

指纹图谱结合一测多评模式在葛根芩连片质量评价中的应用

纪国力, 刘玉玲, 巴然然, 蔡元元, 孙涛* (泰安市食品药品检验检测研究院, 山东 泰安 271000)

摘要: 目的 建立葛根芩连片指纹图谱, 并采用一测多评法(quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS)测定其中 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、黄芩苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、汉黄芩素 11 个化学成分含量。方法 HPLC 测定 10 批葛根芩连片的指纹图谱, 建立指纹图谱共有模式, 以黄芩苷为参照, 计算该成分与 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、汉黄芩素的相对校正因子, 并计算其含量。同时对 QAMS 的计算值与外标法实测值进行比较, 以确证 QAMS 的可行性和科学性。指纹图谱及含量测定色谱条件: 采用 Waters Xbridge-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 30 ℃; 检测波长 260 nm。结果 10 批葛根芩连片标定了共有峰 20 个, 指认了其中 11 个化学成分, 10 批葛根芩连片相似度均>0.97, 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、黄芩苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、汉黄芩素的线性范围分别为 0.056 6~2.830 2, 0.241 2~12.058 6, 0.128 0~6.401 0, 0.059 7~2.983 5, 0.242 7~12.134 9, 0.045 7~2.285 7, 0.192 8~9.641 0, 0.043 3~2.167 0, 0.018 0~0.900 2, 0.021 0~1.048 4, 0.011 5~0.575 4 μg, r^2 为 0.999 6~1.000, 平均回收率分别 100.23%, 102.01%, 101.66%, 102.73%, 100.17%, 98.45%, 98.41%, 100.95%, 101.85%, 97.97%和 100.09%, RSD 分别为 1.24%~2.57%($n=6$); 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、汉黄芩素的相对校正因子分别为 0.860 4, 0.605 3, 0.850 9, 0.582 8, 0.557 1, 0.498 6, 0.767 2, 0.652 1, 2.608 1, 0.545 2, 待测成分含量 QAMS 与外标法实测值 RAD 为 0.03%~2.12%。结论 QAMS 结合指纹图谱可为葛根芩连片的定量测定和质量控制提供参考。

关键词: 指纹图谱; 一测多评; 葛根芩连片; 质量控制; 相对校正因子

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2023)14-1983-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221384

引用本文: 纪国力, 刘玉玲, 巴然然, 等. 指纹图谱结合一测多评模式在葛根芩连片质量评价中的应用[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(14): 1983-1990.

Application of Fingerprint Combined with QAMS in Quality Evaluation of Gegenqinlian Tablets

Ji Guoli, Liu Yuling, Ba Ranran, Cai Yuanyuan, Sun Tao* (*Tai'an Institute for Food and Drug Control, Tai'an 271000, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the fingerprint of Gegenqinlian tablets and determine the content of eleven components(3'-hydroxy puerarin, puerarin, 3'-methoxy puerarin, daidzin, baicalin, palmatine hydrochloride, berberine hydrochloride, scutellarin, baicalein, ammonium glycyrrhizinate and wogonin) by quantitative analysis of multi-components by single-marker(QAMS). **METHODS** Ten batches of Gegenqinlian tablets were determined by HPLC and a common fingerprint was established. Baicalin was selected as internal reference. The relative correction factors of the component with 3'-hydroxy puerarin, puerarin, 3'-methoxy puerarin, daidzin, palmatine hydrochloride, berberine hydrochloride, scutellarin, baicalein, ammonium glycyrrhizinate and wogonin were calculated and their contents were calculated. The feasibility and scientificity of QAMS was evaluated by comparison on the results between the measured value and calculation value by external standard method and QAMS. The chromatographic separation was performed on an analytical column of Waters Xbridge-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with gradient elution, the mobile phase was acetonitrile 0.1% phosphoric acid aqueous solution, at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 30 ℃ and the detection wavelength was 260 nm. **RESULTS** There were 20 peaks in 10 batches of Gegenqinlian tablets and 11 chemical constituents were identified. The similarity of 10 batches of Gegenqinlian tablets was >0.97. The linear range of 3'-hydroxy puerarin, puerarin, 3'-methoxy puerarin, daidzin, baicalin, palmatine hydrochloride, berberine hydrochloride, scutellarin, baicalein, ammonium glycyrrhizinate and wogonin were 0.056 6~2.830 2, 0.241 2~12.058 6, 0.128 0~6.401 0, 0.059 7~2.983 5, 0.242 7~12.134 9, 0.045 7~2.285 7, 0.192 8~9.641 0, 0.043 3~2.167 0, 0.018 0~0.900 2, 0.021 0~1.048 4, 0.011 5~0.575 4 μg ($r^2=0.9996\sim1.000$) respectively. The average recovery were 100.23%, 102.01%, 101.66%, 102.73%, 100.17%, 98.45%, 98.41%, 100.95%, 101.85%, 97.97%, 100.09%(RSD=1.24%~2.57%, $n=6$)

作者简介: 纪国力, 男, 副主任药师

E-mail: jifeng213@163.com

*通信作者: 孙涛, 男, 主管药师

E-mail: 243547629@qq.com

respectively. The relative correction factors of 3'-hydroxy puerarin, puerarin, 3'-methoxy puerarin, daidzin, palmitine hydrochloride, berberine hydrochloride, scutellarin, baicalein, ammonium glycyrrhizinate and wogonin were 0.860 4, 0.605 3, 0.850 9, 0.582 8, 0.557 1, 0.498 6, 0.767 2, 0.652 1, 2.608 1, 0.545 2 respectively. RAD between QAMS method and external standard method were 0.03%–2.12%. **CONCLUSION** The combination of QAMS and fingerprint can provide reference for the quantitative determination and quality control of Gegenqinlian tablets.

