

基于多成分含量测定和化学计量学的克癩胶囊发酵前后成分比较研究*

王玉霞¹, 侯佳豪¹, 李冉², 涂天智², 宋永兴^{1,3}, 段绪红^{1,3}, 马东来^{1,3**}, 王茜^{4**}

(1. 河北中医药大学药学院, 石家庄 050200; 2. 科兴生物制药股份有限公司, 济南 250200;

3. 河北省中药组方制剂技术创新中心, 石家庄 050200; 4. 河北省中医院, 石家庄 050011)

摘要 目的: 采用多成分含量测定结合化学计量学方法比较克癩发酵前后的化学成分变化。方法: 采用 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 203 nm, 进样量 10 μL。对克癩发酵前后所含的绿原酸、升麻素苷、三七皂苷 R₁、黄芩苷、小檗碱、槲皮素、黄芩素、汉黄芩素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚 11 个化学成分进行含量测定; 建立克癩发酵前后的化学指纹图谱; 应用聚类分析 (HCA)、主成分分析 (PCA) 及正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 等化学计量学方法, 对克癩发酵前后成分进行区分与比较, 筛选主要差异性成分。结果: 建立了克癩发酵前后的化学指纹图谱, 共标定了 22 个共有峰, 所建立的化学指纹图谱专属性良好, 可用于克癩的质量评价; 多成分含量测定和化学计量学结果表明, 克癩原药材粉末、克癩发酵粉末和克癩胶囊内容物粉末中三七皂苷 R₁ (1.023~2.927 mg · g⁻¹)、黄芩素 (0.125~0.568 mg · g⁻¹) 和盐酸小檗碱 (2.151~3.068 mg · g⁻¹) 的含量有明显差异; 确认三七皂苷 R₁、黄芩素和小檗碱为克癩发酵前后的差异性成分, 可以作为区分和鉴别克癩发酵前后的质量标志物。结论: 经过发酵的克癩化学成分发生了明显变化, 明确了其差异性成分, 为克癩胶囊生产质量控制提供了分析依据。

关键词: 克癩胶囊; 发酵; 指纹图谱; 含量测定; 化学计量学; 正交偏最小二乘判别分析

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2025) 05-0833-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-1143

Comparative study on the components of Kehuang capsules before and after fermentation based on multi-component content determination and chemometrics*

WANG Yu-xia¹, HOU Jia-hao¹, LI Ran², TU Tian-zhi², SONG Yong-xing^{1,3},
DUAN Xu-hong^{1,3}, MA Dong-lai^{1,3**}, WANG Qian^{4**}

(1. College of Pharmacy, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050020, China; 2. Kexing Biopharmaceutical Co., Ltd., Jinan 250200, China; 3. Hebei Province Traditional Chinese Medicine Formula Preparation Technology Innovation Center, Shijiazhuang 050200, China; 4. Hebei Provincial Hospital of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract Objective: To compare the chemical composition changes in Kehuang before and after fermentation

* 河北中医药大学燕赵医学项目 (YZZZ2023008); 河北省中医药管理局项目 (2023118)

** 通信作者 马东来 Tel: 13831193865; E-mail: mdl_hebei@aliyun.com

王茜 Tel: 13739708630; E-mail: 471704636@qq.com

第一作者 Tel: 18132079554; E-mail: wangyuxiayn@163.com

using multi-component content determination combined with chemometric analysis. **Methods:** HPLC was employed using a ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid aqueous solution, applied with gradient elution. The flow rate was set at 1.0 mL · min⁻¹, the column temperature was maintained at 30 °C, the detection wavelength was 203 nm, and injection volume was 10 μL. This method was applied to analyze the chemical compositions of Kehuang before and after fermentation and to establish their corresponding chemical fingerprint profiles. Quantitative determination was conducted for 11 chemical constituents, including chlorogenic acid, cimifugin, notoginsenoside R₁, baicalin, berberine, quercetin, baicalein, wogonin, emodin, chrysophanol, and physcion. Furthermore, chemometric methods such as hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were employed to distinguish and compare the samples before and after fermentation, with the aim of identifying key differential compounds. **Results:** Chemical fingerprint profiles were established for Kehuang before and after fermentation, with 22 common peaks identified. The fingerprints had good specificity and can be used for quality evaluation of Kehuang. The results of multi-component content determination and chemometrics analysis revealed significant differences in the content of notoginsenoside R₁ (1.023–2.927 mg · g⁻¹), scutellarein (0.125–0.568 mg · g⁻¹), and berberine hydrochloride (2.151–3.068 mg · g⁻¹) among the crude Kehuang powder, fermented Kehuang powder, and the content of Kehuang capsules. Notoginsenoside R₁, scutellarein and berberine were identified as differential markers between pre- and post-fermentation of Kehuang, which could serve as quality indicators for distinguishing and identifying Kehuang before and after fermentation. **Conclusion:** The chemical composition of Kehuang changes significantly after fermentation, and the differential compounds have been clearly identified, which provides an analytical basis for quality control in the production of Kehuang capsules.

Keywords: Kehuang capsules; fermentation; fingerprint; content determination; chemometrics; orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA)

中药炮制是我国独特的制药技术,发酵作为中药的一种炮制方法,在增效减毒及改变药性方面具有特殊意义。通过发酵,可产生新的化学成分或药理作用,如六神曲、半夏曲、淡豆豉、红曲等发酵中药制品,在临床应用广泛^[1-3]。克癍胶囊由三七、黄连、黄芩、白花蛇舌草和甘草等 16 味中药加入红曲发酵制成,可用于湿热邪气积聚、淤血阻塞经络等病症^[4]。现代临床研究表明,克癍胶囊在抗肝纤维化^[4]、治疗非酒精性脂肪肝^[5]和肝癌^[6]等肝脏疾病中疗效显著。

