

不同厂家一清颗粒UPLC指纹图谱的比较

曾倩^{1*}, 黄旭龙¹, 王祥培², 吴红梅^{1#}

¹贵州中医药大学药物分析实验室, 贵州 贵阳

²贵州民族大学中药资源与开发系, 贵州 贵阳

收稿日期: 2022年6月18日; 录用日期: 2022年7月15日; 发布日期: 2022年7月22日

摘要

目的: 建立不同厂家不同批次一清颗粒UPLC指纹图谱分析方法, 比较不同厂家之间指纹图谱的差异, 为有效控制及质量评价不同厂家一清颗粒的质量提供有力依据。方法: 采用ZORBAX RRHD Eclipse Plus C₁₈ (2.1 × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 乙腈(A)-0.1%的甲酸水溶液(B)为流动相, 梯度洗脱, 检测波长为254 nm; 流速为0.1 ml/min; 柱温为30℃; 进样量为1 μl。测定24批不同厂家的一清颗粒的指纹图谱, 并对其结果进行相似度、系统聚类分析和主成分分析。同时对一清颗粒中的部分化学成分进行指认。结果: 24批样品UPLC指纹图谱相似度在0.674~0.978之间, 不同厂家一清颗粒成分存在差异, 同一厂家一清颗粒质量较稳定。系统聚类分析将24批一清颗粒分为3大类, 同一厂家之间聚为一类。且利用VIP值筛选出6个导致差异性的差异峰。同时指认出了大黄素、大黄酸、大黄酚、芦荟大黄素、大黄素甲醚、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、盐酸小檗碱、巴马汀等10个化学成分。结论: 该方法简单、可靠、重复性及稳定性好, 适用于不同厂家一清颗粒的质量控制。

关键词

一清颗粒, UPLC指纹图谱, 质量评价

Study on UPLC Fingerprint of Yiqing Granules from Different Manufacturers

Qian Zeng^{1*}, Xulong Huang¹, Xiangpei Wang², Hongmei Wu^{1#}

¹Pharmaceutical Analysis Laboratory, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

²Department of Resources and Development of Traditional Chinese Medicine, Guizhou University for Nationalities, Guiyang Guizhou

Received: Jun. 18th, 2022; accepted: Jul. 15th, 2022; published: Jul. 22nd, 2022

*第一作者。

#通讯作者。

Abstract

Objective: To establish a UPLC fingerprint analysis method for Yiqing granules of different batches from different manufacturers, compare the differences in fingerprints between different manufacturers, and provide a strong basis for effective control and quality evaluation of Yiqing granules produced by different manufacturers. **Methods:** ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (2.1 × 100 mm, 1.8 μm) column was used with acetonitrile (A)-0.1% formic acid aqueous solution (B) as mobile phase. The detection wavelength was set at 254 nm. The flow rate was 0.1 mL/min. The column temperature is 30°C. The injection volume was 1 μL. The fingerprints of 24 batches of Yiqing granules from different manufacturers were determined, and the similarity comparison, cluster analysis and principal component analysis of Yiqing granules from different manufacturers were carried out. At the same time, some chemical constituents in Yiqing granules were identified. **Results:** The similarity of the UPLC fingerprint of 24 batches of samples was between 0.674 and 0.978. There were differences in the composition of Yiqing granules from different manufacturers. The quality of Yiqing granules from the same manufacturer was stable. Systematic cluster analysis divided 24 batches of Yiqing granules into three categories, and the same manufacturers were clustered into one category. The VIP value was used to screen out six differential peaks leading to differences. At the same time, ten chemical components were identified, including emodin, rhein, chrysophanol, aloe-emodin, emodin methyl ether, baicalin, baicalein, wogonin, berberine hydrochloride, palmatine, etc. **Conclusion:** The method is simple, reliable, reproducible and stable, which is suitable for the quality control of Yiqing granules from different manufacturers.

Keywords

Yiqing Granules, UPLC Fingerprint, Quality Evaluation

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

一清颗粒由黄连、大黄和黄芩三味中药提取制成的复方颗粒制剂, 收载于《中国药典》2020 版一部; 具有清热泻火解毒, 化瘀凉血止血之功效, 临床上主要用于治疗火毒血热所致的身热烦躁、目赤口疮、咽喉牙龈肿痛、大便秘结、痔血、咽炎、牙龈炎等症[1]。

配方颗粒的品质可能会受到原药材的品质、来源、采收期等影响, 而生产一清颗粒的厂家众多, 在制备上虽有固定的工艺, 但不同厂家间获取原药材的渠道不一。容易造成对一清颗粒的质量参差不齐。而目前关于一清颗粒质量控制方面的研究主要集中在对其部分成分如: 黄芩苷、小檗碱等成分的含量测定方面[2] [3], 然而仅通过单一学或某两个化成分无法全面反映不同厂家一清颗粒的整体质量和疗效。且各指标间存在一定相关性和独立性, 难以真正控制其质量。因此, 有必要对不同厂家生产的一清颗粒进行质量控制。中药指纹图谱因其整体性、综合性和模糊性的特点, 为复杂中药及其制剂的多指标质量控制提供了新的思路和方法[4] [5]。现虽有关于一清颗粒 HPLC 指纹图谱的相关报道[6], 但未见不同厂家不同批次一清颗粒指纹图谱和单味药材成分归属研究方面的文献报道, 未能阐明不同厂家一清颗粒的质量差异问题。且 UPLC 与传统的 HPLC 相比, 具有分离度高、速度快、灵敏度高等优点。因此, 本文采用 UPLC-PDA 色谱分析技术, 建立五个厂家 24 批一清颗粒指纹图谱, 结合相似度评价、系统聚类分析和主

