	0.118	-0.024
13	未指认(unspecified)	0.840	0.217	-0.323	0.319	0.052
14	未指认(unspecified)	0.633	0.670	-0.109	0.070	-0.074
15	连翘酯苷 A(forsythiaside A)	0.826	0.533	-0.069	0.059	0.073
16	异绿原酸(isochlorogenic acid)	0.042	0.899	-0.034	-0.220	-0.041
17	未指认(unspecified)	0.867	0.471	-0.034	-0.068	-0.059
18	连翘苷(phillyrin)	0.614	0.618	-0.262	0.137	0.048
19	未指认(unspecified)	-0.820	0.388	-0.140	-0.111	-0.142
20	黄芩苷(baicalin)	0.596	0.402	0.643	-0.056	0.056
21	未指认(unspecified)	0.776	0.395	0.434	0.122	-0.080
22	未指认(unspecified)	0.942	0.134	0.238	0.005	-0.053
23	未指认(unspecified)	0.800	0.235	0.493	-0.172	-0.115
24	汉黄芩苷(wogonoside)	0.652	0.502	0.435	0.136	-0.022
25	黄芩素(baicalein)	-0.577	0.558	0.033	0.275	0.422
26	未指认(unspecified)	0.732	0.484	-0.171	-0.353	-0.188
27	汉黄芩素(wogonin)	-0.760	0.457	0.386	-0.092	0.125
28	未指认(unspecified)	-0.413	0.344	0.019	-0.234	0.726

上述 13 个色谱峰均离原点距离较远,与图 7 - C 结果一致。提示这 13 个色谱峰的差异对样品分类的影响较大,这些成分可能是导致样品批次间差异的主要标志性成分。

2.5 小儿热速清颗粒中 7 个成分的含量测定

2.5.1 溶液的制备 供试品溶液、阴性供试品溶液的制备同“2.2”项方法;精密称取对照品葛根素、连翘酯苷 A、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素等适量,加 50% 甲醇配置成质量浓度分别为 95.76、183.96、82.88、339.24、212.80、37.30、29.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品储备液。

2.5.2 专属性试验 称取样品 S1 适量,取“2.5.1”

项下的混合对照品储备液、供试品溶液以及阴性供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,见图 8。由结果可知,葛根素、连翘酯苷 A、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素与其相邻色谱峰的分度均 > 1.5 ,且无阴性干扰。

2.5.3 线性关系考察 取混合对照品储备液,配制系列标准曲线工作液,以质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标 X,峰面积为纵坐标 Y,进行线性回归,结果各成分线性关系良好,见表 4。

2.5.4 精密度试验 吸取混合对照品储备液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定 6 次,测得葛根素、连翘酯苷 A、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、

表 3 15 批小儿热速清颗粒的主成分因子得分及排序

Tab.3 Principal component factor score and ranking of 15 batches of Xiaoer Resuqing granules

编号(No.)	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	$Y_{\text{综}}(\text{sum up})$	排序(sort)
S1	-4.044	4.354	-4.385	-1.729	-1.408	-1.327	11
S2	-10.518	3.334	0.74	-0.076	0.375	-4.391	12
S3	-7.323	9.234	1.901	1.707	-0.755	-1.015	10
S4	-9.505	-0.598	0.664	0.21	0.145	-4.956	13
S5	-12.675	-5.031	-0.913	-0.794	1.302	-7.914	15
S6	-12.11	-0.916	0.699	0.151	-0.099	-6.383	14
S7	4.683	-1.833	-1.239	1.032	1.473	1.891	6
S8	5.729	-3.334	-0.393	2.137	-1.475	2.017	5
S9	3.544	-5.498	-2.165	1.319	0.719	0.216	9
S10	7.788	2.168	-0.736	-0.334	-0.628	4.482	2
S11	12.409	11.42	0.192	-0.506	1.533	9.527	1
S12	5.338	-3.47	2.242	-0.978	-1.269	1.858	7
S13	3.496	-3.732	2.655	-1.526	-0.123	0.895	8
S14	6.671	-3.286	1.497	-0.495	0.67	2.623	3
S15	6.517	-2.812	-0.759	-0.118	-0.459	2.477	4

