

基于一测多评法含量测定及薄层鉴别的经典名方竹茹汤颗粒剂的质量评价研究

何天雨¹, 梅 茜¹, 王晓丽¹, 毛 靖¹, 谢 辉¹, 郭 勇², 侯金才², 陆兔林¹, 毛春芹^{1*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 神威药业集团有限公司, 河北 石家庄 051430

摘要: 目的 建立经典名方竹茹汤颗粒 (Zhuru Decoction Granules, ZDG) 特征图谱及一测多评 (quantitative analysis multi-components by single marker, QAMS) 法测定其主要成分, 优化薄层色谱条件, 建立同时鉴别葛根素和甘草苷的方法。方法 优化并确定 HPLC 最佳色谱条件并建立特征图谱, 以葛根素作为参照物, 建立葛根素、3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、甘草苷、甘草酸的 QAMS 法, 建立主要药效成分葛根素及甘草苷同时鉴别的薄层条件。结果 得到 15 批样品特征图谱与其对照图谱的相似度均大于 0.95; 15 批制剂运用 QAMS 法和外标法得到的各成分含量无显著性差异, 7 种成分相对误差均低于 5%; 通过稳定性考察证明薄层检测条件稳定可行。结论 该方法科学可行, 稳定可控, 有助于经典名方 ZDG 质量控制方法的完善和提高, 为经典名方的质量控制评价提供参考。

关键词: 经典名方; 竹茹汤; 特征图谱; 一测多评法; 薄层鉴别; 葛根素; 甘草苷; 3'-羟基葛根素; 3'-甲氧基葛根素; 葛根素芹菜糖苷; 大豆苷; 甘草酸

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)14-4511-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.14.011

Quality evaluation of Zhuru Decoction Granules based on quantitative analysis of multi-components with a single-marker content determination and TLC identification

HE Tian-yu¹, MEI Xi¹, WANG Xiao-li¹, MAO Jing¹, XIE Hui¹, GUO Yong², HOU Jin-cai², LU Tu-lin¹, MAO Chun-qin¹

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Shenwei Pharmaceutical Group Co., Ltd., Shijiazhuang 051430, China

Abstract: Objective To establish the characteristic chromatogram of Zhuru Decoction Granules (竹茹汤颗粒, ZDG) and determine its main components by quantitative analysis of multi-components with a single-marker (QAMS) method, optimize the TLC conditions, and establish a simultaneous identification method for puerarin and glycyrrhizin. **Methods** To optimize and determine the best chromatographic conditions of HPLC and establish the characteristic chromatogram. With puerarin as the reference material, establish a QAMS for the identification of puerarin, 3'-hydroxypuerarin, 3'-methoxy puerarin, puerarin apigenide, daidzin, glycyrrhizin and glycyrrhizic acid, and establish the TLC conditions for the simultaneous identification of the main active ingredients puerarin and glycyrrhizin. **Results** The similarity between the characteristic profiles of the 15 batches of samples and their control profiles was greater than 0.95; There was no significant difference between the contents of the components obtained by the QAMS method and the external standard method for the 15 batches of preparations, and the relative errors of the seven components were less than 5%; The stability study proved that the thin-layer assay conditions were stable and feasible. **Conclusion** The method is scientific, feasible, stable and controllable. The study is helpful to improve the quality control method of ZDG, a classic famous prescription, and is expected to provide a reference for the quality control evaluation of the classical prescription.

收稿日期: 2022-12-13

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1707000)

作者简介: 何天雨 (2000—), 硕士研究生, 主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究。E-mail: 13844563203@163.com

*通信作者: 毛春芹, 正高级实验师, 主要从事新药研发及中药质量研究。E-mail: mcq63@163.com

Key words: classical prescription; Zhuru Decoction; characteristic chromatogram; quantitative analysis multi-components by single marker; thin-layer chromatography identification; puerarin; liquiritin; 3'-hydroxy puerarin; 3'-methoxy puerarin; puerarin apioside; daidzin; glycyrrhizic acid

近年来,经典名方成为中医药领域的研究热点之一,国家药监局制定了《古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定》^[1]传承发展中医药事业。竹茹汤出自宋代许叔微《普济本事方》,位列《古代经典名方目录(第一批)》第 35 首,该方重用葛根升阳祛风、升清降浊、生津清热,半夏(姜汁浆水制)、竹茹、生姜用以安胃止呕,同时发挥甘草(水炙)、大枣利脾健气、调和诸药的功效,六药合用,共奏益胃清热,临床主要用于治疗胃热呕吐,症见手足心俱热^[2-5]。

中成药复方制剂由多味中药材组方而成,多成分协同作用,作用效果多靶点,目前多指标成分评价模式已被逐步应用于相关质量控制中^[6-9],但采用外标法进行多指标含量测定时,往往需要较多成分作为对照品,而对照品存在分离纯度难度大,不易获得,价格相对昂贵等问题限制了外标法在复方制剂多指标质量控制和评价中的应用。一测多评法(quantitative analysis multi-components by single marker, QAMS)利用中药有效成分内在函数关系和比例关系,以样品中对照品廉价易得的常见成分为内参物,计算出其他待测成分间的相对校正因子,实现多个待测成分的同步测定,具有操作成本低、简单、快捷的优点,适用于药效成分复杂多样的中药及中药制剂,符合中药多成分、多功效的作用特点^[10-13]。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司; Waters e2695 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司; 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Merck Purospher Star LP RP-18 End Capped 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); FA1104N 型电子天平,上海菁海仪器有限公司; KQ-500B 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司; Milli-Q 型纯水机。

1.2 试药

对照品葛根素(批号 110752-201615,质量分数 95.4%)、6-姜辣素(批号 111833-201303 质量分数≥98%)购自中国食品药品检定研究院;对照品 3'-羟基葛根素(批号 180102,质量分数≥98%)、3'-甲氧基葛根素(批号 171204,质量分数≥98%)、葛根素

