

基于全方特征图谱质量表征的芩连制剂质量评价研究

彭平¹, 熊少哲¹, 张蓓¹, 易剑平¹, 杜菁¹, 杨璇¹, 范国强¹, 顾海鸥^{2*}, 王志斌^{1*}

1. 北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂, 北京 100079

2. 中国北京同仁堂(集团)有限责任公司, 北京 100079

摘要: 目的 建立芩连制剂特征图谱质量表征方法, 以全面表征芩连制剂质量, 并应用于芩连制剂的质量评价。方法 采用 UHPLC-DAD 多波长分析方法, Waters Cortecs T3 (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm) 色谱柱, 以乙腈(含 0.02% 甲酸)-(10 mol/L 乙酸铵-0.09% 甲酸缓冲液)为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测波长 230、330 nm。结果 建立了芩连制剂特征图谱质量表征方法, 指认了 38 个特征峰, 且检测了 12 个指标性成分的含量, 平均加样回收率为 83.58%~106.76%; 测得 11 批芩连制剂中 12 个指标性成分质量分数分别为连翘酯苷 A 0.21~9.08 mg/g、盐酸黄柏碱 0.39~1.91 mg/g、芍药内酯苷 0.13~9.28 mg/g、芍药苷 3.02~20.24 mg/g、甘草苷 0.19~0.51 mg/g、黄芩苷 12.36~27.64 mg/g、1,2,3,4,6-五-O-倍酰-D-葡萄糖(PGG) 0.22~3.63 mg/g、汉黄芩苷 1.92~6.12 mg/g、连翘苷 0.22~4.10 mg/g、盐酸小檗碱 5.37~16.85 mg/g、盐酸巴马汀 0.53~2.26 mg/g、甘草酸 0.45~2.06 mg/g。不同厂家及其不同批次芩连制剂中成药的质量表征差异主要来源于黄芩(峰 22、38、27)、赤芍[峰 2、21(PGG)、7(芍药内酯苷)]、连翘[峰 36(连翘酯素)、30]、黄连(峰 24)、黄连-川黄柏(峰 8、4)、连翘-赤芍(峰 3)。结论 建立的特征图谱质量表征方法可全面地表征与评价芩连制剂中成药, 为该品种的质量控制提供了科学依据, 亦为中成药的质量控制提供方法学借鉴。

关键词: 特征图谱质量表征; 芩连制剂; 质量评价; UHPLC-DAD; 多波长分析法; 连翘酯苷 A; 盐酸黄柏碱; 芍药内酯苷; 芍药苷; 甘草苷; 黄芩苷; 1,2,3,4,6-五-O-倍酰-D-葡萄糖; 汉黄芩苷; 连翘苷; 盐酸小檗碱; 盐酸巴马汀; 甘草酸; 黄芩; 赤芍; 连翘; 黄连; 川黄柏

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)05-1312-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.05.011

Quality evaluation of Qinlian preparations based on quality characterization of whole prescription characteristic spectrum

PENG Ping¹, XIONG Shao-zhe¹, ZHANG Bei¹, YI Jian-ping¹, DU Jing¹, YANG Xuan¹, FAN Guo-qiang¹, GU Hai-ou², WANG Zhi-bin¹

1. Pharmaceutical Factory of Beijing Tongrentang Technology Development Co., Ltd., Beijing 100079, China

2. Beijing Tongrentang Group Co., Ltd., Beijing 100079, China

Abstract: Objective To establish the characteristic spectrum analysis method of Qinlian preparations, and comprehensively characterize the quality, so as to apply the established method to the quality evaluation of Qinlian preparation of Chinese patent medicine. **Methods** The UHPLC-PDA multi-wavelength was used in the method, and a Waters Cortecs T3 column (100 mm × 2.1 μm, 1.6 μm) was used, the mobile phase was acetonitrile with 0.02% formic acid and 10 mol/L ammonium acetate -0.09% formic acid buffer for gradient elution, and the flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was kept at 30 ℃, the detection wavelength was set at 230 nm and 330 nm. **Results** The characteristic spectrum of Qinlian preparations was established, 38 characteristic peaks were marked, and 12 index components were determined. The recovery range for the content determination was 83.58%—106.76%, and the content range of 12 index components in 11 batches of Qinlian preparations was as follows: forsythoside A 0.21—9.08 mg/g; phellodendrine chloride 0.39—1.91 mg/g; albiflorin 0.13—9.28 mg/g; paeoniflorin 3.02—20.24 mg/g; liquiritin

收稿日期: 2020-10-28

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2017YFC1702604)

作者简介: 彭平, 女, 博士, 高级工程师, 研究方向为中药复方质量标准研究。Tel: 15210647038 E-mail: pengping2177@126.com

*通信作者: 顾海鸥, 男, 高级工程师, 主要研究方向为中药新药研发。Tel: (010)87632553 E-mail: yarily@126.com

王志斌, 男, 教授, 主要研究方向为中药质量控制标准及药理毒理研究。Tel: (010)87632521 E-mail: wangzhibin4804@126.com

0.19—0.51 mg/g; baicalin 12.36—27.64 mg/g; 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-*D*-glucose (PGG) 0.22—3.63 mg/g; oroxindin 1.92—6.12 mg/g; phillyrin 0.22—4.10 mg/g; berberine 5.37—16.85 mg/g; palmatine chloride 0.53—2.26 mg/g; glycyrrhizic acid 0.45—2.06 mg/g. Through analysis, the difference in quality characterization of Qinlian preparations was derived from Huangqin (*Scutellariae Radix*, peak 22, 38, 27), Chishao (*Paeoniae Radix Rubra*) [peak 2, 21 (PGG), 7 (albiflorin)], Lianqiao (*Forsythiae Fructus*) [peak 36 (forsythigenin), 30], Huanglian (*Coptidis Rhizoma*, peak 24), *Coptidis Rhizoma*-Chuanghuangbai (*Phellodendri Chinensis Cortex*) (peak 8, 4), *Forsythiae Fructus*-*Paeoniae Radix Rubra* (peak 3). **Conclusion** In conclusion, the quality characterization method established in this study can comprehensively characterize and evaluate Qinlian preparations, thus providing scientific basis and methodological reference for the quality control of this kind of Chinese traditional patent medicine.

