

玉泉丸 HPLC 指纹图谱的建立及 6 个成分定量分析

祁 航, 谢 涛, 吕东峰, 张春腾, 李 伟, 于德红*

华北理工大学药学院, 河北 唐山 063210

摘要:目的 建立玉泉丸 HPLC 指纹图谱,并同时测定玉泉丸中 6 种成分含量,为玉泉丸质量控制提供科学依据。方法 采用 HPLC 法, Symmetry C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C。建立 11 批玉泉丸 HPLC 指纹图谱, 用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2012A 版)、聚类分析及主成分分析进行评价, 同时测定葛根素、大豆苷元、毛蕊花糖苷、五味子醇甲、甘草酸及甘草苷的含量。结果 建立了玉泉丸的 HPLC 指纹图谱, 标定了共有峰 12 个, 各批相似度均在 0.9 以上。多成分定量分析条件通过方法学考察, 6 个成分加样回收率均在 92.06%~109.34%, RSD 均在 0.22%~2.76%。11 批玉泉丸中葛根素、大豆苷元、毛蕊花糖苷、五味子醇甲、甘草酸及甘草苷含量范围分别为 0.838~2.777、0.550~1.014、0.312~0.618、0.023~0.092、1.154~1.674、0.035~0.052 mg/g。结论 HPLC 指纹图谱结合多成分同时测定的方法, 快速、简便、重复性好, 可为玉泉丸的质量控制提供方法学参考。

关键词: 玉泉丸; HPLC; 指纹图谱; 葛根素; 大豆苷元; 毛蕊花糖苷; 五味子醇甲; 甘草酸; 甘草苷; 质量控制; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)23-5753-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.23.016

Establishment of HPLC fingerprint of Yuquan Pills and quantitative analysis of six components

QI Hang, XIE Tao, LV Dong-feng, ZHANG Chun-teng, LI Wei, YU De-hong

School of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

Abstract: Objective In order to provide a scientific basis for the quality control of Yuquan Pills (YP), HPLC fingerprint strategy was established and six components were determined. **Methods** The HPLC analysis was performed on Symmetry C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), using acetonitrile and 0.1% phosphoric acid solution as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min, and the column temperature was 30 °C. The fingerprints of 11 batches of YP were established and evaluated by the similarity evaluation system of TCM (version 2012A), clustering analysis and principal component analysis. Furthermore, the content of puerarin, daidzein, verbascoside, schisandrin, glycyrrhizic acid, and glycyrrhizin was determined. **Results** The HPLC fingerprint with 12 common peaks of YP was established, and the similarities of samples were over 0.9. After validating the multiple component quantitative analysis condition through methodology, the average recoveries ($n = 9$) were between 92.06% and 109.34%, and the RSD were in the range of 0.22%—2.76%. The content of puerarin, daidzein, verbascoside, schisandrin, glycyrrhizic acid, and glycyrrhizin in 11 batches of YP were in the range of 0.838—2.777, 0.550—1.014, 0.312—0.618, 0.023—0.092, 1.154—1.674, 0.035—0.052 mg/g, respectively. **Conclusion** The combination methods of HPLC fingerprint and simultaneous determinations of multiple components are rapid, simple and reproducible, which can provide methodological reference for the quality control of YP.

Key words: Yuquan Pills; HPLC; fingerprint; puerarin; daidzein; verbascoside; schisandrin; glycyrrhizic acid; glycyrrhizin; quality control; CA; PCA

玉泉丸是清代叶天士的经典名方, 收录在《种福堂公选良方》卷二消渴, 被誉为消渴之神药也^[1]。

该方是由葛根、地黄、天花粉、麦冬、五味子及甘草制成的浓缩丸。其中葛根为君药, 地黄、天花粉

收稿日期: 2019-07-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81573560); 河北省科技支撑项目 (No.13226805D)

作者简介: 祁 航 (1993—), 在读硕士, 研究方向为中药质量控制。E-mail: mhpng3539@163.com

*通信作者 于德红 (1971—), 副教授, 博士, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: ydh613@163.com