芹菜糖苷(批号 171216,质量分数≥98%)均购自南京森贝伽生物科技有限公司;对照品大豆苷(批号 20111016,质量分数≥98%)、大豆苷元(批号 YY20101110,质量分数≥98%)、甘草苷(批号 201027BA14,质量分数≥98%)、甘草酸单铵盐(批号 20120911,质量分数≥98%)均购自上海源叶生物技术有限公司。甲醇,分析纯,山东禹王实业有限公司化工分公司;乙腈,色谱纯,默克股份两家公司;甲酸,色谱纯,美国恩科公司;水为娃哈哈纯净水。其他试剂均为分析纯。薄层板分别购于青岛海洋化工有限公司、青岛康业鑫有限公司、上海阿拉丁生化科技股份有限公司芯硅谷厂家。

竹茹汤由葛根、甘草、半夏、竹茹、生姜和大枣 6 味药组成,均购自道地产区或主产区,经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定,其中葛根来自陕西,为豆科葛属植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根;半夏来自江苏泰州,为天南星科半夏属植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎;甘草来自甘肃榆中,为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎;竹茹来自广东广宁,禾本科刚竹属植物淡竹 *Phyllostachys nigra* (Lodd.) Munro var. *henonis* (Mitf.) Stapf ex Rendle 的茎秆的干燥中间层;生姜来自四川沐川,为姜科姜属植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎;大枣来自山西闻喜,为鼠李科枣属植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实,甘草、半夏按课题组前期研究制定的《水炙甘草工艺及质量标准》(草案)、《姜汁浆水制半夏工艺及质量标准》(草案)炮制成符合要求的饮片。药材及对应饮片来源与批号见表 1。竹茹汤颗粒(Zhuru Decoction Granules,

表 1 药材及对应饮片来源

Table 1 Source of medicinal materials and corresponding decoction pieces

药材	产地	饮片炮制标准
葛根	陕西商洛	《中国药典》2020 年版一部“葛根”
甘草	甘肃榆中	《水炙甘草炮制及质量标准研究》(草案)
半夏	江苏泰州	《姜汁浆水制半夏工艺及质量标准研究》(草案)
竹茹	广东广宁	《中国药典》2020 年版一部“竹茹”
生姜	四川沐川	《中国药典》2020 年版一部“生姜”
大枣	山西闻喜	《中国药典》2020 年版一部“大枣”

ZDG), 每袋质量 6 g, 批号 2022071301、2022071302、2022071303、2022071304、2022071305、2022071306、2022071307、2022071308、2022071309、202207131、2022120101、2022120102、2022120103、2022120104、2022120105, 分别编号 S1~S15, 由神威药业集团有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 ZDG 的制备

分别称取 1 份处方量竹茹汤(葛根 13.77 g、甘草 3.44 g、半夏 3.44 g、竹茹 3 g、生姜 3 g、大枣 3 g), 加水 600 mL, 浸泡 60 min, 以红外炉最大功率 2200 W 加热至沸腾, 调整火力至 900 W, 煎煮至半, 趁热采用 80 目筛滤过, 放冷, 定容至 300 mL, 即得竹茹汤基准样品。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Kromasil 100-5C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱: 0~4 min, 0.5%~9.0%乙腈; 4~15 min, 9.0%~12.0%乙腈; 15~20 min, 12.0%乙腈; 20~35 min, 12.0%~16.0%乙腈; 35~38 min, 16.0%~23.0%乙腈; 38~48 min, 23.0%~30.0%乙腈; 48~63 min, 30.0%~75.0%乙腈; 63~64 min, 75.0%~0.5%乙腈; 体积流量为 1 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL, 检测波长为 280 nm。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液 精密称取 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、甘草苷、甘草酸对照品适量, 用甲醇稀释, 即得含 3'-羟基葛根素 244 μg/mL、葛根素 1350 μg/mL、3'-甲氧基葛根素 425 μg/mL、葛根素芹菜糖苷 385 μg/mL、大豆苷 750 μg/mL、甘草苷 114 μg/mL、甘草酸 176 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液 取装量差异项下的 ZDG, 混匀, 取适量, 研细, 取约 0.50 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加 50%甲醇 10 mL, 密塞, 称定质量, 超声 10 min (功率 250 W、频率 40 kHz), 放冷, 再称定质量, 用 50%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.3 阴性样品溶液 按照处方比例[葛根 13.8 g、甘草(水炙) 3.4 g、半夏(姜汁浆水制) 3.4 g、生姜 3.0 g、竹茹 3.0 g、大枣 3.0 g], 按照前期课题组确定的颗粒剂制备方法分别制备缺葛根、缺甘草、缺生姜的阴性样品, 按照“2.3.2”项下方法制备,

即得各阴性样品溶液。

2.3.4 薄层对照品溶液 另取葛根素对照品, 加甲醇制成含葛根素 1 mg/mL 的对照品溶液; 另取甘草苷对照品, 加甲醇制成含甘草苷 1 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。

2.3.5 薄层供试品溶液 取 ZDG 2 g, 加甲醇 30 mL, 超声处理(功率 250 W、频率 50 kHz) 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 2 mL 使溶解, 作为供试品溶液。