Key words: quality characterization of characteristic spectrum; Qinlian preparations; quality evaluation; UHPLC-DAD; multi-wavelength switching; forsythoside A; phellodendrine chloride; albiflorin; paeoniflorin; liquiritin; baicalin; 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-*D*-glucose; oroxindin; phillyrin; berberine; palmatine chloride; glycyrrhizic acid; *Scutellariae Radix*; *Paeoniae Radix Rubra*; *Forsythiae Fructus*; *Coptidis Rhizoma*; *Phellodendri Chinensis Cortex*

芩连制剂所涉及的中成药有芩连片、芩连胶囊、芩连丸，其处方由黄芩、连翘、黄连、川黄柏、赤芍、甘草 6 味药味组成，具有清热解毒、消肿止痛的功效，其中芩连片收载于《中国药典》2020 年版，3 个剂型的芩连药物处方制法均为黄芩、连翘、川黄柏、甘草合并提取，黄连、赤芍粉碎，混合后经不同制剂工艺而得。

现有中成药质量标准中，对其原料的质量控制包括黄连、赤芍药味的显微鉴别项，黄连、黄芩、赤芍药味的薄层鉴别项，黄芩药味的含量测定项。其中对黄连、川黄柏药物的薄层鉴别项以盐酸小檗碱为对照，缺失专属性同时缺少对主要指标成分的定量测定^[1]；对连翘、甘草药味缺少相应的质量控制方法。有文献报道采用 RP-HPLC 等色谱方法建立了芩连片中黄芩苷、盐酸小檗碱、芍药苷、甘草苷、连翘苷等指标性成分的含量测定方法，进一步完善了芩连片复方药物的质量控制^[2-6]，但研究发现不同芩连制剂中指标性成分含量差异较大，普通液相色谱法受限于最低检测限和测定回收率范围，难以实现对芩连制剂整体质量表征的广泛测定；且现有研究方法对组方药物质量的控制还有遗漏，不能有效控制川黄柏、赤芍药味的特征性质量。

经过对芩连制剂处方药味原料质量研究的相关文献分析发现，赤芍、川赤芍及其易混品白芍药材质量差异成分包括芍药苷、芍药内酯苷、1,2,3,4,6-五-*O*-倍酰-*D*-葡萄糖 (PGG) ^[7-10]，黄连和川黄柏及关黄柏质量差异成分是盐酸黄柏碱、盐酸巴马汀^[11-13]，综合连翘、黄芩、甘草药材的《中国药典》指标性成分连翘苷、连翘酯苷 A、甘草苷、甘草酸、黄芩苷、汉黄芩苷以及盐酸小檗碱，共计 12 个指标性成分含量是芩连片质量评价的主要指标^[14-19]。因

此，本实验将采用分离效能和灵敏度均较高的 UPLC- PDA 色谱法^[20]，以芩连片为研究载体，建立其特征图谱质量表征方法，同时测定芩连片中 12 个指标成分的含量，并应用于该类中成药的质量评价之中，为其质量表征与控制提供方法支持。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters Acquity HClass 超高效液相色谱仪，包括四元溶剂管理器，PAD 检测器，在线温度控制器，样品管理器，Empower 工作站，美国 Waters 公司；KQ-250 DE 型数控超声波清洗机，昆山超声仪器有限公司；Mettler ML 204 型电子分析天平、Mettler XP 205 型电子分析天平，瑞士梅特勒-托利集团；0.22 μm 微孔滤膜，天津津腾实验设备有限公司。

1.2 材料

试药：乙腈，默克公司，色谱纯；甲酸，分析纯，天津光复精细化工研究所；乙酸铵，分析纯，南开大学精细化学实验厂；超纯水，Milli-Q 超纯水仪制备。

对照品：盐酸小檗碱（质量分数 86.7%，批号 110713-201814）、盐酸巴马汀（质量分数 86.8%，批号 110732-201611）、盐酸黄柏碱（质量分数 95.8%，批号 111895-201303）、黄芩苷（质量分数 93.3%，批号 110715-201318）、汉黄芩苷（质量分数 98.5%，批号 112002-201702）、甘草酸铵（质量分数 93.0%，批号 110731-201619）、甘草苷（质量分数 93.7%，批号 111610-201106）、芍药苷（质量分数 95.1%，批号 110736-201943）、连翘酯苷 A（质量分数 94.1%，批号 111810-201405）、盐酸黄连碱（质量分数 95.1%，批号 112026-201601）均购自中国食品药品检定研究院；芍药内酯苷（质量分数 ≥98%，批号

YZ3O10H101115)、连翘苷(质量分数 98%, 批号 Z17A8X34077)、表小檗碱(质量分数 98%, 批号 W06M8Z30708)、连翘酯素(质量分数 97%, 批号 YZ3O10H101115)、PGG(质量分数 98%, 批号 P28M9F54631)购自上海源叶生物科技有限公司。

研究用饮片: 黄连 *Coptis chinensis* Franch、黄柏 *Phellodendron chinense* Schneid (川黄柏)、连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl (青翘)、黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi、甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、赤芍 *Paeonia lactiflora* Pall.均由北京同仁堂科技发展股份有限公司提供, 由北京同仁堂科技发展股份有限公司工程师刘博譔鉴定, 均符合《中国药典》2020 年版要求。

芩连制剂中成药样品: 芩连片, 北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂(S1、S2)、牡丹江灵泰药业股份有限公司(S3)、哈尔滨三木制药厂(S4、S5)、山东孔府制药有限公司(S6); 芩连胶囊, 成都迪康药业股份有限公司(S7、S8)、吉林敖东集团力源制药股份有限公司(S9、S10); 芩连丸, 四川旭华制药有限公司(S11)均为市场购买, 生产厂家分别编号 M1~M7。

2 方法与结果

2.1 样品处理方法

2.1.1 对照品溶液的制备 分别用 70% 甲醇配制供定量用的对照品溶液, 取连翘酯苷 A、盐酸黄柏碱、芍药苷、芍药内酯苷、甘草苷、黄芩苷、PGG、连翘苷、盐酸小檗碱、巴马汀、甘草酸、汉黄芩苷对照品适量, 精密称定, 加 70% 甲醇制成含连翘酯苷 A 20 $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸黄柏碱 15 $\mu\text{g/mL}$ 、芍药内酯苷 20 $\mu\text{g/mL}$ 、芍药苷 350 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草苷 20 $\mu\text{g/mL}$ 、黄芩苷 450 $\mu\text{g/mL}$ 、PGG 25 $\mu\text{g/mL}$ 、连翘苷 20 $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸小檗碱 250 $\mu\text{g/mL}$ 、巴马汀 30 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草酸 50 $\mu\text{g/mL}$ 、汉黄芩苷 100 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液,

即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 取装量差异项下芩连制剂成品约 10 g, 磨成细粉, 取约 0.5 g, 精密称定, 置于具塞三角瓶中, 精密加入 70% 甲醇 25 mL, 称定质量, 加热回流处理 90 min, 放冷, 用提取溶剂补足减失的质量, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.2 芩连制剂特征图谱质量表征方法

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Cortecs T3 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.6 μm); 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 流动相乙腈(含 0.02% 甲酸, A)-(10 mol/L 乙酸铵-0.09% 甲酸缓冲液, B), 梯度洗脱: 0~10 min, 10%~12% A; 10~11 min, 12%~15% A; 11~18 min, 15%~16% A; 18~32 min, 16% A; 32~35 min, 16%~19% A; 35~40 min, 19%~21% A; 40~45 min, 21%~50% A; 45~48 min, 50%~90% A; 48~52 min, 90% A; 52~55 min, 90%~10% A; 55~60 min, 10% A; 体积流量 0.3 mL/min; 检测波长 230 nm (连翘酯苷 A 含量测定检测波长 330 nm); 进样体积 1 μL 。

2.2.2 系统适用性 取对照品溶液和供试品溶液适量, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定, 结果见图 1、2, 结果表明, 理论塔板数按黄芩苷峰计均大于 30 000, 12 个主要指标性成分色谱峰的分离度均大于 1.5, 表明系统适用性符合相关测定要求。

