

基于一测多评法定量的四季三黄片质量评价研究

周亚楠, 张元元, 白洁, 苏建, 武红敏, 刘永利* (河北省药品医疗器械检验研究院, 石家庄 050229)

摘要: 目的 建立同时测定四季三黄片中黄芩苷、去甲汉黄芩素苷、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 等 7 种成分的一测多评法。方法 采用 HPLC, 岛津 VP-ODS 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%三氟乙酸溶液为流动相, 梯度洗脱; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 30 °C; 检测波长 276 nm。以黄芩苷为内参物, 建立去甲汉黄芩素苷、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和千层纸素 A 的相对校正因子, 同时采用一测多评法和外标法测定四季三黄片中 7 个成分的含量, 并将 2 种方法的测定结果进行比较。结果 7 种成分在各自范围内线性关系良好($r>0.9998$), 平均加样回收率 97.0%~102.1%, RSD 为 1.2%~2.5%。共测定了 4 个企业 29 批四季三黄片中 7 种成分的含量, 结果一测多评法与外标法测定结果无明显差异。不同企业样品间各成分含量存在明显差异。结论 建立的含量方法能够反映出投料用黄芩饮片的质量状况, 进而全面有效地评价四季三黄片的质量, 为其质量标准的提升奠定基础。

关键词: 四季三黄片; 一测多评; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩素; 质量评价

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)02-0204-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2023.02.008

引用本文: 周亚楠, 张元元, 白洁, 等. 基于一测多评法定量的四季三黄片质量评价研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(2): 204-212.

Study on the Quality Evaluation of Sijisanhuang Tablets Based on Quantitative Analysis of Multi-components by Single Marker

ZHOU Yanan, ZHANG Yuanyuan, BAI Jie, SU Jian, WU Hongmin, LIU Yongli* (Hebei Institute for Drug and Medical Device Control, Shijiazhuang 050299, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a quantitative analysis of multi-components by single marker(QAMS) method for simultaneous determination of baicalin, unmethylated bacicalein, melaeuca A-7-O-β-D-glucuronide, scutellarin, bacicalein, wogonin, melaeuca A in Sijisanhuang tablets. **METHODS** The separation was performed on HPLC with Shimadzu VP-ODS column(4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase consisting of acetonitrile-0.1% trifluoroacetic acid elution for gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was 30 °C, and the detection wavelengths were 276 nm. The relative correction factors of unmethylated bacicalein, melaeuca A-7-O-β-D-glucuronide, scutellarin, bacicalein, wogonin, melaeuca A were calculated by using the baicalin as the internal standard. At the same time, the external standard method was used to determine the content of the seven components, and the differences between the two methods were compared. **RESULTS** The linear ranges of seven components were well($r>0.9998$). And the average recoveries were 97.0%~102.1%, RSDs were 1.2%~2.5%, respectively. There were no significant difference in assay results between QAMS and the external standard method. There were obvious differences in the contents of each component among samples from different enterprises. **CONCLUSION** The QAMS method can reflect the quality of Radix Scutellariae for feeding, and then comprehensively and effectively evaluate the quality of Sijisanhuang tablets, so as to lay a foundation for improving its quality standard.

KEYWORDS: Sijisanhuang tablets; QAMS; baicalin; scutellarin; bacicalein; wogonin; quality evaluation

四季三黄片是由大黄、黄芩、黄柏、栀子 4 味饮片组成的复方制剂, 具有消炎退热、通便利水等功效, 主要用于口鼻生疮、咽疼齿痛、口干舌燥、目眩头晕、大便秘结、小便赤黄等的治疗。方中大黄泻下攻积、清热泻火、凉血解毒、逐瘀通经、利湿退黄, 黄芩清热燥湿、泻火解毒, 黄

柏清热解毒、清热燥湿, 三者共为君药; 栀子具有泻火除烦、清热利湿、凉血解毒之功效, 为臣药。四季三黄片现行质量标准收载于《卫生部药品标准》第二十册, 仅有性状和检查项, 未对其特征成分进行含量控制。结合质量标准和文献报道^[1-2], 发现仅对所含单个成分或部分药味的主要

作者简介: 周亚楠, 女, 硕士, 高级工程师 E-mail: 172774170@qq.com

*通信作者: 刘永利, 男, 硕士, 正高级工程师 E-mail:

liuyongli2008@126.com

成分进行了定量检测,未有针对处方中黄芩药材的全面质量进行评价分析的研究。

现代研究表明黄芩中的主要活性成分以黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A 等黄酮类成分为主^[3],为全面评价四季三黄片中投料用黄芩药材的质量状况,拟采用 HPLC 测定黄芩中黄芩苷、去甲汉黄芩素苷、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 7 种成分的含量。而一测多评法(quantitative analysis of multi-components by single marker, QAMS)既能实现多指标成分的质量控制,又能解决对照品紧缺或价格昂贵的问题,已应用于多个处方制剂的质量评价^[4-7]。本实验选取质量稳定、价廉易得的黄芩苷作为内标,采用 QAMS 对四季三黄片中黄芩苷、去甲汉黄芩素苷、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 7 种成分的含量进行测定,建立其他 6 种成分间的相对校正因子,计算各成分的含量,并用含量结果评价不同企业间四季三黄片投料用黄芩饮片的质量差异,以期为更有效地全面控制四季三黄片的质量提供参考。