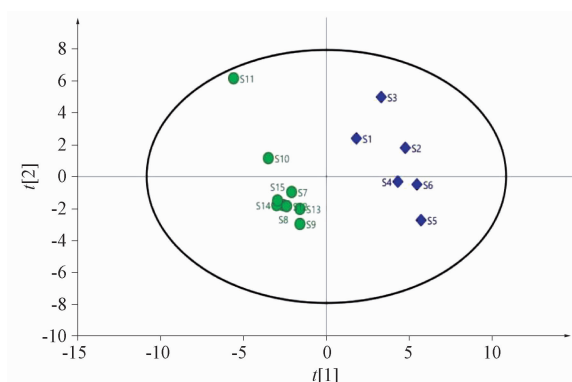


图 6 15 批小儿热速清颗粒的 PCA 得分图

Fig.6 PCA score plots of 15 batches of Xiaoer Resuqing granules

汉黄芩素峰面积的 RSD 在 0.39%~2.3%,表明仪器精密度良好。

2.5.5 稳定性试验 称取样品 S1 适量,按“2.2.1”项方法制备供试品溶液,按“2.1”项色谱条件于 0、2、4、8、12、24 h 后进样测定,测得葛根素、连翘酯苷 A、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素峰面积的 RSD 在 0.37%~2.6%,表明在 24 h 内溶液稳定。

2.5.6 重复性试验 称取样品 S1 适量,按“2.2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,测得葛根素、连翘酯苷 A、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素含量的 RSD 在 1.0%~2.8%,表明方法重复性好。

2.5.7 加样回收率试验 精密称取样品 S1 粉末 1.5 g,共 6 份,分别加入适量对照品葛根素、连翘酯苷 A、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素,使加入量与 1.5 g 粉末中各成分的含量一致,按“2.2.1”项方法制备得到供试品溶液,按“2.1”项色谱条件测定,计算各成分的平均加样回收率。测得葛根素、连翘酯苷 A、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的平均加样回收率在 95.1%~101.7%,RSD 在 1.4%~2.6%,说明该方法加样回收率良好。

2.5.8 样品含量测定 取 15 批样品,按“2.2.1”项方法制备供试品溶液,按“2.1”项色谱条件测定,计算葛根素、连翘酯苷 A、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素含量,结果见表 5,不同批次样品中上述 7 个指标成分含量的 RSD 在 4.2%~11.0%,表明 15 批样品 7 个成分含量批间差异性较小。

2.5.9 7 个成分含量与指纹图谱综合得分的相关性分析 为了明确所测 7 个成分含量是否可作为指标性成分用以评价小儿热速清颗粒的质量,采用 SPSS 21 软件对 15 批样品中葛根素、连翘酯苷 A、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的总量和指纹图谱的综合得分进行相关性分析,结果表明二者的相关系数为 0.746(双尾, $P < 0.01$),说明所测 7 个成分可以作为指标性成分对小儿热速清颗粒进行质量评价。