2.2.3 特征峰指认 分别取芩连制剂处方 6 味药物, 采用已建立的样品处理方法, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定, 标记了 38 个含量较高且色谱分离效果稳定的特征色谱峰, 采用对照品标记了其中 15 个主要色谱峰化学结构。其中包括黄连特征峰 3 个, 黄柏特征峰 1 个, 黄连、黄柏同源特征峰 6 个, 赤芍特征峰 7 个, 连翘特征峰 8 个, 黄芩特征峰 11 个, 甘草特征峰 2 个。结果见表 1。

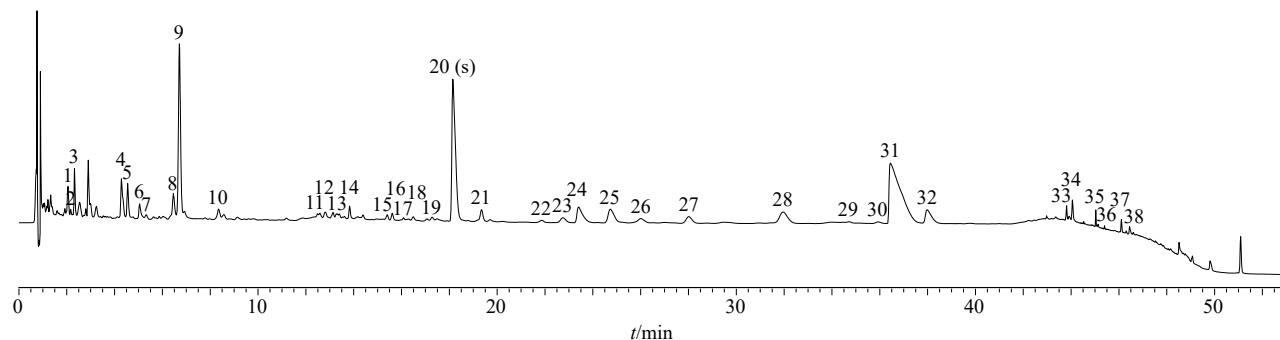
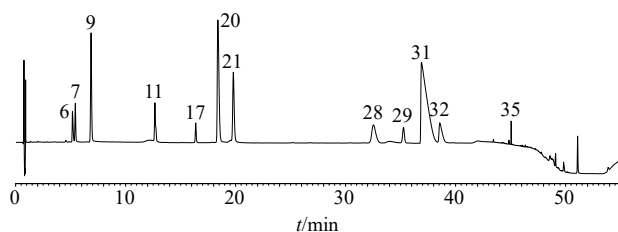


图 1 芩连制剂样品 (S1) 的全方特征指纹图谱

Fig. 1 Whole prescription characteristic spectrum of Qinlian preparation sample (S1)



6-盐酸黄柏碱 7-芍药内酯苷 9-芍药苷 11-甘草苷 17-连翘酯苷 A 20-黄芩苷 21-PGG 28-汉黄芩苷 29-连翘苷 31-盐酸小檗碱 32-盐酸巴马汀 35-甘草酸, 图 3、4 同
6-phellodendrine hydrochloride 7-albiflorin 9-paeoniflorin 11-liquiritin 17-forsythoside A 20-baicalin 21-PGG 28-oxoindin 29-phillyrin 31-berberine hydrochloride 32-palmatine hydrochloride 35-glycyrrhizic acid, same as fig. 3 and 4

图 2 12 个指标成分混合对照品溶液色谱图

Fig. 2 Chromatograms of solutions of 12 index ingredients mixed control solution

2.2.4 指标性成分含量测定专属性考察 按照芩连制剂处方配比, 分别配制芩连制剂缺黄芩、缺黄连和黄柏、缺黄柏、缺黄连、缺连翘、缺赤芍、缺甘草阴性样品, 按照芩连制剂供试品处理方法处理各芩连制剂阴性样品溶液, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定, 见图 3、4。在本色谱条件下, 检测波长为 230 nm 下赤芍中指标性成分芍药苷、芍药内酯苷、PGG 色谱峰处无明显干扰, 黄连中指标性成分盐酸巴马汀色谱峰处无明显干扰, 黄柏中指标性成分盐酸黄柏碱色谱峰处无明显干扰, 黄柏和黄连中指标性成分盐酸小檗碱色谱峰处无明显干扰, 连翘中指标性成分连翘苷色谱峰处无明显干扰, 甘草中指标性成分甘草苷、甘草酸色谱峰处无明显干扰, 黄芩中指标性成分黄芩苷、汉黄芩苷色谱峰处无明

表 1 芩连制剂特征图谱中 38 个特征峰信息

Table 1 Information of 38 characteristic peaks in characteristic map of Qinlian preparation

峰号	相对保留时间	成分	来源	峰号	相对保留时间	成分	来源	峰号	相对保留时间	成分	来源
1	0.13		黄连、黄柏	14	0.77		黄芩	27	1.54		黄芩
2	0.16		赤芍	15	0.86		连翘	28	1.75	汉黄芩苷	黄芩
3	0.16		连翘、赤芍	16	0.87		黄芩	29	1.93	连翘苷	连翘
4	0.24		黄连、黄柏	17	0.90	连翘酯苷 A	连翘	30	2.00		连翘
5	0.25		黄连、黄柏	18	0.92		连翘	31	2.03	小檗碱	黄连、黄柏
6	0.29	黄柏碱	黄柏	19	0.96		黄芩	32	2.12	巴马汀	黄连
7	0.30	芍药内酯苷	赤芍	20	1.00 (s)	黄芩苷	黄芩	33	2.41		赤芍
8	0.37		黄连、黄柏	21	1.09	PGG	赤芍	34	2.43		黄芩
9	0.38	芍药苷	赤芍	22	1.23		黄芩	35	2.47	甘草酸	甘草
10	0.46		赤芍	23	1.26		黄芩	36	2.48	连翘酯素	连翘
11	0.70	甘草苷	甘草	24	1.32		黄连	37	2.57		黄芩
12	0.72		甘草	25	1.39	表小檗碱	黄连	38	2.56		黄芩
13	0.74		连翘	26	1.47		黄连、黄柏				

显干扰; 检测波长 330 nm 下连翘中指标性成分连翘酯苷 A 色谱峰无明显干扰。

2.2.5 精密度考察 取同一芩连制剂供试品溶液, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定, 连续进样 6 针测定, 记录芩连制剂特征图谱中 38 个特征峰峰面积和保留时间, 得芩连制剂供试品溶液特征图谱中 38 个特征峰峰时间和峰面积的精密度结果, 各色谱峰相对保留时间和峰面积 RSD 值均小于 3%, 表明仪器精密度符合要求。

2.2.6 稳定性考察 取同一芩连制剂供试品溶液, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定, 分别于超声处

理后 0、3、6、9、12、24 h 进样, 记录芩连制剂特征图谱中 38 个特征图谱峰面积, 得芩连制剂供试品溶液特征图谱中 38 个特征峰峰面积和相对保留时间的稳定性结果, 各色谱峰峰面积 RSD 值均小于 5%, 表明方法稳定性符合要求。

2.2.7 线性关系考察 分别配制质量浓度为连翘酯苷 A 897.0 μg/mL、盐酸黄柏碱 804.7 μg/mL、芍药内酯苷 576.6 μg/mL、芍药苷 739.9 μg/mL、甘草苷 816.7 μg/mL、PGG 1 059.3 μg/mL、连翘苷 982.4 μg/mL、盐酸小檗碱 982.5 μg/mL、巴马汀 733.6 μg/mL、甘草酸 77.9 μg/mL、汉黄芩苷 439.2 μg/mL