1 仪器与试剂

Waters e2695 高效液相色谱仪(配备 PDA 检测器,美国 Waters 公司);Integral-10 纯水仪(Millipore 公司);KQ-500KDE 超声仪(昆山市超声仪器有限公司);甲醇、乙腈(色谱纯,Merck 公司);三氟乙酸为优级纯;水为超纯水;黄芩苷(批号:110715-201821;含量:95.4%)、汉黄芩苷(批号:112002-201702;含量:98.5%)、黄芩素(批号:111595-201808;含量:97.9%)、汉黄芩素(批号:111514-201706;含量:100%)均购自中国食品药品检定研究院;去甲汉黄芩素苷(批号:STC1110205;含量:95.0%)、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷(批号:ST15720105;含量:98.0%)、千层纸素 A(批号:St23660220,含量:95.0%)对照品均购自上海诗丹德标准技术服务有限公司;四季三黄片样品 29 批,来自全国 4 家药品生产企业,比智高药业有限公司(厂家 A,批号:A01~A06),江西华太药业有限公司(厂家 B,批号:B1~B15),江西新远健药业有限公司(厂家 C,批号:C1~C4),天津中新药业集团股份有限公司乐仁堂制药厂(厂家 D,

批号:D1~D4)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

岛津 VP-ODS 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);以乙腈(A)-0.1%三氟乙酸溶液(B)为流动相,梯度洗脱:0~12 min,22%→24%A;12~17 min,24%A;17~30 min,24%→30%A;30~36 min,30%→40%A;36~42 min,40%A;42~60 min,40%→52%A;60~65 min,52%→80%A;检测波长:276 nm;进样量:10 μL。柱温:30 ℃。流速为 1.0 mL·min⁻¹。混合对照品及样品的色谱图见图 1。表明在此色谱条件下各成分分离度较好。

2.2 混合对照品溶液的制备

取黄芩苷、去甲汉黄芩素苷、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 对照品适量,精密称定,加甲醇制成含黄芩苷 0.203 3 mg·mL⁻¹、去甲汉黄芩素苷 0.012 19 mg·mL⁻¹、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷 0.015 72 mg·mL⁻¹、汉黄芩苷 0.050 13 mg·mL⁻¹、黄芩素 0.031 05 mg·mL⁻¹、汉黄芩素 0.014 20 mg·mL⁻¹、千层纸素 A 0.022 15 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取本品粉末约 0.4 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70%甲醇溶液 25 mL,密塞,称重,超声处理(功率 700 W,频率 80 kHz) 30 min,放冷,再称重,用 70%甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性样品溶液制备

按照处方和制法,制备缺黄芩的阴性样品,按“2.3”项下方法制备,即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性试验 取对照品、供试品、阴性样品溶液,按“2.1”项色谱条件下进行测定,结果显示所记录色谱图基线平稳,四季三黄片中待测目标成分黄芩苷、去甲汉黄芩素苷、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 与相邻成分色谱峰均能达到有效分离,分离度均>1.5%,理论板数按待测目标成分黄芩苷计>5 000,阴性样品对四季三黄片中 7 种待测目标成分测定无干扰,色谱图见图 1。

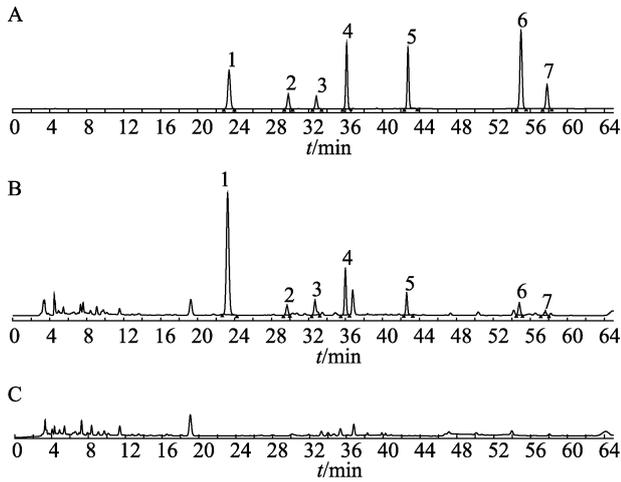


图1 混合对照品和样品的液相色谱图
A-混合对照品；B-四季三黄片样品；C-阴性样品；1-黄芩苷；2-去甲汉黄芩素苷；3-千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷；4-汉黄芩苷；5-黄芩素；6-汉黄芩素；7-千层纸素 A。

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed standards and sample
A-mixed reference substance; B-Sijisanhuang tablets sample; C-negative sample; 1-baicalin; 2-unmethylated bacicalein; 3-melaueca A-7-O-β-D gluconide; 4-scutellarin; 5-bacicalein; 6-wogonin; 7-melaueca A.