吸取竹茹汤基准样品 5 mL, 同法将其制备成竹茹汤基准样品对照溶液。

2.3.6 薄层阴性样品溶液 取葛根阴性颗粒 2 g, 同法将其制备成葛根阴性对照溶液; 取甘草阴性颗粒 2 g, 同法将其制备成甘草阴性对照溶液。

2.4 特征图谱建立

2.4.1 精密度试验 取同一批 ZDG 样品(批号 2022071301)按照“2.3.2”项下方法制备成为供试品溶液, 并按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图, 以 5 号峰(葛根素)为参照峰, 计算所有共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果特征图谱相似度>0.98, 特征峰的相对保留时间 RSD 均小于 0.13%, 相对峰面积 RSD 均小于 0.82%, 表明仪器的精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一批 ZDG 样品(批号 2022071301), 按照“2.3.2”项下方法操作条件平行制备 6 份供试品溶液, 并按“2.2”项下色谱条件连续进样, 记录色谱图, 以 5 号峰(葛根素)为参照峰, 计算所有共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果特征图谱相似度>0.96, 特征峰的相对保留时间 RSD 均小于 0.13%, 相对峰面积 RSD 均小于 3.88%, 表明该方法的重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一批 ZDG 样品(批号 2022071301), 按照“2.3.2”项下方法操作制备成为供试品溶液, 室温下于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.2”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 以 5 号峰(葛根素)为参照峰, 计算所有共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果特征图谱相似度>0.96, 特征峰的相对保留时间 RSD 均小于 0.05%, 相对峰面积 RSD 均小于 0.64%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 特征图谱的建立及分析 将样品所得色谱数据利用 Chromeleon73 软件导出特征图谱 CDF 格式, 并导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度

评个系统》(2012, 130723 版) 软件进行分析。

选择分离度较好、纯度较高且成分已知的 5 号峰(葛根素)作为 ZDG 特征图谱的参照峰, 计算其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积。采用中位

数法生成对照特征图谱, 设定 S1 为参照图谱, 时间窗宽度为 0.1 mm, 自动匹配后多点校正, 进行全谱峰匹配, 得到 15 批 ZDG 样品(S1~S15)的对照特征图谱(图 1)。

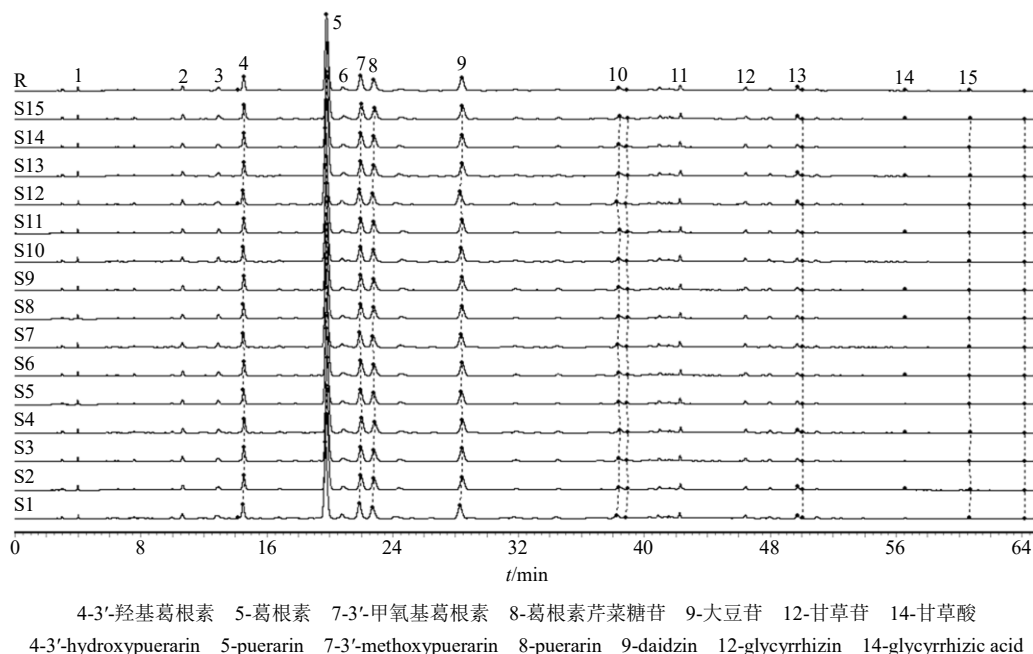


图 1 15 批 ZDG 样品 (S1~S15) 的 HPLC 特征图谱及其对照特征图谱 (R)

Fig. 1 HPLC characteristic spectrum of 15 batches of ZDG samples (S1—S15) and its reference characteristic spectrum (R)

全方共确定 15 个共有峰, 经对照品、ZDG 样品、阴性样品的相关图谱(图 2) 色谱峰比对, 确定其中峰 4 为 3'-羟基葛根素、峰 5 为葛根素、峰 7 为

3'-甲氧基葛根素、峰 8 为葛根素芹菜糖苷、峰 9 为大豆苷、峰 12 为甘草苷、峰 14 为甘草酸。

计算 15 批 ZDG 样品(S1~S15) 与其对照特征图谱的相似度分别为 0.999、0.999、0.999、0.999、0.999、0.999、0.999、0.999、0.999、0.999、1.000、0.999、0.999、0.998、0.999, 均大于 0.95, 表明 ZDG 及制备工艺稳定, 不同批次间的差异较小。

2.5 指标成分含量测定方法学考察

2.5.1 线性关系考察 分别精密吸取“2.3.1”项下的混合对照品溶液(3'-羟基葛根素 244 $\mu\text{g/mL}$ 、葛根素 1350 $\mu\text{g/mL}$ 、3'-甲氧基葛根素 425 $\mu\text{g/mL}$ 、葛根素芹菜糖苷 385 $\mu\text{g/mL}$ 、大豆苷 750 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草苷 114 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草酸 176 $\mu\text{g/mL}$) 0.2、0.4、0.6、0.8、2.0 mL 至 2 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度线, 制成系列混合对照品溶液 II~VI。

将不同质量浓度的混合对照品溶液 I~VI, 按照“2.2”项下色谱条件进样测定, 以对照品质量浓度作为横坐标(X), 峰面积积分值作为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 进行线性回归得回归方程: 3'-羟基葛根素 $Y=17\,787X+299\,860$, $r=0.999\,8$, 线性范围 24.4~244.0 $\mu\text{g/mL}$; 葛根素 $Y=9\,431.4X+93\,790$,