KEYWORDS: fingerprint; quantitative analysis of multi-components by single-marker(QAMS); Gegenqinlian tablets; quality control; relative correction factor

葛根芩连片来源于东汉张仲景《伤寒论》中葛根芩连汤,是表里双解的代表方,全方由葛根、黄芩、黄连、炙甘草 4 味中药组成,具有解肌清热,止泻止痢之功效,主治泄泻痢疾,身热烦渴,下痢臭秽、肠炎等^[1]。中国药典 2020 年版^[2]对葛根芩连制剂质量标准基于葛根、黄连 2 味药材建立了指纹图谱,采用 HPLC 测定葛根素、小檗碱和黄芩苷 3 种成分的含量,但由于使用 2 种流动相系统,操作较为繁琐,且难以实现对其质量的全面评价,指纹图谱结合一测多评分析方法^[3-5]可以很好地实现中药复方制剂的定性加定量的分析,全面评价药物制剂的质量,并且可以大量节约对照品的使用,具有较强的可操作性。目前,对葛根芩连汤质量研究较多见^[6-8],均为 HPLC 同时测定多种成分,但对其制剂葛根芩连片研究较少,有胡晓茹等^[9-10]对葛根芩连片特征图谱及含量测定方法研究,但均未将指纹图谱和一测多评的方法结合起来进行研究。

本实验采用单波长法建立了 HPLC 指纹图谱,涵盖了全部 4 味药材指标性成分,并对共有峰进行了指认,同时采用一测多评法对 11 个成分进行了含量测定,方法简单,对仪器要求不高,可操作性强,为葛根芩连片全面的质量评价提供了参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-2030C3D 高效液相色谱仪(日本岛津公司); Waters ARC 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); MSA225S-1CE-DI 型十万分之一电子分析天平(德国赛多利斯公司); Milli-QAcademic 超纯水系统(美国默克密理博); KQ-600DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

对照品葛根素(批号: 110752-201816; 纯度: 95.4%)、大豆苷(批号: 111738-201904; 纯度: 93.4%)、黄芩苷(批号: 110715-201821; 纯度: 95.4%)、盐酸巴马汀(批号: 110732-201611; 纯度:

86.8%)、盐酸小檗碱(批号: 110713-201814; 纯度: 86.7%)、汉黄芩苷(批号: 112002-201702; 纯度: 98.5%)、黄芩素(批号: 111595-201808; 纯度: 97.9%)、甘草酸铵(批号: 110731-202021; 纯度: 96.2%)、汉黄芩素(批号: 111514-201706; 纯度: 100.0%)均购自中国食品药品检定研究院; 3'-羟基葛根素(批号: 117076-54-5)、3'-甲氧基葛根素(批号: 117047-07-1)均购自成都植标化纯生物技术有限公司,质量分数均为 98%。乙腈为色谱纯[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; 其余试剂均为分析纯; 水为超纯水。

葛根芩连片分别来自广西泰诺制药有限公司产品(批号: 210407, 200703)、昆明中药厂有限公司产品(批号: 490397, 490287)、广东万年青制药股份有限公司(批号: 200705, 200804, 200503)、太极集团四川绵阳制药有限公司(批号: 2106003, 2105002, 2010001), 分别标号为 S1~S10。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters Xbridge-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~10 min, 11%A; 10~47 min, 11%→40%A; 47~60 min, 40%→60%A); 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL·min⁻¹; 进样量 10 μL; 检测波长: 260 nm。

2.2 溶液制备

2.2.1 混合对照品溶液 取 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、黄芩苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、汉黄芩素对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成浓度分别为 1 mL 含 141.50, 602.95, 320.05, 149.20, 606.74, 114.30, 482.05, 108.35, 45.01, 52.40, 28.75 μg 的混合对照品储备液, 精密量取对照品储备液 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。

2.2.2 供试品溶液 取本品 10 片, 除去包衣, 精密称定, 研细, 取约 0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇-水(70:30)的混合溶液 20 mL,

称定质量, 超声处理(功率 300 W, 频率 40 kHz) 20 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇-水(70:30)的混合溶液补足减失的质量, 混匀后滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按照处方比例分别制备缺甘草、缺葛根、缺黄连、缺黄芩的阴性样品, 按照“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。色谱图见图 1。

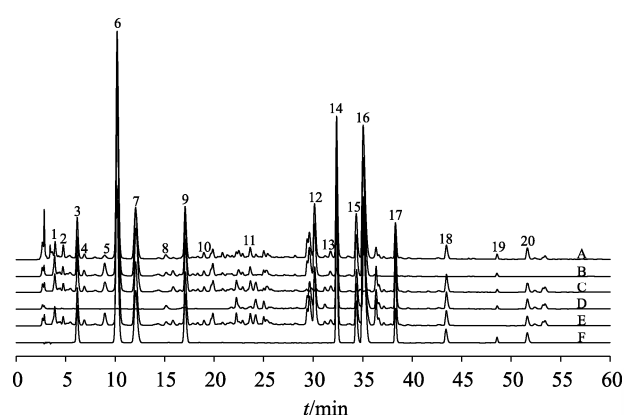


图 1 供试品、阴性对照、混合对照品 HPLC 色谱图
A-供试品; B-缺黄芩阴性对照; C-缺黄连阴性对照; D-缺葛根阴性对照; E-缺甘草阴性对照; F-混合对照品; 3-3'-羟基葛根素; 6-葛根素; 7-3'-甲氧基葛根素; 9-大豆苷; 14-黄芩苷; 15-盐酸巴马汀; 16-盐酸小檗碱; 17-汉黄芩苷; 18-黄芩素; 19-甘草酸铵; 20-汉黄芩素。