2.5.2 线性关系考察 分别精密称取黄芩苷、去甲汉黄芩素苷、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 对照品适量，配置成系列浓度的对照品溶液，注入液相色谱仪，按拟定的色谱条件测定，记录峰面积。以对照品进样量(μg)为横坐标，相应的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，求得回归方程。结果见表 1，表明各成分线性关系良好。

表 1 各成分线性关系结果

Tab. 1 Results of linear regression of each component

成分	回归方程	r	线性范围/μg
黄芩苷	$Y=4.9 \times 10^6 X + 1.2 \times 10^6$	0.999 9	0.194~19.4
去甲汉黄芩素苷	$Y=5.3 \times 10^6 X - 3.9 \times 10^4$	0.999 8	1.1×10^{-2} ~1.16
千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷	$Y=4.2 \times 10^6 X - 8.2 \times 10^3$	0.999 9	1.5×10^{-2} ~1.54
汉黄芩苷	$Y=5.4 \times 10^6 X + 1.6 \times 10^4$	0.999 9	4.9×10^{-2} ~4.93
黄芩素	$Y=7.4 \times 10^6 X - 1.6 \times 10^5$	0.999 9	3.0×10^{-2} ~3.04
汉黄芩素	$Y=8.7 \times 10^6 X - 1.5 \times 10^4$	0.999 9	1.4×10^{-2} ~1.42
千层纸素 A	$Y=7.0 \times 10^6 X - 1.4 \times 10^4$	0.999 9	2.1×10^{-2} ~2.10

2.5.3 重复性试验 取四季三黄片样品(批号: B7)，研细，分别称取 0.2, 0.4, 0.6 g 各 3 份，精密称定，按“2.3”项下方法平行制备供试品溶液，进行测定，计算得各待测成分的平均含量(n=9)及 RSD 值，结果黄芩苷、去甲汉黄芩素苷、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、

汉黄芩素、千层纸素 A 含量 RSD 分别为 2.5%, 1.6%, 2.5%, 1.9%, 1.7%, 1.9%, 2.3%。表明该方法重复性良好。

2.5.4 稳定性试验 分别取四季三黄片样品(批号: B7)，研细，分别称取 0.4 g，精密称定，按供试品溶液制备方法制备，分别于 0, 3, 6, 12, 16, 24 h 进样分析，计算黄芩苷、去甲汉黄芩素苷、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 7 种成分峰面积 RSD 值，结果 RSD 分别为 0.5%, 1.7%, 1.7%, 1.2%, 0.7%, 1.5%, 1.9%。表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.5.5 加样回收率试验 采用加样回收测定法。分别取四季三黄片样品(批号: B7)，研细，取 0.2 g，精密称定，每 3 份为 1 组，分别精密加入用溶液配制的低、中、高 3 个浓度的混合对照品溶液 25 mL，按照中国药典 2020 年版四部要求精密加入对照品溶液(低、中、高 3 个浓度各成分质量浓度分别为黄芩苷 0.067, 0.124, 0.190 mg·mL⁻¹；去甲汉黄芩素苷 0.004 8, 0.009 8, 0.014 3 mg·mL⁻¹；千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷 0.007 3, 0.014 6, 0.021 9 mg·mL⁻¹；汉黄芩苷 0.012 2, 0.024 4, 0.036 6；黄芩素 0.006 3, 0.012 6, 0.018 9 mg·mL⁻¹；汉黄芩素 0.003 2, 0.006 4, 0.009 5 mg·mL⁻¹；千层纸素 A 0.000 96, 0.001 91, 0.003 82 mg·mL⁻¹) 25 mL 各 3 份，按“2.3”项下方法平行制备 9 份供试品溶液，进行测定，计算 7 个成分的加样回收率及 RSD，结果见表 2，表明本方法回收率良好。

2.6 相对校正因子的计算

采用校准曲线相对斜率法及浓度法，以黄芩苷为内标参照物，测定其他 6 个指标成分相对于黄芩苷的校正因子。

2.6.1 斜率法相对校正因子的计算 将各个组分的对照品溶液配制成系列浓度，按“2.1”项下色谱条件测定，以对照品进样量为横坐标，以对应的峰面积为纵坐标，作标准曲线，得出斜率。使用各成分标准曲线的原点的线性斜率，以黄芩苷斜率/待测成分斜率计算各成分校正因子，结果去甲汉黄芩素苷、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 相对校正因子分别为 0.916 8, 1.153 5, 0.918 1, 0.653 4, 0.560 6, 0.697 3。