成分分析, 寻找各自之间的差异性, 以期探讨不同厂家一清颗粒质量的差异, 为一清颗粒的质量评价及深入研究提供参考依据。

2. 仪器、材料与试剂

2.1. 仪器

ACQUITY UPLC 超高效液相色谱, 配备光电二极管矩阵(PDA)检测器 (美国, Waters); 超声波清洗机(型号: HS-10260T, 天津市恒奥科技发展有限公司); 数显恒温水浴锅(型号: HH-6, 常州澳华仪器有限公司); 《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件(2004A 版) (国家药典委员会)。

2.2. 材料

一清颗粒: 规格为每袋 7.5 g, 来源见表 1。对照品大黄素、大黄酸、大黄酚、芦荟大黄素、大黄素甲醚、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、盐酸小檗碱、巴马汀均来源于成都瑞芬思生物科技有限公司, 含量均>97%。

Table 1. Source and batch number of Yiqing granules

表 1. 一清颗粒来源与批号

编号	产品来源	产品批号	相似度
S1	A 厂家	201805010-1	0.614
S2	A 厂家	201805010-2	0.638
S3	B 厂家	171103-1	0.764
S4	B 厂家	171103-2	0.761
S5	B 厂家	1712010-1	0.770
S6	B 厂家	1712010-2	0.769
S7	B 厂家	180606-1	0.831
S8	B 厂家	180606-2	0.827
S9	C 厂家	171213-1	0.742
S10	C 厂家	171213-2	0.742
S11	C 厂家	171214-1	0.721
S12	C 厂家	171214-2	0.689
S13	D 厂家	181280022-1	0.598
S14	D 厂家	181280022-2	0.602
S15	E 厂家	18030005-1	0.747
S16	E 厂家	18030005-2	0.757
S17	E 厂家	18060012-1	0.817
S18	E 厂家	18060012-2	0.836
S19	E 厂家	18060013-1	0.842
S20	E 厂家	18060013-2	0.841
S21	E 厂家	18070015-1	0.837
S22	E 厂家	18070015-2	0.847
S23	E 厂家	17080020-1	0.799
S24	E 厂家	17080020-2	0.805

2.3. 试剂

甲醇、乙腈为色谱纯，水为纯净水，其余试剂均为分析纯。

3. 方法与结果

3.1. 色谱条件

色谱条件: 色谱柱为 ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (2.1 × 100 mm, 1.8 μm), 流动相为乙腈(A)-0.1% 的甲酸水溶液(B)以(0~3 min, 8.5% A~18% A; 3~18 min, 18% A~31% A; 18~24 min, 31% A~45% A; 24~32 min, 45% A~45.5% A; 32~40 min, 45.5% A~80% A; 40~45 min, 80%; 45~50 min, 80% A~8.5% A)进行梯度洗脱; 检测波长为 254 nm; 流速为 0.1 ml/min; 柱温为 30℃; 进样量为 1 μl。

3.2. 对照品溶液的制备

对照品溶液制备: 精密称取大黄素、大黄酸、大黄酚、芦荟大黄素、大黄素甲醚、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、盐酸小檗碱、巴马汀对照品各 0.5 mg, 加甲醇定容至 10 ml, 使之溶解后, 滤过(0.22 μm 微孔滤膜), 备用。

混合对照品溶液: 取上述对照品溶液母液各 1 ml, 加甲醇定容至 10 ml 混匀, 滤过(0.22 μm 微孔滤膜), 备用。

3.3. 供试品溶液的制备

取一清颗粒 1.0 g, 精密称定, 置 50 ml 的锥形瓶中, 加甲醇 25 ml, 超声处理两次(每次加 25 ml 甲醇各超声 30 min), 过滤, 合并滤液, 于水浴锅上蒸干, 用甲醇溶解定容至 10 ml, 摇匀, 滤过(0.22 μm 微孔滤膜), 备用。

3.4. 方法学考察

3.4.1. 精密度试验

精密称取 S3 批号一清颗粒样品 1.0 g, 按“2.3”项下制备方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测试, 连续进样 6 针, 记录色谱图, 六个图谱的相似度分别为 1.000, 1.000, 1.000, 1.000, 1.000, 1.000, 并记录各共有峰的保留时间和峰面积, 以黄芩苷为参比峰, 计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD < 3%, 表明仪器精密度良好。

3.4.2. 重复性试验

精密称取 S3 批号一清颗粒 6 份 1.0 g, 按“2.3”项下制备方法制备供试品溶液, 分别按“2.1”项下色谱条件进行测试, 记录色谱图, 六个图谱的相似度分别为 0.999, 1.000, 1.000, 1.000, 1.000, 1.000, 并记录各共有峰的保留时间和峰面积, 以黄芩苷为参比峰, 计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD < 3%, 表明方法重复性良好。

3.4.3. 稳定性试验

精密称取 S3 批号一清颗粒样品 1.0 g, 按“2.3”项下制备方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测试, 分别在 0 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h 进样, 记录色谱图, 计算出六个图谱的相似度分别为 0.996, 0.998, 0.998, 0.998, 0.996, 0.996, 并记录各共有峰的保留时间和峰面积, 以黄芩苷为参比峰, 计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD < 3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