Fig. 1 HPLC chromatograms of sample, negative reference, mixed reference

A-sample; B-negative reference without *Scutellaria baicalensis* Georgi; C-negative sample without *Coptis chinensis* Franch; D-negative sample without *Pueraria lobata*; E-negative sample without *Glycyrrhiza uralensis* Fisch; F-mixed reference substances; 3-3'-hydroxy puerarin; 6-puerarin; 7-3'-methoxy puerarin; 9-daidzin; 14-baicalin; 15-palmatine hydrochloride; 16-berberine hydrochloride; 17-scutellarin; 18-baicalin; 19-ammonium glycyrrhizinate; 20-wogonin.

2.3 HPLC 指纹图谱的建立

2.3.1 仪器精密度试验 取葛根芩连片样品(S8, 批号: 2106003), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图。以 14 号峰黄芩苷峰为参比峰, 计算 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、汉黄芩素的相对保留时间 RSD 均 <0.54%, 相对峰面积的 RSD 均 <0.39%, 表明该方法仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取葛根芩连片样品(S8, 批号: 2106003), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于配制后 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 按“2.1”项下色谱条件进样测定。以 14 号峰黄芩苷峰为参比峰, 计算 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根

素、大豆苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、汉黄芩素的相对保留时间 RSD 均 <0.36%, 相对峰面积的 RSD 均 <0.57%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批号样品 6 份(S8, 批号: 2106003), 按“2.2.2”项下方法制备, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图。以 14 号峰黄芩苷峰为参比峰, 计算 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、汉黄芩素的相对保留时间 RSD($n=6$)均 <0.48%。指纹图谱采用国家药典委员会“中药指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”软件处理, 6 份样品指纹图谱相似度均 >0.97, 表明方法重复性良好。

2.3.4 指纹图谱的建立及相似度评价 采用“2.2.2”项下方法制备 10 批葛根芩连片的供试品溶液(S1~S10), 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。将色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”, 得到 10 批样品的 HPLC 指纹图谱, 以 S1 为参照图谱, 多点校正法匹配色谱峰, 时间宽度设定为 0.2 min, 平均数法建立对照指纹图谱(R), 标定了其中稳定性及峰型较好的 20 个共有峰, 通过对照品、阴性对照溶液指认出 11 个色谱峰, 分别为 3 号峰(3'-羟基葛根素)、6 号峰(葛根素)、7 号峰(3'-甲氧基葛根素)、9 号峰(大豆苷)、14 号峰(黄芩苷)、15 号峰(盐酸巴马汀)、16 号峰(盐酸小檗碱)、17 号峰(汉黄芩苷)、18 号峰(黄芩素)、19 号峰(甘草酸铵)、20 号峰(汉黄芩素)。其中黄芩苷的峰面积较大, 保留时间适中且分离度较好, 因此确定黄芩苷峰(14 号峰)为参照峰 S, 见图 2。10 批葛根芩连片图谱与对照图谱的相似度分别为 0.987, 0.982, 0.991, 0.994, 0.971, 0.978, 0.988, 0.976, 0.982, 0.981, 相似度均 >0.97, 说明不同厂家样品指纹图谱相似度较高。

2.4 一测多评法测定葛根芩连片中 11 个成分含量

2.4.1 线性关系的考察 分别精密吸取混合对照品溶液 2, 5, 10, 20, 50, 100 μ L, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 以各成分峰面积(Y)对进样量(X, μ g)进行回归处理, 得各成分回归方程及线性范围见表 1。

2.4.2 重复性试验 取同一批号样品 6 份(S8, 批号: 2106003), 按“2.2.2”项下方法制备, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图。测得 3'-羟

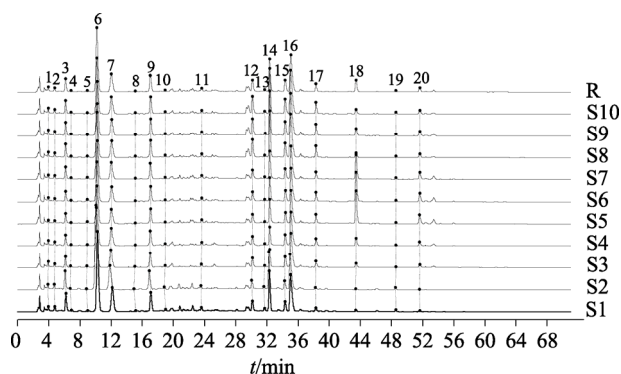


图2 各成分 HPLC 色谱图

3-3'-羟基葛根素; 6-葛根素; 7-3'-甲氧基葛根素; 9-大豆苷; 14-黄芩苷; 15-盐酸巴马汀; 16-盐酸小檗碱; 17-汉黄芩苷; 18-黄芩素; 19-甘草酸铵; 20-汉黄芩素。

Fig. 2 HPLC chromatograms of various constituents

3-3'-hydroxypuerarin; 6-puerarin; 7-3'-methoxypuerarin; 9-daidzin; 14-baicalin; 15-palmatine hydrochloride; 16-berberine hydrochloride; 17-scutellarin; 18-baicalein; 19-ammonium glycyrrhizinate; 20-wogonin.