为臣药, 麦冬、五味子为佐药, 甘草为使药。玉泉丸是国家保密品种, 卫生部颁标准 WS₃-B-3802-98 对玉泉丸的质量控制仅规定了对葛根素的鉴别项。近年仅有关于葛根素、大豆苷元、甘草次酸、甘草酸及甘草苷等成分的含量测定的文献报道^[2-4], 目前尚未见指纹图谱的相关研究。

指纹图谱是评价药物整体质量的有效手段, 《中国药典》2015 年版将其作为中药质量控制标准之一^[5-8]。而指纹图谱结合聚类分析(cluster analysis, CA)和主成分分析(principal component analysis, PCA)法可对指纹图谱大量信息进行简单化处理, 更加便于数据分析^[9-11]。本研究用 HPLC 法建立玉泉丸指纹图谱, 并结合 CA 与 PCA 方法进行质量分析; 通过与混合对照品对比指认了 6 个主要成分(葛根素、大豆苷元、毛蕊花糖苷、五味子醇甲、甘草酸及甘草苷), 并进行了定量分析, 以期为该复方制剂的质量控制提供方法学参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters-e2695-2998 高效液相色谱仪, 美国沃特世公司, 配备自动进样器, 四元低压混合泵, PDA 检测器; Symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); AT 201 电子天平、AG 135 电子天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; KQ-300DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试剂与样品

乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯), 美国默克公司; 去离子水为实验室自制, 其他试剂均为分析纯。

对照品葛根素(批号 681-99-0, 质量分数≥98%), 购自大连美仑生物技术有限公司; 毛蕊花糖苷(批号 61276-17-3, 质量分数≥98%)、大豆苷元(批号 111502-200402, 质量分数≥98%)、五味子醇甲(批号 110857-201714, 质量分数≥98%)、甘草苷(批号 111610-201607, 质量分数≥93%)和甘草酸(批号 110731-201619, 质量分数≥93%)均购自中国食品药品检定研究院; 玉泉丸样品批号 161101、161201、161202、170101、170301、170801、180402、180601、181101、181103、181104, 分别编号为 S1~S11, 有效期 36 个月, 由成都九芝堂金鼎药业有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取干燥至恒定质量的葛根素对照品 10

mg 放置于 1 mL 量瓶、毛蕊花糖苷对照品 10 mg 放置于 5 mL 量瓶、甘草酸对照品 10 mg 放置于 10 mL 量瓶、甘草苷对照品 10 mg 放置于 25 mL 量瓶、大豆苷元对照品 10 mg 放置于 5 mL 量瓶、五味子醇甲对照品 10 mg 放置于 100 mL 量瓶用 50% 甲醇溶解并定容。分别取葛根素对照品溶液 0.5 mL、毛蕊花糖苷对照品溶液 1.0 mL、甘草酸对照品溶液 1.5 mL、甘草苷对照品溶液 0.5 mL、大豆苷元对照品溶液 2 mL、五味子醇甲对照品溶液 1.5 mL 置于同一 10 mL 量瓶中, 并用 50% 甲醇定容制成质量浓度分别为 539.576、207.703、146.074、20.140、388.041、15.420 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取玉泉丸样品适量, 粉碎后过 4 号筛, 精密称定 6 g, 加 50% 甲醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中, 超声提取 30 min, 冷却后定容, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液为供试品溶液。

