指纹图谱结合一测多评模式在贞蓉丹合剂质量评价中的应用

张建平，王栋，周雪梅(内蒙古自治区药品检验研究院，呼和浩特 010020)

摘要：目的 采用指纹图谱与一测多评(QAMS)结合的方法对贞蓉丹合剂进行质量评价。**方法** 以松果菊苷为参照物建立贞蓉丹合剂 HPLC 指纹图谱，计算该成分与阿魏酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷的相对校正因子，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 法的可行性和科学性。**结果** 研究建立了贞蓉丹合剂 HPLC 特征指纹图谱共有模式，标定了 13 个共有峰，占总体峰面积的 91%，指认了其中 4 个共有峰，5 批次贞蓉丹合剂的相似度均>0.99。5 批次贞蓉丹合剂中 4 个主要成分 QAMS 法和外标法测定结果间无显著差异。**结论** QAMS 结合指纹图谱可为贞蓉丹合剂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；贞蓉丹合剂；质量控制；校正因子

中图分类号：R284.1；R917.101　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1007-7693(2019)02-0200-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.02.014

引用本文：张建平, 王栋, 周雪梅. 指纹图谱结合一测多评模式在贞蓉丹合剂质量评价中的应用[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(2): 200-204.

Application of Fingerprint Combined with QAMS in Quality Evaluation of Zhenrongdan Mixture

ZHANG Jianping, WANG Dong, ZHOU Xuemei(*The Inner Mongolia Autonomous Region Institute for Drug Control, Hohehot 010020, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the quality of Zhenrongdan mixture by fingerprint combined with QAMS. **METHODS** The quality evaluation method was established and validated with echinacoside as internal reference to determine the contents of other components (ferulic acid, salvianolic acid B, and icariin) according to the relative correction factor. The accuracy and feasibility of QAMS was evaluated by comparison on the results between the measured value and calculation value by external standard method and QAMS. **RESULTS** A common pattern of characteristic fingerprint of Zhenrong Dan mixture by HPLC was established. Thirteen common peaks were identified, they accounted for 91% of the total peak area and four components were verified in five batches of Zhenrongdan mixture, good similarities with correlation coefficients >0.99 were found in the fingerprints. There was no significant difference between the quantitative results of the four ingredients in the five batches by external standard method and QAMS. **CONCLUSION** The method of fingerprint combined with QAMS can be used for the quality control of multiple components determination and fingerprint chromatography for Zhenrongdan mixture.

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

贞蓉丹合剂是由河北康芝制药有限公司生产的独家新药，由熟地黄、白芍、当归、川芎、牡丹皮、丹参、鸡血藤、肉苁蓉、女贞子、淫羊藿、续断、黄柏、知母、酸枣仁(炒)、山茱萸和枸杞子共 16 味药材经提取制成。贞蓉丹合剂的主要功效为养血，补益肝肾，滋阴养神，适用于中老年妇女因肝肾不足，气血不调所致的腰膝酸软，神疲乏力，烦躁易怒，失眠健忘，精神不振，头晕耳鸣等症，具有良好的临床疗效。

中成药复方制剂的疗效是由多组分共同作用的结果，贞蓉丹合剂由 16 味中药材经过提取浓缩加入辅料后制成，成分更加复杂。对其单一成分进行定量分析测定，不能全面控制内在质量，达不到整体质量控制的目的。但对多指标成分进行测定需要有相对应的对照品。在中药整体质量评价体系中，多采用指纹图谱技术来体现中药的整体性[1-3]；采用一测多评分析方法(quantitative analysis of multi-components by single marker，QAMS)来实现单一对照品同时测定多个指标成分含量的目的[4-5]。从理论意义上看，指纹图谱技术结合 QAMS 分析方法可以很好地实现从整体到局部的质量控制，全面评价制剂的整体质量。这 2 种技术和方法的结合，有着诸多的优点，将会成为药品生产过程质量控制、中药质量检验和药品标准制定优先采用的评价检测方法[6-7]。

