

一测多评法测定葛根芩连丸中7种指标成分

王迪^{1,2}, 吴亿晗³, 李维², 曹亚楠², 宋雨⁴, 章津铭^{3*}, 邹亮^{2*}

1. 大理大学药学与化学学院, 云南 大理 671000

2. 成都大学医学院, 四川 成都 610106

3. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

4. 成都大学药学与生物工程学院, 四川 成都 610106

摘要:目的 建立以葛根素为内标物, 测定葛根芩连丸中大豆苷、药根碱、巴马汀、大豆苷元、黄芩素、汉黄芩素等多个指标性成分的一测多评法(QAMS)。方法 采用 Waters 超高效液相色谱系统, 以 Acquity BEH C₁₈ 色谱柱, 流动相甲醇-0.1% 冰醋酸水溶液梯度洗脱, 检测波长 260 nm, 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 30 °C 进行测定。以葛根素作为内标物, 建立制剂中其他 6 种指标成分的相对校正因子($f_{s/x}$), 从而计算各待测成分的量, 并将 QAMS 计算值与外标法(ESM)实测值进行比较, 以验证 QAMS 的准确性和方法适宜性。结果 在各待测成分线性范围内, 葛根芩连丸中的葛根素与大豆苷、药根碱、巴马汀、大豆苷元、黄芩素、汉黄芩素 6 种有效成分的 $f_{s/x}$ 重现性良好, 分别为 1.02、1.07、1.05、1.32、0.62、0.90; 采用 QAMS 测定的 10 个批次葛根芩连丸样品中 7 种指标成分与外标法(ESM)的实测值之间无显著性差异; 其中 7 种指标性成分葛根素、大豆苷、药根碱、巴马汀、大豆苷元、黄芩素和汉黄芩素在 10 个批次中的质量分数分别为 8.923~10.746 mg/g、2.231~2.988 mg/g、0.825~1.197 mg/g、1.274~1.522 mg/g、2.330~2.713 mg/g、0.836~0.951 mg/g、0.901~1.092 mg/g。结论 以葛根素为内标物, 建立的 QAMS 方便快捷, 结果准确可靠, 可用于葛根芩连丸多指标成分质量控制, 为葛根芩连丸的质量评价提供参考。

关键词: 葛根芩连丸; 一测多评; 相对校正因子; 葛根素; 大豆苷; 药根碱; 巴马汀; 大豆苷元; 黄芩素; 汉黄芩素

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)21-4453-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.21.014

Quantitative determination of multiple characteristic components in Gegen Qinlian Pills by QAMS method

WANG Di^{1,2}, WU Yi-han³, LI Wei², CAO Ya-nan², SONG Yu⁴, ZHANG Jin-ming³, ZOU Liang²

1. College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China

2. College of Medical, Chengdu University, Chengdu 610106, China

3. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

4. College of Pharmacy and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China

Abstract: Objective To develop a quantitative analysis multi-components by single marker (QAMS) method for the quantification of multiple characteristic components, namely, puerarin, daidzin, jatrorrhizine, palmatine, soybean glycol, wogonoside, wogonin, in Gegen Qinlian Pills (GQP) with puerarin as the internal reference. **Methods** Samples were analyzed by Waters ultra-high efficiency liquid chromatography (UPLC) system, equipped with a reverse phase Acquity BEH C₁₈ chromatographic column, with the mobile phase of methanol-0.1% phosphoric acid solution at a flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature and the detection wavelength set at 30 °C and 260 nm respectively. Based on puerarin as the internal reference, the relative correction factors (RCFs) with other six characteristic components were calculated, then compared with the external standard method. This result benefits to verify the accuracy

收稿日期: 2017-06-01

基金项目: 四川省教育厅高校科研创新团队(17TD0010); 药食同源植物资源开发四川省高校重点实验室(10Y201703)