表 2 回收率试验结果

Tab. 2 Results of recovery test

成分	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均值/ %	RSD/ %	成分	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均值/ %	RSD/ %		
黄芩苷	3.524 7	1.678 1	5.167 0	97.87	97.0	2.5	黄芩素	0.320 1	0.157 3	0.470 3	95.49	96.3	2.5		
	3.437 7	1.678 1	5.050 1	96.09				0.312 2	0.157 3	0.460 5	94.33				
	3.506 0	1.678 1	5.226 4	102.52				0.318 4	0.157 3	0.471 1	97.10				
	3.449 6	3.111 9	6.443 8	96.21				0.313 3	0.314 6	0.610 1	94.34				
	3.422 3	3.111 9	6.367 3	94.64				0.310 8	0.314 6	0.603 8	93.14				
	3.439 4	3.111 9	6.537 0	99.54				0.312 3	0.314 6	0.626 7	99.94				
	3.425 7	4.745 4	7.914 5	94.59				0.311 1	0.471 9	0.761 9	95.54				
	3.418 9	4.745 4	7.881 2	94.03				0.310 5	0.471 9	0.762 4	95.76				
3.487 2	4.745 4	8.122 0	97.67	0.316 7	0.471 9	0.791 6	100.64								
去甲汉黄芩素苷	0.259	0.119	0.379	100.16	100.5	2.2	汉黄芩素	0.181 7	0.078 8	0.257 8	96.57	97.0	2.4		
	0.253	0.119	0.373	100.55				0.177 2	0.078 8	0.249 3	91.46				
	0.253	0.119	0.376	103.26				0.180 8	0.078 8	0.259 2	99.53				
	0.254	0.239	0.501	103.41				0.177 8	0.157 6	0.330 3	96.71				
	0.253	0.239	0.486	97.42				0.176 4	0.157 6	0.328 2	96.26				
	0.253	0.239	0.497	102.33				0.177 3	0.157 6	0.333 4	99.05				
	0.252	0.358	0.604	98.28				0.176 6	0.236 4	0.406 8	97.37				
	0.252	0.358	0.601	97.71				0.176 3	0.236 4	0.407 7	97.88				
0.257	0.358	0.619	101.39	0.179 8	0.236 4	0.411 7	98.10								
千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷	0.381 0	0.182 5	0.568 9	102.97	102.1	2.0	千层纸素 A	0.038 4	0.023 9	0.062 3	99.92	99.5	2.0		
	0.371 6	0.182 5	0.561 6	104.14				0.037 5	0.023 9	0.060 6	97.09				
	0.371 6	0.182 5	0.559 7	103.10				0.037 5	0.023 9	0.060 9	98.26				
	0.372 9	0.365 0	0.741 2	100.93				0.037 6	0.047 7	0.086 6	102.65				
	0.371 8	0.365 0	0.734 5	99.40				0.037 5	0.047 7	0.086 1	101.75				
	0.371 8	0.365 0	0.754 7	104.93				0.037 5	0.047 7	0.084 8	99.06				
	0.374 0	0.547 4	0.914 4	98.72				0.037 7	0.095 5	0.132 7	99.47				
	0.376 9	0.547 4	0.940 5	102.95				0.038 0	0.095 5	0.134 4	100.94				
0.376 9	0.547 4	0.933 5	101.67	0.038 0	0.095 5	0.130 0	96.35								
汉黄芩苷	0.702 1	0.305 3	1.000 5	97.73	97.4	1.2									
	0.684 8	0.305 3	0.979 7	96.61											
	0.698 4	0.305 3	1.000 5	98.95											
	0.687 1	0.610 7	1.276 5	96.51											
	0.681 7	0.610 7	1.267 0	95.84											
	0.685 1	0.610 7	1.291 2	99.26											
	0.682 4	0.916 0	1.565 7	96.43											
	0.681 0	0.916 0	1.568 6	96.90											
0.694 6	0.916 0	1.596 2	98.43												

2.6.2 浓度法(多点法)相对校正因子的计算 精密称取黄芩苷、去甲汉黄芩素苷、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 对照品适量,加入甲醇超声溶解,制成质量浓度分别为 0.194 0, 0.011 6, 0.015 4, 0.049 4, 0.030 4, 0.014 2, 0.021 0 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液,精密吸取混合对照品溶液 3,

6, 10 μL(n=3)注入液相色谱仪中,记录峰面积,根据 QAMS 的相对校正因子(f_s/i)计算公示 $f_s/i = f_s/f_i = A_s \times C_i / (A_i \times C_s)$ (式中 C_i 为待测组分浓度, A_i 为待测组分峰面积, C_s 为内标参物 s 浓度, A_s 为内标参物 s 峰面积),以黄芩苷为内标参物,计算各组分的相对校正因子,结果见表 3。

结果,由过原点的标准曲线线性斜率、浓度

法计算得出的校正因子, 差距不大。校正因子 $RD < 1.0\%$ 。因此采用过原点的标准曲线线性斜率计算出的相对校正因子进行后续实验考察。

表 3 浓度法相对校正因子结果

Tab. 3 Results of relative correction factor calculated by concentration method

进样量/ μL	去甲汉黄 芩素苷	千层纸素 A-7-O-β-D 葡 萄糖醛酸苷	汉黄 芩苷	黄芩素	汉黄 芩素	千层纸 素 A
3	0.912 9	1.145 4	0.892 3	0.652 1	0.558 8	0.692 3
6	0.921 5	1.199 2	0.908 7	0.651 7	0.556 9	0.698 1
10	0.916 6	1.152 8	0.911 5	0.661 8	0.585 8	0.692 2
平均	0.917 0	1.165 8	0.904 5	0.655 2	0.567 2	0.694 2

2.6.3 相对校正因子耐用性考察

2.6.3.1 不同仪器、不同色谱柱对 f 的影响 精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液, 进样测定 7 种成分的峰面积, 分别考察 2 种不同品牌高效液相色谱仪(Waters e2695 型高效液相色谱仪、Shimadzu LC-20AT 型高效液相色谱仪)和 3 种不同品牌色谱柱(资生堂 C₁₈ 柱、Thermo C₁₈ 柱、岛津 VP-ODS 柱)对相对校正因子的影响, 结果不同品牌高效液相色谱仪

和不同品牌色谱柱条件下, 去甲汉黄芩素苷、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 的相对校正因子无明显差异, RSD 均 $< 2.0\%$, 表明所测各成分的相对校正因子耐用性良好, 结果见表 4。

2.6.3.2 不同流速、不同柱温对 f 的影响 精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液, 进样测定 7 种成分的峰面积, 分别考察不同流速(0.9, 1.0, 1.1 mL·min⁻¹)、不同柱温(28, 30, 32 °C)对 f 的影响, 结果见表 5。

2.7 待测成分色谱峰的定位

对待测成分色谱峰黄芩苷、去甲汉黄芩素苷、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 的准确定位是使建立的 QAMS 可行性的前提, 本次实验研究以内参物黄芩苷色谱峰为基准峰, 采用相对保留时间法对待测成分色谱峰进行定位, 分别考察 2 种不同品牌高效液相色谱仪(Waters e2695 型高效液相色谱仪、Shimadzu LC-20AT 型高效液相色谱仪)和 3