基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、黄芩苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、汉黄芩素含量 RSD 分别为 1.29%, 0.71%, 1.05%, 0.65%, 1.01%, 0.76%, 0.52%, 1.48%, 1.36%, 1.55%, 1.68%, 表明该方法重复性较好。

表1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r^2	线性范围/ μg	检测限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
3'-羟基葛根素	$Y=2.594\ 33\times 10^6X+21\ 698$	0.999 8	0.056 6~2.830 2	0.016	0.056
葛根素	$Y=3.772\ 37\times 10^6X+102\ 327$	0.999 9	0.241 2~12.058 6	0.016	0.056
3'-甲氧基葛根素	$Y=2.614\ 85\times 10^6X+56\ 507$	0.999 6	0.128 0~6.401 0	0.026	0.087
大豆苷	$Y=3.841\ 37\times 10^6X+29\ 472$	0.999 8	0.059 7~2.983 5	0.013	0.044
黄芩苷	$Y=2.267\ 01\times 10^6X+1\ 701$	0.999 9	0.242 7~12.134 9	0.017	0.057
盐酸巴马汀	$Y=4.044\ 63\times 10^6X+13\ 088$	0.999 9	0.045 7~2.285 7	0.012	0.038
盐酸小檗碱	$Y=4.547\ 84\times 10^6X+17\ 241$	0.999 8	0.192 8~9.641 0	0.015	0.050
汉黄芩苷	$Y=2.956\ 61\times 10^6X-1\ 739$	1.000 0	0.043 3~2.167 0	0.013	0.044
黄芩素	$Y=3.477\ 33\times 10^6X+2\ 456$	1.000 0	0.018 0~0.900 2	0.011	0.034
甘草酸铵	$Y=8.703\ 76\times 10^5X+221$	0.999 9	0.021 0~1.048 4	0.041	0.132
汉黄芩素	$Y=4.149\ 60\times 10^6X+1\ 144$	1.000 0	0.011 5~0.575 4	0.012	0.037

表2 葛根芩连片 11 个成分的加样回收率结果($n=6$)

Tab. 2 Result of sample recovery rate for 11 components of Gegenqinlian tablets($n=6$)

化合物	称样量/g	样品含量/mg	对照品加入量/mg	测得总量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
3'-羟基葛根素	0.050 23	0.275 1	0.283 0	0.561 8	101.32	100.23	1.24
	0.049 78	0.272 6	0.283 0	0.554 5	99.61		
	0.049 66	0.271 9	0.283 0	0.560 2	101.86		
	0.050 22	0.275 0	0.283 0	0.558 7	100.25		
	0.050 29	0.275 4	0.283 0	0.558 2	99.93		
	0.050 12	0.274 5	0.283 0	0.552 9	98.39		
葛根素	0.050 23	1.148 1	1.205 9	2.392 7	103.21	102.01	2.10
	0.049 78	1.137 8	1.205 9	2.406 5	105.20		
	0.049 66	1.135 1	1.205 9	2.376 5	102.94		
	0.050 22	1.147 9	1.205 9	2.355 1	100.11		
	0.050 29	1.149 5	1.205 9	2.367 2	100.98		
	0.050 12	1.145 6	1.205 9	2.346 8	99.61		

2.4.3 稳定性试验 取葛根芩连片样品(S8,批号: 2106003), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于配制后 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。测得 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、黄芩苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、汉黄芩素峰面积的 RSD 分别为 0.46%, 0.56%, 0.37%, 0.62%, 0.51%, 0.77%, 0.50%, 0.66%, 0.72%, 0.55%, 0.68%, 表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 加样回收率试验 取已知含量葛根芩连片(S8)细粉 6 份, 每份约 0.05 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入混合对照品储备液 2 mL, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 计算回收率, 结果见表 2。

2.4.5 相对校正因子的计算 一测多评法是利用在一定的线性范围成分的量(质量或浓度)与检测器响应成正比原理, 用公式 $f(s/i)=f_s/f_i=(W_i\times A_s)/(W_s\times A_i)$, 算得相对校正因子, 式中 A_s 为内参物 s 的峰面积, W_s 为内参物对照 s 的质量,