作者简介: 王迪(1992—), 男, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型的研究与开发。

Tel: 18215620650 E-mail: 798891970@qq.com

*通信作者 邹亮, 教授. Tel: (028)84617082 E-mail: zouliang@cdu.edu.cn

章津铭, 博士. Tel: 13551043885 E-mail: cdutcmzjm@126.com

and advantages of the established QAMS method. **Results** Under the linear range of determination, RCFs of daidzin, jatrorrhizine, palmatine, soybean glycol, wogonoside, wogonin with reference to puerarin, were 1.02, 1.07, 1.05, 1.32, 0.62, and 0.90 in GQP, respectively. And the repeatability was good in different experimental conditions. Moreover, there was no significant difference on the quantitative results of seven characteristic components, derived from between external standard method and QAMS method in the 10 batches of GQP samples. The range of seven characteristic components contents in the 10 batches of GQP samples, namely puerarin, daidzin, jatrorrhizine, palmatine, soybean glycol, wogonoside and wogonin, were 8.923—10.746 mg/g, 2.231—2.988 mg/g, 0.825—1.197 mg/g, 1.274—1.522 mg/g, 2.330—2.713 mg/g, 0.836—0.951 mg/g, and 0.901—1.092 mg/g, respectively. **Conclusion** In present study, a feasible, convenient and accurate QAMS method with puerarin as the internal reference was established. Therefore, it is suitable to quantify multiple characteristic components in GQP and provide a useful approach for the quality control of GQP.

Key words: Gegen Qinlian Pills; quantitative analysis of multi-components by single marker; relative correction factor; puerarin; daidzin; jatrorrhizine; palmatine; soybean glycol; wogonoside; wogonin

中药中成分具有多样性、复杂性特点, 中药成方制剂中药味配伍的实质是多成分相互作用的结果, 因此, 中药制剂较单味药材更需强调其多成分、多靶点特性, 单一指标成分难以表征中药制剂的质量优劣^[1-5]。但由于中药复方中化学成分类型多样, 常规的多成分同时测定外标法具有所需对照品种类多、成本高、色谱同时分离难度较大、方法学考察复杂等不足, 而一测多评法(QAMS)是一种采用 1 个成分来实现对多个成分同步监控的有效方法, 近年来在中药材多指标成分定量测定中得到广泛应用。《中国药典》2010 年、2015 年版中已连续收录该方法用于黄连小檗碱、表小檗碱、巴马汀等成分的定量测定, 但目前均以同一类型化合物的质量控制研究居多, 且在中药复方制剂的质量控制研究中较少应用^[6-12]。

葛根芩连丸源自《伤寒论》中经典名方葛根芩连汤, 由葛根、黄芩、黄连、炙甘草 4 味药组成^[13], 具有解肌透表、清热解毒、利湿止泻等功效, 主要用于治疗湿热所致腹泻、痢疾或风热感冒所致头身疼痛等症, 为现代治疗急性腹泻、胃肠性感冒的重要中药制剂品种^[14-16]。

目前文献对葛根芩连丸的质量控制研究主要是对葛根素、小檗碱等成分的定量测定, 《中国药典》2015 年版中也是仅以葛根素、盐酸小檗碱 2 个成分为检测指标, 难以实现中药复方制剂的多成分控制。依据该方药味组成, 葛根为君药, 黄芩、黄连为臣药^[17-18], 现代研究表明, 葛根素、大豆苷、大豆苷元、黄芩素、汉黄芩素、药根碱、巴马汀分别是葛根、黄芩、黄连中的主要活性成分。因此, 选取这 7 个成分作为指标成分对葛根芩连丸进行质量控制符合中药质量标志物(Q-marker)的选择标准, 有利于该制剂质量控制的科学合理^[19-20]。为了更好地

控制葛根芩连丸的质量, 本实验拟以葛根素为内标物, 采用分离性能优越的超高效液相色谱(UPLC)系统建立 QAMS, 对葛根芩连丸中主要药味葛根、黄芩、黄连中多个指标性成分进行测定, 从而保证该制剂质量的可控性。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Acquity UPLC H-Class 超高效液相色谱仪, QSM 四元泵、SM-FTN 进样器、CH-A 柱温箱、PDA 检测器, 沃特世上海科技有限公司; 色谱柱: Acquity BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), Acquity SunFire™ C₁₈ (150 mm×3.0 mm, 3.5 μm), Acquity XBridge™ C₁₈ (150 mm×3.0 mm, 3.5 μm); KQ5200DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; CP224C 十万分之一分析天平, 上海奥豪斯仪器有限公司。