表 4 不同仪器及色谱柱对校正因子的影响

Tab. 4 Effect of different instruments and columns on RCFs

仪器	色谱柱	校正因子					
		去甲汉黄芩素苷	千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	千层纸素 A
Waters e2695	资生堂 C ₁₈	0.916 8	1.153 5	0.918 1	0.653 4	0.560 6	0.697 3
	Thermo C ₁₈	0.916 5	1.178 9	0.927 1	0.680 6	0.583 3	0.716 9
	岛津 VP-ODS	0.908 0	1.161 2	0.901 9	0.647 7	0.556 6	0.707 4
Shimadzu LC-20AT	资生堂 C ₁₈	0.902 2	1.146 8	0.902 1	0.662 1	0.570 2	0.730 3
	Thermo C ₁₈	0.912 1	1.158 7	0.930 1	0.653 8	0.571 1	0.722 4
	岛津 VP-ODS	0.927 8	1.166 6	0.920 4	0.660 4	0.580 3	0.713 1
	平均值	0.913 9	1.161 0	0.916 6	0.659 7	0.570 4	0.714 6
	RSD/%	0.9	0.9	1.3	1.7	1.8	1.6

表 5 不同流速、柱温对校正因子的影响

Tab. 5 Effect of different flow rates, column temperature on RCFs

影响指标		校正因子					
		去甲汉黄芩素苷	千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	千层纸素 A
流速	0.9 mL·min ⁻¹	0.912 2	1.160 2	0.909 8	0.667 5	0.571 2	0.707 3
	1.0 mL·min ⁻¹	0.916 8	1.153 5	0.918 1	0.653 4	0.560 6	0.697 3
	1.1 mL·min ⁻¹	0.908 0	1.156 7	0.907 8	0.657 7	0.564 6	0.706 3
	平均值	0.912 3	1.156 8	0.911 9	0.659 5	0.565 5	0.703 6
	RSD/%	0.5	0.3	0.6	1.0	0.9	0.8
柱温	28 °C	0.913 4	1.160 2	0.911 2	0.653 3	0.563 4	0.707 3
	30 °C	0.916 8	1.153 5	0.918 1	0.653 4	0.560 6	0.697 3
	32 °C	0.907 9	1.158 8	0.908 7	0.662 7	0.567 6	0.701 2
	平均值	0.912 7	1.157 5	0.912 7	0.656 5	0.563 9	0.701 9
	RSD/%	0.5	0.3	0.6	0.8	0.7	0.8

种不同品牌色谱柱(资生堂 C₁₈ 柱、Thermo C₁₈ 柱、岛津 VP-ODS 柱)条件下相对保留时间值, 结果见表 6。

2.8 QAMS 与外标法结果比较

将收集的四季三黄片样品共 29 批, 每批次平

行 3 份, 分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 分别采用外标法和 QAMS 计算 7 种成分的含量, 结果 2 种方法所测定结果无显著性差异, RSD 均 < 2.0%, 结果见表 7。

表 6 不同品牌液相及不同色谱柱测得的相对保留时间

Tab. 6 Relative time measured by different brands of liquid and different columns

仪器	色谱柱	相对保留时间					
		去甲汉黄芩素苷	千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	千层纸素 A
Waters e2695	资生堂 C ₁₈	1.280 8	1.413 8	1.586 4	1.866 4	2.396 1	2.493 0
	Thermo C ₁₈	1.278 4	1.412 0	1.567 9	1.836 3	2.335 2	2.458 4
	岛津 VP-ODS	1.280 4	1.411 8	1.570 5	1.845 4	2.352 3	2.475 4
Shimadzu LC-20AT	资生堂 C ₁₈	1.278 8	1.414 5	1.580 9	1.873 2	2.350 8	2.470 4
	Thermo C ₁₈	1.282 3	1.405 8	1.574 1	1.853 2	2.373 4	2.462 3
	岛津 VP-ODS	1.281 9	1.410 4	1.572 4	1.839 4	2.353 6	2.483 6
	平均值	1.280 4	1.411 4	1.575 4	1.852 3	2.360 2	2.473 9
	RSD%	0.2	0.3	0.5	0.8	0.9	0.6

表 7 样品 QAMS 与外标法测得各成分含量的比较结果

Tab. 7 Results of content determination of 6 components in samples by QAMS and ES method