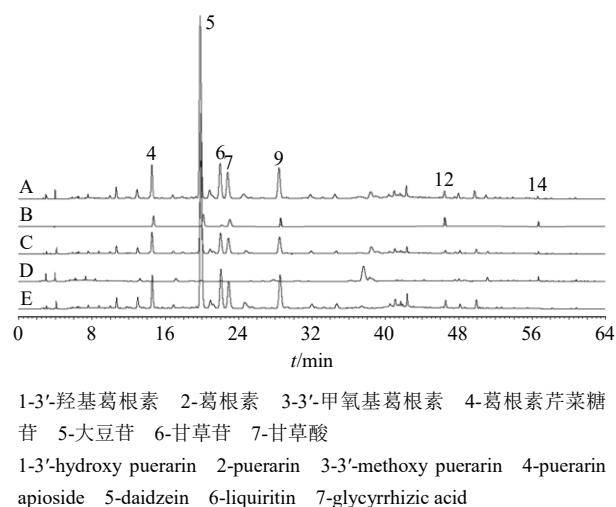


图 2 ZDG 样品 (A)、混合对照品 (B) 及缺生姜 (C)、缺葛根 (D)、缺甘草 (E) 阴性样品的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of ZDG samples (A), mixed reference substances (B), and negative samples without *Zingiberis Rhizoma Recens* (C), without *Puerariae Lobatae Radix* (D), without *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (E)

$r=0.999\ 4$, 线性范围 $135.0\sim1\ 350.0\ \mu\text{g/mL}$; 3'-甲氧基葛根素 $Y=9\ 680.3X-82\ 200$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 $42.5\sim425.0\ \mu\text{g/mL}$; 葛根素芹菜糖苷 $Y=10\ 184X-59\ 226$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 $38.5\sim385.0\ \mu\text{g/mL}$; 大豆苷 $Y=10\ 472X-193\ 440$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 $75.0\sim750.0\ \mu\text{g/mL}$; 甘草苷 $Y=6\ 857.0X-9\ 627.4$, $r=0.999\ 6$, 线性范围 $11.4\sim114.0\ \mu\text{g/mL}$; 甘草酸 $Y=2\ 737.0X-11\ 248$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 $17.6\sim176.0\ \mu\text{g/mL}$; 结果表明, 各成分在各自质量浓度范围内线性关系良好。

2.5.2 专属性考察 精密吸取“2.3.3”项下阴性样品溶液、“2.3.1”项下对照品溶液及“2.3.2”项下 ZDG 供试品溶液各 $5\ \mu\text{L}$, 按确定的色谱条件进行测定, 结果见图 2, 结果显示, 在此条件下, ZDG 中葛根、甘草和生姜的色谱峰分离较好, 互不干扰, 说明方中各药味色谱峰的专属性良好。

2.5.3 精密度试验 精密吸取“2.3.1”项下混合对照品溶液, 按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次进行测定, 测得 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、甘草苷、甘草酸峰面积的 RSD 分别为 0.62% 、 0.59% 、 0.61% 、 0.64% 、 0.45% 、 0.80% 、 1.13% , 说明仪器的精密度良好。

2.5.4 稳定性试验 取同一份供试品溶液 (批号 2022071301), 室温下于制备后 0、2、4、8、12、24 h 在“2.2”项下色谱条件进样测定, 得 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、甘草苷、甘草酸峰面积的 RSD 分别为 2.25% 、 1.06% 、 1.21% 、 1.41% 、 1.12% 、 1.21% 、 0.97% , 结果表明供试品溶液在制备后 24 h 内稳定性良好。

2.5.5 重复性试验 取同一批样品 (批号 2022071301), 按照“2.3.2”项下条件平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.2”项下色谱条件进行测定, 测

得 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、甘草苷、甘草酸质量分数的 RSD 分别为 1.83% 、 0.85% 、 0.93% 、 0.76% 、 0.48% 、 0.83% 、 0.30% , 说明该方法的重复性良好。

2.5.6 加样回收率试验 取 6 份装量差异项下的本品, 混匀, 取适量, 研细, 分别取约 $0.25\ \text{g}$, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 取与供试品等量的对照品, 加 50% 甲醇至 $10\ \text{mL}$, 密塞, 称定质量, 超声处理 (功率 $250\ \text{W}$ 、频率 $40\ \text{kHz}$) $10\ \text{min}$, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

分别精密吸取供试品溶液各 $10\ \mu\text{L}$, 注入液相色谱仪, 测定, 记录色谱图, 计算各成分的加样回收率及其 RSD。结果 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、甘草苷、甘草酸的加样回收率分别为 102.01% 、 97.36% 、 102.12% 、 99.57% 、 97.18% 、 96.96% 、 101.57% , RSD 分别为 0.40% 、 1.75% 、 0.82% 、 1.47% 、 1.63% 、 1.72% 、 0.87% , 表明该方法的准确度良好。

2.6 QAMS 建立

2.6.1 相对校正因子 ($f_{s/i}$) 的测定 按照“2.2”项下色谱条件, 将“2.3.1”项下的混合对照品溶液分别进样 2、5、8、10、15、22 μL , 记录各成分峰面积, 以葛根素为内参物, 采用多点校正法, 按照公式 $f_{s/i} = f_s/f_i = A_s C_i / A_i C_s$ 计算, 其中 A_s 为葛根素对照品的峰面积, C_s 为葛根素对照品的质量浓度, A_i 为待测成分峰面积, C_i 为待测成分的质量浓度。

分别计算 3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、甘草苷、甘草酸的 $f_{s/i}$, 结果 5 个待测成分与内参物 $f_{s/i}$ 的 RSD 值均小于 3% , 结果见表 2。