1.2 材料

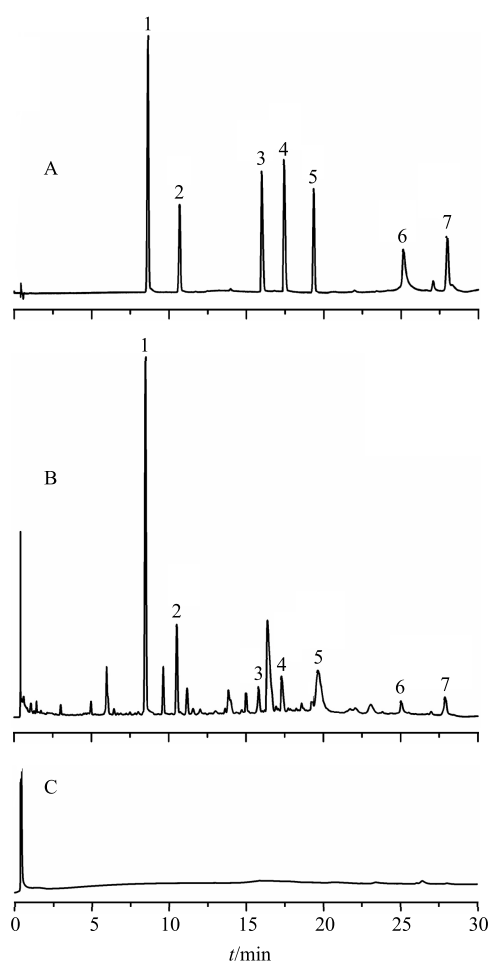
对照品葛根素(批号 MUST-16111007, 质量分数≥98%)、盐酸药根碱(批号 MUST-16040702, 质量分数≥94%)、大豆苷(批号 MUST-16092710, 质量分数≥98%)、黄芩素(批号 MUST-16031618, 质量分数≥98%)、汉黄芩素(批号 MUST-16062507, 质量分数≥98%)、大豆苷元(批号 MUST-16022713, 质量分数≥98%), 均购于成都曼斯特生物科技有限公司; 对照品巴马汀(批号 MUST-16062814, 质量分数≥98%)购于四川省维克奇生物科技有限公司; 葛根芩连丸, 生产批号分别为 150401、151101、151001、141201、160403、160402、161102、140602、160801、160701, 广西花红药业有限公司。

甲醇, 安徽天地高纯溶剂有限公司, 色谱纯, 生产批号 MS1992-001; 水为超纯水; 冰醋酸, 天津科密欧化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Acquity BEH C₁₈ 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为甲醇-0.1%冰醋酸水溶液, 梯度洗脱: 0~1.5 min, 90%~88%甲醇; 1.5~2.5 min, 88%~87%甲醇; 2.5~4 min, 87%~84%甲醇; 4~8 min, 84%~80%甲醇; 8~9 min, 80%~79%甲醇; 9~10 min, 79%甲醇; 10~19 min, 79%~60%甲醇; 19~25 min, 60%~50%甲醇; 25~27 min, 50%~49%甲醇; 27~30 min, 49%~10%甲醇; 体积流量 0.3 mL/min, 检测波长 260 nm, 柱温 30 ℃, 进样量 1 μL。色谱图见图 1。



1-葛根素 2-大豆苷 3-药根碱 4-巴马汀 5-大豆苷元
6-黄芩素 7-汉黄芩素, 下图同
1-puerarin 2-daidzin 3-jatrorrhizine 4-palmatine
5-soybean glycol 6-wogonoside 7-wogonin, same as below

图 1 混合对照品 (A)、葛根芩连丸样品 (B) 和阴性样品 (C) HPLC 谱图

Fig. 1 HPLC spectrum of mixed reference substances (A), GQP (B), and negative samples (C)

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取葛根素、大豆苷、药根碱、巴马汀、大豆苷元、黄芩素、汉黄芩素对照品适量, 置于棕色量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 制成质量浓度分别为 2.360、0.864、1.250、1.396、0.814、2.358、0.916 mg/mL 的单一对照品贮备液; 再分别精密吸取 1 mL 置于同一 10 mL 棕色量瓶中, 以甲醇稀释至刻度, 制成含葛根素 236 μg/mL、大豆苷 86.4 μg/mL、药根碱 125 μg/mL、巴马汀 139.6 μg/mL、大豆苷元 81.4 μg/mL、黄芩素 235.8 μg/mL、汉黄芩素 91.6 μg/mL 的混合对照品溶液。将上述混合对照品溶液用倍半稀释法稀释成 6 个不同质量浓度, 于 4 ℃ 保存, 备用。