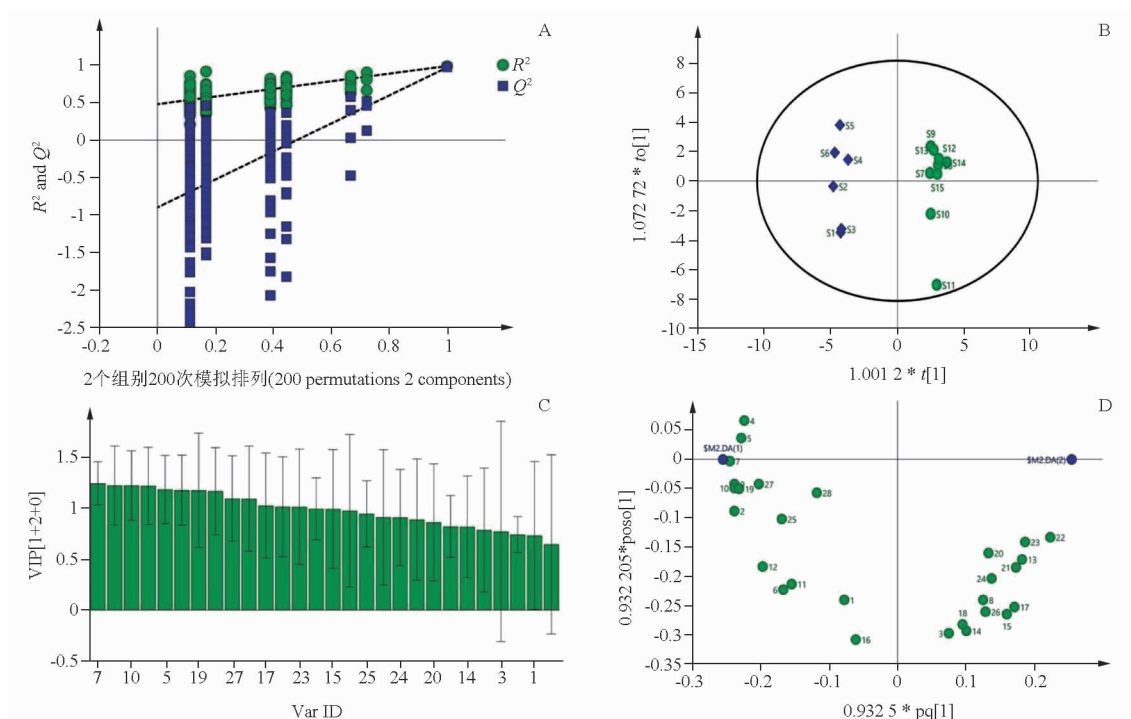


图 7 15 批小儿热速清颗粒的 OPLS-DA 的置换检验 (A)、得分 (B)、VIP 值 (C)、载荷散点 (D) 图

Fig. 7 OPLS-DA replacement test (A), score (B), VIP value (C) and load scatter (D) diagram of 15 batches of Xiao'er Resuqing granules

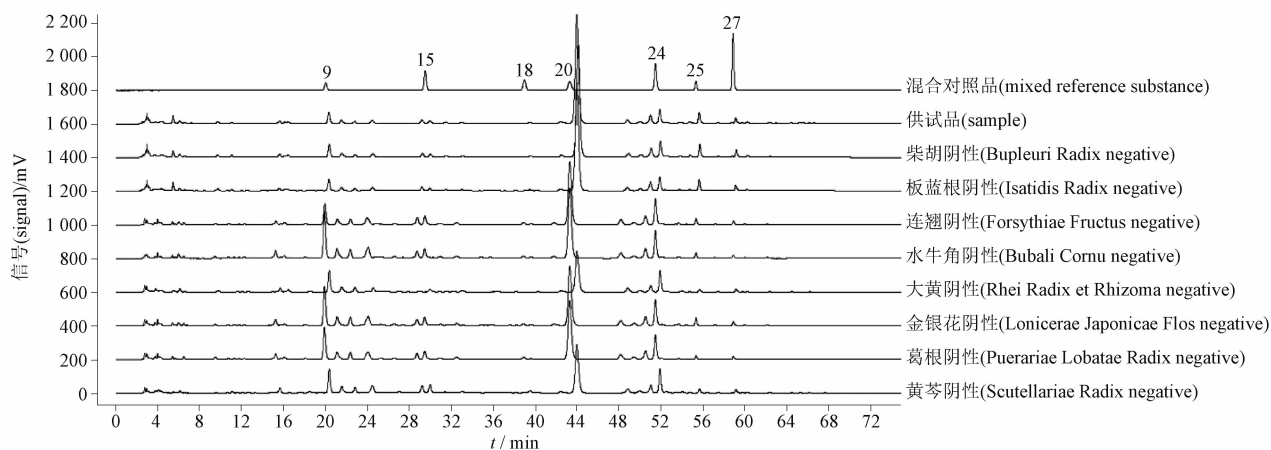


图 8 混合对照品储备液、供试品溶液及阴性供试品溶液叠加 HPLC 图

Fig. 8 Superimposed HPLC diagram of mixed reference reserve solution, test product solution and negative test product solution

3 讨论

中药以多成分作为物质基础发挥药效作用,建立多成分分析检测技术和方法是中药质量评价的有力手段。小儿热速清颗粒处方中黄芩主要有效成分为黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素等黄酮类化合物,具有解热抗炎、抗微生物、调节免疫等药理作用^[22];连翘中含有的连翘苷、连翘酯苷 A 具有抗菌、抗病毒、抗炎、免疫调节等药理作用^[23];金银花有“中