根据贞蓉丹合剂所含组分的理化性质，结合

作者简介：张建平，男，硕士，主管检验师　Tel: (0471)4505967　E-mail: zhangjianping2007@163.com

各组分含量，本实验以肉苁蓉、川芎、丹参、淫羊藿的主要成分松果菊苷、阿魏酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷为指标性成分，采用 QAMS 法同时测定 4 种成分，并建立贞蓉丹合剂的 HPLC 指纹图谱。本实验将指纹图谱技术和 QAMS 定量测定技术相结合，为贞蓉丹合剂质量的全面评价提供参考依据。

1 仪器与试剂

LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津)；Waters e2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)；InertSustain-C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；DiKMA-C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；百万分之一电子天平、万分之一电子天平(Sartorius)。甲醇(批号：WXBC3069V)、乙腈(批号：WXBC3036V)为色谱纯，均购自 Sigma-Aldrich；磷酸(分析纯，国药集团化学试剂有限公司，批号：20141104)；水为去离子水。

对照品松果菊苷(批号：111670-201505；纯度：92.5%)、阿魏酸(批号：110773-201313；纯度：99.6%)、丹酚酸 B(批号：111562-201514；纯度：93.7%)、淫羊藿苷(批号：110737-200415；纯度按 100%计)，均购自中国食品药品检定研究院。贞蓉丹合剂样品来源：样 1(S1，批号：20160101；规格：每瓶 100 mL)、样 2(S2，批号：20160301；规格：每支 20 mL)、样 3(S3，批号：20160302；规格：每支 20 mL)均来自河北康芝制药有限公司；样 4(S4，批号：20160301；规格：每支 20 mL)、样 5(S5，批号：20160301；规格：每支 20 mL)均购于药店。

2 方法与结果

2.1 定量测定分析方法验证

2.1.1 色谱条件 DiKMA-C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)。流动相：A 相为含 1%磷酸的 80%乙腈水溶液，B 相为 1%磷酸水溶液。梯度洗脱(0~50 min，16%A；50~92 min，21%→40%A；92~95 min，80%A)。柱温 35 ℃；流速：1 mL·min^{-1}；检测波长 190~400 nm，定量测定波长选择：松果菊苷 330 nm、阿魏酸 322 nm、丹酚酸 B 286 nm、淫羊藿苷 269 nm，进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取松果菊苷、阿魏酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷对照品适量置于同一量瓶中，加 80%甲醇使溶解并定容，得到混合对照品溶液，质量浓度分别为松果菊苷 0.828 7 mg·mL^{-1}、阿魏酸 0.212 5 mg·mL^{-1}、丹酚酸 B 0.219 9 mg·mL^{-1}、淫羊藿苷 0.270 0 mg·mL^{-1}。

2.1.3 供试品溶液的制备 取供试品，过 0.45 μm 微孔滤膜，即得。

2.1.4 系统适用性试验 取混合对照品溶液、样品溶液进样分析，结果见图 1，各待测组分分离效果良好(分离度>1.5)。

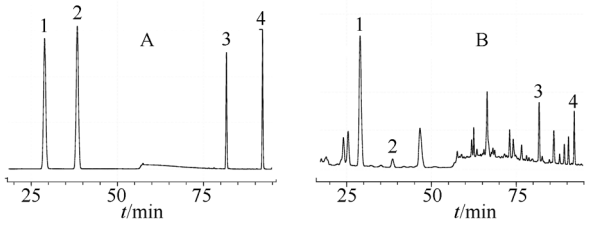


图 1 高效液相色谱图(285 nm)

A–混合对照；B–贞蓉丹合剂样品；1–松果菊苷；2–阿魏酸；3–丹酚酸 B；4–淫羊藿苷。

Fig. 1 HPLC chromatogram(285 nm)

A–mixed reference substances; B–Zhenrongdan mixture sample; 1–echinacoside; 2–ferulic acid; 3–salvianolic acid B; 4–icariin.