目前,克癍胶囊研究多集中于药效评价、作用机制等方面^[7-10],对其多指标化学成分分析的研究较少,未收录于 2020 年版《中华人民共和国药典》。此外,克癍胶囊质量标准以薄层色谱定性鉴别为主,没有指标成分的含量测定,尤其是发酵前后化学成分变化规律及差异性成分尚不明确,无法全面表征其中间体及成品的整体质量。因此,本研究采用 HPLC 法,对 15 批次大生产规模的克癍粉末发酵前后及胶囊的

化学成分进行指纹图谱分析,建立绿原酸、升麻素苷、三七皂苷 R₁、黄芩苷、小檗碱、槲皮素、黄芩素、汉黄芩素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚 11 个化学成分的含量测定方法,再运用聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)及正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)等化学计量学方法,寻找克癍粉末发酵前后及胶囊的差异性成分,为后期克癍胶囊生产质量控制和质量标准建立提供参考依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津 LC-20A 型高效液相色谱仪(岛津公司),低速台式离心机 L420-A(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),ME204E 电子万分之一天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),KQ-500DE 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

克癍原药材粉末、克癍发酵粉末和克癍胶囊均

由科兴生物制药股份有限公司提供,样品信息见表1。对照品绿原酸(批号 B20782)、大黄素甲醚(批号 B20242)、三七皂苷 R₁(批号 B21099)、盐酸小檗碱(批号 B21449)、大黄酚(批号 B20238)、大黄素(批号 B20240)、升麻素苷(批号 B21157)、黄芩苷(批号 B20570)、槲皮素(批号 B20527)购自上海源叶生

物科技有限公司,质量分数均 $\geq 98\%$;汉黄芩素(批号 15363)、黄芩素(批号 15727)购自上海诗丹德标准技术服务有限公司,质量分数均 $\geq 98\%$;甲醇、乙腈为色谱纯,均购于天津市彪仕奇科技发展有限公司;水为超纯水(Milli-Q 默克),其他试剂均为分析纯。

表 1 15 批克癩胶囊原药材粉末、发酵粉末和胶囊内容物粉末信息

Tab. 1 Information on 15 batches of raw material powder, fermented powder, and capsule content powder of Kehuang capsules

样品名称 (sample name)	样品编号 (sample code)	批号 (batch number)	样品名称 (sample name)	样品编号 (sample code)	批号 (batch number)
原药材粉末 (raw material powder)	YYC1	2108011	胶囊内容物粉末 (capsule content powder)	JN1	2203011
	YYC2	2108012		JN2	2203012
	YYC3	2108013		JN3	2203013
	YYC4	2108014		JN4	2203014
	YYC5	2108015		JN5	2203015
发酵粉末 (fermented powder)	FJ1	2209011			
	FJ2	2209012			
	FJ3	2209013			
	FJ4	2209014			
	FJ5	2209015			

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液 取克癩原药材粉末、克癩发酵粉末和克癩胶囊内容物粉末(过 65 目筛)各约 0.3 g,精密称定,分别置于 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,再次精密称定,超声处理(500 W、40 kHz) 30 min,静置,放冷,称量,用甲醇补足减失的量,于 4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液,过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得各样品的供试品溶液。

2.1.2 混合对照品溶液 精密称取绿原酸、升麻素苷、三七皂苷 R₁、黄芩苷、盐酸小檗碱、槲皮素、黄芩素、汉黄芩素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的对照品适量,置于 5 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,配制质量浓度分别为 360、610、1 590、680、410、420、590、470、330、370 和 1 020 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液,并于 4 °C 条件下保存,备用。

2.2 色谱条件

采用 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,以乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~15 min, 15%A → 20%A; 15~50 min, 20%A → 38%A; 50~60 min, 38%A → 42%A; 60~70 min, 42%A → 60%A; 70~80 min, 60%A → 90%A;

80~95 min, 90%A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 10 μL,检测波长 203 nm。

2.3 克癩胶囊指纹图谱的建立

2.3.1 精密度试验 取克癩胶囊内容物粉末(JN1)适量,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次,以黄芩苷(6 号峰)为参照峰,指纹图谱中 22 个共有峰的结果显示,各共有峰相对保留时间的 RSD < 2.0%,相对峰面积的 RSD < 2.8%,表明所用仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取克癩胶囊内容物粉末(JN1),平行 6 份,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件检测,以黄芩苷(6 号峰)为参照峰,指纹图谱中 22 个共有峰的结果显示,各共有峰相对保留时间的 RSD < 1.8%,相对峰面积的 RSD < 2.3%,表明方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一份克癩胶囊内容物粉末(JN1),按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件,分别于 0、2、4、8、12、18 和 24 h 进样检测,以黄芩苷(6 号峰)为参照峰,指纹图谱中 22 个共有峰的结果显示,各共有峰相对保留时间的 RSD < 2.5%,相对峰面积的 RSD < 2.9%,表明供试品溶液于室温放置 24 h 稳定性良好。

2.3.4 指纹图谱的建立及相似度评价 按“2.1.1”项下方法,分别制备克癩原药材粉末(YYC1~YYC5)、克癩发酵粉末(FJ1~FJ5)和克癩胶囊内容物粉末(JN1~JN5)的供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件分别进样测定,得到HPLC色谱图。将上述色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》,以YYC1号样品的色谱图作为参照图谱,采用平均数法,时间窗宽度设置为0.10 min,经多点校正后,再Mark峰匹配,

生成指纹图谱叠加图谱(图1)。最终标定出22个共有峰,其中6号峰(黄芩苷)稳定性好,峰面积较大,故选该峰作为参照峰。将色谱图与混合对照品色谱图进行比对,指出11个共有峰,分别为绿原酸(1号峰)、升麻素苷(3号峰)、三七皂苷 R_1 (5号峰)、黄芩苷(6号峰)、小檗碱(8号峰)、槲皮素(10号峰)、黄芩素(12号峰)、汉黄芩素(14号峰)、大黄素(17号峰)、大黄酚(18号峰)和大黄素甲醚(19号峰)。