2.6.2 不同仪器和不同色谱柱考察 考察了 Waters

表 2 各成分 $f_{s/i}$

Table 2 $f_{s/i}$ values of each component

进样体积/ μL	$f_{\text{葛根素}/3'\text{-羟基葛根素}}$	$f_{\text{葛根素}/3'\text{-甲氧基葛根素}}$	$f_{\text{葛根素}/\text{葛根素芹菜糖苷}}$	$f_{\text{葛根素}/\text{大豆苷}}$	$f_{\text{葛根素}/\text{甘草苷}}$	$f_{\text{葛根素}/\text{甘草酸}}$
2	0.552 2	0.512 7	0.545 0	0.548 7	0.361 5	0.145 6
5	0.553 1	0.514 5	0.545 8	0.555 4	0.364 3	0.145 0
8	0.554 7	0.516 6	0.547 3	0.553 8	0.369 9	0.145 1
10	0.555 0	0.517 8	0.548 7	0.555 4	0.373 6	0.145 3
15	0.547 0	0.524 2	0.555 4	0.563 1	0.379 1	0.147 4
22	0.531 5	0.542 4	0.570 7	0.586 9	0.382 3	0.153 5
平均值	0.548 9	0.521 4	0.552 2	0.560 5	0.371 8	0.147 0
RSD/ $\%$	1.64	2.11	1.77	2.45	2.19	2.25

e2695 和 Agilent 1260 2 种高效液相色谱仪及 Kromasil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Merck Purospher Star LP RP-18 End Capped 柱 (250 mm×

4.6 mm, 5 μm) 2 种色谱柱对 $f_{s/i}$ 的影响, 并计算 RSD, 结果均小于 2%, 表明不同仪器和色谱柱适用性良好。结果见表 3。

表 3 仪器及色谱柱对 $f_{s/i}$ 的影响

Table 3 Effect of instrument and chromatographic column on $f_{s/i}$

仪器	色谱柱	$f_{\text{葛根素/3'-羟基葛根素}}$	$f_{\text{葛根素/3'-甲氧基葛根素}}$	$f_{\text{葛根素/葛根素芹菜糖苷}}$	$f_{\text{葛根素/大豆苷}}$	$f_{\text{葛根素/甘草苷}}$	$f_{\text{葛根素/甘草酸}}$
Waters	Kromasil	0.563 4	0.528 9	0.559 9	0.566 4	0.382 4	0.148 5
	Merck	0.556 1	0.524 2	0.555 4	0.563 1	0.379 1	0.147 4
Agilent 1260	Kromasil	0.566 2	0.520 1	0.551 2	0.570 1	0.380 3	0.146 9
	Merck	0.551 2	0.527 9	0.539 8	0.569 3	0.371 2	0.142 3
平均值		0.559 2	0.525 3	0.551 6	0.567 2	0.378 3	0.146 3
RSD/%		1.22	0.76	1.56	0.56	1.30	1.87

2.6.3 不同柱温对 $f_{s/i}$ 的影响 采用 Waters e2695 色谱仪和 Kromasil C₁₈ 色谱柱考察了柱温 23、25、27 °C 对 $f_{s/i}$ 的影响, 并计算其 RSD, 结果均小于 3%, 表明不同柱温对各成分无显著影响。结果见表 4。

2.6.4 不同体积流量对 $f_{s/i}$ 的影响 采用 Waters e2695 色谱仪和 Kromasil C₁₈ 色谱柱考察了体积流量为 0.8、1.0、1.2 mL/min 时对 $f_{s/i}$ 的影响, 并计算其 RSD, 结果均小于 3%, 表明不同体积流量的变化对各成分的 $f_{s/i}$ 无明显影响。结果见表 5。

2.7 待测组分色谱峰定位

取混合对照品溶液, 选取 2 只不同品牌色谱柱, 按照“2.2”项下色谱条件测定, 以葛根素为内参物, 计算其他 6 种成分相对保留时间 ($t_{s/i}$), 对待测组分进行定位, 并计算 RSD, 结果各待测成分相对保留值得 RSD 均小于 3%, 表明采用相对保留值法对待

测成分定位合理。结果见表 6。

2.8 QAMS 与外标法结果对比

取 15 批样品, 按照“2.3.3”项下条件制备供试品溶液, 在“2.2”项下色谱条件进行测定, 记录峰面积, 采用 QAMS 法建立内参物葛根素与 3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、甘草苷、甘草酸的 $f_{s/i}$, 对 15 批 ZDG 样品中各成分进行含量测定, 同时采用外标法对其进行含量测定, 并以相对误差来表示 2 种方法测得结果的差异, 相对误差 = $(W_{\text{QAMS}} - W_{\text{外标法}}) / W_{\text{外标法}}$ (W_{QAMS} 为 QAMS 测得的含量, $W_{\text{外标法}}$ 为外标法测得的含量)。结果见表 7。结果发现, 外标法与 QAMS 法计算所得到的组分含量基本一致, 外标法实测含量值与 QAMS 法所测成分含量值无显著性差异。QAMS 法简化了分析过程, 降低分析成本, 但在实际应用中

表 4 柱温对 $f_{s/i}$ 的影响

Table 4 Effect of column temperature on $f_{s/i}$

柱温/°C	$f_{\text{葛根素/3'-羟基葛根素}}$	$f_{\text{葛根素/3'-甲氧基葛根素}}$	$f_{\text{葛根素/葛根素芹菜糖苷}}$	$f_{\text{葛根素/大豆苷}}$	$f_{\text{葛根素/甘草苷}}$	$f_{\text{葛根素/甘草酸}}$
23	0.561 3	0.531 1	0.562 8	0.570 0	0.384 7	0.149 4
25	0.556 1	0.524 2	0.555 4	0.563 1	0.379 1	0.147 4
27	0.578 1	0.538 1	0.551 6	0.570 9	0.388 2	0.148 5
平均值	0.565 2	0.531 1	0.556 6	0.568 0	0.384 0	0.148 4
RSD/%	2.04	1.30	1.02	0.75	1.19	0.66