2.1.5 线性范围 分别吸取混合对照品溶液 5，10，15，20，25，40，50 μL，注入液相色谱仪，记录色谱峰面积。以对照品质量为横坐标，最大吸收波长下各成分峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，进行线性回归，得回归方程分别如下：松果菊苷为 Y=1.412 63×10^6X–223 482，r=0.999 8，线性范围 3.832~38.327 μg；阿魏酸为 Y=5.361 81×10^6X–282 118，r=0.999 9，线性范围 1.058~10.582 μg；丹酚酸 B 为 Y=1.232 15×10^6X– 44 011.5，r=0.999 9，线性范围 1.030~10.302 μg；淫羊藿苷为 Y=2.052 1×10^6X–71 222.1，r=0.999 9，线性范围 1.350~13.500 μg。结果显示，各成分标准曲线在线性范围内线性关系良好。

2.1.6 加样回收率试验 精密量取供试品溶液 5 mL，加入松果菊苷 5 mg、阿魏酸 1 mg、丹酚酸 B 1 mg、淫羊藿苷 1 mg，精密称定，超声使溶解，作为加标回收溶液，精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪，计算加样回收率。加样回收率结果为松果菊苷 99.8%、阿魏酸 98.5%、丹酚酸 B 99.1%、淫羊藿苷 98.7%，表明方法回收率良好。

2.1.7 仪器精密度试验 精密吸取同一供试品溶液，不间断连续进样 6 次，记录峰面积。结果松果菊苷、阿魏酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷的峰面积 RSD 分别为 0.58%，0.28%，0.23%，0.58%(n=6)，表明仪器精密度良好。

2.1.8 稳定性试验 取同一供试品溶液，分别于

0，2，4，8，12，24，36，48 h 注入液相色谱仪，记录各组分峰面积。结果松果菊苷、阿魏酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷峰面积 RSD 分别为 0.50%，0.26%，0.21%，0.90%(n=8)。结果表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.1.9 重复性试验 取同一批次贞蓉丹合剂样品 6 份，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，进样分析，计算松果菊苷、阿魏酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷的峰面积重复性 RSD 分别为 0.54%，0.33%，0.29%，0.78%(n=6)。结果表明重复性良好。

2.2 指纹图谱

2.2.1 指纹图谱共有模式的建立 按“2.1.1”项下液相色谱条件对 5 批贞蓉丹合剂的供试品溶液进行测定，采集波长为 285 nm，记录指纹图谱见图 2，比较各批次供试品的色谱图，考虑到峰面积的大小及分离的情况，标定共有峰 13 个，确定为共有指纹峰，计算共有峰占比，剔除溶剂峰(从 5 min 开始计算)，共有峰面积占总峰面积的 91%。根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》的要求，比较 5 个批次的贞蓉丹合剂样品的 HPLC 色谱图，以松果菊苷作为参照峰(S)，计算各共有指纹峰的保留时间、相对保留时间、峰面积、峰面积百分比、相对峰面积的平均值及其标准偏差，结果见表 1。结果表明各共有指纹峰相对保留时间、相对峰面积稳定。根据对照品保留时间指认了其中的松果菊苷(3)、阿魏酸(4)、丹酚酸 B(8)和淫羊藿苷(13)共 4 个成分，各图谱共有峰相对保留时间无显著性差异[5]。