4. 指纹图谱的建立及分析

不同厂家一清颗粒指纹图谱建立及相似度评价

取 5 个不同厂家的一清颗粒共 24 批次, 按“3.3”项下方法制备供试品溶液, 按“3.1”项下条件进行指纹图谱测定, 将 24 批次样品指纹图谱的 AIA 数据文件导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件进行分析, 以 S1 作为参照图谱, 五个厂家 24 批一清颗粒指纹图谱的共有峰仅只有 11 个, 分别为图 1 所示的 1 号、2 号、6 号、20 号、28 号、31-36 号色谱峰, 相似度在 0.598~0.847 之间, 24 批次一清颗粒色谱图见图 2。而各厂家不同批次的指纹图谱相似度及共有峰依次为: E 厂家(10 个批次): 0.992~0.998、36 个共有峰; D 厂家(2 个批次): 1.00、1.00、共有峰 24 个; C 厂家(4 个批次): 0.997~0.998、26 个共有峰; B 厂家(6 个批次) 0.992~0.995、11 个共有峰; A 厂家(2 个不同批次): 0.998、0.998、22 个共有峰; 以 20 号峰(黄芩苷)为参照峰, 计算各共有峰的相对相对峰面积。结果见表 2。

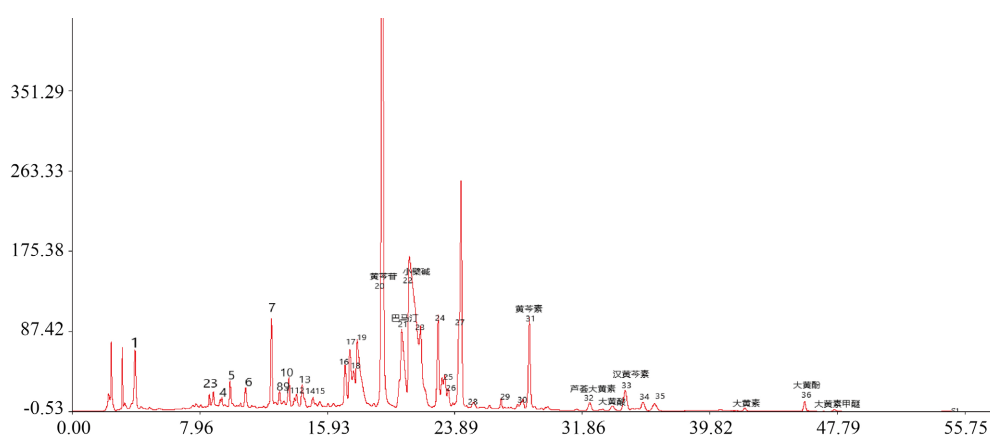


Figure 1. UPLC control fingerprint R of manufacturer Yiqing granules

图 1. E 厂家一清颗粒的 UPLC 对照指纹图谱 R

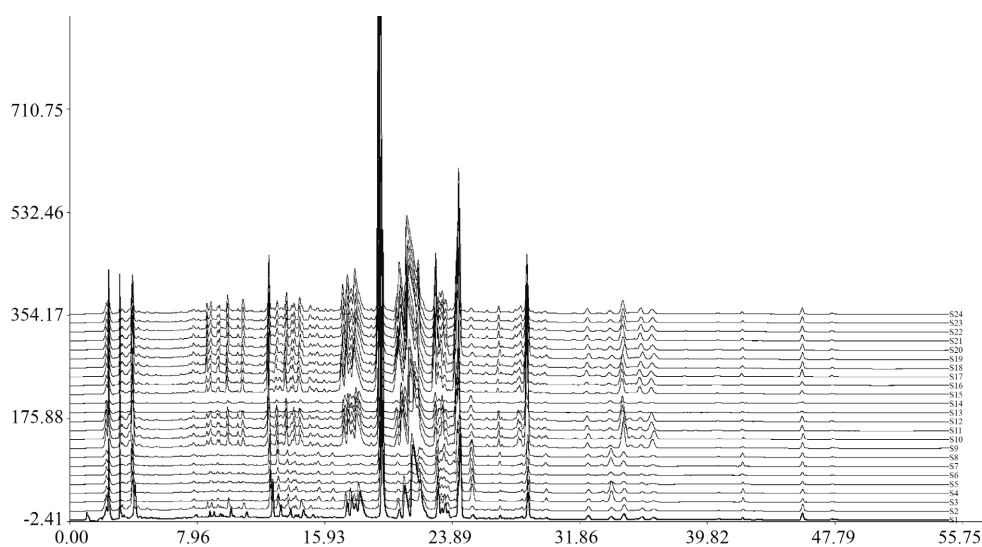


Figure 2. UPLC fingerprint of Yiqing granules from different manufacturers (S1~S2 are A manufacturer; S3~S8 are MANUFACTURER B; S9~S12 are C manufacturer; S13~S14 are D manufacturers; S15~S24 are E manufacturer)

图 2. 不同厂家一清颗粒 UPLC 指纹图谱(S1~S2 为 A 厂家; S3~S8 为 B 厂家; S9~S12 为 C 厂家; S13~S14 为 D 厂家; S15~S24 为 E 厂家)

Table 2. Relative peak areas of common peaks of the fingerprint of Yiqing granules from different manufacturers
表 2. 不同厂家一清颗粒指纹图谱共有峰的相对峰面积

(a)