续表 2

化合物	称样量/g	样品含量/mg	对照品加入量/mg	测得总量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
3'-甲氧基葛根素	0.050 23	0.612 7	0.640 1	1.265 8	102.03	101.66	2.03
	0.049 78	0.607 2	0.640 1	1.257 5	101.59		
	0.049 66	0.605 8	0.640 1	1.246 5	100.10		
	0.050 22	0.612 6	0.640 1	1.275 3	103.53		
	0.050 29	0.613 5	0.640 1	1.279 9	104.11		
大豆苷	0.050 12	0.611 4	0.640 1	1.242 6	98.61	102.73	2.57
	0.050 23	0.297 2	0.298 4	0.601 8	102.08		
	0.049 78	0.294 5	0.298 4	0.613 6	106.93		
	0.049 66	0.293 8	0.298 4	0.600 1	102.64		
	0.050 22	0.297 1	0.298 4	0.593 1	99.18		
黄芩苷	0.050 29	0.297 6	0.298 4	0.599 9	101.32	100.17	1.28
	0.050 12	0.296 5	0.298 4	0.607 5	104.21		
	0.050 23	1.138 9	1.213 5	2.354 6	100.18		
	0.049 78	1.128 7	1.213 5	2.367 8	102.11		
	0.049 66	1.126 0	1.213 5	2.334 6	99.60		
盐酸巴马汀	0.050 22	1.138 7	1.213 5	2.330 2	98.19	98.45	1.92
	0.050 29	1.140 3	1.213 5	2.358 2	100.36		
	0.050 12	1.136 4	1.213 5	2.357 4	100.61		
	0.050 23	0.230 9	0.228 6	0.458 7	99.63		
	0.049 78	0.228 9	0.228 6	0.450 1	96.77		
盐酸小檗碱	0.049 66	0.228 3	0.228 6	0.460 1	101.39	98.41	1.29
	0.050 22	0.230 9	0.228 6	0.453 6	97.42		
	0.050 29	0.231 2	0.228 6	0.451 9	96.54		
	0.050 12	0.230 4	0.228 6	0.456 6	98.93		
	0.050 23	0.894 1	0.964 1	1.853 4	99.50		
汉黄芩苷	0.049 78	0.886 1	0.964 1	1.843 9	99.35	100.95	1.35
	0.049 66	0.884 0	0.964 1	1.838 2	98.98		
	0.050 22	0.893 9	0.964 1	1.823 9	96.46		
	0.050 29	0.895 2	0.964 1	1.832 3	97.20		
	0.050 12	0.892 2	0.964 1	1.846 7	99.01		
黄芩素	0.050 23	0.221 0	0.216 7	0.436 7	99.52	101.85	1.73
	0.049 78	0.219 1	0.216 7	0.440 2	102.05		
	0.049 66	0.218 5	0.216 7	0.439 8	102.11		
	0.050 22	0.221 0	0.216 7	0.436 4	99.40		
	0.050 29	0.221 3	0.216 7	0.438 6	100.28		
甘草酸铵	0.050 12	0.220 5	0.216 7	0.442 3	102.33	97.97	1.52
	0.050 23	0.087 6	0.090 0	0.178 9	101.48		
	0.049 78	0.086 8	0.090 0	0.175 6	98.68		
	0.049 66	0.086 6	0.090 0	0.178 8	102.47		
	0.050 22	0.087 6	0.090 0	0.179 5	102.17		
汉黄芩素	0.050 29	0.087 7	0.090 0	0.181 3	104.03	100.09	1.96
	0.050 12	0.087 4	0.090 0	0.179 4	102.25		
	0.050 23	0.097 9	0.104 8	0.202 3	99.59		
	0.049 78	0.097 1	0.104 8	0.201 0	99.19		
	0.049 66	0.096 8	0.104 8	0.197 8	96.36		
大豆苷	0.050 22	0.097 9	0.104 8	0.199 8	97.22	100.09	1.96
	0.050 29	0.098 0	0.104 8	0.201 9	99.10		
	0.050 12	0.097 7	0.104 8	0.198 7	96.36		
	0.050 23	0.062 0	0.057 5	0.120 3	101.36		
	0.049 78	0.061 5	0.057 5	0.118 9	99.89		
黄芩素	0.049 66	0.061 3	0.057 5	0.120 1	102.23	100.09	1.96
	0.050 22	0.062 0	0.057 5	0.120 3	101.38		
	0.050 29	0.062 1	0.057 5	0.117 9	97.05		
	0.050 12	0.061 9	0.057 5	0.118 6	98.64		

A_i 为某待测成分 i 的峰面积, W_i 为某待测成分 i 的质量; 在运用过程中, 再通过相对校正因子求算待测成分的质量 $W_i = f(s/i) \times W_s \times A_i / A_s$ 。

分别精密吸取混合对照品溶液 2, 5, 10, 20, 50, 100 μL , 按“2.1”项下色谱条件进样测定。以黄芩苷(s)为内参物, 根据公式分别计算待测成分 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大

豆苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、汉黄芩素的相对校正因子, 结果见表 3。

2.5 相对校正因子耐用性试验

2.5.1 仪器、色谱柱 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液, 按“2.1”项色谱条件下进样测定, 考察岛津 2030C、Waters ARC、Agilent 1260 型高效液

相色谱仪及 Waters HSS T3-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Wondasil-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)对相对校正因子的影响,测得 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、汉黄芩素的相对校正因子之间的 RSD 分别为 1.19%, 2.53%, 1.08%, 2.65%, 1.84%, 1.75%, 1.24%, 1.68%, 1.68%, 2.34%, 表明均无明显影响(RSD<5%)。

2.5.2 柱温 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液,按“2.1”项色谱条件下进样测定,考察柱温 28, 29, 30, 31, 32 °C对相对校正因子的影响,3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、汉黄芩素的相对校正因子之间的 RSD 分别为 0.75%, 1.59%, 0.63%, 1.68%, 0.74%, 1.21%, 0.60%, 1.31%, 1.31%, 1.40%, 表明均无明显影响(RSD<5%)。