2.3 色谱条件

Symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相, 线性洗脱梯度: 0~8.0 min, 12%~34% 乙腈; 8.0~8.1 min, 34%~45% 乙腈; 8.1~16.0 min, 45%~65% 乙腈; 16.0~20.0 min, 65% 乙腈; 20.0~20.1 min, 65%~100% 乙腈; 20.1~25.0 min, 100% 乙腈; 平衡时间 10 min; 体积流量 1.0 mL/min; 0~7.5 min、11.0~25.0 min 波长 252 nm, 7.5~11.0 min 波长 280 nm; 柱温 30 °C; 进样量 5 μL; 理论塔板数按葛根素峰计算不低于 3 000。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密称取玉泉丸(S8)1 份 6 g, 按“2.2”项方法制备供试品溶液, 按“2.3”项色谱条件, 连续进样 6 次。以 6 号峰毛蕊花糖苷为参比峰, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 精密称取(S8)玉泉丸 6 份, 每份 6 g, 按“2.2”项方法制备供试品溶液, 按“2.3”项色谱条件进样。以 6 号峰毛蕊花糖苷为参比峰, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%, 表明本方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 精密称取玉泉丸(S9)1 份 6 g, 按“2.2”项方法制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、

6、8、10、12、24、48 h 进样分析。以 6 号峰毛蕊花糖苷为参比峰, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%, 样品在 48 h 内稳定性良好。

2.5 HPLC 指纹图谱的生成与相似度评价、共有峰相关分析

2.5.1 指纹图谱的生成 分别取 11 批样品按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.3”项下色谱条件进样分析。将 11 批样品色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012A 版)》进行分析, 以 S10 为参照图谱, 时间窗宽度为 0.1 min, 对色谱峰进行多点校正和全峰匹配, 得到指纹图谱, 见图 1。其中保留时间稳定的共有峰有 12 个, 通过混合对照品色谱图, 可以确定 3 号峰为葛根素, 6 号峰为毛蕊花糖苷, 7 号峰为甘草苷, 8 号峰为大豆苷元, 10 号峰为甘草酸, 12 号峰为五味子醇甲。

2.5.2 相似度评价及 CA 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012A 版)》进行整体相似度评价。结果显示, S1~S11 批玉泉丸与对照图谱的相似度分别为 0.975、0.924、0.999、0.996、0.987、0.967、0.994、0.940、0.995、0.996、0.997, 11 批样品的相似度为 0.924~0.999, 表明各批次样品的化学成分基本一致, 但各个成分的含量存在差异。其中 6 号峰分离度好, 峰面积较为稳定且保留时间合适, 因此确定毛蕊花糖苷为参照峰。其他峰相对于毛蕊花糖苷的相对保留时间及相对峰面积, 见表 1、2。

表 1 11 批样品 HPLC 指纹图共有峰的相对保留时间

Table 1 Relative retention time of common peaks in HPLC chromatograms of 11 batches of samples

峰号	相对保留时间										
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
1	0.388	0.388	0.388	0.389	0.388	0.389	0.388	0.388	0.388	0.388	0.387
2	0.559	0.558	0.558	0.559	0.558	0.559	0.558	0.559	0.558	0.558	0.558
3	0.732	0.732	0.732	0.732	0.732	0.732	0.733	0.732	0.732	0.732	0.732
4	0.872	0.872	0.872	0.873	0.873	0.873	0.873	0.873	0.873	0.872	0.872
5	0.896	0.897	0.896	0.897	0.897	0.897	0.897	0.897	0.897	0.896	0.897
6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
7	1.043	1.043	1.043	1.043	1.043	1.044	1.044	1.044	1.044	1.043	1.043
8	1.398	1.397	1.398	1.398	1.398	1.399	1.400	1.400	1.399	1.401	1.397
9	1.494	1.493	1.493	1.494	1.494	1.494	1.496	1.496	1.495	1.497	1.492
10	1.550	1.549	1.549	1.550	1.550	1.550	1.552	1.552	1.551	1.553	1.548
11	1.643	1.642	1.642	1.643	1.643	1.644	1.645	1.645	1.645	1.646	1.641
12	2.038	2.036	2.037	2.038	2.037	2.038	2.040	2.041	2.040	2.042	2.035