药中的抗生素”之称,含有的新绿原酸、异绿原酸等酚酸类物质具有抗菌、抗病毒的药理活性^[24];葛根中含有葛根素、3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素,这些异黄酮类成分具有解热镇痛的药理作用^[25];在 2020 年版《中国药典》中,黄芩苷与连翘苷是小儿热速清颗粒的定量指标成分,因此本试验选择标定小儿热速清颗粒中新绿原酸、3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、连翘酯苷 A、异绿原酸、连翘苷、

表 4 小儿热速清颗粒中 7 个成分线性关系考察结果

Tab. 4 Results of linear relationship investigation of 7 components in Xiaoer Resuqing granules

成分 (component)	回归方程 (regressive equation)	<i>r</i>	线性范围 (linear range)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
葛根素 (puerarin)	$Y = 65.87X + 2.188$	1.000	2.99 ~ 95.76
连翘酯苷 A (forsythiaside A)	$Y = 16.07X + 8.893$	0.999 9	5.75 ~ 183.96
连翘苷 (phillyrin)	$Y = 6.3623X - 4.697$	0.999 8	2.59 ~ 82.88
黄芩苷 (baicalin)	$Y = 34.50X + 29.31$	0.999 9	10.60 ~ 339.24
汉黄芩苷 (wogonoside)	$Y = 14.22X + 10.26$	0.999 9	6.65 ~ 212.80
黄芩素 (baicalein)	$Y = 51.824X + 1.380$	0.999 8	1.17 ~ 37.30
汉黄芩素 (wogonin)	$Y = 56.633X + 3.615$	0.999 8	0.93 ~ 29.60

 表 5 15 批小儿热速清颗粒中 7 个成分的含量测定 ($n=3$)

Tab. 5 Determination of 7 components in 15 batches of Xiaoer Resuqing granules

编号 (No.)	含量 (content)/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)							总量 (amounts)
	葛根素 (puerarin)	连翘酯苷 A (forsythiaside a)	连翘苷 (phillyrin)	黄芩苷 (baicalin)	汉黄芩苷 (wogonoside)	黄芩素 (baicalein)	汉黄芩素 (wogonin)	
S1	0.607	0.984	0.171	4.600	0.348	0.174	0.063	6.946
S2	0.655	0.929	0.163	4.844	0.377	0.195	0.076	7.239
S3	0.694	1.013	0.164	4.965	0.404	0.197	0.077	7.514
S4	0.637	0.891	0.156	4.797	0.357	0.190	0.074	7.102
S5	0.610	0.833	0.144	4.472	0.347	0.179	0.070	6.655
S6	0.641	0.832	0.156	4.739	0.354	0.189	0.074	6.986
S7	0.532	1.020	0.171	4.844	0.377	0.180	0.059	7.182
S8	0.544	1.013	0.168	4.846	0.384	0.161	0.054	7.171
S9	0.515	1.009	0.160	4.608	0.363	0.183	0.059	6.896
S10	0.529	1.087	0.164	4.887	0.403	0.171	0.061	7.302
S11	0.539	1.251	0.188	5.235	0.419	0.189	0.068	7.887
S12	0.532	0.994	0.159	4.987	0.382	0.164	0.065	7.282
S13	0.529	0.973	0.152	5.028	0.395	0.164	0.065	7.305
S14	0.503	0.989	0.165	5.127	0.378	0.169	0.060	7.391
S15	0.514	1.028	0.171	4.838	0.389	0.169	0.059	7.167
$\bar{x}/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	0.572	0.990	0.163	4.854	0.378	0.178	0.066	7.202
RSD/%	11	10	6.2	4.2	5.7	6.7	11	4.0

黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素,这 11 个成分协同发挥作用共奏清热解毒、泻火利咽的功效。因此,本文建立同时检测 11 个成分的方法,为更全面的控制小儿热速清颗粒的质量奠定基础。

中药指纹图谱是实现整体鉴别中药真实性、评价质量一致性和产品稳定性的可行模式,在中药质

量控制领域被广泛应用。采用指纹图谱及多成分同测方法对 15 批小儿热速清颗粒质量进行分析,结果显示批间差异较小,质量较为稳定、均一。当前未见采用指纹图谱评价小儿热速清颗粒质量的相关研究,因此本文建立了小儿热速清颗粒的 HPLC 中药指纹图谱,共标定了 28 个共有峰,指认了其中 11 个色