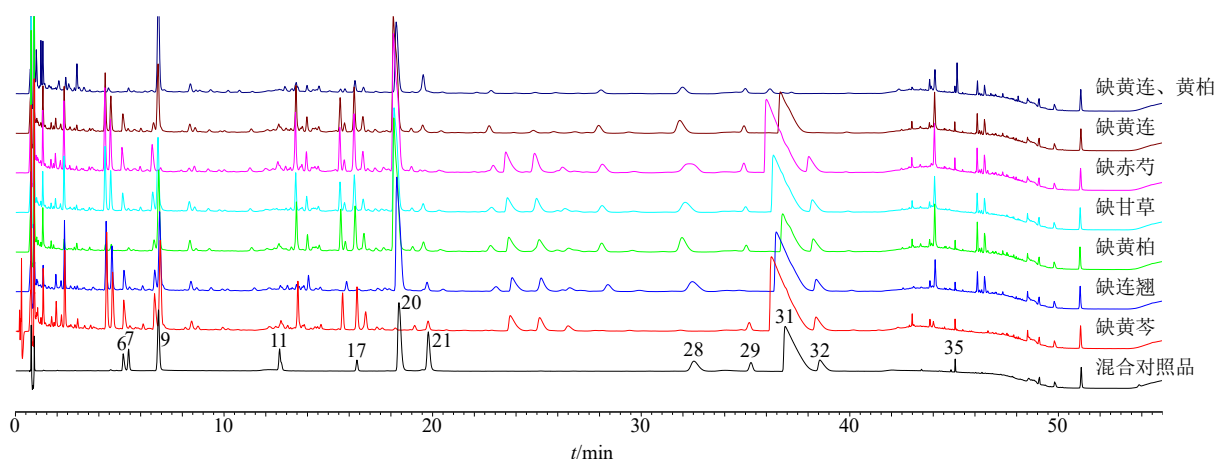


图 3 检测波长 230 nm 下芩连制剂阴性样品与混合对照品液相色谱图对比图

Fig. 3 Chromatograms of negative samples of Qinlian preparation under detection wavelength of 230 nm compared with those of mixed controls

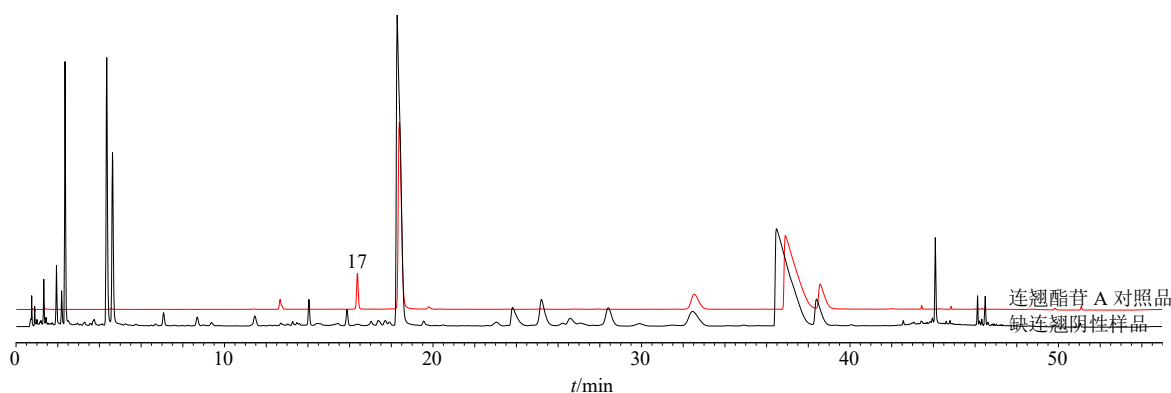


图 4 检测波长 330 nm 下芩连制剂阴性样品与连翘酯苷 A 对照品液相色谱图对比图

Fig. 4 Chromatograms comparison of negative sample of Qinlian preparation with forsythoside A standard under detection wavelength of 330 nm

的对照品溶液储备液, 分别取各对照品储备液采用 70% 甲醇溶液稀释 2、2.5、5、10、20、50、100、200 倍进样, 配制质量浓度为 287.1 $\mu\text{g/mL}$ 黄芩苷对照品溶液分别进样 0.2、0.6、0.8、1.0、1.4、1.8、2.2 μL , 以进样量为横坐标 (X), 对照品峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线。建立色谱峰峰面积对进样量的回归方程 (表 2), 结果表明, 各指标成分在检测的质量浓度范围内线性关系良好。

2.2.8 重复性考察 分别取芩连片、芩连胶囊、芩连丸样品各 6 份, 分别按样品处理方法制备样品溶液, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定, 记录芩连制剂特征图谱中 38 个指标性成分色谱峰面积, 得芩连制剂供试品溶液特征图谱中 38 个特征峰峰面积和相对保留时间的重复性结果, 各特征峰面积和相对保留时间 RSD 值均小于 5%, 采用外标法计算样品中 12 个指标性成分含量, 结果见表 3。

表 2 12 个指标性成分线性回归方程

Table 2 Linear regression equation of 12 exponential components

成分	回归方程	r	线性范围/ ng
连翘酯苷 A	$Y=5\,316\,917.96 X-1\,617.78$	1.000 0	2.7~53.8
盐酸黄柏碱	$Y=5\,490\,929.20 X-1\,305.64$	1.000 0	2.4~48.2
芍药内酯苷	$Y=4\,016\,292.19 X-223.03$	0.999 9	1.7~57.6
芍药苷	$Y=4\,362\,922.39 X+550.20$	0.999 9	5.9~370.0
甘草苷	$Y=8\,156\,346.21 X-509.81$	0.999 8	2.5~49.0
黄芩苷	$Y=4\,599\,674.58 X-40\,139.51$	1.000 0	57.4~631.6
PGG	$Y=7\,116\,091.93 X-8\,427.38$	0.999 8	3.2~63.6
汉黄芩苷	$Y=4\,580\,671.22 X-4\,378.16$	0.999 8	3.5~175.7
连翘苷	$Y=4\,749\,887.00 X-902.92$	0.999 1	2.9~58.9
盐酸小檗碱	$Y=14\,827\,464.04 X-6\,910.31$	1.000 0	7.9~491.2
盐酸巴马汀	$Y=12\,978\,937.28 X-7\,111.76$	0.999 6	2.2~44.0
甘草酸	$Y=1\,325\,006.53 X-289.55$	0.999 9	2.3~46.7

2.2.9 加样回收率考察 取已知指标性成分含量的 3 种芩连制剂粉末各 6 份, 每份 250.0 mg, 参考“2.2.8”项下重复性含量测定结果, 按照中间质量浓度加样回收率测定方法, 分别加入 25 mL 含有相应对照品质量浓度的 70% 甲醇, 称定质量, 加热回流处理 90 min, 放冷, 用 70% 甲醇溶液补足减失的质量, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定。根据“2.2.8”项下重复性考察测得的各成分的量, 计算各成分的加样回收率和 RSD, 结果见表 4, 12 个指标性成分回收率在 83.58%~106.76%。