2.5.3 体积流量 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶

液,按“2.1”项色谱条件下进样测定,考察体积流量 0.8, 1.0, 1.2 mL·min⁻¹对相对校正因子的影响,3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、汉黄芩素的相对校正因子之间的 RSD 分别为 0.47%, 1.57%, 0.55%, 1.30%, 0.72%, 0.63%, 0.73%, 0.92%, 1.04%, 1.16%, 表明均无明显影响(RSD<5%)。

2.6 色谱峰定位

以黄芩苷为内标,按照“2.5.1”项下仪器、色谱柱,测定其他 10 种成分在不同条件下对相对保留时间的影响,结果见表 4,表明均无明显影响(RSD<5.0%)。

2.7 样品含有量测定

精密吸取供试品溶液 10 μL,在“2.1”项色谱条件下进样测定,用外标法(ESM)计算 11 种成分的含量、采用“2.4.5”项下测得平均相对校正因子计算 11 种成分的含量(QAMS),结果见表 5,可知 2 种方法所得结果无明显差异。

表 3 10 种成分相对校正因子

Tab. 3 Relative correction factors of 10 components

对照品溶液 进样体积/μL	相对校正因子									
	3'-羟基葛根素	葛根素	3'-甲氧基葛根素	大豆苷	盐酸巴马汀	盐酸小檗碱	汉黄芩苷	黄芩素	甘草酸	汉黄芩素
2	0.860 5	0.603 5	0.859 0	0.579 8	0.553 3	0.496 6	0.779 9	0.650 1	2.634 5	0.547 8
5	0.861 2	0.610 2	0.847 8	0.589 7	0.567 8	0.490 1	0.772 5	0.669 6	2.578 6	0.553 6
10	0.860 1	0.605 0	0.851 3	0.582 6	0.557 1	0.498 6	0.766 8	0.650 3	2.599 6	0.546 3
20	0.846 7	0.624 8	0.834 6	0.578 3	0.569 6	0.502 1	0.760 3	0.644 8	2.634 7	0.528 9
50	0.864 9	0.588 8	0.860 5	0.584 5	0.554 1	0.503 3	0.770 6	0.649 9	2.587 6	0.539 2
100	0.868 9	0.599 6	0.852 0	0.581 6	0.540 9	0.500 6	0.752 9	0.647 8	2.613 5	0.555 6
平均值	0.860 4	0.605 3	0.850 9	0.582 8	0.557 1	0.498 6	0.767 2	0.652 1	2.608 1	0.545 2
RSD/%	0.87	1.97	1.10	0.69	1.89	0.96	1.24	1.35	0.91	1.81

表 4 不同仪器、色谱柱对相对保留时间的影响

Tab. 4 Effects of different instruments and columns on relative retention time

仪器	色谱柱	相对保留时间									
		3'-羟基葛根素	葛根素	3'-甲氧基葛根素	大豆苷	盐酸巴马汀	盐酸小檗碱	汉黄芩苷	黄芩素	甘草酸	汉黄芩素
岛津 2030C	Xbridge-C ₁₈	0.190 0	0.314 1	0.372 8	0.526 9	1.061 2	1.082 3	1.183 6	1.342 5	1.500 6	1.595 1
	XDB-C ₁₈	0.191 1	0.318 9	0.385 6	0.520 1	1.055 2	1.076 7	1.214 5	1.359 8	1.499 8	1.632 5
	Wondasil-C ₁₈	0.181 9	0.302 8	0.380 2	0.542 9	1.060 5	1.081 6	1.223 6	1.313 7	1.543 4	1.617 6
Waters	Xbridge-C ₁₈	0.197 8	0.312 3	0.373 6	0.527 6	1.062 6	1.085 6	1.185 7	1.345 8	1.523 7	1.598 7
	XDB-C ₁₈	0.184 6	0.308 9	0.370 0	0.512 6	1.074 5	1.065 2	1.164 3	1.306 4	1.552 0	1.642 3
	Wondasil-C ₁₈	0.192 3	0.320 5	0.362 7	0.534 4	1.088 3	1.076 4	1.157 6	1.338 9	1.487 6	1.605 6
Agilent 1260	Xbridge-C ₁₈	0.188 7	0.321 8	0.388 3	0.545 5	1.045 7	1.097 6	1.147 5	1.365 9	1.456 7	1.567 4
	XDB-C ₁₈	0.185 1	0.314 4	0.381 2	0.523 7	1.054 2	1.103 4	1.208 9	1.377 4	1.498 8	1.554 6
	Wondasil-C ₁₈	0.192 8	0.310 2	0.377 6	0.512 3	1.063 9	1.065 4	1.190 3	1.334 5	1.472 3	1.563 4
平均值		0.189 4	0.313 8	0.376 9	0.527 3	1.062 9	1.081 6	1.186 2	1.342 8	1.503 9	1.597 5
RSD/%		2.59	1.94	2.12	2.25	1.16	1.19	2.22	1.72	2.08	1.93