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
1	0.132	0.130	0.148	0.143	0.187	0.187	0.168	0.167	0.419	0.427	0.409	0.416
2	0.005	0.015	0.005	0.002	0.003	0.002	0.004	0.003	0.026	0.036	0.035	0.026
3	0.020	0.021	-	-	-	0.026	-	0.006	0.035	0.032	0.033	0.034
4	-	-	-	-	-	-	-	-	0.028	0.026	0.025	0.023
5	-	-	-	-	-	-	-	-	0.077	0.080	0.087	0.072
6	0.013	0.019	0.016	0.016	0.012	0.014	0.010	0.008	0.056	0.059	0.057	0.054
7	-	-	-	-	-	-	-	-	0.345	0.350	0.342	0.343
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	0.042	0.013	0.014	0.015	0.009	0.009	0.003	-	0.033	0.031	0.031	0.031
10	0.014	0.012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	0.036	0.035	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	0.013	0.011	-	-	-	0.020	0.015	0.015	-	-	-	-
13	0.011	0.012	-	-	-	-	-	-	0.087	0.088	0.087	0.085
14	-	-	-	-	-	-	-	-	0.026	0.025	0.026	0.026
15	-	-	-	0.012	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	0.057	0.060	0.057	0.052
17	0.065	0.068	-	-	-	-	-	-	0.026	0.029	0.027	0.024
18	0.086	0.087	-	0.019	-	-	-	-	0.345	0.350	0.342	0.343
19	-	-	-	-	0.007	0.007	-	-	-	-	-	-
20	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
21	-	-	-	-	-	0.019	0.032	0.024	0.078	0.078	-	-
22	0.197	0.197	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	0.396	0.396	0.399	0.245
24	-	-	-	-	-	-	-	-	0.121	0.119	0.120	0.125
25	0.037	0.038	0.051	-	0.044	0.044	0.040	0.042	-	-	-	-
26	0.065	0.064	0.051	0.052	-	-	-	-	0.059	0.060	0.057	0.057
27	-	-	-	-	-	-	0.203	0.203	0.439	0.436	0.434	0.435
28	0.022	0.022	0.155	0.156	0.138	0.146	0.169	0.167	0.051	0.052	0.048	0.049
29	-	-	-	-	-	-	-	-	0.038	0.039	0.037	0.038
30	0.004	0.005	-	-	-	-	-	-	-	0.015	0.014	0.013
31	0.109	0.098	0.141	0.148	0.112	0.108	0.156	0.141	0.768	0.773	0.765	0.765
32	0.025	0.024	0.033	0.032	0.012	0.012	0.032	0.034	0.046	0.047	0.044	0.043
33	0.039	0.038	0.047	0.048	0.029	0.030	0.069	0.068	0.250	0.250	0.248	0.247
34	0.020	0.020	0.013	0.013	0.012	0.013	0.014	0.014	0.036	0.036	0.036	0.035
35	0.017	0.016	0.020	0.021	0.016	0.016	0.024	0.024	0.099	0.098	0.098	0.097
36	0.029	0.027	0.026	0.027	0.023	0.026	0.040	0.040	0.036	0.036	0.035	0.035

(b)												
峰号	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24
1	0.133	0.148	0.055	0.054	0.120	0.121	0.111	0.116	0.109	0.106	0.080	0.083
2	-	-	0.010	0.011	0.027	0.026	0.024	0.025	0.020	0.020	0.013	0.013
3	-	-	0.024	0.026	0.040	0.038	0.037	0.037	0.035	0.035	0.029	0.029
4	-	-	0.013	0.014	0.031	0.026	0.026	0.028	0.013	0.013	0.010	0.010
5	0.027	0.027	0.032	0.032	0.039	0.036	0.040	0.041	0.035	0.040	0.037	0.037
6	0.013	0.014	0.027	0.027	0.037	0.033	0.034	0.035	0.034	0.033	0.031	0.031
7	0.049	0.048	0.079	0.078	0.107	0.104	0.102	0.104	0.102	0.102	0.092	0.092
8	-	-	0.013	0.013	0.025	0.037	0.024	0.025	0.025	0.025	0.022	0.023
9	-	0.005	0.017	0.018	0.024	0.007	0.021	0.021	0.021	0.021	0.016	0.016
10	-	-	0.038	0.038	0.043	0.041	0.043	0.043	0.044	0.044	0.040	0.039
11	-	-	0.011	0.011	0.023	0.020	0.022	0.022	0.021	0.021	0.015	0.015
12	-	-	0.014	0.014	0.024	0.022	0.023	0.023	0.023	0.023	0.017	0.018
13	0.042	0.043	0.045	0.044	0.051	0.046	0.043	0.049	0.049	0.047	0.045	0.044
14	0.003	0.003	0.021	0.021	0.015	0.012	0.014	0.014	0.016	0.016	0.017	0.018
15	-	-	0.011	0.011	0.020	0.016	0.018	0.019	0.019	0.019	0.014	0.014
16	0.002	0.002	0.076	0.074	0.076	0.068	0.071	0.072	0.074	0.072	0.071	0.070
17	0.084	0.083	0.106	0.102	0.097	0.095	0.095	0.096	0.093	0.087	0.099	0.097
18	0.101	0.100	0.063	0.061	0.067	0.062	0.058	0.060	0.059	0.059	0.057	0.057
19	0.089	0.088	0.233	0.224	0.209	0.206	0.214	0.215	0.202	0.189	0.216	0.212
20	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.001	1.000	1.000
21	-	-	0.250	0.243	0.189	0.178	0.174	0.177	0.180	0.171	0.221	0.217
22	0.266	0.262	0.754	0.725	0.642	0.629	0.621	0.622	0.632	0.598	0.692	0.674
23	-	-	0.211	0.208	0.227	0.211	0.209	0.217	0.209	0.210	0.186	0.185
24	0.122	0.120	0.133	0.133	0.136	0.133	0.139	0.140	0.139	0.139	0.124	0.123
25	-	-	0.042	0.041	0.077	0.071	0.048	0.073	0.073	0.073	0.052	0.053
26	0.034	0.033	0.024	0.024	0.040	0.034	0.070	0.038	0.034	0.034	0.028	0.028
27	0.329	0.314	0.326	0.326	0.285	0.399	0.400	0.405	0.400	0.399	0.349	0.347
28	0.116	0.113	0.015	0.015	0.028	0.014	0.026	0.027	0.026	0.026	0.014	0.014
29	0.008	0.007	0.009	0.009	0.018	0.014	0.017	0.017	0.017	0.017	0.010	0.010
30	0.015	0.016	0.026	0.026	0.027	0.025	0.027	0.027	0.019	0.018	0.021	0.020
31	0.104	0.103	0.162	0.164	0.150	0.149	0.148	0.148	0.160	0.160	0.119	0.115
32	0.012	0.009	0.008	0.008	0.018	0.018	0.017	0.017	0.016	0.015	0.015	0.015
33	0.033	0.031	0.055	0.055	0.051	0.052	0.050	0.050	0.056	0.056	0.047	0.045
34	0.022	0.021	0.026	0.026	0.025	0.025	0.006	0.025	0.026	0.026	0.019	0.019
35	0.015	0.014	0.026	0.026	0.024	0.024	0.023	0.023	0.025	0.025	0.020	0.019
36	0.021	0.018	0.009	0.009	0.017	0.017	0.016	0.017	0.014	0.014	0.014	0.014