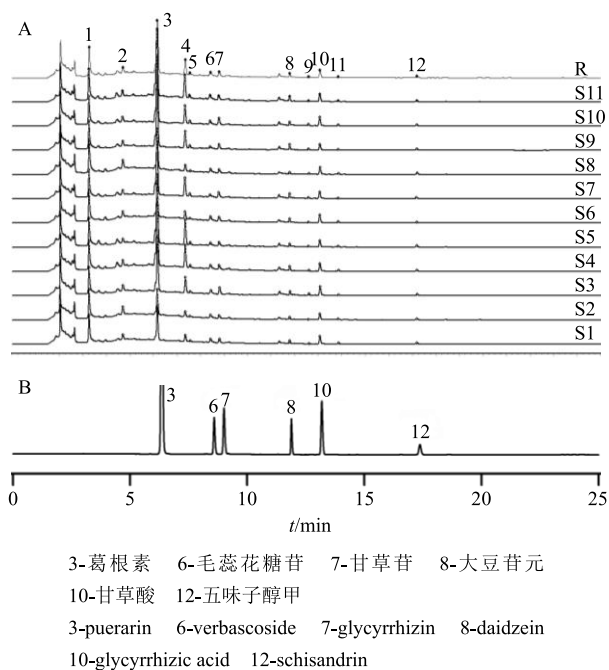


图 1 11 批样品 HPLC 叠加指纹图谱 (A) 与对照品 HPLC 色谱图 (B)

Fig. 1 HPLC superposed fingerprints of 11 batches of samples (A) and HPLC chromatograph of control substance (B)

采用 SPSS 19.0 数据分析软件, 将 11 批样品的共有峰面积数据, 运用组间对比进行聚类, 用平方 Euclidean 距离计算样品相似程度, 聚类结果见图 2。根据聚类树状图, 11 个样品被分成了 4 类: S9、S11、S6、S10 为一类, S3、S5、S2、S7、S4 为一类, S8 为一类, S1 为一类。

表 2 11 批样品 HPLC 指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 2 Relative peak area of common peaks in HPLC chromatograms of 11 batches of samples

峰号	相对峰面积										
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
1	4.604	4.163	5.702	6.319	3.492	3.683	4.605	4.076	3.838	3.468	4.688
2	0.706	0.587	1.344	1.195	0.493	0.400	0.676	0.560	0.585	0.532	0.721
3	5.306	5.277	5.259	6.087	9.005	1.165	12.036	11.146	10.204	8.522	9.761
4	1.774	1.405	1.014	1.752	2.879	3.923	3.086	3.018	2.685	0.277	2.929
5	0.376	0.220	0.255	0.230	0.360	0.424	0.425	0.408	0.390	0.353	0.327
6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
7	0.709	0.659	0.671	0.727	0.500	0.602	0.803	0.799	0.900	0.486	1.190
8	0.308	0.239	0.236	0.188	0.279	0.239	0.561	0.398	0.285	0.315	0.615
9	0.089	0.091	0.094	0.108	0.066	0.107	0.142	0.145	0.161	0.065	0.263
10	1.166	1.138	1.209	1.325	0.860	0.902	1.023	1.014	1.184	0.833	1.568
11	0.159	0.164	0.172	0.188	0.115	0.092	0.085	0.084	0.101	0.111	0.131
12	0.188	0.243	0.316	0.348	0.173	0.238	0.251	0.195	0.227	0.170	0.246

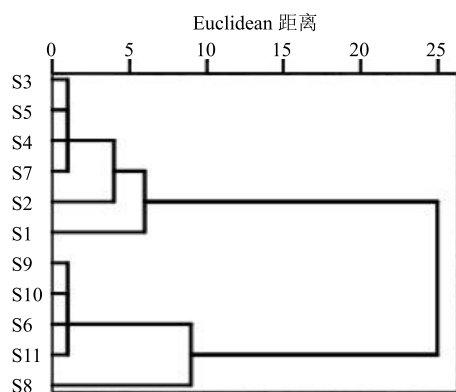


图 2 11 批玉泉丸聚类分析树状图

Fig. 2 Cluster analysis of 11 batches of YP

2.5.3 PCA PCA 是利用降维的手段,使问题分析更加方便直观。结果第 1 主成分特征值为 4.662,方差贡献率为 38.850%;第 2 主成分特征值为 2.801,方差贡献率为 23.346%;第 3 主成分特征值为 1.673,方差贡献率为 13.946%;第 4 主成分特征值为 1.111,方差贡献率为 9.261%;前 4 个主成分累积方差贡献率为 85.403%,其他主成分特征值的贡献率依次减少。故可用提取的 4 个主成分代表指纹图谱对样品进行分析。第 1 主成分主要反映了峰 2~5、7~10 的信息;第 2 主成分反映了峰 1、6、11 的主要信息,第 3 主成分反映了峰 10 的信息;第 4 主成分反映了峰 12 的信息,见图 3。