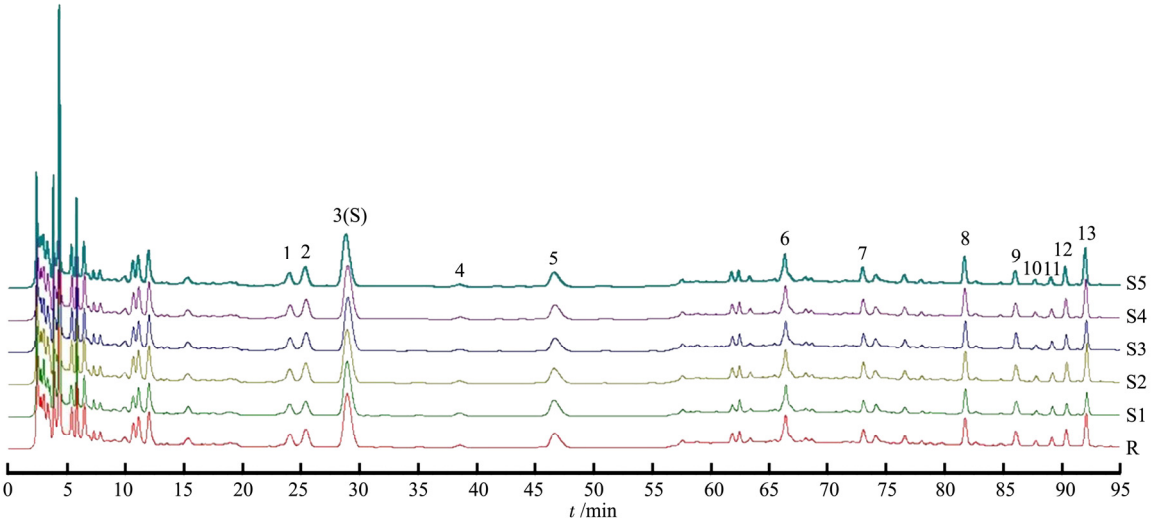


图 2 5 个批次(S1~S5)贞蓉丹合剂指纹图谱及合成的对照指纹图谱(R)

Fig. 2 Reference fingerprint (R) and 5 batches of fingerprints of Zhenrongdan mixture (S1-S5)

表 1 贞蓉丹合剂 HPLC 指纹图谱技术参数($\bar{x} \pm s$，n=5)

Tab. 1 Technical parameter for HPLC fingerprint of Zhenrongdan mixture($\bar{x} \pm s$, n=5)

共有峰号	保留时间/min	相对保留时间	峰面积	峰面积百分比/%	相对峰面积	色谱峰指认
1	24.042±0.025	0.831±0.001	2 108 887±42 893	4.609±0.094	0.139±0.003	
2	25.413±0.025	0.878±0.001	3 900 891±82 657	8.525±0.181	0.258±0.008	
3	28.946±0.057	1.000±0.000	15 125 165±194 389	33.055±0.425	1.000±0.000	松果菊苷
4	38.562±0.035	1.332±0.002	675 664±8 999	1.477±0.020	0.045±0.001	阿魏酸
5	46.649±0.039	1.612±0.002	4 875 977±172 096	10.656±0.376	0.322±0.013	
6	66.396±0.022	2.294±0.004	4 670 307±149 422	10.207±0.327	0.309±0.012	
7	73.033±0.024	2.523±0.004	1 873 160±96 900	4.094±0.212	0.124±0.007	
8	81.732±0.024	2.824±0.005	3 195 512±66 021	6.984±0.144	0.211±0.004	丹酚酸 B
9	86.062±0.025	2.973±0.005	1 748 726±38 964	3.822±0.085	0.116±0.003	
10	87.766±0.046	3.032±0.006	546 380±33 968	1.194±0.074	0.036±0.003	
11	89.141±0.048	3.080±0.006	893 389±26 262	1.952±0.057	0.059±0.002	
12	90.368±0.049	3.122±0.006	1 923 446±171 451	4.204±0.374	0.127±0.012	
13	92.077±0.047	3.181±0.006	4 220 399±119 584	9.223±0.261	0.279±0.005	淫羊藿苷

2.2.2 指纹图谱的相似度评价结果 采用药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版本)”对 5 批贞蓉丹合剂样品的指纹图谱进行相似度分析、合成及标定，生成对照图谱(图 2)。以 3 号峰松果菊苷为参照峰 S，标定 13 个共有峰，以 S1 批贞蓉丹合剂样品的指纹图谱作为参照图谱，以平均数法生成 5 批样品的对照指纹图谱(图 2 中的 R 图谱)，5 批样品与对照指纹图谱相似度分别为 0.998，0.999，0.999，0.999，0.999。结果表明贞蓉丹合剂各批次之间相似度较好、质量稳定。