2.3 供试品溶液的制备

取葛根芩连丸样品粉末 (过 5 号筛) 约 0.2 g, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 加入 70% 甲醇定容并称定, 超声提取 30 min, 放至室温, 以 70% 甲醇补足减失的质量, 以 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 置于棕色进样小瓶中, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 分别精密吸取“2.2”项下 6 个不同质量浓度的混合对照品溶液各 1 μL, 按“2.1”项下色谱条件测定, 以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制葛根素、大豆苷、药根碱、巴马汀、大豆苷元、黄芩素、汉黄芩素的标准曲线, 进行线性回归, 得到各成分的回归方程及线性范围分别为葛根素 $Y=1\,339.6\,X+0.186\,3$, $R^2=0.999\,9$, 线性范围 7~236 μg/mL; 大豆苷 $Y=1\,360.5\,X+0.090\,2$, $R^2=0.999\,9$, 线性范围 3~86.1 μg/mL; 药根碱 $Y=1\,406.9\,X+0.617\,5$, $R^2=0.999\,9$, 线性范围 4~125 μg/mL; 巴马汀 $Y=1\,391.4\,X+0.311\,9$, $R^2=0.999\,9$, 线性范围 4~139 μg/mL; 大豆苷元 $Y=1\,783.7\,X+0.019\,7$, $R^2=0.999\,8$, 线性范围 2~81 μg/mL; 黄芩素 $Y=849.41\,X-0.554\,5$, $R^2=0.999\,7$, 线性范围 7~236 μg/mL; 汉黄芩素 $Y=1\,213.4\,X+0.032$, $R^2=0.999\,9$, 线性范围 3~92 μg/mL。结果表明 7 种成分在各自范围内线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 取混合对照品溶液连续进样 6 次, 测定其中葛根素、大豆苷、药根碱、巴马汀、大豆苷元、黄芩素、汉黄芩素的峰面积, 其 RSD 值分别为 0.97%、1.48%、1.30%、1.59%、1.53%、1.69%、1.97%, 均小于 2%; 表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 精密称定同一批葛根芩连丸(批号 151001) 约 0.2 g, 按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 测定其中葛根素、大豆苷、药根碱、巴马汀、大豆苷元、黄芩素、汉黄芩素的峰面积, 其 RSD 值分别为 1.18%、1.92%、1.03%、1.87%、1.61%、1.08%、1.93%, 均小于 2%; 表明方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 精密称定同一批葛根芩连丸(批号 151001) 约 0.2 g, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、8、12、16、24 h 进样, 测定其中葛根素、大豆苷、药根碱、巴马汀、大豆苷元、黄芩素、汉黄芩素的峰面积, 其 RSD 值分别为 0.94%、1.29%、1.92%、0.55%、1.99%、1.62%、1.74%, 均小于 2%; 表明供试品溶液在 24 h 内的稳定性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称定已测定各指标分量的葛根芩连丸约 0.1 g, 平行 6 份, 以药材中各成分量-对照品(1:1)的比例加入一定量的对照品溶液, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 测定其中 7 种有效成分的峰面积, 计算各成分的平均加样回收率以及 RSD。结果葛根素、大豆苷、药根碱、巴马汀、大豆苷元、黄芩素、汉黄芩素的平均加样回收率分别为 100.37%、101.99%、104%、100.24%、104.25%、101.85%、99.53%; RSD 分别为 1.97%、1.16%、0.69%、1.97%、0.68%、0.79%、0.82%。表明本方法具有良好的回收率。

2.5 相对校正因子($f_{s/x}$)的确定

2.5.1 相对校正因子的计算方法 在线性范围内各成分的量与响应信号峰面积呈正比增减, 即 $f=W/A$, f 表示校正因子, W 表示成分的量, A 表示仪器响应值。在对葛根芩连丸中 7 种有效成分进行质量控制时, 以葛根素(s)为内参物, 根据公式 $f_{s/x}=f_s/f_x=A_xC_s/(A_sC_x)$ (式中 C_s 、 C_x 分别代表内参物与待测物成分质量浓度, A_s 、 A_x 分别代表内参物与待测成分的仪器响应值) 计算葛根素(s)与大豆苷(B)、药根碱(C)、巴马汀(D)、大豆苷元(E)、黄芩素(F)、汉黄芩素(G)之间的 $f_{s/x}$ 。通过 $f_{s/x}$ 方法计算大豆苷、药根碱、巴马汀、大豆苷元、黄芩素、汉黄芩素 6 种成分的量。

2.5.2 待测成分的 $f_{s/x}$ 的计算 取“2.2”项下的不同质量浓度的混合对照品溶液, 分别进样 1 μ L, 测定葛根素、大豆苷、药根碱、巴马汀、大豆苷元、黄芩素、汉黄芩素的峰面积, 以葛根素为内标物,