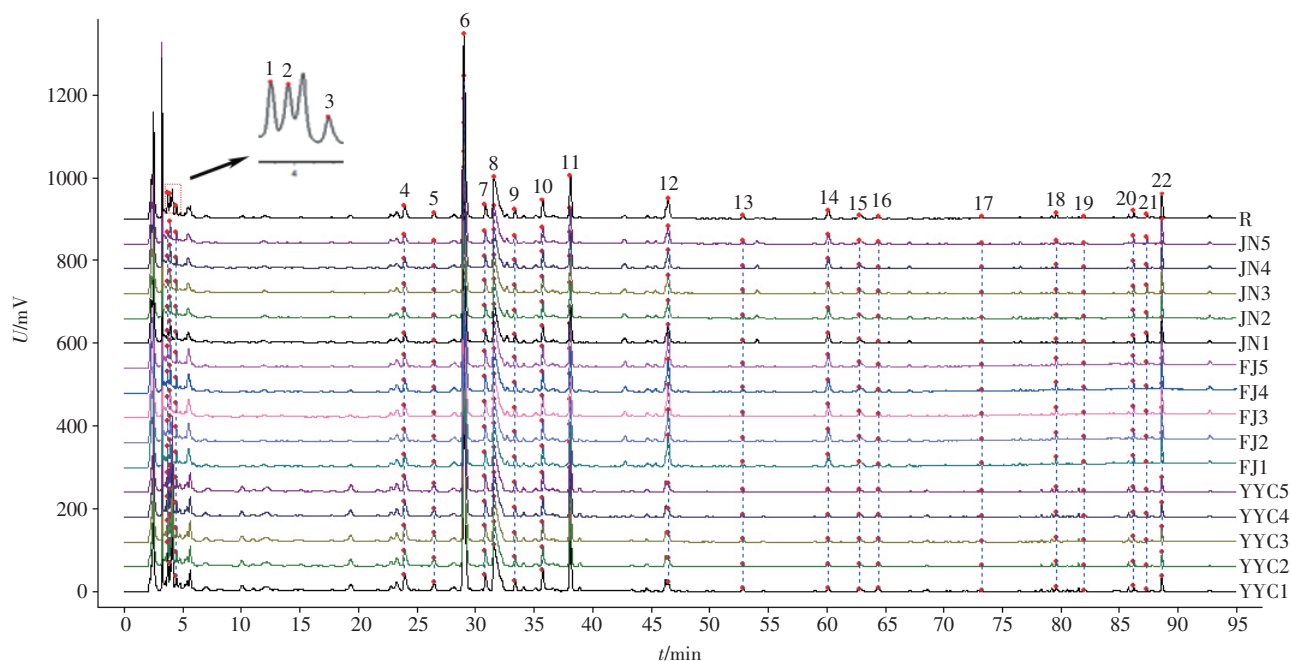


图1 15批克癩胶囊原药材粉末、发酵粉末和胶囊内容物粉末指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint profiles of raw material powder, fermentation powder, and capsule content powder of Kehuang capsules (15 batches total)

15批样品的色谱图与对照图谱(R)的相似度评价结果见表2,表明各批克癩药材粉末、克癩发酵粉末和

克癩胶囊内容物粉末的相似度有明显的差异性,所建立的指纹图谱方法可用于克癩发酵前后的质量控制。

表2 克癩胶囊原药材粉末、发酵粉末和胶囊内容物粉末指纹图谱相似度评价

Tab. 2 Similarity evaluation of fingerprint profiles of raw material powder, fermented powder, and capsule content powder of Kehuang capsules

样品编号 (sample code)	相似度 (similarity)	样品编号 (sample code)	相似度 (similarity)
YYC1	0.995	FJ4	0.997
YYC2	0.994	FJ5	0.996
YYC3	0.995	JN1	0.999
YYC4	0.995	JN2	0.999
YYC5	0.995	JN3	0.998
FJ1	0.997	JN4	0.998
FJ2	0.997	JN5	0.999
FJ3	0.997		

2.4 含量测定

2.4.1 线性关系考察 精密量取“2.1.2”项下的混合对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样,以对照品的质量浓度 X 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标进行

线性回归,结果见表3。绿原酸、升麻素苷、三七皂苷 R_1 、黄芩苷、盐酸小檗碱、槲皮素、黄芩素、汉黄芩素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚在各自的线性范围内线性关系良好。

表3 11个成分回归方程、相关系数和线性范围

Tab. 3 Regression equations, correlation coefficients, and linear ranges for 11 components

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
绿原酸(chlorogenic acid)	$Y=8.456 \times 10^5 X+5.015 \times 10^5$	0.999 6	0.072~0.360
升麻素苷(cimifugin)	$Y=2.199 \times 10^5 X+2.658 \times 10^5$	0.999 8	0.122~0.610
三七皂苷 R_1 (notoginsenoside R_1)	$Y=7.689 \times 10^4 X-1.110 \times 10^3$	0.999 6	0.318~1.590
黄芩苷(baicalin)	$Y=4.214 \times 10^5 X+4.991 \times 10^4$	1.000	0.136~0.680
盐酸小檗碱(berberine hydrochloride)	$Y=1.505 \times 10^5 X+5.693 \times 10^4$	0.999 3	0.082~0.410
槲皮素(quercetin)	$Y=3.571 \times 10^5 X+4.958 \times 10^4$	1.000	0.084~0.420
黄芩素(baicalein)	$Y=5.107 \times 10^5 X+1.176 \times 10^5$	0.999 8	0.118~0.590
汉黄芩素(wogonin)	$Y=4.630 \times 10^5 X+9.918 \times 10^4$	0.999 9	0.094~0.470
大黄素(emodin)	$Y=2.013 \times 10^5 X+2.944 \times 10^4$	1.000	0.066~0.330
大黄酚(chrysophanol)	$Y=2.645 \times 10^5 X+7.692 \times 10^4$	1.000	0.074~0.370
大黄素甲醚(physcion)	$Y=2.402 \times 10^5 X+6.958 \times 10^4$	1.000	0.204~1.020