谱峰成分,结合化学模式识别技术对其进一步分析,实现对小儿热速清颗粒全面质量的综合评价,可用于小儿热速清颗粒批次间的一致性评价,为全面控制小儿热速清颗粒的质量提供参考依据。

参考文献

- [1] 陆娅楠. 第七次全国人口普查主要数据公布人口总量保持平增长[N]. 人民日报, 2021-05-12(1)
LU YN. The Main Data of The Seventh National Census Announced that the Total Population Maintained Steady Growth[N]. People's Daily, 2021-05-12(1)
- [2] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 578
ChP 2020. Vol I [S]. 2020: 578
- [3] 俞泽伟, 周优丽, 褚亚苏. 小儿热速清颗粒联合磷酸奥司他韦治疗儿童甲型流感病毒肺炎临床研究[J]. 新中医, 2022, 54(4): 114
YU ZW, ZHOU YL, CHU YS. Clinica study on Xiaoer Resuqing granules combined with oseltamivir phosphate for influenza a virus pneumonia in children[J]. New Chin Med, 2022, 54(4): 114
- [4] 范宝建. 小儿热速清颗粒联合抗生素治疗小儿急性化脓性扁桃体炎的效果观察[J]. 海峡药学, 2021, 33(9): 110
FAN BJ. Effect of Xiaoer Resuqing granules combined with antibiotics on acute suppurative tonsillitis in children[J]. Strait Pharm J, 2021, 33(9): 110
- [5] 李江. 小儿热速清颗粒联合利巴韦林对小儿急性上呼吸道感染伴发热的疗效观察[J]. 实用中西医结合临床, 2018, 18(4): 154
LI J. Observation on curative effect of Xiaoer Resuqing granules combined with ribavirin on infantile acute upper respiratory tract infection with fever[J]. Pract Clin J Integrat Tradit Chin West Med, 2018, 18(4): 154
- [6] 郑根霖, 吕述华, 康锋. 小儿热速清颗粒联合利巴韦林治疗手足口病的临床观察[J]. 中国当代医药, 2017, 24(28): 132
ZHEN GL, LÜ SH, KANG F. Clinical observation of Xiaoer Resuqing granules for children combined with Ribavirin in the treatment of hand-foot-mouth diseases[J]. Chin Mod Med, 2017, 24(28): 132
- [7] 李明月. 心脉通胶囊的 HPLC 指纹图谱研究与化学模式识别[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(6): 1104
LI MY. HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of Xinmaitong capsules[J]. Chin J Pharm Anal, 2020, 40(6): 1104
- [8] 李世雄, 张喜利, 刘文龙, 等. 一种中药指纹图谱的定性定量研究新方法: 全成分斜率相似度比较方法[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(12): 3064
LI SX, ZHANG XL, LIU WL, *et al.* A new method for qualitative and quantitative study of fingerprint of traditional Chinese medicine: comparison method of slope similarity of whole component[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 32(12): 3064
- [9] 何艳, 胡小祥. 小儿解表颗粒 HPLC 指纹图谱研究及多指标成分定量分析[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(8): 1355
HE Y, HU XX. Study on HPLC fingerprint and multi-indicator quantitative analysis of Xiaoer Jiebiao granules[J]. Chin J Pharm Anal, 2020, 40(8): 1355
- [10] 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
SUN LL, WANG M, REN XL. Application progress on chemical pattern recognition in quality control of Chinese materia medica[J]. Chin Tradit Herb Drug, 2017, 48(20): 4339
- [11] 孙如煜, 李鹏跃, 杜守颖, 等. 基于中药指纹图谱结合模式识别的清开灵硬胶囊批次间稳定性控制研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(10): 4629
SUN RY, LI PY, DU SY, *et al.* Based on fingerprint combined with chemical pattern recognition for stability control study between different batches of Qingkailing hard capsules[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(10): 4629
- [12] 陆建国, 张格, 龚江峰. HPLC 波长切换法同时测定小儿热速清颗粒中 9 种成分的含量[J]. 中国药师, 2019, 22(11): 2114
LU JG, ZHANG G, GONG JF. Simultaneous determination of 9 constituents in Xiaoer Resuqing granules by HPLC[J]. China Pharm, 2019, 22(11): 2114
- [13] 袁慕荣, 王汝上. 小儿热速清颗粒 UPLC 指纹图谱及 5 种成分含量测定研究[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(12): 1517
YUAN MR, WANG RS. Study on UPLC fingerprints of Xiaoer Resuqing granules and determination of five constituents[J]. Chin J New Drugs, 2019, 28(12): 1517
- [14] 周昱杉, 梁洁, 黄光强, 等. 基于化学模式识别方法分析止咳颗粒的抗炎谱效关系[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(22): 156
ZHOU YS, LIANG J, HUANG GQ, *et al.* Analysis on spectrum-effect relationship of anti-inflammatory effect of Zhideke granules based on chemical pattern recognition[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2020, 26(22): 156
- [15] 宋奇, 刘宏, 王添敏, 等. HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别法评价不同产地胡桃楸叶质量[J]. 中草药, 2022, 53(7): 2143
SONG Q, LIU H, WANG TM, *et al.* Quality evaluation of leaves of Juglans mandshurica based on combinative methods of HPLC fingerprint and multi-components determination and chemical pattern recognition[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(7): 2143
- [16] 邱俊娜, 张榆, 张双, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别及定量测定的夏枯草质量控制研究[J]. 中草药, 2020, 51(10): 2842
QIU JN, ZHANG Y, ZHANG S, *et al.* Quality control of Prunella Spica based on HPLC fingerprints combined with chemical pattern recognition and content determination[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(10): 2842
- [17] 吴娟萍, 薛涛, 郭璐, 等. 华蟾素胶囊 HPLC 指纹图谱研究与