分别计算各待测成分与葛根素之间的 $f_{s/x}$, 结果见表 1, 代号同“2.5.1”项。

表 1 6 种指标成分与葛根素的 $f_{s/x}$
Table 1 $f_{s/x}$ of six characteristic components

编号	$f_{s/B}$	$f_{s/C}$	$f_{s/D}$	$f_{s/E}$	$f_{s/F}$	$f_{s/G}$
1	1.013	1.048	1.039	1.333	0.634	0.906
2	1.033	1.076	1.043	1.316	0.624	0.905
3	1.001	1.079	1.046	1.364	0.613	0.905
4	1.002	1.036	1.065	1.321	0.622	0.902
5	1.043	1.070	1.014	1.288	0.628	0.900
6	1.001	1.085	1.064	1.301	0.626	0.905
均值	1.015	1.066	1.045	1.320	0.624	0.904
RSD/%	1.798	1.814	1.782	1.840	1.146	0.254

根据《一测多评法建立的技术指南》, 综合影响校正因子的上述因素, 取各质量浓度下获得的 $f_{s/x}$ 的平均值, 最终确定大豆苷、药根碱、巴马汀、大豆苷元、黄芩素、汉黄芩素与葛根素的 $f_{s/x}$ 分别为 1.02、1.07、1.05、1.32、0.62、0.90。

2.6 $f_{s/x}$ 的耐用性考察

2.6.1 不同色谱柱对 $f_{s/x}$ 的影响 采用 Acquity UPLC H-Class 超高效液相色谱系统, 分别考察了 Waters 公司 3 根不同型号的 UPLC 色谱柱: Acquity BEH C₁₈、Acquity SunFire™ C₁₈、Acquity XBridge™ C₁₈ 对各待测成分的 $f_{s/x}$ 的影响, 色谱图结果见图 2, $f_{s/x}$ 见表 2。结果表明大豆苷、药根碱、巴马汀、大豆苷元、黄芩素、汉黄芩素与内参物葛根素间 $f_{s/x}$ 在不同色谱柱下重现性良好, RSD 在 0.648%~2.741%。

2.6.2 不同检测波长对 $f_{s/x}$ 的影响 采用 Acquity UPLC H-Class 超高效液相色谱系统和 Acquity UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱, 分别考察了不同检测波长(259、260、261 nm) 对各待测成分 $f_{s/x}$ 的影响, 见表 3。结果表明, 大豆苷、药根碱、巴马汀、大豆苷元、黄芩素、汉黄芩素与内参物葛根素间 $f_{s/x}$ 在不同波长下重现性良好, RSD 在 0.510%~2.380%。

2.6.3 不同柱温对 $f_{s/x}$ 的影响 采用 Acquity UPLC H-Class 超高效液相色谱系统和 Acquity UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱, 分别考察了不同柱温(28、30、32 $^{\circ}$ C) 对各待测成分 $f_{s/x}$ 的影响, 见表 4。结果表明, 大豆苷、药根碱、巴马汀、大豆苷元、黄芩素、汉黄芩素与内参物葛根素间 $f_{s/x}$ 在不同柱温下重现性良好, RSD 在 0.627%~1.398%。

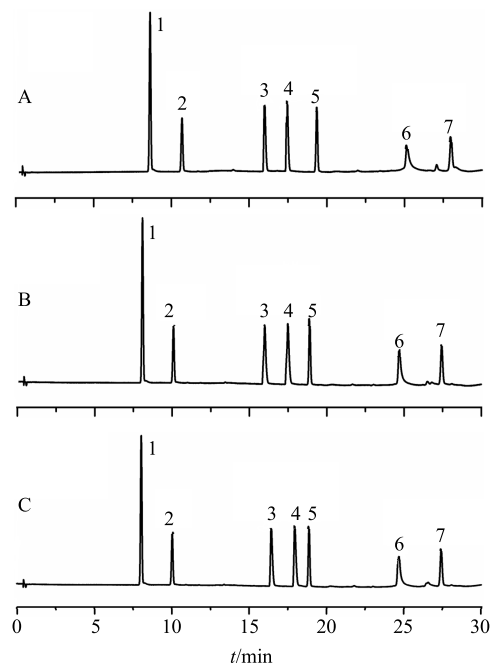


图 2 Acquity SunFire™ C₁₈ (A)、Acquity XBridge™ C₁₈ (B) 和 Acquity BEH C₁₈ (C) 不同色谱柱下的 HPLC 图谱
Fig. 2 HPLC spectrum of different types of chromatographic column Acquity SunFire™ C₁₈ (A), Acquity XBridge™ C₁₈ (B), and Acquity BEH C₁₈ (C)