2.4.2 精密度考察 取克癩胶囊内容物粉末(JN1),按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件,连续进样6次,记录峰面积,计算其RSD,结果供试品溶液中绿原酸、升麻素苷、三七皂苷 R_1 、黄芩苷、小檗碱、槲皮素、黄芩素、汉黄芩素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为1.7%、0.47%、1.8%、1.3%、1.7%、1.8%、1.8%、1.1%、1.3%、0.72%和1.1%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性考察 取克癩胶囊内容物粉末(JN1),按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,室温放置,按“2.2”项下色谱条件,分别于0、4、8、12、16、24 h进行测定,记录峰面积,计算其RSD,结果供试品溶液中绿原酸、升麻素苷、三七皂苷 R_1 、黄芩苷、小檗碱、槲皮素、黄芩素、汉黄芩素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为1.8%、1.5%、2.5%、1.9%、0.69%、1.1%、2.3%、1.6%、2.0%、1.9%和2.1%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.4.4 重复性考察 取同批克癩胶囊内容物粉末(JN1),按“2.1.1”项下方法,平行制备6份供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件分别进样,记录峰面积,计算绿原酸、升麻素苷、三七皂苷 R_1 、黄芩苷、小檗碱(以盐酸小檗碱计)、槲皮素、黄芩素、汉黄芩素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均含量分别为0.304 2、

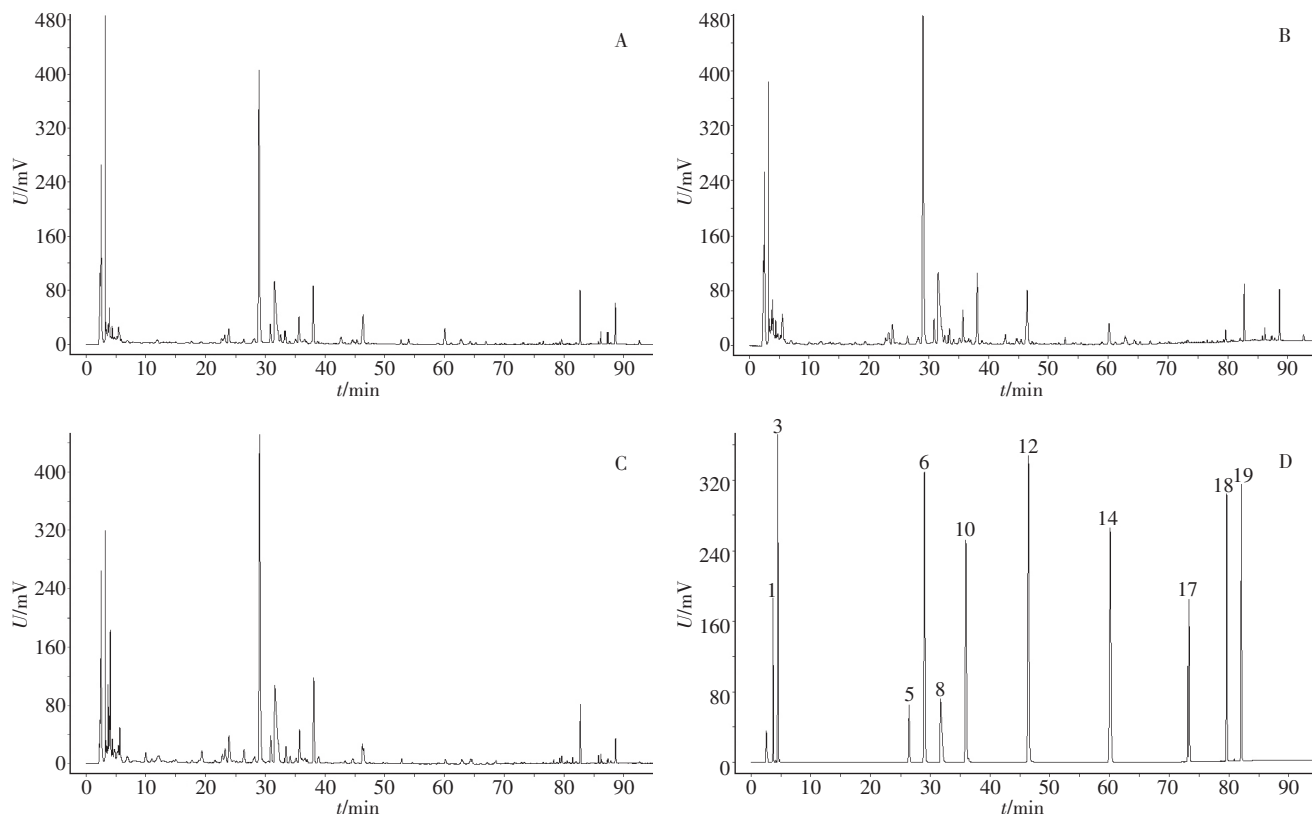
0.223 2、1.064 0、3.014 0、2.189 1、0.222 7、0.317 1、0.146 1、0.021 8、0.045 9、0.045 8 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD分别为1.9%、2.6%、1.8%、1.7%、0.75%、2.0%、2.1%、0.87%、2.5%、0.66%和1.6%,表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率考察 取已知含量的克癩胶囊内容物粉末(JN1),平行6份,每份约0.15 g,精密称定,分别加入绿原酸、升麻素苷、三七皂苷 R_1 、黄芩苷、小檗碱、槲皮素、黄芩素、汉黄芩素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,进样测定,计算样品加样回收率。结果绿原酸、升麻素苷、三七皂苷 R_1 、黄芩苷、小檗碱(以盐酸小檗碱计)、槲皮素、黄芩素、汉黄芩素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均加样回收率($n=6$)分别为93.0%、99.5%、97.4%、94.2%、97.0%、98.0%、93.3%、99.4%、98.8%、99.2%和98.1%,RSD分别为0.96%、1.9%、2.3%、2.4%、2.9%、2.7%、2.4%、2.9%、2.2%、2.7%和2.5%,表明该方法加样回收率良好。