表 5 各成分含有量测定结果

Tab. 5 Results of content determination of various components

mg·g⁻¹

样品	黄芩苷	3'-羟基葛根素			葛根素			3'-甲氧基葛根素		
		ESM	QAMS	RAD/%	ESM	QAMS	RAD/%	ESM	QAMS	RAD/%
S1	18.693 3	7.547 3	7.597 2	0.33	34.822 1	35.635 7	1.15	17.265 1	17.370 1	0.30
S2	19.973 3	7.666 9	7.719 2	0.34	34.498 6	35.323 2	1.18	17.312 8	17.427 5	0.33
S3	8.946 6	4.361 9	4.460 8	1.12	25.420 0	26.166 0	1.45	13.367 4	13.548 6	0.67
S4	9.483 9	4.299 5	4.398 0	1.13	25.016 3	25.754 8	1.45	12.716 1	12.905 5	0.74
S5	12.749 8	4.022 5	4.122 4	1.23	25.128 5	25.859 2	1.43	10.111 1	10.339 8	1.12
S6	12.636 9	4.196 1	4.298 2	1.20	25.735 3	26.486 5	1.44	10.712 1	10.942 2	1.06
S7	14.593 3	5.021 5	5.108 6	0.86	28.355 7	29.118 4	1.33	12.230 0	12.425 6	0.79
S8	22.674 3	5.475 9	5.557 7	0.74	22.857 4	23.579 2	1.55	12.198 6	12.397 9	0.81
S9	22.228 2	5.433 3	5.519 1	0.78	23.611 2	24.350 4	1.54	12.080 2	12.290 3	0.86
S10	21.895 2	5.486 2	5.569 1	0.75	23.652 5	24.385 1	1.52	12.559 6	12.755 8	0.78

样品	大豆苷			盐酸巴马汀			盐酸小檗碱			汉黄芩苷		
	ESM	QAMS	RAD/%	ESM	QAMS	RAD%	ESM	QAMS	RAD/%	ESM	QAMS	RAD/%
S1	6.388 5	6.460 7	0.56	2.465 3	2.515 0	1.00	12.670 1	12.756 9	0.34	0.829 5	0.819 7	0.59
S2	6.629 6	6.702 8	0.55	2.875 6	2.924 8	0.85	13.704 5	13.794 2	0.33	1.429 8	1.420 9	0.31
S3	5.169 7	5.258 6	0.85	3.417 5	3.463 5	0.67	12.713 0	12.801 0	0.35	2.624 6	2.618 1	0.12
S4	4.990 9	5.080 7	0.89	3.342 8	3.388 6	0.68	12.425 3	12.512 4	0.35	2.707 2	2.701 0	0.11
S5	4.828 7	4.918 0	0.92	3.254 0	3.299 2	0.69	11.662 2	11.747 4	0.36	3.310 1	3.305 3	0.07
S6	5.023 9	5.115 3	0.90	3.338 4	3.385 0	0.69	12.066 7	12.154 4	0.36	3.407 5	3.402 5	0.07
S7	5.341 2	5.426 1	0.79	3.088 8	3.135 5	0.75	11.938 4	12.024 6	0.36	2.807 1	2.801 2	0.11
S8	5.916 7	5.996 1	0.67	4.597 7	4.637 2	0.73	17.800 6	17.893 6	0.26	4.400 4	4.397 5	0.03
S9	6.029 9	6.111 0	0.67	4.505 1	4.546 4	0.76	17.540 1	17.634 3	0.27	4.390 2	4.387 0	0.04
S10	6.067 7	6.146 5	0.64	4.605 0	4.645 0	0.43	17.764 4	17.858 0	0.26	4.342 3	4.339 1	0.04

样品	黄芩素			甘草酸			汉黄芩素		
	ESM	QAMS	RAD/%	ESM	QAMS	RAD/%	ESM	QAMS	RAD/%
S1	0.323 5	0.337 5	2.12	2.398 9	2.409 2	0.21	0.164 7	0.169 8	1.54
S2	0.525 0	0.539 7	1.37	2.558 1	2.568 9	0.21	0.337 6	0.342 7	0.75
S3	1.592 9	1.608 6	0.49	0.788 8	0.795 6	0.43	1.017 0	1.003 5	0.67
S4	2.895 0	2.912 1	0.29	0.856 7	0.863 6	0.40	1.268 8	1.272 8	0.16
S5	12.265 7	12.293 3	0.11	1.587 8	1.596 3	0.27	2.933 1	2.935 2	0.04
S6	15.865 5	15.897 5	0.10	1.580 6	1.589 1	0.27	2.803 2	2.805 7	0.04
S7	9.309 2	9.333 5	0.13	1.929 4	1.938 7	0.24	2.309 5	2.312 3	0.06
S8	1.743 4	1.759 2	0.45	1.949 6	1.959 0	0.24	1.234 7	1.238 8	0.16
S9	2.768 8	2.786 0	0.31	2.052 1	2.061 8	0.24	1.420 4	1.424 3	0.14
S10	1.694 0	1.709 9	0.47	1.996 6	2.006 1	0.24	1.235 9	1.240 0	0.17

3 讨论

3.1 指标成分的选择

葛根苓连片由葛根、黄芩、黄连、炙甘草 4 味中药制得。葛根为君，臣以黄芩、黄连，炙甘草为佐使药。3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷等黄酮类和皂苷类化合物为葛根的活性成分^[11]，黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素等黄酮类化合物为黄芩的活性成分^[12]，盐酸巴马汀、盐酸小檗碱等生物碱为黄连的活性成分^[13]，甘草酸铵为炙甘草的活性成分^[14]。因此本实验选择将这 11 种成分作为考察指标，覆盖了葛根苓连片处方中全部 4 种中药材，可以对药品质量进行全面控制。