表 2 色谱柱对 $f_{s/x}$ 的影响

色谱柱	$f_{s/B}$	$f_{s/C}$	$f_{s/D}$	$f_{s/E}$	$f_{s/F}$	$f_{s/G}$
Acquity BEH C ₁₈	1.036	1.086	1.041	1.288	0.622	0.875
Acquity SunFire™ C ₁₈	1.019	1.087	1.011	1.304	0.656	0.891
Acquity XBridge™ C ₁₈	1.041	1.050	0.988	1.292	0.632	0.897
均值	1.032	1.074	1.014	1.294	0.637	0.888
RSD/%	1.077	1.949	2.627	0.648	2.741	1.241

表 3 检测波长对 $f_{s/x}$ 的影响

波长/nm	$f_{s/B}$	$f_{s/C}$	$f_{s/D}$	$f_{s/E}$	$f_{s/F}$	$f_{s/G}$
259	1.033	1.038	1.044	1.288	0.615	0.901
260	1.021	1.088	1.009	1.305	0.626	0.895
261	1.053	1.071	1.015	1.301	0.635	0.904
均值	1.036	1.065	1.022	1.298	0.625	0.900
RSD/%	1.523	2.380	1.827	0.689	1.547	0.511

2.6.4 不同体积流量对 $f_{s/x}$ 的影响 采用 Acquity UPLC H-Class 超高效液相色谱系统和 Acquity UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱，分别考察了不同体积流量（0.2、0.3、0.4 mL/min）对各待测成分 $f_{s/x}$ 的影响，见表 5。结果表明，大豆苷、药根碱、巴马汀、大

表 4 柱温对 $f_{s/x}$ 的影响

柱温/℃	$f_{s/B}$	$f_{s/C}$	$f_{s/D}$	$f_{s/E}$	$f_{s/F}$	$f_{s/G}$
28	1.043	1.072	0.988	1.300	0.628	0.899
30	1.035	1.089	1.014	1.315	0.619	0.888
32	1.028	1.076	1.009	1.290	0.627	0.892
均值	1.035	1.079	1.004	1.302	0.625	0.893
RSD/%	0.697	0.856	1.398	0.977	0.798	0.627

表 5 体积流量对 $f_{s/x}$ 的影响

体积流量/ (mL·min ⁻¹)	$f_{s/B}$	$f_{s/C}$	$f_{s/D}$	$f_{s/E}$	$f_{s/F}$	$f_{s/G}$
0.2	1.039	1.062	1.058	1.291	0.628	0.898
0.3	1.046	1.082	1.023	1.323	0.666	0.893
0.4	1.023	1.063	1.022	1.294	0.654	0.911
均值	1.036	1.069	1.034	1.303	0.649	0.901
RSD/%	1.108	1.038	1.980	1.371	2.946	1.061

豆苷元、黄芩素、汉黄芩素与内参物葛根素间 $f_{s/x}$ 在不同体积流量下重现性良好，RSD 在 1.038%~2.946%。

2.7 待测成分的色谱峰定位

取“2.2”项下的混合对照品溶液，在 Acquity UPLC H-Class 超高效液相色谱系统上，分别采用 Acquity BEH C₁₈、Acquity SunFire™ C₁₈、Acquity XBridge™ C₁₈ 3 种型号色谱柱，测定并计算各待测成分与内参物葛根素的相对保留值（ R ）和保留时间差（ Δt ），见表 6、7。结果显示不同色谱柱下各待测成分间的 R 波动较小，RSD 在 0.339%~2.322%；而各待测成分间的 Δt 波动稍大，RSD 在 0.57%~5.07%；说明 R 更适宜于葛根芩连丸中待测成分 QAMS 的定位。

表 6 不同色谱柱下待测成分的色谱峰定位- R 法

色谱柱	$R_{s/B}$	$R_{s/C}$	$R_{s/D}$	$R_{s/E}$	$R_{s/F}$	$R_{s/G}$
Acquity BEH C ₁₈	1.239	1.787	2.003	2.304	2.972	3.284
Acquity SunFire™ C ₁₈	1.223	1.860	2.038	2.318	2.949	3.237
Acquity XBridge™ C ₁₈	1.237	1.862	2.037	2.317	3.031	3.258
均值	1.233	1.837	2.026	2.313	2.984	3.260
RSD/%	0.694	2.322	0.976	0.339	1.412	0.731

表 7 不同色谱柱下待测成分的色谱峰定位- Δt 法Table 7 Location of chromatographic peaks of components measured under different chromatographic columns- Δt method