2.4.6 样品含量测定 按“2.1.1”项下方法制备5批克癩原药材粉末(YYC1~YYC5)、5批克癩发酵粉末(FJ1~FJ5)和5批克癩胶囊内容物粉末(JN1~JN5)样品的供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进行分析,分别测定绿原酸、升麻素苷、三七皂苷 R_1 、黄芩苷、小檗碱(以盐酸小檗碱计)、槲皮素、黄芩素、汉黄

芩素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量。克癩原药材粉末、克癩发酵粉末、克癩胶囊内容物粉末和混

合对照品的 HPLC 如图 2 所示,各样品的成分含量测定结果见表 4。



1. 绿原酸 (chlorogenic acid) 3. 升麻素苷 (cimifugin) 5. 三七皂苷 R_1 (notoginsenoside R_1) 6. 黄芩苷 (baicalin) 8. 小檗碱 (berberine) 10. 槲皮素 (quercetin) 12. 黄芩素 (baicalein) 14. 汉黄芩素 (wogonin) 17. 大黄素 (emodin) 18. 大黄酚 (chrysophanol) 19. 大黄素甲醚 (physcion)

图 2 克癩胶囊内容物粉末 (A)、发酵粉末 (B)、原药材粉末 (C) 和混合对照品 (D) 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of Kele capsule content powder (A), fermentation powder (B), raw material powder (C), and mixed reference substances (D)

由测定结果可知,克癩原药材粉末、克癩发酵粉末和克癩胶囊内容物粉末中均含有所测定的 11 个化学成分。其中,黄芩苷的质量分数在克癩原药材粉末、克癩发酵粉末和克癩胶囊内容物粉末中均最高,分别为 3.536~4.019、3.611~3.773 和 2.987~3.189 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$;质量分数最低的是大黄素,分别为 0.020~0.030、0.034~0.045 和 0.021~0.023 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。从各成分的 RSD 可知,绿原酸、三七皂苷 R_1 、黄芩素、汉黄芩素和大黄素甲醚在克癩原药材粉末、发酵粉末和胶囊内容物粉末中存在较明显的差异。

2.5 基于化学计量学的克癩胶囊发酵前后分析与比较

为了进一步对克癩原药材粉末、克癩发酵粉末和克癩胶囊内容物粉末进行比较,明确三者之间的差异,寻找质量标志物,在多成分定量分析的基础上,

运用 HCA、PCA 和 OPLS-DA 等化学计量学方法,以所测定的 11 个化学成分含量为变量,对克癩原药材粉末、发酵粉末和克癩胶囊内容物粉末进行分析与比较。

2.5.1 HCA 将表 2 数据导入 SPSS 26.0 软件,以组间连接法结合平方欧氏距离对克癩原药材粉末、克癩发酵粉末和克癩胶囊内容物粉末进行 HCA,结果见图 3。由 HCA 结果可知,当平方欧氏距离为 5 时,克癩胶囊内容物粉末 (JN1~JN5) 聚为一类,克癩发酵粉末 (FJ1~FJ5) 聚为一类,克癩胶囊原药材粉末 (YYC1~YYC5) 聚为另一类;当平方欧氏距离 > 5 时,所有样品主要聚为两大类,克癩胶囊内容物粉末和克癩发酵粉末为一类,克癩原药材粉末为另一类。提示克癩原药材粉末与克癩发酵粉末、克癩胶囊内容物粉末化学成分之间有差异。

表 4 克癩胶囊原药材粉末、发酵粉末和胶囊内容物粉末中 11 个成分含量测定结果

Tab. 4 Quantitative determination of 11 compounds in raw material powder, fermented powder, and capsule content powder of Kehuang capsules

编号 (No.)	质量分数 (content) / (mg · g ⁻¹)										
	绿原酸 (chlorogenic acid)	升麻素苷 (cimifugin)	三七皂苷 R ₁ (notoginsenoside R ₁)	黄芩苷 (baicalin)	小檗碱 (berberine)	槲皮素 (quercetin)	黄芩素 (baicalein)	汉黄芩素 (wogonin)	大黄素 (emodin)	大黄酚 (chrysophanol)	大黄素甲醚 (physcion)
YYC1	0.794	0.322	2.878	3.771	3.068	0.300	0.129	0.043	0.027	0.055	0.051
YYC2	0.785	0.312	2.927	3.536	2.905	0.287	0.126	0.041	0.027	0.056	0.052
YYC3	0.784	0.313	2.848	3.567	2.918	0.294	0.125	0.042	0.027	0.057	0.053
YYC4	0.809	0.327	2.856	3.704	2.966	0.309	0.132	0.043	0.027	0.057	0.050
YYC5	0.782	0.312	2.722	3.730	3.005	0.293	0.125	0.043	0.028	0.058	0.051
FJ1	0.481	0.293	1.848	3.654	2.709	0.291	0.551	0.182	0.036	0.091	0.109
FJ2	0.494	0.297	1.773	3.701	2.733	0.298	0.560	0.179	0.034	0.093	0.112
FJ3	0.498	0.298	1.831	3.773	2.803	0.298	0.568	0.186	0.035	0.094	0.105
FJ4	0.490	0.285	1.757	3.611	2.667	0.289	0.556	0.176	0.034	0.096	0.111
FJ5	0.504	0.297	1.752	3.687	2.744	0.287	0.542	0.181	0.035	0.091	0.113
JN1	0.311	0.226	1.065	3.093	2.216	0.221	0.315	0.146	0.021	0.046	0.046
JN2	0.299	0.217	1.023	2.987	2.170	0.216	0.305	0.145	0.021	0.046	0.044
JN3	0.311	0.229	1.053	3.189	2.268	0.224	0.313	0.145	0.021	0.048	0.047
JN4	0.307	0.229	1.085	3.103	2.207	0.227	0.309	0.145	0.022	0.046	0.048
JN5	0.298	0.224	1.045	3.001	2.151	0.216	0.308	0.143	0.022	0.045	0.046
RSD/%	39.1	14.6	40.2	8.71	12.8	13.5	54.9	49.5	20.2	31.9	43.5