主成分的模型为 $Y_1 = -0.053 Z_1 - 0.286 Z_2 + 0.317 Z_3 + 0.276 Z_4 + 0.326 Z_5 + 0.236 Z_6 + 0.403 Z_7 + 0.384 Z_8 + 0.365 Z_9 + 0.296 Z_{10} - 0.192 Z_{11} - 0.091$

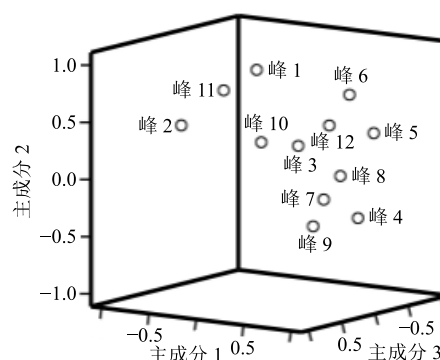


图 3 11 批玉泉丸中 12 个成分载荷图

Fig. 3 Loading diagram of 12 components in 11 batches of YP

$Z_{12}; Y_2 = 0.541 Z_1 + 0.256 Z_2 + 0.302 Z_3 - 0.235 Z_4 + 0.208 Z_5 + 0.405 Z_6 - 0.044 Z_7 + 0.050 Z_8 - 0.185 Z_9 + 0.228 Z_{10} + 0.421 Z_{11} + 0.142 Z_{12}; Y_3 = 0.029 Z_1 + 0.350 Z_2 + 0.063 Z_3 - 0.369 Z_4 - 0.433 Z_5 - 0.366 Z_6 + 0.334 Z_7 + 0.094 Z_8 + 0.366 Z_9 + 0.377 Z_{10} + 0.082 Z_{11} - 0.115 Z_{12}; Y_4 = 0.091 Z_1 + 0.064 Z_2 - 0.108 Z_3 + 0.250 Z_4 - 0.050 Z_5 - 0.025 Z_6 + 0.140 Z_7 - 0.289 Z_8 + 0.208 Z_9 + 0.148 Z_{10} - 0.117 Z_{11} + 0.854 Z_{12}。$

$Y_1 \sim Y_4$ 代表 4 个主成分, $Z_1 \sim Z_{12}$ 分别代表各个色谱峰的相对峰面积经标准化的数据。式中 Y_1 的特征值最大,所涵盖信息最多,主成分 1 中系数较大的为峰 7~9、5、3、10,表明共有峰 7~9、5、3、10 在玉泉丸质量控制中起着较重要的作用,见表 3。其中峰 7 和 8 变异系数最大,即甘草苷和大豆苷元是影响样品差异的重要因素,企业在生产中应着重

表 3 11 批玉泉丸初始载荷矩阵

Table 3 Primary factor loading matrix of 11 batches of YP

峰号	主成分			
	1	2	3	4
1	-0.114	0.906	0.038	0.096
2	-0.618	0.429	0.453	0.067
3	0.685	0.506	0.082	-0.114
4	0.596	-0.394	-0.477	0.264
5	0.704	0.348	-0.560	-0.053
6	0.509	0.677	-0.473	-0.026
7	0.871	-0.073	0.432	0.148
8	0.829	0.084	0.122	-0.305
9	0.788	-0.310	0.473	0.219
10	0.640	0.381	0.487	0.156
11	-0.414	0.705	0.106	-0.123
12	-0.196	0.237	-0.149	0.900