色谱柱	$\Delta t_{s/B}$	$\Delta t_{s/C}$	$\Delta t_{s/D}$	$\Delta t_{s/E}$	$\Delta t_{s/F}$	$\Delta t_{s/G}$
Acquity BEH C ₁₈	2.032	6.688	8.521	11.074	16.751	19.402
Acquity SunFire™ C ₁₈	1.897	7.301	8.813	11.189	16.551	18.989
Acquity XBridge™ C ₁₈	2.013	7.323	8.803	11.180	17.246	19.174
均值	1.981	7.104	8.712	11.148	16.849	19.188
RSD/%	3.690	5.074	1.903	0.574	2.123	1.078

2.8 QAMS 与外标法 (ESM) 测定结果的比较

采用 ESM 同时测定 10 个不同批次葛根芩连丸供试品中的 7 种有效成分的量, 由公式 $A_E = a C_E + b$ (式中 A_E 代表待测成分的仪器响应值, a 、 b 分别代表本公式的斜率和截距, C_E 代表 ESM 计算所得待测成分的质量浓度) 计算各指标成分的量, 以验证计算值的准确性和可行性。取 10 个批次葛根芩连丸样品按“2.3”项下制备供试品溶液, 分别采用 ESM 和 QAMS 对其量进行测定, 并采用 SPSS 软件对 2 种方法测得的数据进行对比分析, 见表 8。结

表 8 QAMS 与 ESM 测得 7 种指标成分的结果对比

Table 8 Results of seven characteristic components compared by QAMS and ESM method

批号	葛根素/ (mg·g ⁻¹)	大豆苷/(mg·g ⁻¹)		药根碱/(mg·g ⁻¹)		巴马汀/(mg·g ⁻¹)		大豆苷元/(mg·g ⁻¹)		黄芩素/(mg·g ⁻¹)		汉黄芩素/(mg·g ⁻¹)	
		ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS
150401	8.923	2.468	2.459	0.848	0.852	1.280	1.274	2.624	2.621	0.909	0.901	0.967	0.961
151101	9.314	2.983	2.988	1.193	1.197	1.530	1.522	2.700	2.698	0.926	0.922	1.098	1.092
151001	9.355	2.585	2.589	1.154	1.159	1.461	1.460	2.723	2.713	0.956	0.951	0.908	0.901
141201	10.009	2.650	2.657	1.113	1.117	1.461	1.459	2.509	2.504	0.949	0.942	0.989	0.981
160403	9.785	2.553	2.555	1.160	1.169	1.308	1.301	2.613	2.610	0.894	0.891	0.969	0.960
160402	9.623	2.498	2.501	1.187	1.188	1.373	1.371	2.527	2.521	0.912	0.910	0.995	0.989
161102	10.012	2.638	2.639	1.028	1.036	1.300	1.295	2.668	2.667	0.855	0.848	0.917	0.911
140602	10.399	2.723	2.729	1.179	1.186	1.395	1.391	2.583	2.573	0.837	0.836	0.913	0.911
160801	10.573	2.226	2.231	0.918	0.921	1.396	1.391	2.332	2.330	0.851	0.847	0.902	0.901
160701	10.746	2.385	2.391	1.085	1.089	1.339	1.331	2.689	2.683	0.909	0.901	0.967	0.964

果表明, 常规 ESM 实测量与本实验所建立的 QAMS 计算所得量, 经配对 t 检验结果显示, 2 种方法所得量值无显著性差异 ($P > 0.05$), 证明本实验所建立的 QAMS 具有较好的准确性和可行性, 所得结果可靠。

3 讨论

本实验首先分别以甲醇、70%甲醇、90%乙醇、70%乙醇、50%乙醇作为提取溶剂对葛根芩连丸的提取效果进行了对比, 结果表明用 70%甲醇作为提取溶剂时, 7 种有效成分的量较高, 且色谱峰的分离效果最佳。其次本实验对流动相也进行了考察, 分别考察了甲醇-0.1%冰醋酸、乙腈-0.1%冰醋酸溶液系统, 其中采用甲醇-0.1%冰醋酸溶液系统, 基线平整, 峰型较好, 没有拖尾现象, 分离效果理想。

方中葛根为君药, 葛根素为葛根主要有效成分且其量较高, 故《中国药典》2015 年版规定葛根素为其指标性成分; 同时葛根素对照品性质稳定、价廉易得, 故本实验选用葛根素作为内标物进行其他