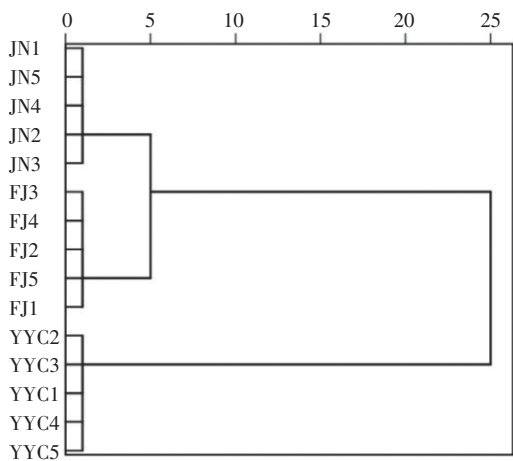


图 3 克癩胶囊原药材粉末、发酵粉末和胶囊内容物粉末 HCA 树状图
Fig. 3 HCA dendrogram of raw material powder, fermented powder, and capsule content powder of Kehuang capsules

2.5.2 PCA 采用 SIMCA 14.1.0 软件,以测得的 11 个成分含量测定结果为变量进行 PCA,结果见图 4。由 PCA 结果可知,前 2 个主成分的累积贡献率为 99.1%。从所得的方差贡献率来看,建立的模型累计解释能力参数 R^2_x 为 0.996,预测能力参数 Q^2 为 0.989,说明所建立的 PCA 模型的区分度和预测

程度都较好。按照 PCA 结果,将 15 批粉末样品划分为 3 类:FJ1~FJ5 为第 I 类,JN1~JN5 为第 II 类,YYC1~YYC5 为 III 类。PCA 的结果与 HCA 结果一致。

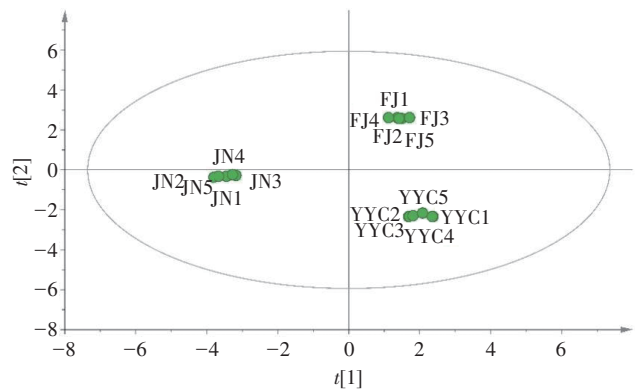


图 4 克癩胶囊原药材粉末、发酵粉末和胶囊内容物粉末 PCA 得分图
Fig. 4 PCA score plot of raw material powder, fermented powder, and capsule content powder of Kehuang capsules

2.5.3 OPLS-DA 为进一步区分克癩原药材粉末、克癩发酵粉末和克癩胶囊内容物粉末之间的差异性标志化合物,以 11 个成分含量测定结果为变量,借助 SIMCA 14.1.0 软件,建立 OPLS-DA 模型(图 5)。

该模型中,自变量拟合指数 $R^2_X=0.999$,因变量拟合指数 $R^2_Y=0.998$,模型预测指数 $Q^2=0.997$,说明所建立的 OPLS-DA 模型可很好地用于克癩原药材粉末、克癩发酵粉末和克癩胶囊内容物粉末之间的分析。15 批样品较好地分为 3 类,且与 HCA、PCA 的结果一

致。进行置换检验 ($n=200$),结果如图 6 所示, Q^2 回归线与纵轴的相交点小于 0,说明模型未出现过拟合,模型预测能力好且验证有效,能够用于克癩原药材粉末、发酵粉末和胶囊内容物粉末的整体差异性分析。

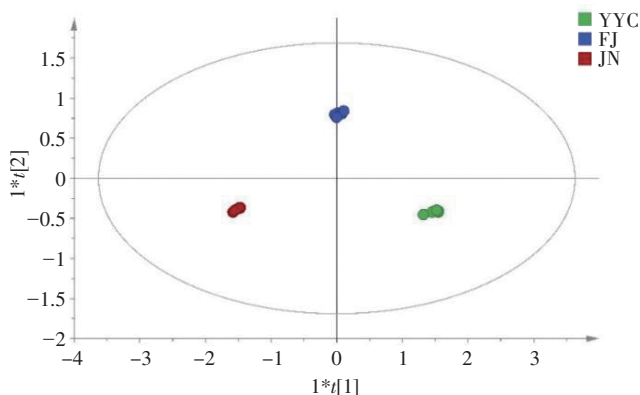


图 5 克癩胶囊原药材粉末、发酵粉末和胶囊内容物粉末 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 OPLS-DA score plot of the raw material powder, fermented powder, and capsule content powder of Kehuang capsules

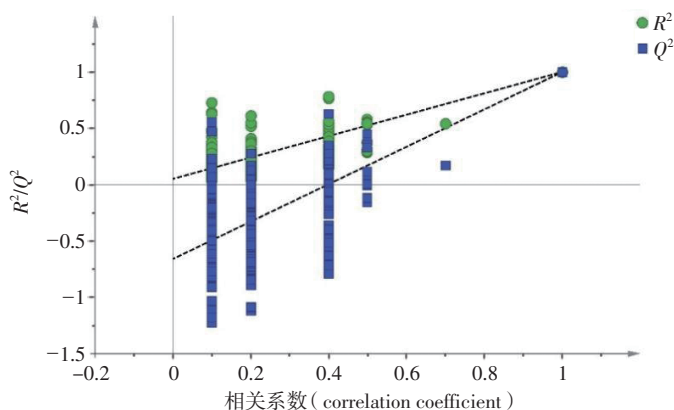


图 6 OPLS-DA 置换检测结果图

Fig. 6 OPLS-DA permutation test results plot

通过预测变量重要性投影值 (VIP) 进一步筛选出克癩发酵前后的主要标志性成分,见图 7。以 $VIP > 1$ 为标准,筛选出差异较大的成分,其贡献大小依次为三七皂苷 R_1 、黄芩苷、黄芩素、小檗碱,这在区分克癩原药材粉末、克癩发酵粉末和克癩胶囊内容物粉末方面发挥了重要作用。如图 8 所示,三七皂苷 R_1 、黄芩素和小檗碱的含量在克癩原药材粉末、克癩发酵粉末和克癩胶囊内容物粉末中存在显著差异 ($P < 0.0001$)。其中,三七皂苷 R_1 和小檗碱呈现出递减的趋势,黄芩素在克癩发酵粉末中的含量最高,而黄芩苷在克癩原药材粉末和克癩发酵粉末之间并无显著性差异,由此可认为,三七皂苷 R_1 、黄芩素和小檗碱是克癩原