关注这 2 个成分的质量变化, 可以更有效地控制药物批次间的质量。

以上述 4 个主成分因子对 11 批样品的质量进行综合评分 (Y), 结果见表 4。可知, S10 样品的综合得分最高, 整体质量相对较好。

$$Y = 4.662 Y_1 / (4.662 + 2.801 + 1.673 + 1.111) + 2.801 Y_2 / (4.662 + 2.801 + 1.673 + 1.111) + 1.673 Y_3 / (4.662 + 2.801 + 1.673 + 1.111) + 1.111 Y_4 / (4.662 + 2.801 + 1.673 + 1.111)$$

2.6 玉泉丸中 6 个成分含量测定

2.6.1 线性关系考察 精密吸取“2.1”项下对照品溶液, 50%甲醇稀释成 6 个质量浓度, 在“2.3”项

色谱条件下测定。依次进样, 以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 分别绘制标准曲线得到回归方程, 结果分别为葛根素 $Y = 4 \times 10^6 X + 136\ 434$, $r = 0.999\ 5$, 线性范围 $10.792 \sim 539.576\ \mu\text{g/mL}$; 毛蕊花糖苷 $Y = 858\ 421 X - 21\ 656$, $r = 0.999\ 6$, 线性范围 $4.154 \sim 207.703\ \mu\text{g/mL}$; 甘草苷 $Y = 2 \times 10^6 X - 34\ 507$, $r = 0.999\ 5$, 线性范围 $2.922 \sim 146.074\ \mu\text{g/mL}$; 大豆苷元 $Y = 7 \times 10^6 X - 16\ 587$, $r = 0.999\ 6$, 线性范围 $0.402 \sim 20.140\ \mu\text{g/mL}$; 甘草酸 $Y = 716\ 259 X - 35\ 859$, $r = 0.999\ 5$, 线性范围 $7.761 \sim 388.041\ \mu\text{g/mL}$; 五味子醇甲 $Y = 5 \times 10^6 X - 11\ 497$, $r = 0.999\ 5$, 线性范围 $0.310\ 8 \sim 15.420\ 0\ \mu\text{g/mL}$ 。

2.6.2 精密度试验 取混合对照品溶液, 按“2.3”项色谱条件, 连续进样 6 次。葛根素、毛蕊花糖苷、甘草苷、大豆苷元、甘草酸和五味子醇甲峰面积的 RSD 为 0.45%、0.93%、0.66%、0.64%、0.64%、0.88%。

2.6.3 重复性试验 精密称取玉泉丸 (S8) 6 份, 每份 6 g, 按“2.2”项方法制备供试品溶液, 按“2.3”项色谱条件进样测定。葛根素、毛蕊花糖苷、甘草苷、大豆苷元、甘草酸和五味子醇甲质量分数的 RSD 为 1.13%、1.31%、1.23%、0.82%、0.56%、1.50%。

2.6.4 稳定性试验 精密称取玉泉丸 (S9) 1 份 6 g, 按“2.2”项方法制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、10、12、24、48 h 进样分析。结果葛根素、毛蕊花糖苷、甘草苷、大豆苷元、甘草酸和五味子醇甲峰面积的 RSD 为 1.17%、1.41%、0.66%、0.83%、1.17%、1.73%, 结果表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.6.5 加样回收率试验 精密称取批次 (S8) 玉泉丸 9 份, 每份 3 g, 并按样品中各成分量 1:0.5、1:1、1:1.5 加入混合对照品, 按“2.2”项方法制备供试品溶液, 按“2.3”项色谱条件进样分析。结果葛根素的平均回收率分别为 97.18%、98.84%、97.46%, RSD 分别为 0.41%、0.88%、0.22%; 毛蕊花糖苷的平均回收率为 92.06%、105.76%、104.63%, RSD 分别为 0.43%、0.91%、0.32%; 甘草苷的平均回收率为 103.67%、106.60%、106.30%, RSD 分别为 0.88%、0.37%、0.41%; 大豆苷元的平均回收率分别为 93.72%、107.11%、97.57%, RSD 分别为 0.79%、2.76%、1.47%; 甘草酸的平均回收率为 93.60%、108.54%、109.34%, RSD 分别为 1.29%、0.49%、1.04%; 五味子醇甲的平均回收率分别为