指标成分的 QAMS 定量测定。

本实验建立葛根素与其他 6 种有效成分的 $f_{s/x}$, 并考察了不同规格色谱柱、检测波长、柱温、体积流量对相对保留因子的影响, 结果 RSD 均 $< 3\%$, 表明各成分的相对保留因子重复性良好。实验中还分别考察了 R 和 Δt 2 种方法的重复性, 可以看出 7 种有效成分在不同色谱柱中出峰时间的变化。结果发现不同色谱柱上各成分の出峰时间有所差别, 相比之下, R 的 RSD 变化相对较小, 而 Δt 较不稳定 ($RSD > 5\%$), 所以, R 更适合作为待测成分色谱峰定位的依据; 因此葛根芩连丸中 7 种有效成分的色谱峰定位采用 R 法。本实验采用 QAMS 与传统 ESM 分别对 10 个不同批次的葛根芩连丸中多种指标性成分进行了定量测定, 结果显示 2 种方法测定值无显著性差异; 说明在无对照品的情况下, 可以通过 QAMS 实现葛根芩连丸多种指标成分定量测定, 方法准确可行, 结果可靠, 可以为中药制剂 QAMS 的进一步研究提供参考。

参考文献

- [1] 黄泰康, 施 诚. 中药方剂现代研究大典 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1996.
- [2] 吕晓霞, 陈宗良, 陈桂茜, 等. 一测多评法在仙灵骨葆胶囊中多成分检测的应用研究 [J]. 中草药, 2016, 47(24): 4374-4378.
- [3] Liu C X, Cheng Y Y, Guo D A, *et al.* A new concept on quality marker for quality assessment and process control of Chinese medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(1): 3-13.
- [4] 郭 盛, 段金彪, 朱邵晴, 等. 基于一测多评法的大枣药材三萜酸类化学成分检测分析方法的建立 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3884-3889.
- [5] Wang L, Zhang Y, Sun X, *et al.* Simultaneous quantitative analysis of main components in *linderae reflexae radix* with one single marker [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2016, 39(8): 422-427.
- [6] 崔 璐, 包永睿, 孟宪生, 等. 一测多评法测定前列癉闭通片中 8 种成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(5): 89-95.
- [7] 刘慧妍, 沈国滨. 一测多评法同时测定野菊花中 7 种成分 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2012-2013.
- [8] Sun J, Jiang Z Z, Yan R Q, *et al.* Quality evaluation of *Astragali Radix* products by quantitative analysis of multi-components by single marker [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(4): 272-279.
- [9] 张 婷, 郑 夺, 王文彤, 等. 指纹图谱结合一测多评模式在参芎养心颗粒质量评价中的应用研究 [J]. 中草药, 2015, 46(13): 1920-1925.
- [10] 程丽丽, 许妍妍, Nyirimigabo E, 等. 一测多评法测定乌头类药材中生物碱 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 528-534.
- [11] 陈 俊, 许 浚, 张静雅, 等. 基于一测多评法对延胡索中生物碱类成分的质量控制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(3): 493-498.
- [12] 王晓燕, 霍甜甜, 李振国. 一测多评法同时测定杞菊地黄口服液 4 种有效成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(2): 290-296.
- [13] 骆红飞, 黄丽娜. 反相高效液相色谱法测定葛根芩连丸中葛根素的含量 [J]. 浙江中医杂志, 2013, 48(3): 225-226.
- [14] 陈丽红, 唐于平, 王 强. 葛根芩连汤的现代研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 676-680.
- [15] 李 杰, 戚团结, 刘 汶, 等. 葛根芩连丸联合整肠生胶囊治疗急性腹泻 62 例 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(7): 1421-1422.
- [16] 吴文杰, 邓 阳, 谭桂林, 等. 一测多评法测定葛根药材中 5 种异黄酮类成分 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 777-781.
- [17] He F C, Li S X, Zhao Z Q, *et al.* Simultaneous quantitative analysis of four lignanoids in *Schisandra chinensis* by quantitative analysis of multi-components by single marker [J]. *Acta Pharm Sin*, 2012, 47(7): 930-932.
- [18] 赵灵灵, 屈会化, 赵 琰, 等. 葛根芩连汤中四种主要活性成分的分析方法研究进展 [A]. // 全国第二十二次仲景学说学术年会论文集 [C]. 北京: 人民卫生出版社, 2014.
- [19] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [20] 张铁军, 许 浚, 韩彦琪, 等. 中药质量标志物 (Q-marker) 研究: 延胡索质量评价及质量标准研究 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1458-1467.