2.3 多批次芩连制剂质量测定结果

2.3.1 芩连制剂特征图谱质量表征结果 取 11 批不同厂家生产芩连制剂样品, 按照已建立的样品处理方法, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定。各研究用样品均可检出 38 个特征色谱法, 各样品特征图谱结果见图 5。记录峰面积值, 以黄芩苷色谱峰(峰 20)为参比峰(s), 计算 38 个色谱峰相对峰面积比值, 见表 5。

2.3.2 芩连制剂中 12 个指标成分的含量测定结果 采用已建立的分析方法, 测定 11 份芩连制剂中 12 个指标性成分质量分数, 结果见表 6。

表 3 芩连制剂指标性成分含量测定重复性结果

Table 3 Repeatability results of determination of index components in Qinlian preparation

成分	芩连片(S2)		芩连胶囊(S10)		芩连丸(S11)	
	平均质量分数/(mg·g ⁻¹)	RSD/%	平均质量分数/(mg·g ⁻¹)	RSD/%	平均质量分数/(mg·g ⁻¹)	RSD/%
连翘酯苷 A	0.24	1.1	7.94	0.9	3.05	0.5
盐酸黄柏碱	0.99	1.3	1.91	2.6	0.95	2.4
芍药内酯苷	0.32	1.0	0.13	4.4	7.73	1.4
芍药苷	17.34	0.8	10.58	1.4	8.83	2.5
甘草苷	0.36	0.7	0.37	2.7	0.47	2.6
黄芩苷	22.40	0.7	22.22	0.5	20.39	0.5
PGG	1.21	0.7	0.46	2.3	3.48	2.8
汉黄芩苷	4.86	1.0	4.11	1.0	4.29	0.5
连翘苷	0.33	1.1	3.80	0.8	2.01	1.9
盐酸小檗碱	10.54	0.7	12.40	1.3	16.04	0.5
盐酸巴马汀	1.39	0.2	1.51	1.4	2.12	1.0
甘草酸	1.42	1.2	1.02	1.7	1.32	1.7

表 4 芩连制剂指标性成分含量测定回收率考察结果

Table 4 Test results of recoveries for determination of index compounds of Qinlian preparation

成分	芩连片(S2)		芩连胶囊(S10)		芩连丸(S11)	
	平均加样回收率/%	RSD/%	平均加样回收率/%	RSD/%	平均加样回收率/%	RSD/%
连翘酯苷 A	96.07	1.0	95.79	1.8	97.60	1.5
盐酸黄柏碱	93.49	1.8	95.89	1.6	100.13	1.7
芍药内酯苷	95.80	1.1	83.58	3.2	102.35	2.1
芍药苷	101.13	1.2	90.03	2.3	95.02	1.0
甘草苷	99.28	0.9	97.73	2.7	90.63	2.1
黄芩苷	102.03	1.5	96.41	1.7	101.70	0.8
PGG	98.31	0.7	106.76	2.0	93.55	2.2
汉黄芩苷	105.94	0.3	99.59	1.6	106.26	1.2
连翘苷	101.04	2.0	96.00	2.1	97.90	0.5
盐酸小檗碱	102.59	2.2	97.03	1.6	98.31	0.7
盐酸巴马汀	93.54	1.9	100.61	1.7	101.03	0.5
甘草酸	99.48	1.4	97.36	2.1	91.89	1.3

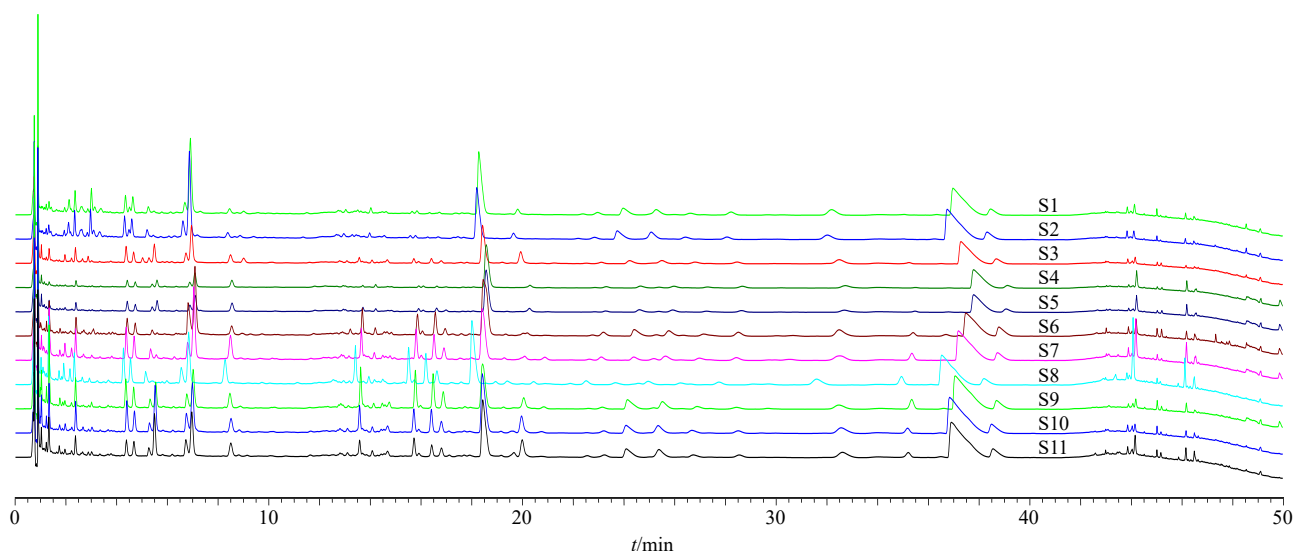


图 5 11 批芩连制剂样品特征图谱

Fig. 5 Sample characteristics profiles of 11 batches of Qinlian preparation

表 5 11 批芩连制剂样品特征图谱相对峰面积测定结果

Table 5 Determination of relative peak area of 11 batches of samples from Qinlian preparation

样品	相对峰面积												
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
S1	0.149 3	0.023 9	0.171 2	0.150 2	0.118 0	0.070 0	0.017 5	0.136 1	1.006 8	0.073 2	0.035 5	0.030 5	0.010 8
S2	0.099 2	0.015 4	0.118 6	0.115 4	0.077 8	0.047 7	0.008 5	0.095 0	0.736 4	0.048 5	0.030 9	0.019 3	0.010 9
S3	0.058 4	0.007 6	0.028 7	0.080 0	0.065 0	0.025 8	0.006 9	0.229 3	0.474 9	0.069 9	0.014 3	0.026 8	0.118 7
S4	0.053 7	0.004 7	0.006 8	0.093 6	0.067 5	0.043 0	0.107 7	0.064 9	0.202 4	0.132 8	0.028 1	0.006 4	0.030 3
S5	0.038 6	0.002 4	0.006 1	0.059 9	0.046 2	0.028 6	0.066 1	0.046 5	0.173 7	0.106 2	0.020 5	0.005 2	0.012 1
S6	0.124 0	0.033 4	0.031 2	0.191 0	0.129 0	0.058 0	0.247 0	0.119 0	0.601 0	0.158 0	0.027 2	0.018 1	0.046 6
S7	0.129 9	0.008 8	0.023 2	0.206 2	0.146 3	0.063 2	0.341 4	0.146 7	0.440 2	0.153 4	0.020 4	0.021 9	0.146 8
S8	0.166 8	0.008 6	0.027 8	0.240 8	0.177 4	0.076 1	0.227 3	0.143 7	0.452 4	0.196 6	0.028 5	0.013 8	0.313 9
S9	0.144 9	0.011 5	0.015 1	0.225 9	0.171 5	0.078 8	0.023 8	0.142 9	0.721 7	0.278 6	0.041 0	0.014 3	0.184 1
S10	0.130 0	0.017 1	0.019 4	0.226 3	0.172 0	0.085 3	0.013 7	0.135 9	0.466 2	0.265 0	0.031 2	0.014 9	0.258 0
S11	0.090 8	0.015 2	0.019 3	0.107 8	0.108 8	0.060 6	0.334 4	0.135 3	0.414 7	0.158 6	0.023 0	0.019 7	0.087 1