药材粉末、发酵粉末和胶囊内容物粉末的差异性化合物。

3 讨论

为了明确克癩胶囊粉末发酵前后的成分变化规律,本文采用 HPLC 法对克癩胶囊粉末发酵前后及胶囊进行指纹图谱分析及多成分含量测定。克癩胶囊的成分多而复杂,在分析前参考相关文献^[7-8,11],考察了甲醇-水、甲醇-0.01%磷酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.01%磷酸水溶液等体系的梯度洗脱分离,结果显示,以乙腈-0.01%磷酸水溶液作为流动相,能使克癩胶囊中的各成分得到更好的分离,且基线平稳。

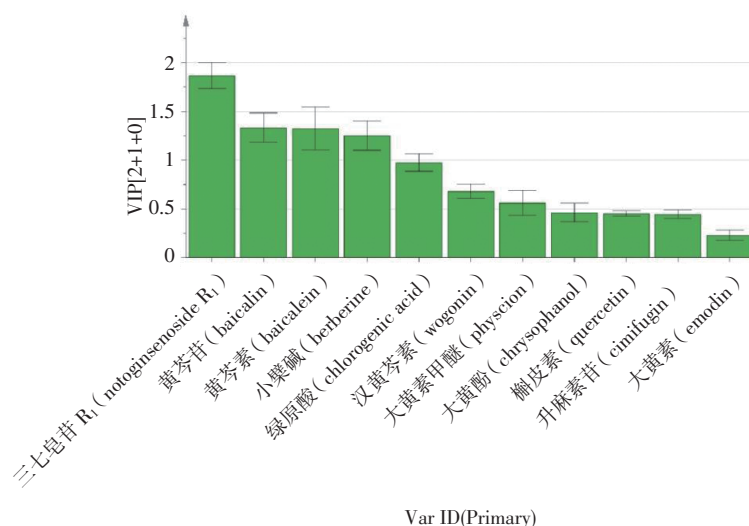


图 7 克癩胶囊原药材粉末、发酵粉末和胶囊内容物粉末的 VIP 值分析图

Fig. 7 VIP value analysis chart of raw material powder, fermented powder, and capsule content powder of Kehuang capsules

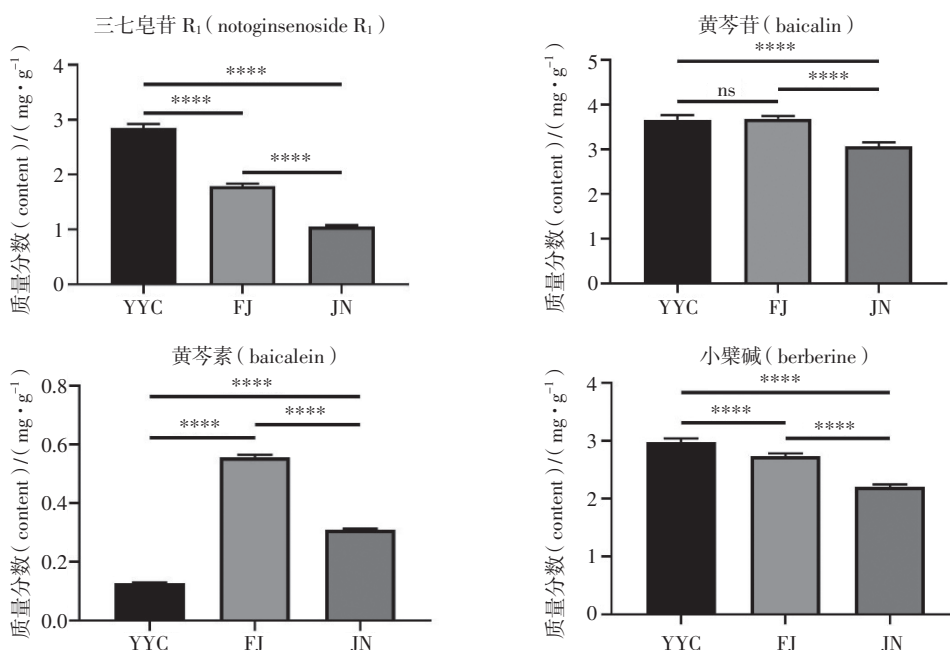


图 8 克癩胶囊原药材粉末、发酵粉末和胶囊内容物粉末中三七皂苷 R₁、黄芩素、黄芩苷和小檗碱的含量分析图 (****P < 0.000 1)

Fig. 8 Content analysis chart of notoginsenoside R₁, baicalin, scutellarin, and berberine in the raw material powder, fermented powder, and capsule content powder of Kehuang capsules

本研究采用 HPLC 法建立了 15 批克癩发酵前后的指纹图谱,确定了 22 个共有峰,指认 11 个化学成分。各样品间指纹图谱相似度良好,均在 0.994 以上。通过指纹图谱分析可知,15 批克癩原药材粉末、发酵粉末和胶囊内容物粉末的峰面积大小不一,表明三者的成分含量之间存在一定差异性。为了找出其中的差异性化合物,本研究进一步测定了克癩胶囊发酵前后绿原酸、升麻素苷、三七皂苷 R₁、黄芩苷、小檗

碱、槲皮素、黄芩素、汉黄芩素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚 11 个共有成分的含量,结果以黄芩苷的含量最高。