表 4 11 批玉泉丸主成分得分、综合得分和排名统计

Table 4 Main component factor score, comprehensive score and ranking of 11 batches of YP

批号	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4	综合得分	排名
S1	-1.602	-0.837	0.345	-0.816	-1.012	10
S2	-3.452	-0.589	0.408	-0.813	-1.800	11
S3	2.850	-0.174	-0.053	-2.337	0.960	3
S4	0.480	1.050	-0.928	1.578	0.559	4
S5	0.035	-2.812	0.909	1.677	-0.326	8
S6	-0.887	0.077	-1.242	-0.782	-0.685	9
S7	1.703	-1.174	-1.041	0.003	0.342	6
S8	2.503	1.300	1.205	0.079	1.681	2
S9	1.118	-1.216	-0.886	0.552	0.157	7
S10	3.019	1.531	2.564	0.249	2.206	1
S11	-0.153	2.843	-1.282	0.611	0.529	5

105.51%、98.91%、99.53%，RSD 分别为 2.40%、0.34%、2.20%。

2.6.6 含量测定 取 11 批待测样品，按“2.2”项

下方法制备，按“2.3”项下色谱条件进样分析。计算得葛根素、毛蕊花糖苷、甘草苷、大豆苷元、甘草酸和五味子醇甲的含量见表 5。

表 5 6 个化合物在玉泉丸中的质量分数

Table 5 Content of six compounds in YP

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	葛根素	毛蕊花糖苷	甘草苷	大豆苷元	甘草酸	五味子醇甲
S1	1.123	0.853	0.460	0.047	1.480	0.035
S2	1.127	0.800	0.440	0.034	1.428	0.046
S3	0.838	0.690	0.367	0.027	1.154	0.044
S4	1.010	0.751	0.400	0.024	1.355	0.051
S5	2.739	1.014	0.454	0.056	1.450	0.046
S6	2.753	0.664	0.448	0.052	1.183	0.048
S7	2.490	0.550	0.487	0.092	1.161	0.043
S8	2.644	0.641	0.538	0.079	1.353	0.040
S9	2.610	0.952	0.618	0.070	1.674	0.050
S10	2.777	0.936	0.461	0.063	1.541	0.045
S11	1.047	0.609	0.312	0.023	1.389	0.052

3 讨论

3.1 提取方法的考察

实验分别考察了以水和不同体积分数的甲醇为提取溶剂，实验结果表明以水为提取溶剂有效成分的提取率最低，以 50%甲醇为提取溶剂时，效果最好，且提取液易于滤过。实验对超声时间（15、30、60 min）进行考察，以有效成分提取率为指标，结果发现 30~60 min 提取率并无增大，故选用 30 min。

3.2 检测波长的考察

葛根素、大豆苷元、五味子醇甲和甘草酸最大吸收波长为 252 nm；毛蕊花糖苷及甘草苷在 280 nm 有良好的吸收峰^[12-15]，且分离效果较好。故选用紫外检测器波长切换法，在一张色谱图中有效成分均能较好地分离。

3.3 色谱条件的考察

实验中对比了甲醇-水、乙腈-水，发现乙腈-水能实现较好的色谱分离。水相中加入不同体积分数的甲酸、磷酸及冰醋酸^[16-17]，结果磷酸色谱图分离较好，且 0.1%磷酸和 0.2%磷酸，分离效果相同。故选用 0.1%磷酸水溶液-乙腈为流动相。实验中对流动相的比例及梯度洗脱进行了摸索，最终得到了本实验的流动相条件。

3.4 CA 和 PCA 法

指纹图谱结合 CA 法将 11 批玉泉丸分为 4 类，

S9、S11、S6、S10 为一类，S3、S5、S2、S7、S4 为一类，S8 为一类，S1 为一类，可直观地比较各类中的成分和含量差异；通过指纹图谱结合 PCA 法可知甘草苷和大豆苷元是影响 11 批玉泉丸各批次间差异的原因，在生产中应着重注意。