3.2 色谱条件的优化

试验前期发现 11 个成分的最大吸收波长多介于 250~280 nm。实验使用 PDA 检测器，经过反复比较不同波长下的色谱图，发现在 260 nm 波长处色谱信息最全，共有峰数量最多，11 种成分的峰形较好，各成分间分离良好，能够满足方法学考查的各项参数要求，考虑到建立的分析方法简便易行，于是最终选择 260 nm 单个波长为检测波长；本实验分别考察了在水-乙腈、水-甲醇、0.1%甲酸水溶液-乙腈以及 0.1%磷酸水溶液-乙腈 4 种不同的流动相体系，结果显示流动相为 0.1%磷酸水溶液-乙腈时，各色谱峰分离度较好，峰形较好，无明显拖尾，因此选择 0.1%磷酸水溶液-乙腈为流动

相, 后经一系列的摸索, 确定了梯度洗脱的程序。本实验的样品制备参考了 2020 年版中国药典葛根芩连片的提取方式。

3.3 指纹图谱研究

中成药成分复杂, 尤其是复方制剂, 其种类更为繁多, 作用机制也更为复杂。药理研究表明, 中成药不是某种单一成分发挥作用, 而是多种成分同时作用在同一或不同靶点来发挥疗效, 因此研究单一或个别几种成分难以全面准确地对其进行综合评价, 而特征图谱的引入很好地解决了这一问题, 并且在中药定性过程中得到了大量的应用^[15-16]。本实验建立了葛根芩连片的指纹图谱, 共标注了 20 个共有峰, 覆盖了全部的 4 味药材, 中国药典 2020 年版一部^[2]葛根芩连片标准只标注了葛根和黄连 2 味药材的 8 个共有峰, 本实验能更为客观、全面地评价葛根芩连片的质量。

3.4 含有量分析

表 5 显示, 不同厂家和批次样品之间各成分含有量存在较大差异, 特别是黄芩素, S1 与 S6 含量相差 47 倍, 可能与原药材、产地、采收季节差异及生产工艺控制参数等有关。因此, 建议药品生产企业和监管部门对原药材来源和制剂生产过程加以控制, 以确保该制剂质量稳定性和疗效一致性。

4 结论

本实验将一测多评法与 HPLC 特征图谱相结合来控制葛根芩连片质量, 充分发挥两者优势, 可对该制剂同时进行定性、定量测定, 此实验方法简便, 重复性好, 同时大大降低了检验成本, 可为葛根芩连片进行全面的质量控制提供依据。

REFERENCES

- [1] 赵旭凡, 田立新. 从“火郁发之”论《伤寒论》葛根芩连汤方证本义[J]. 环球中医药, 2020, 13: 122-124.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2020: 附录 1713-1714.
- [3] YANG B, ZHAO J, LIU F, et al. Quality evaluation of Forsythiae Fructus based on combinative method of fingerprint, pattern recognition and quantitative analysis of multi-components by single marker[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(3): 292-298.
- [4] ZHANG J P, WANG D, ZHOU X M. Application of

fingerprint combined with QAMS in quality evaluation of Zhenrongdan mixture[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(2): 200-204.

- [5] TONG F M, LIU H, WANG J Z. Study on fingerprint and quantitation method of multi-components by single-marker of Zhengtian pills[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2018, 38(1): 79-88.
- [6] ZHANG Y, SUN X Z, YU M, et al. Simultaneous determination of 13 active components in Gegen Qinlian decoction by reversed-phase ion pair-high performance liquid chromatography and its application in compatibility mechanism exploration[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2021, 52(16): 4852-4859.
- [7] LI H, TIAN J, LI Y, et al. Study on the composition analysis of the drugs in Gegen Baicalin decoction based on fingerprint[J]. World Chin Med(世界中医药), 2018, 13(10): 2613-2616.
- [8] REN W G, GUO L L, ZHANG C Y. The research progress and predictive parsing for Q-marker of Gegenqinlian decoction[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2021, 30(18): 1675-1679.
- [9] HU X R, YANG S G, DAI Z, et al. Study on characteristic fingerprints and quantitative analysis of Gegen Qinlian tablets[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2014, 34(9): 1590-1596.
- [10] LI L L, LYU Y F, ZHU X Y. Determination of multiple components in Gegen Qinlian tablets[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2017, 37(9): 1607-1614.
- [11] HUANG X W, ZHANG D D, WANG J J, et al. Chemical composition and pharmacological action of Pueraria Lobata[J]. Jilin J Chin Med(吉林中医药), 2018, 38(1): 87-89.
- [12] JIANG X H, LIU S M. Research on pharmacological effects and substance basis of scutellaria baicalensis[J]. China Pharm(中国药师), 2020, 23(10): 2004-2010.
- [13] ZHOU R, XIANG C P, ZHANG J J, et al. Research progress on chemical compositions of Coptidis Rhizoma and pharmacological effects of berberine[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45(19): 4561-4573.
- [14] ZHANG Y L, WANG M Y, YANG J Y, et al. Research progress of chemical constituents and pharmacological effects of baked licorice[J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai(上海中医药大学学报), 2015, 29(3): 99-102.
- [15] ZHU M, CHEN B L, SHI S M. Application of fingerprint technology on traditional Chinese medicine in Chinese pharmacopoeia(2015 edition) volume I [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(5): 611-614.
- [16] 李凤丽, 李进, 吴娇. 指纹图谱技术在中药领域研究中应用现状[J]. 天津药学, 2014, 26(3): 52-57.

收稿日期: 2022-04-18

(本文责编: 沈倩)