- 化学模式识别[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(11): 1977
WU JP, XUE T, GUO L, *et al.* HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of cinobufagin capsules [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2020, 40(11): 1977
- [18] 王震. 不同生长期穿心莲药材 HPLC 指纹图谱及化学模式识别[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(3): 410
WANG Z. HPLC Fingerprint and chemical pattern recognition of *Andrographis Herba* with different growth period [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2021, 41(3): 410
- [19] 张桐, 王玥玥, 王康宇, 等. 基于化学模式识别法的不同品种木通药材指纹图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(9): 1590
ZHANG T, WANG YY, WANG KY, *et al.* Study on fingerprint of different species of *Akebiae Caulis* based on chemical pattern recognition method [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2021, 41(9): 1590
- [20] 王强, 苏若, 王翰华. 醒脾养儿颗粒 HPLC 指纹图谱研究与化学模式识别[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(6): 1083
WANG Q, SU R, WANG HH. HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of *Xingpi Yang'er granules* [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2021, 41(6): 1083
- [21] 潘玄玄, 宋粉云, 林秀莲, 等. 沉香化气丸的 UPLC 指纹图谱与化学模式识别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(19): 105
PAN XX, SONG FY, LIN XL, *et al.* UPLC fingerprint and chemical pattern recognition of *Chenxiang Huaqi Wan* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2017, 23(19): 105
- [22] 郑勇凤, 王佳婧, 傅超美, 等. 黄芩的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中成药, 2016, 38(1): 141
ZHEN YF, WANG JJ, FU CM, *et al.* Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Scutellariae Radix* [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2016, 38(1): 141
- [23] 赵佩媛, 韩立柱, 汪芸兰, 等. 连翘的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(4): 19
ZHAO PY, HAN LZ, WANG YL, *et al.* Research progress of *Forsythiae Fructus* and predictive analysis of quality markers [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2022, 40(4): 19
- [24] 熊乐文, 金莹, 王彦予, 等. 金银花酚酸类化学成分、药理活性及体内代谢研究进展[J]. 中成药, 2022, 44(3): 864
XIONG LW, JIN Y, WANG YY, *et al.* Research progress on chemical constituents, pharmacological activities and *in vivo* metabolism of *Lonicerae Japonicae Flos* phenolic acids [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2022, 44(3): 864
- [25] 管咏梅, 万鑫浩, 吴文婷, 等. 经典名方桂枝加葛根汤标准汤剂 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2021, 52(18): 5535
GUAN YM, WAN XH, WU WT, *et al.* HPLC fingerprint of classic prescription *Cinnamon Twig decoction plus Pueraria* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(18): 5535

(本文于2024年4月15日修改回)