本研究利用波长切换法建立了 11 批玉泉丸 HPLC 指纹图谱，共有峰 12 个，各批次间相似度均高于 0.924；并指认了 6 个共有峰，分别为葛根素、大豆苷元、毛蕊花糖苷、五味子醇甲、甘草酸及甘草苷，同时对这 6 个成分进行了含量测定。玉泉丸指纹图谱结合 CA 和 PCA 的同时对多指标进行含量测定的方法，快速、简便、重复性好，可以为玉泉丸质量控制提供方法学参考。

参考文献

- [1] 高 翌, 骆天炯, 叶晨玉. 玉泉丸对气阴两虚型接受胰岛素治疗的糖尿病患者血糖波动的影响 [J]. 中草药, 2015, 46(15): 2275-2278.
- [2] 史培颖, 林逢林, 陈芳美, 等. 高效液相色谱法同时测定玉泉丸中的葛根素及甘草酸 [J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(20): 1657-1659.
- [3] 方文清. 玉泉丸的质量标准研究 [J]. 海峡药学, 2012, 24(10): 58-60.
- [4] 李少光, 蔡林雪, 姚 宏, 等. HPLC 法同时测定玉泉丸中 5 个成分的含量 [J]. 福建医科大学学报, 2016,

- 50(3): 155-158.
- [5] 侯文, 刘宏胜, 王树森, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和多成分同时测定的护肝剂质量评价研究 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5830-5835.
- [6] Ma X, Zou H M, Pan Y B, *et al.* Quality assessment of *Pollen Typhae* by high-performance liquid chromatography fingerprint, hierarchical cluster analysis, and principal component analysis [J]. *Pharmacogn Mag*, 2019, 15(61): 177-182.
- [7] Xiong J, Zheng T J, Shi Y, *et al.* Analysis of the fingerprint profile of bioactive constituents of traditional Chinese medicinal materials derived from animal bile using the HPLC-ELSD and chemometric methods: An application of a reference scaleplate [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 174: 50-56.
- [8] Laura M P, Alberto Z G, Samuel C M, *et al.* Analysis of *Phlebodium decumanum* fronds by high-performance liquid chromatography by ultraviolet-visible and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (HPLC-UV-VIS-QTOF-MS/MS) [J]. *Anal Lett*, 2019, 52(13): 2107-2132.
- [9] 林源, 陈敏. 小儿柴桂退热颗粒的 UPLC 指纹图谱及聚类、主成分分析 [J]. 中国药房, 2018, 29(4): 474-477.
- [10] 李潮, 于欢, 温柔, 等. 江西不同产区车前子药材的 HPLC 指纹图谱及其多成分化学模式识别分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15): 161-167.
- [11] 付小梅, 孙菡, 刘婧, 等. 基于聚类分析和主成分分析的栀子指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2018, 49(19): 4653-4661.
- [12] 罗燕燕, 刘效栓, 肖正国, 等. HPLC 双波长法同时测定甘草药渣提取物中甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素及甘草酸含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(12): 64-67.
- [13] 胡玮, 顾丽亚, 周亚萍, 等. HPLC 法同时测定温肾养肝颗粒中 4 种成分 [J]. 中成药, 2019, 41(4): 756-759.
- [14] 郑艳春. 颈复康片质量控制方法研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.
- [15] 郑艳超, 马琳, 张坚, 等. HPLC 法测定五味子果梗中 6 种木脂素 [J]. 中成药, 2017, 39(2): 355-359.
- [16] Tian Z B, Jeong S Y, Kim T I, *et al.* Simultaneous quantitation and validation of method for the quality evaluation of *Eucommiae Cortex* by HPLC/UV [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(12): 2183-2192.
- [17] 张文宗, 张璞. HPLC 波长切换法同时测定益安宁丸中 7 种活性成分 [J]. 中草药, 2019, 50(8): 1947-1951.