样品	相对峰面积												
	峰 14	峰 15	峰 16	峰 17	峰 18	峰 19	峰 20 (s)	峰 21	峰 22	峰 23	峰 24	峰 25	峰 26
S1	0.036 3	0.012 7	0.020 0	0.007 2	0.010 2	0.010 6	1.000 0	0.075 8	0.015 0	0.047 1	0.297 4	0.211 8	0.067 8
S2	0.036 2	0.018 3	0.020 3	0.006 3	0.009 8	0.015 2	1.000 0	0.063 4	0.013 3	0.047 3	0.192 2	0.135 5	0.050 9
S3	0.036 2	0.121 5	0.019 5	0.151 2	0.048 7	0.013 9	1.000 0	0.010 8	0.011 7	0.057 4	0.140 4	0.100 3	0.037 0
S4	0.027 7	0.031 8	0.014 9	0.040 9	0.023 3	0.005 7	1.000 0	0.074 8	0.007 7	0.028 8	0.089 2	0.074 0	0.031 0
S5	0.027 3	0.015 5	0.014 9	0.014 1	0.009 1	0.006 9	1.000 0	0.047 3	0.008 4	0.033 0	0.062 7	0.052 2	0.029 0
S6	0.034 9	0.060 6	0.019 6	0.067 1	0.045 2	0.009 6	1.000 0	0.293 0	0.014 6	0.049 2	0.141 0	0.114 0	0.069 9
S7	0.034 9	0.177 8	0.018 1	0.189 5	0.109 4	0.012 3	1.000 0	0.220 2	0.009 0	0.052 2	0.213 9	0.192 4	0.070 0
S8	0.037 4	0.364 8	0.017 3	0.367 0	0.210 8	0.007 4	1.000 0	0.170 4	0.010 4	0.048 4	0.344 6	0.218 0	0.076 7
S9	0.043 7	0.239 4	0.027 8	0.216 8	0.120 8	0.017 0	1.000 0	0.044 5	0.015 0	0.070 3	0.080 8	0.105 7	0.049 9
S10	0.046 2	0.269 3	0.025 9	0.245 9	0.116 4	0.016 8	1.000 0	0.046 5	0.015 6	0.072 7	0.048 6	0.064 4	0.038 4
S11	0.039 8	0.144 4	0.019 4	0.099 0	0.087 7	0.012 9	1.000 0	0.243 5	0.031 5	0.054 9	0.252 7	0.219 5	0.063 3

续表 5

样品	相对峰面积											
	峰 27	峰 28	峰 29	峰 30	峰 31	峰 32	峰 33	峰 34	峰 35	峰 36	峰 37	峰 38
S1	0.086 3	0.205 5	0.013 7	0.015 9	2.154 8	0.263 3	0.035 3	0.035 9	0.015 2	0.005 4	0.022 4	0.017 8
S2	0.084 3	0.199 2	0.010 3	0.014 4	1.453 2	0.169 9	0.025 3	0.042 3	0.015 6	0.004 2	0.021 5	0.016 3
S3	0.085 0	0.194 2	0.045 2	0.030 6	0.897 9	0.204 8	0.020 4	0.062 2	0.018 9	0.022 5	0.024 0	0.026 1
S4	0.065 2	0.116 2	0.026 5	0.013 4	1.105 3	0.120 3	0.013 9	0.120 9	0.009 1	0.016 2	0.064 4	0.026 3
S5	0.064 2	0.124 1	0.013 0	0.008 5	1.145 9	0.087 2	0.011 9	0.123 1	0.007 7	0.009 8	0.058 7	0.026 3
S6	0.083 9	0.249 0	0.043 9	0.015 0	1.930 0	0.235 0	0.028 7	0.053 9	0.014 0	0.019 0	0.015 9	0.012 7
S7	0.067 1	0.221 1	0.087 1	0.009 5	2.285 3	0.253 6	0.023 0	0.035 8	0.018 9	0.009 1	0.022 9	0.021 6
S8	0.059 3	0.197 3	0.206 9	0.019 6	2.575 9	0.297 2	0.015 8	0.055 1	0.031 1	0.017 1	0.044 5	0.019 5
S9	0.085 1	0.234 1	0.125 5	0.007 8	1.813 7	0.221 9	0.036 2	0.220 5	0.013 6	0.006 8	0.087 5	0.057 3
S10	0.068 2	0.214 9	0.150 1	0.007 2	1.658 9	0.177 1	0.023 9	0.323 5	0.011 3	0.007 9	0.111 1	0.066 4
S11	0.069 0	0.215 0	0.094 8	0.018 9	2.304 0	0.249 4	0.028 9	0.092 4	0.017 0	0.018 7	0.048 9	0.485 0

表 6 11 份芩连制剂中 12 个指标性成分含量测定结果

Table 6 Determination of 12 index ingredients in 11 samples of Qinlian preparation

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)											
	连翘酯苷 A	盐酸黄柏碱	芍药内酯苷	芍药苷	甘草苷	黄芩苷	PGG	汉黄芩苷	连翘苷	盐酸小檗碱	盐酸巴马汀	甘草酸
S1	0.21	1.06	0.34	20.24	0.40	17.64	1.25	4.09	0.22	12.49	1.79	0.89
S2	0.24	0.99	0.32	17.32	0.36	22.40	1.21	4.86	0.33	10.54	1.39	1.42
S3	5.91	0.64	0.24	14.89	0.24	27.64	0.22	6.12	1.44	8.30	2.26	2.01
S4	0.88	0.56	1.93	3.33	0.25	14.52	0.81	1.92	0.44	5.37	0.70	0.51
S5	0.36	0.39	1.25	3.02	0.19	15.30	0.54	2.16	0.23	5.86	0.53	0.45
S6	1.33	0.64	3.76	8.43	0.21	12.36	2.71	3.51	0.62	7.99	1.16	0.67
S7	6.27	1.25	9.28	11.01	0.28	22.09	3.63	5.56	2.21	16.85	2.23	1.60
S8	9.08	1.17	4.83	8.84	0.30	17.23	2.19	3.87	4.10	14.84	2.04	2.06
S9	6.37	1.42	0.60	16.47	0.51	20.11	0.67	5.37	2.90	12.20	1.78	1.05
S10	7.94	1.91	0.13	10.58	0.37	22.22	0.46	4.11	3.80	12.40	1.51	1.02
S11	3.05	0.95	7.73	8.83	0.47	20.39	3.48	4.29	2.01	16.04	2.12	1.32
最大值	9.08	1.91	9.28	20.24	0.51	27.64	3.63	6.12	4.10	16.85	2.26	2.06
最小值	0.21	0.39	0.13	3.02	0.19	12.36	0.22	1.92	0.22	5.37	0.53	0.45
最大值/最小值	43.24	4.90	71.38	6.70	2.68	2.24	16.50	3.19	18.64	3.14	4.26	4.58