表 5 体积流量对 $f_{s/i}$ 的影响

Table 5 Effect of volume flow on $f_{s/i}$

体积流量/(mg·mL ⁻¹)	$f_{\text{葛根素/3'-羟基葛根素}}$	$f_{\text{葛根素/3'-甲氧基葛根素}}$	$f_{\text{葛根素/葛根素芹菜糖苷}}$	$f_{\text{葛根素/大豆苷}}$	$f_{\text{葛根素/甘草苷}}$	$f_{\text{葛根素/甘草酸}}$
0.8	0.569 8	0.513 1	0.540 4	0.573 8	0.382 7	0.150 4
1.0	0.556 1	0.524 2	0.555 4	0.563 1	0.379 1	0.147 4
1.2	0.571 4	0.528 5	0.558 8	0.564 6	0.374 4	0.154 1
平均值	0.565 8	0.521 9	0.551 5	0.567 2	0.378 7	0.150 6
RSD/%	1.48	1.52	1.78	1.02	1.09	2.22

表 6 各成分相对保留时间

Table 6 Relative retention time of each component

仪器	色谱柱	t 葛根素/3'-羟基葛根素	t 葛根素/3'-甲氧基葛根素	t 葛根素/葛根素芹菜糖苷	t 葛根素/大豆苷	t 葛根素/甘草苷	t 葛根素/甘草酸
Waters	Kromasil	0.404 9	0.530 3	0.662 6	0.652 8	1.141 8	1.459 3
	Merck	0.404 7	0.530 4	0.662 9	0.653 2	1.153 3	1.533 0
Agilent 1260	Kromasil	0.404 9	0.530 2	0.664 0	0.652 9	1.147 0	1.494 6
	Merck	0.404 8	0.530 1	0.662 7	0.653 0	1.143 3	1.472 5
平均值		0.404 8	0.530 3	0.663 1	0.653 0	1.146 4	1.489 8
RSD/%		0.02	0.02	0.10	0.03	0.45	2.16

表 7 QAMS 法与外标法测得 15 批 ZDG 中 7 种成分的质量分数

Table 7 Mass concentrations of seven components in 15 batches of ZDG measured by QAMS and external standard methods

批号	3'-羟基葛根素/(mg·g ⁻¹)			3'-甲氧基葛根素/(mg·g ⁻¹)			葛根素芹菜糖苷/(mg·g ⁻¹)			葛根素/ (mg·g ⁻¹)
	外标法	QAMS 法	相对误差/%	外标法	QAMS 法	相对误差/%	外标法	QAMS 法	相对误差/%	
S1	8.476	8.508	0.379	14.920	14.968	0.321	14.564	15.358	4.831	46.002
S2	8.653	8.690	0.432	14.981	15.027	0.306	14.824	15.599	4.866	46.160
S3	8.509	8.545	0.427	14.762	14.808	0.311	13.878	14.846	4.770	45.409
S4	8.472	8.506	0.404	14.492	14.536	0.303	14.873	15.048	4.801	45.552
S5	8.104	8.128	0.303	14.629	14.676	0.320	14.378	15.174	4.863	44.965
S6	8.494	8.528	0.406	14.863	14.916	0.355	14.640	15.434	4.867	45.652
S7	8.305	8.337	0.380	14.592	14.642	0.341	14.423	15.165	4.862	44.947
S8	8.330	8.363	0.394	14.583	14.632	0.335	14.338	15.119	4.857	44.890
S9	8.210	8.241	0.374	14.448	14.495	0.324	14.194	14.999	4.860	44.493
S10	8.046	8.072	0.326	14.370	14.413	0.298	14.410	14.879	4.856	44.210
S11	8.705	8.744	0.449	15.023	15.072	0.325	14.747	15.600	4.864	46.183
S12	8.656	8.693	0.427	15.037	15.090	0.351	14.247	15.666	4.871	46.257
S13	8.073	8.099	0.321	14.382	14.429	0.326	14.134	15.004	4.866	44.431
S14	8.209	8.242	0.407	14.113	14.153	0.283	14.399	14.686	4.834	43.971
S15	8.229	8.261	0.386	14.147	14.190	0.303	14.512	14.669	4.801	44.393
批号	大豆苷/(mg·g ⁻¹)			甘草苷/(mg·g ⁻¹)			甘草酸/(mg·g ⁻¹)			
	外标法	QAMS 法	相对误差/%	外标法	QAMS 法	相对误差/%	外标法	QAMS 法	相对误差/%	
S1	14.561	14.232	-2.312	3.547	3.610	1.778	6.475	6.524	0.755	
S2	14.822	14.497	-2.242	3.431	3.484	1.562	6.531	6.581	0.766	
S3	13.883	13.525	-2.647	3.009	3.032	0.778	6.400	6.449	0.768	
S4	14.869	14.553	-2.171	3.446	3.502	1.630	6.477	6.528	0.785	
S5	14.368	14.051	-2.256	3.418	3.474	1.646	6.330	6.378	0.765	
S6	14.638	14.311	-2.285	3.463	3.520	1.653	6.439	6.488	0.765	
S7	14.422	14.093	-2.334	3.417	3.473	1.621	6.297	6.345	0.760	
S8	14.340	14.007	-2.377	3.436	3.493	1.662	6.305	6.353	0.765	
S9	14.191	13.862	-2.373	3.334	3.384	1.510	6.302	6.352	0.790	
S10	14.412	14.088	-2.300	3.368	3.421	1.587	6.231	6.280	0.783	
S11	14.753	14.417	-2.331	3.496	3.555	1.675	6.542	6.593	0.768	
S12	14.250	13.900	-2.518	3.502	3.561	1.681	6.547	6.597	0.764	
S13	14.129	13.798	-2.399	3.454	3.513	1.715	6.294	6.344	0.793	
S14	14.403	14.077	-2.316	3.349	3.401	1.562	6.170	6.218	0.778	
S15	14.509	14.191	-2.241	3.367	3.420	1.564	6.142	6.188	0.739	