mg·g⁻¹

厂家/批号	去甲汉黄芩素苷		千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷		汉黄芩苷		黄芩素		汉黄芩素		千层纸素 A		黄芩苷
	QAMS	ES	QAMS	ES	QAMS	ES	QAMS	ES	QAMS	ES	QAMS	ES	ES
A01	0.031	0.032	0.075	0.076	0.088	0.090	0.736	0.734	0.333	0.336	0.032	0.034	0.454
A02	0.018	0.018	0.078	0.077	0.072	0.069	1.049	1.054	0.453	0.454	0.051	0.050	0.423
A03	0.072	0.075	0.221	0.227	0.608	0.598	0.271	0.274	0.115	0.115	0.011	0.011	2.644
A04	0.080	0.081	0.282	0.282	0.686	0.686	0.323	0.320	0.174	0.171	0.013	0.013	3.282
A05	0.064	0.064	0.166	0.165	0.434	0.435	0.415	0.414	0.180	0.178	0.013	0.013	2.066
A06	0.056	0.055	0.130	0.131	0.398	0.393	0.471	0.469	0.197	0.194	0.014	0.015	1.796
B1	0.090	0.092	0.363	0.360	0.752	0.749	0.416	0.412	0.181	0.181	0.014	0.014	3.946
B2	0.082	0.082	0.278	0.276	0.670	0.667	0.444	0.447	0.205	0.203	0.016	0.016	3.217
B3	0.088	0.087	0.314	0.314	0.715	0.715	0.491	0.491	0.220	0.217	0.017	0.018	3.497
B4	0.120	0.118	0.439	0.440	0.988	0.985	0.505	0.503	0.217	0.213	0.019	0.019	4.731
B5	0.090	0.091	0.329	0.326	0.725	0.722	0.285	0.285	0.165	0.164	0.011	0.011	3.622
B6	0.103	0.103	0.314	0.314	0.806	0.805	0.585	0.587	0.189	0.189	0.018	0.018	4.083
B7	0.122	0.120	0.433	0.436	0.959	0.959	0.445	0.444	0.251	0.251	0.017	0.018	4.844
B8	0.088	0.087	0.297	0.300	0.661	0.656	0.553	0.553	0.183	0.182	0.018	0.017	3.274
B9	0.103	0.103	0.372	0.376	0.811	0.810	0.590	0.591	0.187	0.190	0.018	0.018	4.108
B10	0.088	0.088	0.270	0.273	0.609	0.609	0.298	0.300	0.155	0.155	0.010	0.010	3.383
B11	0.124	0.125	0.409	0.409	0.890	0.888	0.340	0.341	0.176	0.175	0.011	0.011	4.535
B12	0.088	0.087	0.302	0.300	0.657	0.656	0.553	0.553	0.182	0.182	0.017	0.017	3.274
B13	0.088	0.088	0.274	0.273	0.612	0.609	0.301	0.300	0.157	0.155	0.011	0.010	3.383
B14	0.089	0.088	0.273	0.273	0.613	0.609	0.300	0.300	0.154	0.155	0.010	0.010	3.383
B15	0.121	0.120	0.437	0.436	0.959	0.959	0.448	0.444	0.249	0.251	0.018	0.018	4.844
C1	0.062	0.064	0.148	0.147	0.520	0.524	0.542	0.539	0.195	0.197	0.016	0.016	2.321
C2	0.064	0.064	0.147	0.147	0.528	0.524	0.541	0.539	0.198	0.197	0.016	0.016	2.321
C3	0.063	0.064	0.216	0.215	0.526	0.526	0.548	0.541	0.197	0.197	0.015	0.015	2.330
C4	0.064	0.064	0.213	0.215	0.530	0.526	0.537	0.541	0.197	0.197	0.015	0.015	2.330
D1	0.222	0.220	0.616	0.615	1.724	1.725	0.495	0.492	0.181	0.185	0.019	0.019	8.875
D2	0.252	0.255	0.788	0.783	1.909	1.909	0.672	0.689	0.268	0.266	0.025	0.025	9.765
D3	0.225	0.224	0.759	0.766	1.650	1.647	0.601	0.598	0.220	0.219	0.022	0.022	8.601
D4	0.133	0.131	0.481	0.481	1.039	1.037	0.825	0.824	0.241	0.241	0.027	0.029	4.594

3 7种成分含量结果分析及质量评价

3.1 结果分析

7种化学成分的平均含量分布情况雷达图结果显示,各化学成分含量比值的落点分布广,表明同一化学成分在不同企业样品中的差异较大。厂家D的整体轮廓较大,说明该企业样品中7种化学成分含量均较高,提示投料用黄芩质量较好;而厂家A和厂家C的整体轮廓明显小于其他企业,说明上述2个企业样品中7种化学成分含量均偏低,推断投料用黄芩质量较差,见图2。

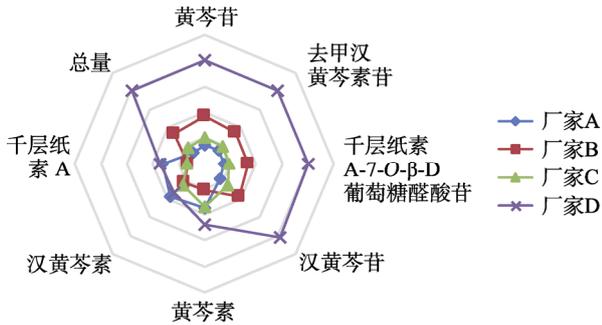


图2 四季三黄片中7种成分平均含量的分布雷达图

Fig. 2 Radar chart of average content of 7 chemical components in samples

7种化学成分含量分布的直方图结果显示,B、C、D3个企业各样品7种总量各成分比例较为一致,表明各企业投料用黄芩质量稳定,而厂家A01,02批次样品含量较低,且7种成分比例与其他批次亦不同,由图可知黄芩素、汉黄芩素含量比例明显升高,黄芩苷、汉黄芩苷含量比例降低,结合文献报道^[8]及其分子式结构,推断该批次样品可能存在黄芩苷、汉黄芩苷脱糖转化为其苷元黄芩素、汉黄芩素情况,见图3。