5. 对照品指纹图谱的指认

取混合对照品,按“2.2”项下方法制备,吸取 1 μm 在“2.1”项色谱条件下注入 UPLC-PDA 联用仪中进行测定。由此混合对照品从左往右依次为黄芩苷、巴马汀、小檗碱、黄芩素、芦荟大黄素、大黄酸、汉黄芩素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚。将 5 个厂家指纹图谱与 10 个对照品进行成分指认,如见图 3 所示,由图 3 可知,5 个厂家中均含有除大黄素甲醚以外的 9 个对照品指纹图谱,但各厂家之间的含量存在一定差异,表明各厂家一清颗粒的质量不均一。

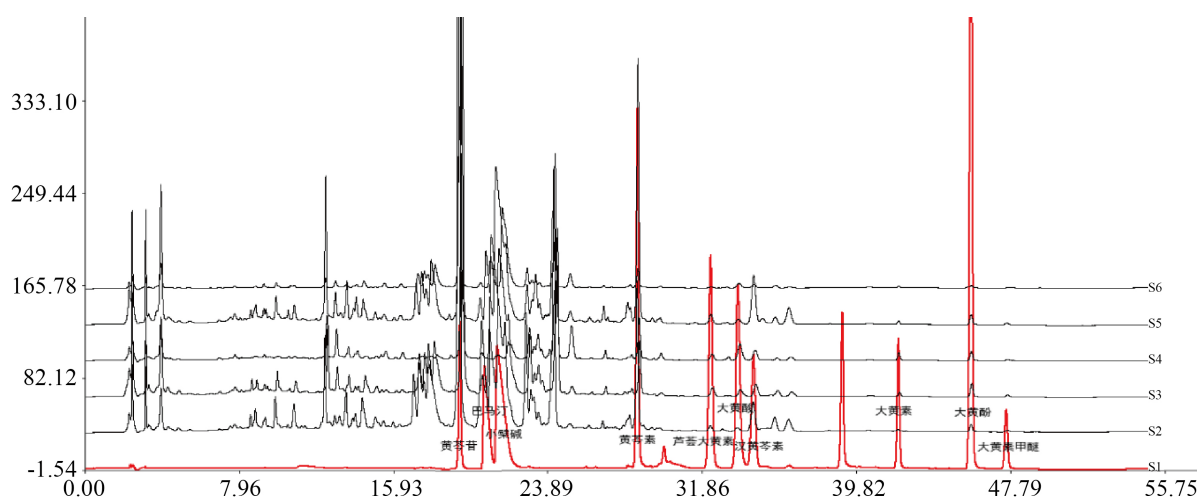


Figure 3. UPLC fingerprint of Yiqing granules and reference substance from different manufacturers (S1: mixed reference; S2: E manufacturers; S3: D manufacturer; S4: C manufacturer; S5: manufacturer B; S6: A manufacturer)

图 3. 不同厂家一清颗粒与对照品 UPLC 指纹图谱(S1: 混合对照品; S2: E 厂家; S3: D 厂家; S4: C 厂家; S5: B 厂家; S6: A 厂家)

6. 相对峰面积的聚类分析

将 5 个不同厂家的一清颗粒 24 批样品 UPLC 图谱中的 36 个共有峰(没有共有峰数据的以 0 来计)的相对峰面积值标准化组成 24×36 阶原始数据矩阵,运 SPSS 20.0 软件进行系统聚类分析,采用组间连接法,利用欧式距离(Euclidean)作为样品的测度。根据 24 批样品之间相关系数由大到小的顺序合并,样品中 S9、S10、S11、S12 聚为 I 类, S15、S16、S17、S18、S19、S20、S21、S22、S23、S24 聚为 II 类, S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S13、S14 聚为 III 类。结果见图 4。

7. 主成分分析(PCA)

为了合理评价、综合分析不同厂家一清颗粒化学成分的差异性,对 24 批一清颗粒的相对峰面积进行主成分分析。将所有一清颗粒样品共有峰的相对峰面积导入 SIMCA14.0 软件中,得到 3 大特征主成分 PC1, PC2, PC3, 结果见图 5。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^2X 、预测能力参数 Q^2 分别为 0.868, 0.714, 说明该模型的区分程度和预测程度较好,所以前 3 个主成分分析已基本能反映出一清颗粒的主要特征。