为了进一步寻找克癩原药材粉末、发酵粉末和胶囊内容物粉末中的质量标志物,在含量测定的基础上,应用 HCA、PCA 及 OPLS-DA 等化学计量学方法对克癩原药材粉末、发酵粉末和胶囊内容物粉末进行了区分与比较。结果显示,基于 11 个化学成分的定

量结果,可以将克癍发酵前后进行较好地区分。通过 11 个化学成分的 VIP 值筛选和含量分析可知(图 7、8),三七皂苷 R₁、黄芩素和小檗碱 3 个成分为克癍原药材粉末、发酵粉末和胶囊内容物粉末之间的差异性化合物,可作为克癍发酵前后的质量控制指标,也可作为区分克癍发酵前后的指标性化合物。

图 8 中 4 个成分含量分析显示,黄芩素的含量在克癍胶囊发酵粉末中显著($P < 0.000 1$)高于原药材粉末,黄芩苷与其来源于同种药材,但在发酵粉末与原药材粉末之间并无显著性差异。相关研究显示,黄芩中所含的黄芩素天然含量极低,但黄芩素表现出比原苷黄芩苷更优越的药理活性,黄芩苷转化为黄芩素极大地提高了其脂溶性和疏水性,使得黄芩苷更容易穿过胃黏膜,且研究表明,黄芩苷在体内发挥药效需要转化为黄芩素后才能实现^[12-14]。因此,本研究最终未将含量最高的黄芩苷作为克癍发酵前后的质量控制指标之一,而是选择黄芩素,这对克癍胶囊发酵前后的综合质量评价更具有参考意义。

本研究采用 HPLC 法对克癍发酵前后化学成分进行了分析,建立了克癍发酵前后化学指纹图谱和含量测定方法;采用化学计量学方法对克癍发酵前后进行了比较,确定了三七皂苷 R₁、黄芩素和小檗碱为质量标志物。所建立的分析方法准确,结果稳定,可用于克癍的质量控制和评价,并为其提供了方法保障和数据支撑。

参考文献

- [1] LI L, WANG L, FAN W, *et al.* The application of fermentation technology in traditional Chinese medicine: a review[J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(4): 899
- [2] YANG HY, HAN L, LIN YQ, *et al.* Probiotic fermentation of herbal medicine: progress, challenges, and opportunities[J]. *Am J Chin Med*, 2023, 51(5): 1105
- [3] 付婷婷,尹兴斌,蔡梦如,等. 曲类中药的品种整理和标准现状分析[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(10): 2699
FU TT, YIN XB, CAI MR, *et al.* Varieties systematization and standards status analysis of fermented Chinese medicine[J]. *China J Chin Mater Med*, 2023, 48(10): 2699
- [4] 倪沁雨,林佳成,涂天智,等. 基于网络药理学探讨克癍胶囊抗肝纤维化的作用机制[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2023, 33(6): 518
NI QY, LIN JC, TU TZ, *et al.* The mechanism of Kehuang capsule against hepatic fibrosis based on network pharmacology[J]. *Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis*, 2023, 33(6): 518
- [5] 周艾强,关卫兵,王凤林,等. 克癍胶囊对非酒精性脂肪肝大鼠的影响[J]. *中成药*, 2019, 41(8): 1969
ZHOU AQ, GUAN WB, WANG FL, *et al.* Effects of Kehuang capsule on rats with nonalcoholic fatty liver[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2019, 41(8): 1969
- [6] 纪翠芳,章明敏. 克癍胶囊改用人工麝香、人工牛黄前后对肝癌细胞的影响[J]. *中国现代药物应用*, 2020, 14(13): 249
JI CF, ZHANG MM. Effect of Kehuang capsule on hepatocellular carcinoma cells before and after using artificial musk and artificial bezoar[J]. *Chin J Mod Drug Appl*, 2020, 14(13): 249
- [7] 刘逆夫,娄勇军. HPLC 法测定克癍胶囊中人参皂苷 R_{g1} 的含量[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2007, 5(7): 26
LIU NF, LOU YJ. Determination of ginsenoside R_{g1} in Kehuang capsule by HPLC[J]. *Chin Med Mod Dis Educ China*, 2007, 5(7): 26
- [8] 叶曼红. 液相色谱法快速测定克癍胶囊中 3 种皂苷含量[J]. *海峡药学*, 2009, 21(8): 58
YE MH. Content determination of 3 ginsenosides in Kehuang capsule by ultra performance LC[J]. *Straits Pharm J*, 2009, 21(8): 58
- [9] 吴聪泉,马鸿杰,刘冬凤. 克癍胶囊中麝香酮组分的含量检测研究[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17(86): 199
WU CQ, MA HJ, LIU DF. Study on the content detection of muscone components in Kehuang capsule[J]. *World Latest Med Inf*, 2017, 17(86): 199
- [10] 李晓静,刘雅茹,李冉,等. 克癍胶囊治疗非酒精性脂肪性肝炎小鼠药效学研究[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2024, 34(3): 230
LI XJ, LIU YR, LI R, *et al.* Pharmacodynamic study of Kehuang capsule in mice with nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis*, 2024, 34(3): 230
- [11] 胡超,贺红,杨岩涛,等. 片仔癍 HPLC 指纹图谱的总量统计矩及其相似度法分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(8): 53
HU C, HE H, YANG YT, *et al.* HPLC fingerprint of Pien Tze Huang by total statistical moment and similarity method[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2016, 22(8): 53
- [12] TANG L, SHAO J, ZHENG H, *et al.* Cleaner production of baicalcin by novel high-temperature-little-acid hydrolysis of baicalin[J]. *Green Chem Lett Rev*, 2024, 17(1): 2319698
- [13] YIM JS, KIM YS, MOON SK, *et al.* Metabolic activities of ginsenoside Rb₁, baicalin, glycyrrhizin and geniposide to their bioactive compounds by human intestinal microflora[J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(10): 1580
- [14] GUO FY, LI CH, DOU JX, *et al.* Research progress on pharmacological properties and application of probiotics in the fermentation of *Scutellaria baicalensis* Georgi[J]. *Front Nutr*, 2024, 11: 1407182

(本文于 2024 年 9 月 20 日收到)