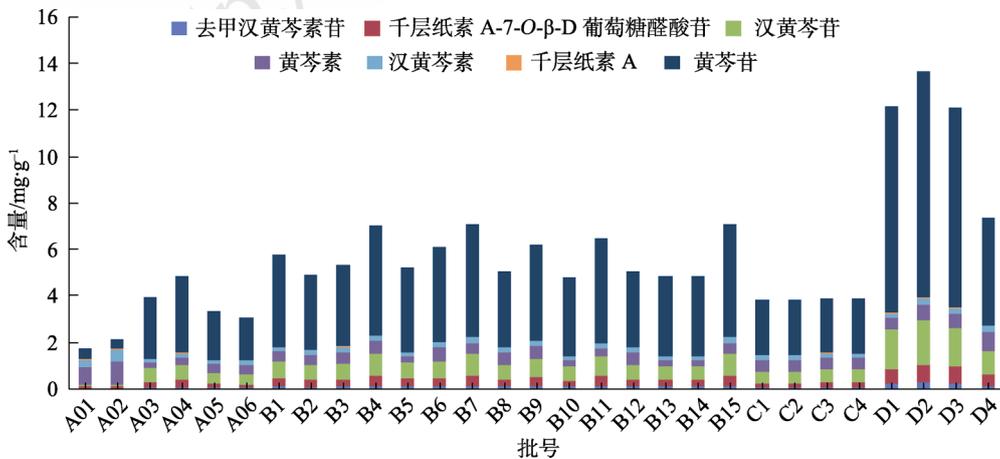


图3 四季三黄片中7种成分含量的分布直方图

Fig. 3 Histogram of 7 chemical components in Sijisanhuang tablets

3.2 聚类分析及主成分分析

在SPSS 21.0软件中将“2.8”项样品含量测定结果进行标准化运算,以标准化得分为变量进行系统聚类分析,分析方法选用ward联接,度量标准选用“平方Euclidean距离”,得到树状图见图4。29批样品大体上被聚为3类,其中A01、A02批次样品归为1类,D1、D2、D3批样品归为2类,其余样品均归于第3类。

以“2.8”项中样品含量测定结果的标准化得分作为变量,使用SPSS软件进行主成分分析,结果见表8,主成分分析得分图见图5,分析结果显示可以用2个主成分来体现7个成分含量的信息,

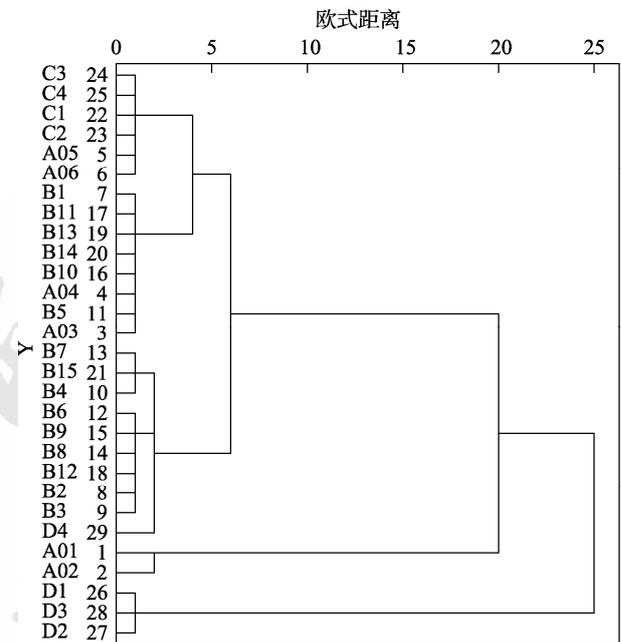


图4 聚类分析树状图

Fig. 4 Cluster analysis diagram

累积方差贡献率达 96.653%。主成分 1 主要反映黄芩苷、去甲汉黄芩素苷、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷等成分信息, 权重均>0.6; 主成分 2 主要反映黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 等成分信息, 权重均>0.6。

表 8 主成分分析结果

Tab. 8 Results of principal component analysis

主成分	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差的百分比/%	累积的百分比/%	合计	方差的百分比/%	累积的百分比/%
1	3.990	57.004	57.004	3.990	57.004	57.004
2	2.775	39.649	96.653	2.775	39.649	96.653
3	0.160	2.290	98.942			
4	0.034	0.488	99.430			
5	0.029	0.411	99.840			
6	0.008	0.112	99.952			
7	0.003	0.048	100.000			

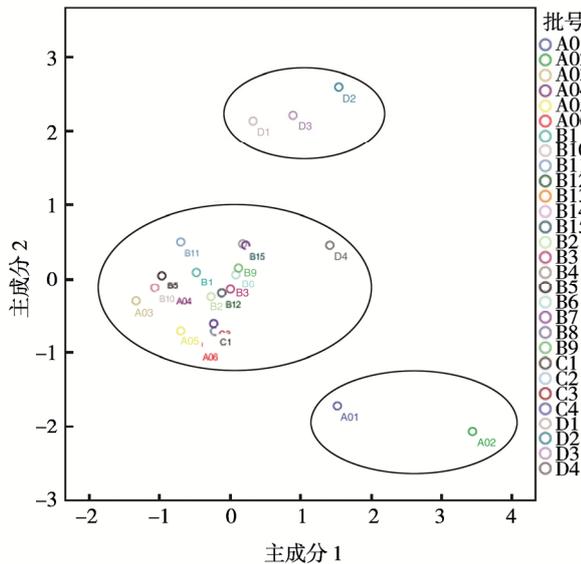


图 5 主成分分析得分图

Fig. 5 Score chart of principal component analysis

用聚类分析和主成分分析均将样品分为 3 类。对测定结果进行分析, 结果 A01、A02 批次样品单独聚为一类, 其中个别成分含量有所差异, 可能存在投料用黄芩饮片质量的差异, 及生产工艺技术的问题。