可能还存在着局限性^[14-16],为了使 QAMS 法在同时测定中药多成分中得到广泛应用,还需对 QAMS 法相关技术进行深入研究。

2.9 薄层色谱鉴别

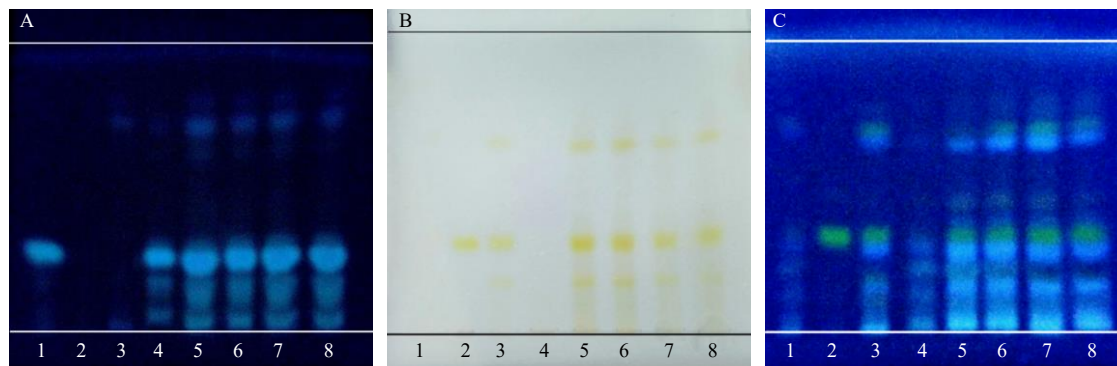
取“2.3.4”项对照品溶液、“2.3.5”项供试品溶液和“2.3.6”项阴性样品溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(20:4.5:

0.5)为展开剂展开,取出,晾干,置于紫外灯(365 nm)下检视,结果见图 3-A。再喷以 10%硫酸乙醇溶液,在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰,置日光和紫外光灯(365 nm)下检视,结果见图 3-B、C。

3 讨论

3.1 QAMS 含量测定色谱条件考察

3.1.1 供试品溶液制备方法的考察 本实验考察了



A-葛根成分显色图(紫外 365 nm) B-甘草成分显色图(日光) C-甘草成分显色图(紫外 365 nm) 1-葛根素对照品 2-甘草苷对照品 3-葛根阴性颗粒 4-甘草阴性颗粒 5-ZDG 2022071301 6-ZDG 2022071302 7-ZDG 2022071303 8-ZDG 基准样品

A-color rendering diagram of *Puerariae Lobatae Radix* components (UV 365 nm) B-color rendering of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* components (sunlight) C-color rendering of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* components (UV 365 nm) 1-puerarin reference substance 2-glycyrrhizin reference substance 3-*Puerariae Lobatae Radix* negative granules 4-*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* negative granules 5-ZDG 2022071301 6-ZDG 2022071302 7-ZDG 2022071303 8-ZDG reference sample

图 3 ZDG 中甘草苷、葛根素薄层色谱图

Fig. 3 Thin layer chromatogram of liquiritin and puerarin in ZDG

提取溶剂(水及 20%、50%、80%甲醇),结果发现选择用 50%甲醇作为提取溶剂,已提取完全,且峰型较好,基线也平稳,因此综合考虑,选用 50%甲醇作为提取溶剂。超声时间(10、15、20 min),结果显示,10 min 和 15 min 各共有峰峰面积无明显差异,说明超声 10 min 已经提取完全,因此超声时间定为 10 min。

3.1.2 流动相筛选 本实验考察了甲醇-水溶液、乙腈-水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液等不同体系流动相,以 ZDG 中所测成分葛根素、3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、甘草苷、甘草酸分离效果为指标,结果表明,乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相色谱峰峰型较好,各峰之间的分离度良好,基线较平稳,最终选择乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相。

3.1.3 检测波长的选择 本实验测定的化学成分种类较多,分别考察了 220、254、280 nm 波长下的样品谱图,通过比较分析在 280 nm 下的峰数目,峰形、分离度、对称因子、理论塔板数等参数,结果显示在 280 nm 波长下检测到的图谱出峰较多,基

线平稳,峰形良好,且干扰少,故选择以 280 nm 作为含量测定波长。

3.1.4 内参物的选定 建立 QAMS 法,内参物的选定是关键,选定内参物的标准是易得、价廉、性质稳定、峰面积和保留时间稳定、供试品中的含量高^[17-20]。在本实验研究的 7 个指标成分中,葛根素^[15]为葛根异黄酮类中主要活性成分之一,且相较价廉易得,含量高、稳定性好,因此,本实验以葛根素为内标物,建立 QAMS 的分析方法,弥补了对照品不足或价格昂贵的缺点,也体现了 QAMS 法低成本的优势。

3.1.5 $f_{s/i}$ 耐用性考察 采用 2 个不同品牌高效液相色谱仪和 2 种不同品牌色谱柱以及不同柱温和体积流量,分别考察了 $f_{s/i}$ 和相对保留时间的可靠性,结果发现,不同仪器、不同色谱柱、不同柱温、不同体积流量下 $f_{s/i}$ 的 RSD 均小于 3.0%,相对保留时间的 RSD 均小于 3.0%,说明该 QAMS 法的系统耐用性良好。