以主成分建立坐标系,得到 24 批一清颗粒样品的 PCA 得分图、载荷图,由 PCA 得分图可知,24 批一清颗粒样品可聚为 3 大类: S15~S24 聚为一类, S9~S12 为一类, S1~S8、S13、S14、S 聚为一类,与聚类分析结果一致。载荷图上每个点代表一个变量,离原点距离越远,表明该成分含量变化对分类的贡献越大,表明不同厂家的一清颗粒之间有一定的区分,说明不同厂家一清颗粒在化学成分的种类和量

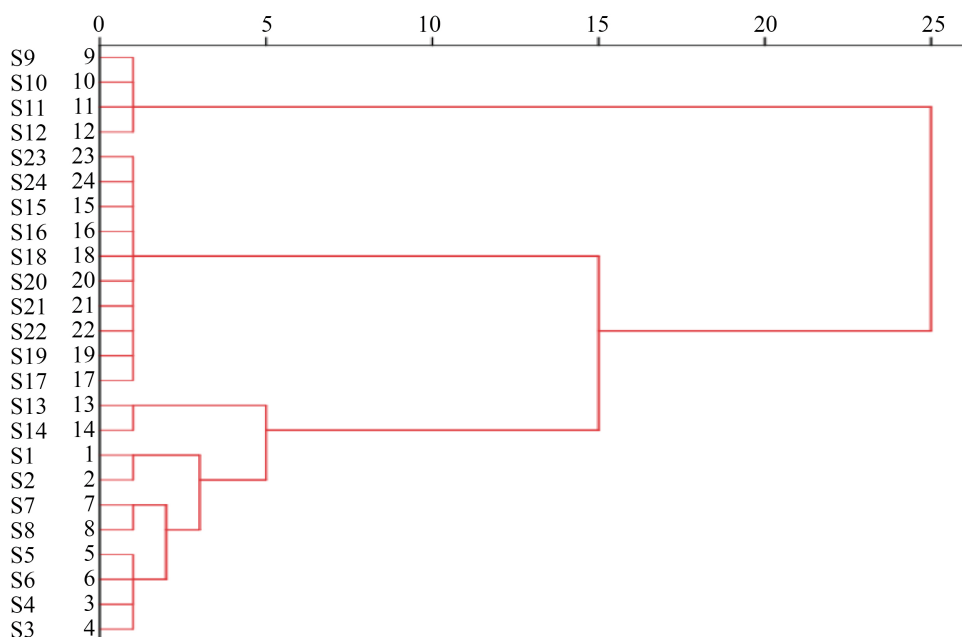


Figure 4. Cluster analysis of fingerprint of 24 batches of Yiqing granule samples
图 4. 24 批一清颗粒样品指纹图谱的聚类分析

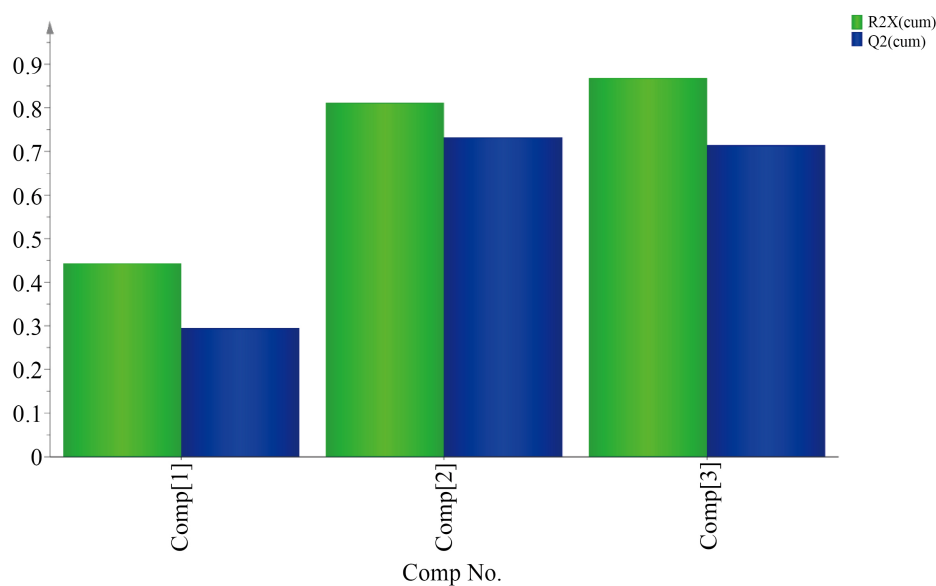


Figure 5. Cumulative variance contribution rate of principal components 1, 2 and 3 of common peaks relative to peak area of 24 batches of Yiqing granule samples
图 5. 24 批一清颗粒样品共有峰相对峰面积第 1, 2, 3 主成分的方差累计贡献率

上具有一定的差异性, 见图 6 和图 7。为更好地反映 24 批一清颗粒的成分差异, 基于 PCA 结果, 采用正交偏最小二乘法 - 判别分析(OPLS~DA), 根据模型的 VIP 值来筛选导致差异性的主要化学成分, 结果见图 8。一般认为 $VIP > 1$ 的变量对分类起着关键作用, 从图 7 可知: 30 号峰、17 号峰、19 号峰、22 号峰、24 号峰、16 号峰、36 号峰、10 号峰、18 号峰、8 号峰、21 号峰、15 号峰、14 号峰、4 号峰、27