2.3 QAMS

2.3.1 相对校正因子 以松果菊苷(330 nm)为内标，按公式 $f_{k/m}=C_k \times A_m/(C_m \times A_k)$计算，式中 f 为相对校正因子，k 代表内标物，m 代表其他组分，A 代表峰面积，C 代表质量浓度。计算其他 3 种成分的相对校正因子，分别记为：阿魏酸 $f_{松/阿}^{322}$、丹酚酸 B $f_{松/丹}^{286}$、淫羊藿苷 $f_{松/淫}^{269}$。结果见表 2。

表 2 待测成分的相对校正因子

Tab. 2 Relative correction factors of be-measured components

进样体积/μL	$f_{松/阿}^{322}$	$f_{松/丹}^{286}$	$f_{松/淫}^{269}$
5	3.784	0.880	1.470
10	3.787	0.877	1.468
15	3.786	0.875	1.460
20	3.785	0.874	1.460
25	3.782	0.872	1.459
40	3.784	0.871	1.450
50	3.799	0.874	1.457
平均值	3.787	0.875	1.460
RSD/%	0.144	0.345	0.454

2.3.2 耐用性和系统适用性考察 ①色谱柱及高效液相色谱仪考察：取混合对照品溶液 10 μL，分别进样 5 次，考察 2 种高效液相色谱仪和 2 种色谱柱，结果见表 3。②色谱峰专属性：待测组分峰的定位，首先是内标峰用对照品定位，其他峰一般根据相对保留时间差进行定位，内标峰的保留时间已知，根据相对保留时间差值，再根据色谱峰的峰型以及峰纯度的信息，即可正确判断出目标峰的准确峰位置，松果菊苷、阿魏酸、丹酚酸 B 和淫羊藿苷的保留时间分别记为 $RT_{松}$、$RT_{阿}$、$RT_{丹}$和 $RT_{淫}$，各待测组分相对于松果菊苷的相对保留时间差值分别记为 $RT_{阿}$-$RT_{松}$、$RT_{丹}$-$RT_{松}$和 $RT_{淫}$-$RT_{松}$。结果表明，相对保留时间差值的波动相对较小，因此采用相对保留时间差值进行成分定性较为可行，在不同仪器及色谱柱上各成分间的相对保留时间差值见表 4。

表 3 不同仪器和不同色谱柱待测成分的相对校正因子

Tab. 3 Relative correction factors determined by different instructions and chromatographic columns

高效液相色谱仪	色谱柱	$f_{松/阿}^{322}$	$f_{松/丹}^{286}$	$f_{松/淫}^{269}$
岛津 20A	InertSustain	3.789	0.883	1.474
	DiKMA	3.774	0.877	1.468
Waters e2695	InertSustain	3.781	0.879	1.466
	DiKMA	3.779	0.874	1.460
平均值		3.781	0.878	1.467
RSD%		0.143	0.372	0.341

表 4 不同仪器和不同色谱柱待测成分色谱峰的相对保留时间差值

Tab. 4 Different values of relative retention time determined by different instructions and chromatographic columns

高效液相色谱仪	色谱柱	$RT_{松}$	$RT_{阿}$-$RT_{松}$	$RT_{丹}$-$RT_{松}$	$RT_{淫}$-$RT_{松}$
岛津 20A	InertSustain	28.941	1.333	2.828	3.187
	DiKMA	28.961	1.334	2.828	3.187
Waters e2695	InertSustain	28.858	1.333	2.828	3.185
	DiKMA	28.871	1.333	2.827	3.184
平均值		28.908	1.333	2.828	3.186
RSD%		0.177	0.030	0.023	0.042

2.3.3 样品含量测定 取 5 批贞蓉丹合剂供试品溶液，采用 QAMS 法及外标法测定各批次中待测组分的量(结果以 $mg \cdot mL^{-1}$表示)。为确认 QAMS 的准确性，将 2 种方法计算结果经相关系数分析，结果 2 种方法之间的相关系数均≥0.999 9，2 种方法计算所得结果一致，t 检验结果表明 $P>0.05$，说明 2 种方法的计算结果无显著性差异。可见 QAMS 在贞蓉丹合剂的多指标成分质量评价中的应用是可行的，结果见表 5。