3.2 薄层鉴别条件考察

3.2.1 展开剂考察 分别以三氯甲烷-甲醇-水(20:4.5:0.5)(展开剂 1)及环己烷-丙酮-醋酸乙

酯(5:2:1)(展开剂2)为展开剂,展开,取出,晾干,展开系统2用氨水熏10 min,置紫外光灯(365 nm)下检视,后喷以10%硫酸乙醇溶液,在105℃加热至斑点显色清晰,置日光和紫外光灯(365 nm)下检视。根据薄层色谱的分离情况,选择分离效果更好的展开系统1三氯甲烷-甲醇-水(20:4.5:0.5)作为ZDG同时鉴别葛根及甘草的薄层鉴别方法。

3.2.2 色谱条件稳定性考察 按上述确定的方法对薄层鉴别方法考察其稳定性,考察不同温度4、25℃及不同湿度25%、70%的影响。结果表明,与对照品、基准样品相应色谱位置上供试品色谱斑点颜色大小相同,且各考察因素下结果差异不大,温度及湿度对葛根及甘草薄层鉴别方法的影响较小。

3.2.3 不同厂家薄层板 按上述方法对葛根进行薄层鉴别,考察青岛海洋化工有限公司、青岛康业鑫有限公司、上海阿拉丁生化科技股份有限公司芯硅谷3个厂家生产的硅胶G板对竹茹汤中葛根及甘草薄层鉴别的影响。结果表明,与对照品、对照药材相应色谱位置上的供试品色谱斑点颜色大小相同,且各考察因素下结果差异不大,薄层板对葛根及甘草薄层鉴别方法的影响较小。

本研究首次建立了QAMS法结合特征图谱技术同时测定经典名方ZDG 7种成分的含量,同时建立薄层色谱法同时鉴别经典名方ZDG剂在质量控制鉴别中主要成分葛根素和甘草苷,此方法减少了薄层鉴别的工作量及试剂,并为经典名方薄层鉴别方法提供参考。15批样品特征图谱相似度均大于0.9;同时QAMS法和外标法分别测定15批ZDG 7种成分的含量结果无显著差异;薄层鉴别方法稳定性良好,特征图谱与QAMS联用的方法,可客观评价药效成分复杂的复方制剂的整体质量,以期为该制剂质量控制和评价提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定[N]. 中国中医药报, 2018-06-04(2).
- [2] 宋·许叔微著. 刘景超, 李具双校注. 刘景超, 李具双校注. 普济本事方[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 58.
- [3] 严用和. 严氏济生方[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2012: 24.
- [4] 李翠娟. 许叔微《普济本事方》论治呕吐经验探析[J]. 陕西中医学院学报, 2012, 35(5): 25-26.

- [5] 何天雨, 王璐, 李林, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术的经典名方竹茹汤化学成分鉴定及网络药理学研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(19): 5235-5245.
- [6] 李小阳, 翟小林, 王丹, 等. 基于一测多评法的当归药材质量控制研究[J]. 中草药, 2022, 53(20): 6354-6360.
- [7] 王翠翠, 毕启瑞, 张建青, 等. 一测多评法定量分析半夏及其混伪品中的4种核苷类成分[J]. 中草药, 2022, 53(19): 6180-6186.
- [8] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925-1928.
- [9] 刘艳芬, 段芳, 张翹, 等. 基于HPLC-QAMS及化学计量学的利胆石颗粒质量评价研究[J]. 中草药, 2022, 53(19): 6044-6053.
- [10] 林丽, 杨雯晴, 商和儒. 基于一测多评定量控制联合灰色关联度分析的颈痛颗粒综合质量评价[J]. 药物评价研究, 2023, 46(6): 1254-1263.
- [11] 赵剑锋, 宋宗华, 刘静. 一测多评法同时测定菊花配方颗粒中8个成分的含量[J/OL]. 中国现代中药, [2023-05-31]. <https://doi.org/10.13313/j.issn.1673-4890.20230131002>.
- [12] 梁国嫔, 袁铭铭, 熊晓丽, 等. 一测多评法同时测定大青叶中4个黄酮类成分[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(4): 582-588.
- [13] 周凡, 李淑萍, 贺飞, 等. 一测多评法测定藏茴香中异绿原酸A、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸C[J]. 药物评价研究, 2023, 46(4): 703-710.
- [14] 罗家敏, 高雯, 李萍. 指纹图谱结合一测多评法的栀子质量控制方法研究[J]. 中草药, 2022, 53(11): 3480-3486.
- [15] 唐清, 匡艳辉, 李雯珊, 等. 基于指纹图谱和一测多评(QAMS)法的丹红化瘀口服液质量评价研究[J]. 中草药, 2022, 53(6): 1663-1670.
- [16] 刘艳芬, 段芳, 张翹, 等. 基于一测多评(QAMS)法联合化学计量学的参贝止咳颗粒综合质量评价[J]. 中草药, 2022, 53(2): 413-423.
- [17] 方宝霞, 李湘, 滚代芬, 等. 一测多评法应用于化学药及中药的化学药成分质量控制研究进展[J]. 药物评价研究, 2023, 46(6): 1382-1388.
- [18] 马梦鸽, 杨莎, 唐志书, 等. 基于HPLC指纹图谱与一测多评法联用的血府逐瘀片质量控制研究[J]. 中草药, 2021, 52(22): 6856-6863.
- [19] 宝鲁尔, 王徽, 吴杰斯, 等. 一测多评法同时测定蒙药扎冲十三味丸中8种成分[J]. 中草药, 2021, 52(11): 3249-3256.
- [20] 木盼盼, 安琪, 张彦昭, 等. 一测多评法测定葛根药材中9个异黄酮成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(22): 4888-4895.

[责任编辑 郑礼胜]