号峰、3号峰、32号峰、28号峰的VIP均大于1，而导致一清颗粒最大差异的是30号峰、17号峰、19号峰、22号峰、24号峰、16号峰。因此，不同厂家一清颗粒在其化学成分的种类和量具有明显的区分。

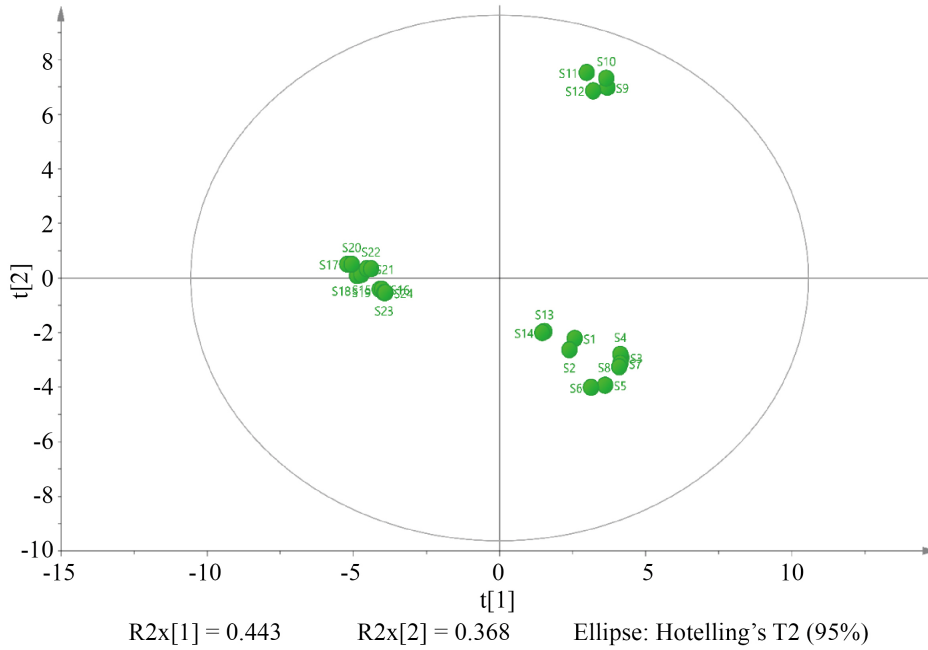


Figure 6. PCA score of common peak relative peak area of 24 batches of Yiqing granule samples
图 6. 24 批一清颗粒样品共有峰相对峰面积的主成分 PCA 得分图

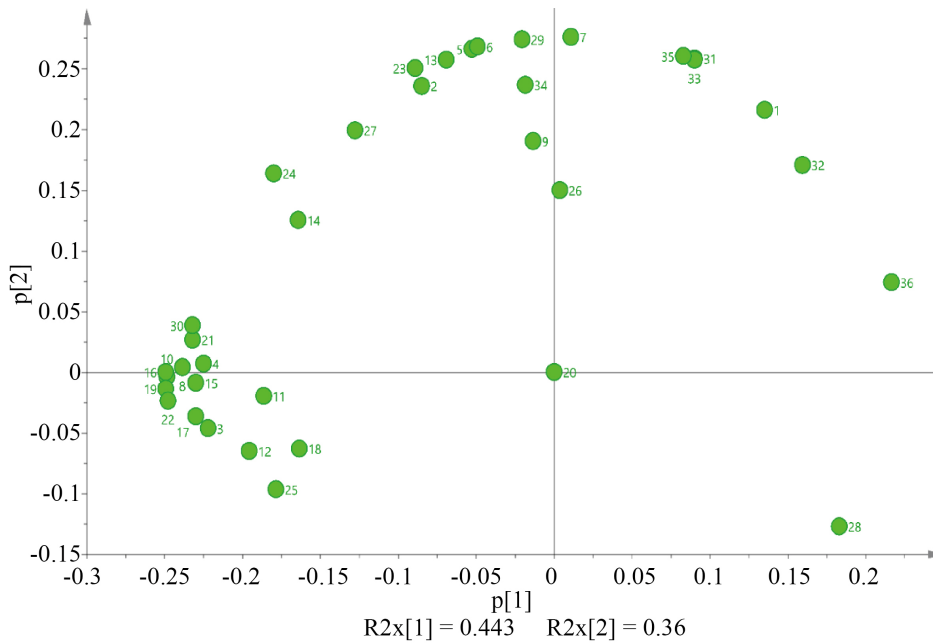


Figure 7. PCA loading diagram of common peak relative peak area of 24 batches of Yiqing granule samples
图 7. 24 批一清颗粒样品共有峰相对峰面积的主成分 PCA 载荷图