3 讨论

贞蓉丹合剂由 16 味中药材提取制成，其样品中的化学成分复杂，具有生物活性的成分更是不止一种。通过指纹图谱技术与 QAMS 技术相结合的方式对其质量进行评价，可以实现从整体到局部的质量控制，具有很大的研究意义。

表 5 贞蓉丹合剂中各成分的 QAMS 法与外标法含量测定结果比较

Tab. 5 Comparison on each constituent in Zhenrongdan mixture by QAMS and external standard methods mg·mL^{-1}

样品	松果菊苷	阿魏酸		丹酚酸 B		淫羊藿苷	
		QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法
S1	1.646 2	0.028 4	0.028 5	0.239 1	0.238 2	0.234 6	0.235 0
S2	1.650 2	0.027 6	0.028 1	0.235 4	0.234 4	0.232 7	0.233 4
S3	1.648 6	0.027 9	0.028 3	0.235 8	0.235 8	0.236 9	0.237 8
S4	1.663 0	0.028 1	0.028 3	0.236 6	0.237 1	0.235 4	0.236 1
S5	1.654 4	0.028 7	0.029 2	0.236 0	0.237 1	0.236 6	0.237 5

本实验采用 HPLC 全波长扫描测定贞蓉丹合剂中 4 种成分的含量，保证各成分在最大检测波长处具有最大吸收，可以保证在 QAMS 实验中定量测定的准确性。同时，在建立指纹图谱时，为保证样品中各组分峰高比例协调，共有峰数量合适，选择 285 nm 作为最优吸收波长，在此条件下图谱清晰，各峰高比例适宜，共有峰数目较多，灵敏度高，干扰少。

本实验建立了贞蓉丹合剂的 HPLC 测定方法，该方法能很好地分离该药品所含的化学成分，各峰峰型较好，方法具有很好的稳定性、重复性和可行性。同时，通过测定 5 批不同批次的样品，得到各自的指纹图谱，通过软件合成指纹图谱对照图谱，建立了指纹图谱方法，实现整体质量控制。与此同时，融入 QAMS 技术，以松果菊苷作为内标，可以准确定量其他 3 种成分的含量，实现整体与局部质量控制的融合。建立的指纹图谱与 QAMS 结合的分析方法简便、准确、重复性好、可操作性强，既考察了样品中多个指标性成分的含量，又考察了其指纹图谱整体相似度，为贞蓉丹合剂的质量研究提供了科学依据。

REFERENCES

[1] MAO S H,CHEN B L,TANG D F.Establishment of HPLC fingerprint of *Rabdosia japonica* (Burm. f.) Hara and its HPLC-MS analysis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(4): 556-560.

[2] LIANG Y L, WANG H L, PENG L H, et al. Study on HPLC fingerprint of ultrafine granular powder of *Erigerontis herba* [J]. Pharm Today(今日药学), 2017, 27(8): 532-536.

[3] ZHAO W L, CHENG X Q, YAN A J, et al. Studies on fingerprint of oil of *Ganoderma lucidum* spore and identification for it's confusion [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(7): 1011-1014.

[4] ZHANG T, ZHENG D, WANG W T, et al. Application of fingerprint combined with QAMS in quality evaluation of Shenxiong Yangxin Granule [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2015, 46(13): 1920-1925.

[5] HUANG R M, LIU W R, LIU C H, et al. Determination of total lactones content in ginkgo folium by QAMS [J]. Pharm Today(今日药学), 2016, 26(4): 231-234.

[6] FAN L, HOU X L, WANG W Q, et al. Application of fingerprint combined with quantitative analysis of multi-component by single marker in quality evaluation of *Ampelopsis grossedentata* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 44(22): 4076-4081.

[7] LI N N, MENG X S, BAO Y R, et al. Simultaneous quantitative determination of five active chemical compositions in Oroxyli Semen by QAMS based on full-time multi-wavelength fusion method [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(7): 943-947.

收稿日期：2018-04-17

(本文责编：曹粤锋)