4 讨论

4.1 提取方式的确定

本试验对提取方法进行了考察, 首先提取溶剂分别采用甲醇、50%甲醇、70%甲醇进行对比, 结果以 70%甲醇为提取溶剂时, 7 种待测成分含量较高, 提取效率最佳, 且杂质成分干扰较少; 其

次在对超声、回流不同的提取方式进行考察, 结果 2 种方法的提取效果差异不大; 最后通过对提取时间的优化, 采用 70%甲醇超声提取 30 min 为最终提取方法。

4.2 色谱条件流动相的选择

本试验参考相关文献[9-11], 分别考察了乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸、乙腈-0.1%三氟乙酸作为流动相, 以待测成分黄芩苷、去甲汉黄芩素苷、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 分离度为主要指标, 结果采用乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸为流动相时, 盐酸小檗碱峰与汉黄芩苷峰分离效果较差, 通过调整比例效果仍不理想, 且不同色谱柱之间差异显著。最终结合各成分及盐酸小檗碱性质选择乙腈-0.1%三氟乙酸作为流动相, 各待测成分的分离良好。通过对流动相比例进行不断摸索, 最终确定采用乙腈-0.1%三氟乙酸为流动相按照正文中洗脱程序对四季三黄片中待测成分黄芩苷、去甲汉黄芩素苷、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 含量进行同时测定。

4.3 检测波长的确定

采用二极管阵列检测器在 190~600 nm 下对待测成分对照品溶液进行全波长扫描, 结果表明, 待测成分黄芩苷、去甲汉黄芩素苷、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 在 276 nm 附近均有较大吸收, 故采用 276 nm 作为测定波长, 各待测成分与杂质峰分离良好, 阴性无干扰。

4.4 待测成分及参照物的选择

四季三黄片由大黄、黄芩、黄柏、栀子 4 味饮片加工而成, 黄芩作为其中一味君药, 具有清热燥湿、泻火解毒之功效。本实验选取方中君药黄芩为研究对象, 将黄芩中代表性成分黄芩苷、去甲汉黄芩素苷、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 作为定量控制指标成分, 旨在全面评价四季三黄片中投料用黄芩饮片的质量。中国药典 2020 年版选取黄芩苷为黄芩的定量指标成分, 黄芩药材中黄芩苷含量较高、对照品化学性质稳定、价廉易得, 且其具有药理活性的, 本实验最终选择黄芩苷作为 QAMS 的参照物。

5 结论

本实验采用 QAMS 对四季三黄片中黄芩苷、去甲汉黄芩素苷、千层纸素 A-7-O-β-D 葡萄糖醛

酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 等 7 种成分进行了含量测定, 方法简便, 快速环保, 专属性、重复性、准确性、稳定性均较好, 更加全面地反映了样品中黄芩的质量状况, 可准确地评价产品内在质量, 实现对四季三黄片的质量评价。

REFERENCES

- [1] WANG J P, CHAI J, LYU L F. Simultaneous determination of Aloe-emodin, baicalin, obacunone and crocin I in sijisanhuang tablets by HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(2): 199-203.
- [2] ZHANG H H, WANG S, ZHANG D S, et al. Determination of five components in Siji Sanhuang Tablets by RP-HPLC[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2012, 34(10): 1915-1918.
- [3] CHAI C C, CAO Y, MAO M, et al. Comparison of chemical compositions before and after wine-frying of *Scutellaria baicalensis* based on HPLC characteristic chromatogram, UPLC-Q-TOF/MS qualitative and multi-component quantitative analysis[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2020, 51(9): 2436-2447.
- [4] FENG F, XU J G, YAN G J, et al. Quality evaluation of Ginseng Radix et Rhizoma based on UPLC characteristic chromatogram and quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS)[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2022, 47(13): 3530-3538.
- [5] ZHANG J, TIAN L L, WAN X Q. Study on quality control of eight components in Baohou tablets based on quantitative analysis of multi-components by single marker[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2021, 38(1): 55-62.
- [6] LIAO X F, BI X L, XU A L, et al. Simultaneous determination of nine constituents in Yupingfeng Granules by UPLC[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2019, 41(8): 1778-1781.
- [7] ZHANG W J, WANG X Y, LI X Y, et al. Simultaneous determination of seven components in Fuke Tiaoqing tablets by quantitative analysis of multi-components by single marker[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2020, 40(2): 329-336.
- [8] CHAI C C, MAO M, YUAN J F, et al. Correlation between color of *Scutellariae Radix* pieces and content of five flavonoids after softening and cutting by different methods[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44(20): 4467-4475.
- [9] 连中学, 刘玉, 柴俊雯, 等. UPLC 法同时测定黄芩中 9 种黄酮类成分的含量[J]. 中国中医药科技, 2017, 24(5): 604-606.
- [10] ZHANG J M, ZHANG Z W, LI Y M. Determination of 4 chemical constituents in wine-processed *Radix Scutellariae* from 13 different habitats by HPLC[J]. China Pharm(中国药师), 2018, 21(2): 253-256.
- [11] LI E Z, LIU Y F, LIU Y J, et al. Simultaneous determination of six components in *Scutellaria baicalensis* Georgi from different districts by HPLC[J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2018, 38(9): 946-948.

收稿日期: 2021-12-28

(本文责编: 沈倩)