2.4 多批次芩连制剂样品质量分析

2.4.1 芩连制剂样品整体质量分析 采用 SIMCA 13.0 统计分析软件 PCA-X, OPLS-DA 分析方法, 以芩连制剂特征图谱中 38 个特征峰的相对峰面积比值及其 12 个指标性成分含量为质量表征数据, 分析 11 份芩连制剂质量分布状况。

如图 6 所示, 在无监督模型下 (PCA-X), 11 批次芩连制剂整理质量分布按聚集程度分为 3 类: 第 1 类包括 S1~S3 (片剂)、S6~S8 (片剂、胶囊

剂)、S11 (丸剂); 第 2 类包括 S4~S5 (片剂); 第 3 类包括 S9~S10 (胶囊剂)。

如图 7 所示, 在以生产厂家为分类的监督模型下 (OPLS-DA), 11 批芩连制剂整体质量分布趋势, 与无监督模型下一致 (第 1 类: S1~S2 厂家 1, S3 厂家 2, S6 厂家 4, S7~S8 厂家 5, S11 厂家 7; 第 2 类: S4~S5 厂家 3; 第 3 类: S9~S10 厂家 6); 如图 8 所示, 质量差异成分 VIP 值得分高于 1.0 的指标成分有 13 个, 依次为 (VIP 值 1.6~1.0 从大到

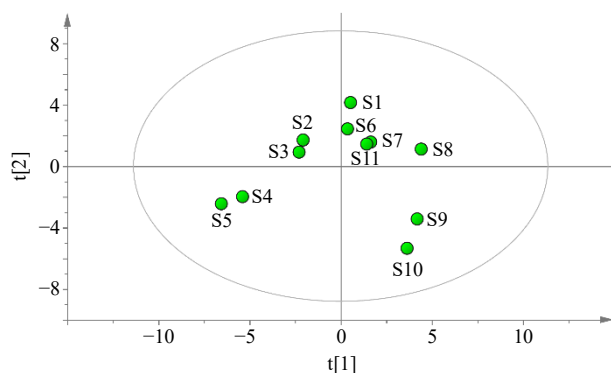


图 6 无监督模型下 11 批次芩连制剂特征图谱质量表征分布散点图

Fig. 6 Scatter plot of quality characterization profiles of 11 batches of Qinlian preparation under unsupervised model

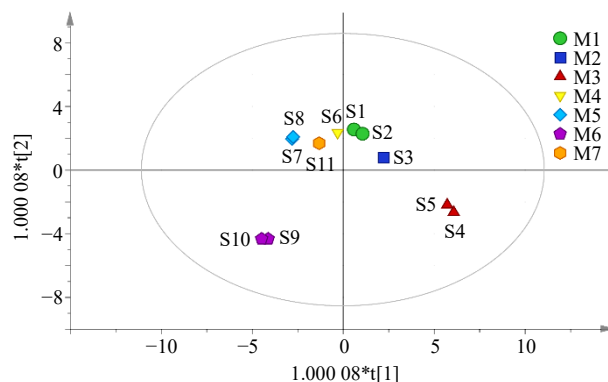


图 7 以生产厂家为分类的有监督模型下 11 批次芩连制剂特征图谱质量表征分布散点图

Fig. 7 Scatter plot of quality characterization distribution of 11 batches of Qinlian preparations under a supervised model classified by manufacturer

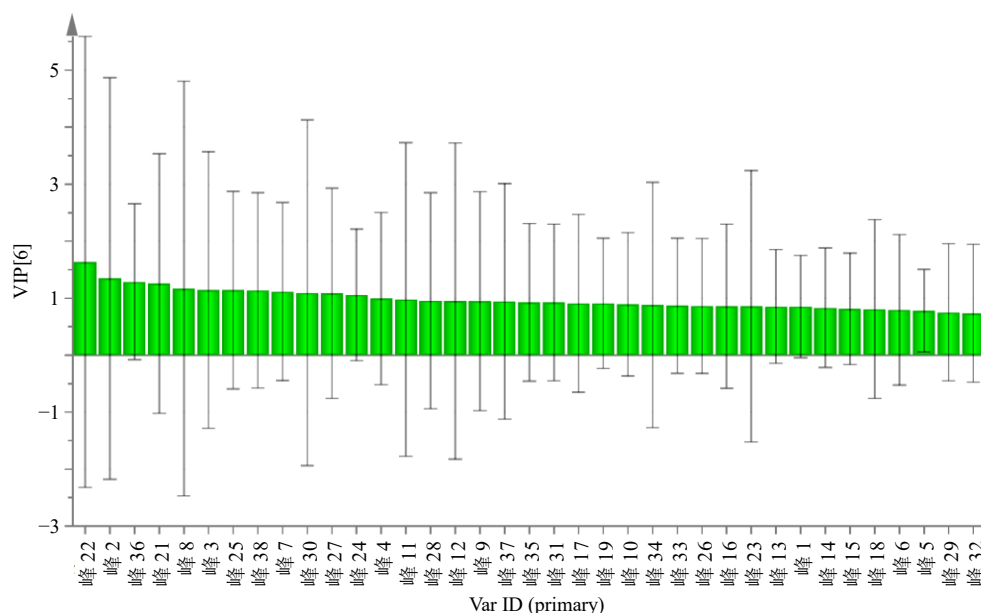


图 8 以生产厂家为分类的有监督模型下 11 批次芩连制剂特征成分 VIP 得分图

Fig. 8 VIP score chart of characteristic components of 11 batches of Qinlian preparations under a supervised model classified by manufacturer

小): 峰 22 (黄芩)、2 (赤芍)、36 [连翘 (连翘酯素)]、21 [赤芍 (PGG)]、8 (黄连、川黄柏)、3 (连翘)、25 (黄连)、38 (黄芩)、7 [赤芍 (芍药内酯苷)]、30 (连翘)、27 (黄芩)、24 (黄连)、4 (黄连、川黄柏); 质量分类的相关成分主要来源于: 黄芩 (峰 22、38、27), 赤芍 [峰 2、21 (PGG)、7 (芍药内酯苷)], 连翘 [峰 36 (连翘酯素)、30], 黄连 (峰 24), 黄连-川黄柏 (峰 8、4), 连翘-赤芍 (峰 3)。