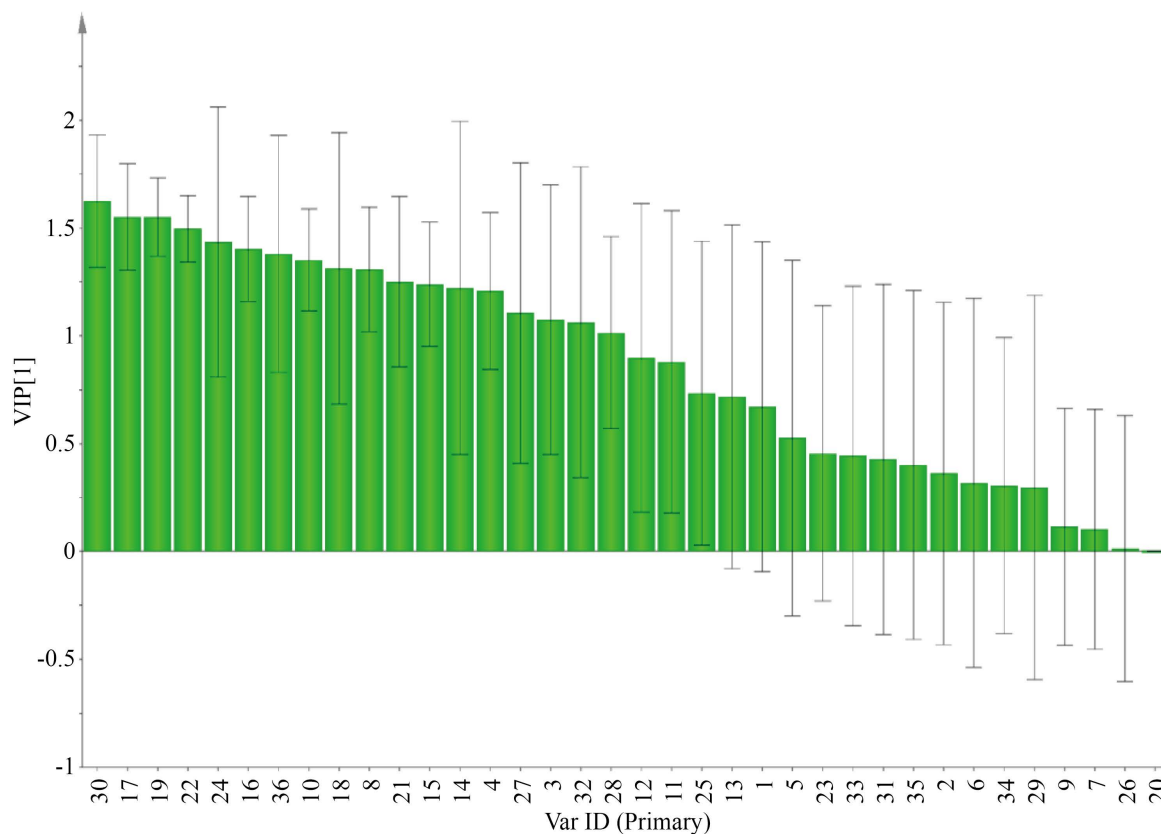


Figure 8. VIP values of the different markers in the PLS-DA model of the common peak relative peak area of 24 batches of Yiqing granule samples

图 8. 24 批一清颗粒样品共有峰相对峰面积 PLS-DA 模型差异性标志物的 VIP 值图

8. 结果与讨论

本文通过液相指纹图谱技术建立了多个厂家一清颗粒 UPLC 指纹图谱分析方法, 其相似度在 0.598~0.847 之间。而 A、B、C、D、E 厂家各自之间一清颗粒 UPLC 指纹图谱相似度高, 在 0.992~1.000 之间, 且在不同厂家间样品的共有峰个数上有差异; 对照品指认发现 5 个厂家中均含有除大黄素甲醚以外的 9 个对照品指纹图谱, 但各厂家之间的含量存在一定差异; 系统聚类分析将 24 批一清颗粒分为 3 大类 5 小类, 且按厂家呈现一定的规律性, 同一厂家聚为一小类。主成分分析其分为三个主成分, 结合样品间各峰的峰面积大小分析发现三个主成分一清颗粒间色谱峰所对应的化学成分含量与种类存在较大差异, 而导致不同厂家一清颗粒差异大的主要成分为 30 号峰、17 号峰、19 号峰、22 号峰、24 号峰、16 号峰。

以上结果可知, 同一厂家一清颗粒样品之间指纹图谱相似度差异较小, 表明同一厂家生产制备的一清颗粒的质量及其化学成分较稳定; 不同厂家一清颗粒指纹图谱差异较大; 不同厂家可能因其生产过程中所采购的药材来源(品种、产地、采收期、加工炮制、药用部位等)、制备工艺的控制、储藏条件等不同而导致其制剂的质量差异及某些化学成分的增减或改变。质量差异是导致疗效和副作用的关键因素, 可能会在临床用药上带来较大的安全隐患。建议各厂家严把药材质量关口, 统一生产工艺, 并建立合理的质控指标。液相指纹图谱技术不仅可以识别不同厂家一清颗粒的异同性, 也可为不同厂家一清颗粒所用的原药材来源的识别提供参考。该研究为一清颗粒的整体质量控制提供了参考。

基金项目

贵州省一流课程重点建设项目(项目合同编号: 黔教高发[2017]158)。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典一部[S]. 北京: 中国医药出版社, 2020: 447.
- [2] 宋丽丽, 曹颖, 李晓霞, 张玉萍, 张祎. 应用 HPLC 对复方一清颗粒中黄芩苷含量测定方法的改进[J]. 实验室科学, 2015, 18(2): 10-13.
- [3] 王玉林, 崔俊凤, 王建强. HPLC 法同时测定一清颗粒中 5 种成分含量[J]. 解放军药学学报, 2017, 33(4): 330-332+336.
- [4] 徐妍, 杨华蕊, 杨永寿, 肖培云. 中药指纹图谱研究现状及展望[J]. 世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊), 2018, 18(76): 91-94.
- [5] Liu, W.C., Sun, L., Yu, M.Q., *et al.* (2010) Advances in the Pattern Recognition Research on Fingerprint of Traditional Chinese Medicine. *Journal of International Pharmaceutical Research*, **27**, 489-494.
- [6] 王梦旻, 陶智, 张雁. 一清颗粒 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药师, 2018, 21(5): 836-839.