2.4.2 芩连制剂样品指标性成分的含量分析 根据指标性成分来源, 分别对 11 批芩连制剂中各药味指标性成分含量进行分析, 统计 11 批次芩连制剂中各

指标性成分含量范围, 计算最大含量和最小含量倍数关系, 见表 5; 12 个指标成分含量差异范围为 2~71 倍, 根据各指标成分含量范围最大值与最小值的差量倍数依次从大到小排序为芍药内酯苷 (71.38 倍) > 连翘酯苷 A (43.24 倍) > 连翘苷 (18.64 倍) > PGG (16.50 倍) > 芍药苷 (6.70 倍) > 甘草酸 (4.58 倍) > 盐酸黄柏碱 (4.90 倍) > 盐酸巴马汀 (4.26 倍) > 汉黄芩苷 (3.19 倍) > 盐酸小檗碱 (3.14 倍) > 甘草苷 (2.68 倍) > 黄芩苷 (2.24 倍); 指标性成分含量差异大于 5 倍的药味来源主要是: 连翘 (连翘酯苷 A 和连翘苷)、赤芍 (芍药内酯苷、PGG 和芍药苷)。

3 讨论

3.1 芩连制剂质量差异表征分析

芩连片、芩连胶囊、芩连丸 3 种制剂中成药处方组成相同, 导致其质量差异的主要因素有: 原料质量、提取次数、提取时间、提取溶剂量、干燥方式、辅料添加量等。因此, 不同批次的芩连制剂特征图谱及其 12 个指标性成分含量, 都表现为以厂家为主的质量聚类分布。

从芩连制剂的整体质量分布分析结果看, 以厂家为主的质量聚类分布相关因子, 主要来源于黄芩(峰 22、38、27)、赤芍[峰 2、21 (PGG)、7 (芍药内酯苷)]、连翘[峰 36 (连翘酯素)、30]、黄连(峰 24)、黄连-川黄柏(峰 8、4)、连翘-赤芍(峰 3)。

从芩连制剂的指标性成分含量差异上看, 不同厂家的生产工艺均由黄芩、川黄柏、甘草、连翘 4 味饮片同时提取制备, 而黄芩、甘草、川黄柏指标性成分含量差异范围(2~5 倍)明显低于连翘指标性成分连翘酯苷 A 含量差异(43.24 倍); 同样, 不同剂型的芩连制剂中赤芍和黄连均为粉碎后与提取物混合制备药物, 而赤芍指标性成分芍药内酯苷含量差异(71.38 倍)明显高于其它黄芩、甘草、川黄柏、黄连的含量差异范围。结合连翘和赤芍原料饮片及其中药材的质量特征可知, 青翘和老翘不同规格的连翘中连翘酯苷 A 含量差异较大, 赤芍和易混药材白芍中芍药内酯苷含量差异较大, 芩连制剂中这两个成分含量的显著差异, 应与原料中药材的质量差异相关。

3.2 芩连制剂特征图谱分析方法

在分析方法建立的过程中, 通过甲酸、磷酸等不同流动相的对比考察, 不同体积流量考察, 发现赤芍成分与黄连、黄柏成分相互干扰严重, 受流动相 pH 值变化影响较大; 小檗碱等生物碱成分拖尾较为严重, 不易与连翘苷等成分分离检测; 经实验选定了乙腈(含 0.02%甲酸)-(10 mol/L 乙酸铵-0.09%甲酸缓冲液)为流动相, 实现了目标测定成分较为稳定的分离效果。研究最终采用 UHPLC-DAD 法建立了芩连制剂特征图谱质量表征方法, 在已有文献报道的基础上, 提高了指标性成分定量范围的宽度和准确度, 并首次建立了对芩连制剂组方 6 味中药的 12 个关键指标性成分含量的同时测定, 为芩连制剂的质量评价提供的研究基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 916-917.
- [2] 崔俊凤, 赵卫, 王颖臻, 等. 芩连片中 7 种化学成分 HPLC-DAD 法测定 [J]. 中国医药工业杂志, 2017, 48(9): 1355-1358.
- [3] 蒋范任, 蔡洪鲲, 夏用恢, 等. 高效液相色谱法同时测定芩连片中巴马汀、小檗碱、黄芩苷、连翘苷的含量 [J]. 中南药学, 2015, 13(12): 1296-1299.
- [4] 王冬梅, 高颢, 张洪霞, 等. HPLC 法同时测定芩连片中黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(12): 955-958.
- [5] 陈雪英. 芩连片 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(7): 615-617.
- [6] 高颢, 王冬梅, 栾爽, 等. HPLC 法同时测定芩连片中盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(6): 480-483.
- [7] 余捷婧, 吴金雄, 梁亚凤, 等. HPLC 同时测定赤芍和白芍中没食子酸等 6 种成分的量 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1673-1677.
- [8] Zhu M X, Li S N, You H D, et al. Simultaneous determination of paeoniflorin and albiflorin in *Radix Paeoniae Rubra* by HPLC-DAD-ELSD [J]. *Acta Chromatogr*, 2016, doi: 10.1556/1326.2017.29.2.12.
- [9] Tan Y Q, Chen H W, Li J, et al. Efficacy, chemical constituents, and pharmacological actions of *Radix Paeoniae Rubra* and *Radix Paeoniae Alba* [J]. *Front Pharmacol*, 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.01054.
- [10] Wang Y, Wang P, Xu C H, et al. Discrimination and chemical characterization of different *Paeonia lactiflora* (*Radix Paeoniae Alba* and *Radix Paeoniae Rubra*) by infrared macro-fingerprint analysis-through-separation [J]. *J Mol Struct*, 2015, doi: 10.1016/j.molstruc.2015.06.035.
- [11] 刘江亭, 李慧芬, 崔伟亮. 川黄柏、关黄柏饮片和水煎液中 3 种生物碱含量的比较研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2013, 37(5): 437-438.
- [12] 李媛. 黄柏、黄连体内成分对比研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2013.
- [13] 郑丽婷, 周鸿, 刘奕明, 等. 黄柏碱对 α -葡萄糖苷酶的体外抑制作用 [J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(6): 853-858.
- [14] Qi M H, Zhao S Y, Zhou B, et al. Probing the degradation mechanism of forsythiaside A and simultaneous determination of three forsythiasides in *Forsythia* preparations by a single marker [J]. *J Sep Sci*, 2019, doi: 10.1002/jssc.201900521.
- [15] Wang Z B, Song M M, Cui B B, et al. A LC-MS/MS

- method for simultaneous determination of seven alkaloids in rat plasma after oral administration of *Phellodendri Chinensis Cortex* extract and its application to a pharmacokinetic study [J]. *J Sep Sci*, 2019, doi: 10.1002/jssc.201801018.
- [16] 杨彬, 赵君, 刘芳, 等. 指纹图谱结合模式识别、一测多评的连翘质量评价 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(3): 292-298.
- [17] 魏丽芳, 梅余琪, 邹立思, 等. 超快速液相色谱-三重四极杆/线性离子阱质谱法同时测定连翘药材中的多元活性成分 [J]. 分析测试学报, 2019, 38(12): 1407-1415.
- [18] 刘芳, 魏娟, 张晓燕, 等. UPLC-PDA 法同时测定连翘中 4 种成分的含量 [J]. 食品与药品, 2019, 21(6): 460-463.
- [19] 宗阳, 董宏利, 陈婷, 等. 基于网络药理学黄芩-黄连药对治疗 2 型糖尿病作用机制探讨 [J]. 中草药, 2019, 50(4): 888-894.
- [20] 彭平, 张蓓, 杜菁, 等. 基于天然麝香-牛黄和 4 个植物药味的安宫牛黄丸特征图谱质量表征研究 [J]. 中草药, 2019, 50(14): 3313-3323.

[责任编辑 郑礼胜]