

基于 HPLC 指纹图谱和一测多评法结合化学计量法的黄连须质量评价研究

唐亚男¹, 张文丽¹, 闫 婕¹, 罗 然³, 龙 飞^{1*}, 李隆云^{2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 重庆市中药研究院, 重庆 400065

3. 西南大学园艺园林学院, 重庆 400715

摘要: **目的** 建立黄连 *Coptis chinensis* 须根 HPLC 指纹图谱, 结合化学计量学进行不同产地黄连须的质量评价, 并采用一测多评法 (quantitative analysis of multi-components by single marker, QAMS) 进行多成分含量测定, 筛选差异化合物。 **方法** 采用 Welch Xtimate C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈为流动相 (A), 30 mmol/L 碳酸氢铵溶液 (每 1 000 毫升碳酸氢铵溶液含 7 mL 氨水, 1 mL 三乙胺) 为流动相 (B), 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 270 nm, 柱温 30 °C。 **结果** 建立了 18 批黄连须的指纹图谱, 与对照图谱相似度均≥0.966, 共标定 10 个共有峰, 并指出格兰地新、药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱 7 个共有峰, 通过聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA) 可将 18 批样品分为 3 类, 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 得到 2 个主成分, 累积方差贡献率为 81.556%, 通过正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares-discrimination analysis, OPLS-DA) 筛选出 4 个主要的差异性成分。以小檗碱为内参物, 建立了该成分与格兰地新、药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀的相对校正因子, 同时对 QAMS 的计算值与外标法 (ESM) 实测值进行比较, QAMS 和 ESM 计算的 6 种成分的含量无显著差异。 **结论** 建立的 HPLC 指纹图谱和 QAMS 法重复性好, 操作简单, 可用于黄连须的质量评价。

关键词: 黄连须; 指纹图谱; 化学计量学; 一测多评; 质量控制; 格兰地新; 药根碱; 非洲防己碱; 表小檗碱; 黄连碱; 巴马汀

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2025)22-8347-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.22.024

Quality evaluation of *Coptis chinensis* rootlet based on HPLC fingerprints and QAMS method combined with chemometrics

TANG Yanan¹, ZHANG Wenli¹, YAN Jie¹, LUO Ran³, LONG Fei¹, LI Longyun²

1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

3. College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint for *Coptis chinensis* rootlet, evaluate the quality of rootlets from different origins using chemometric methods, and determine the contents of multiple components via quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS), screening for differential compounds. **Methods** A Welch Xtimate C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was employed. The mobile phase consisted of acetonitrile (A) and 30 mmol/L ammonium bicarbonate solution (B; each 1 000 mL of ammonium bicarbonate solution contained 7 mL ammonia and 1 mL triethylamine). Gradient elution was performed at a flow rate of 1.0 mL/min, with detection at 270 nm and a column temperature of 30 °C. **Results** HPLC fingerprints were established for 18 batches of *C. chinensis* rootlet, all of which exhibited a similarity of ≥ 0.966 with the reference fingerprint. A total of 10 common peaks were identified, among which seven peaks were assigned to groenlandicine, jatrorrhizine, columbamine, epiberberine, coptisine, palmatine, and berberine. Hierarchical cluster analysis (HCA) classified the 18 samples into three groups. Principal component analysis (PCA)

收稿日期: 2025-02-02

基金项目: 科技部国家重点研发计划 (2021YD1601005-2); 农业部国家中药材产业技术体系重庆站 (CARS-21); 乌蒙山区特色中药材全产业链生产模式创建与示范 (2023YFD1600401); 成都中医药大学杏林学者传承创新专项 (CCCX2024011)

作者简介: 唐亚男, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与鉴定研究。E-mail: 2205403626@qq.com

***通信作者:** 龙 飞, 副教授, 主要从事中药品种、品质及资源利用。E-mail: longfei@cdutcm.edu.cn

李隆云, 重庆市中药研究院研究员, 博士学位, 主要从事药用植物栽培与质量评价研究工作。E-mail: lilongyun8@163.com

extracted two principal components, accounting for a cumulative variance contribution of 81.556%. Orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) identified four major differential components. Using berberine as the internal reference, relative correction factors were established for groenlandicine, jatrorrhizine, columbamine, epiberberine, coptisine, and palmatine. The QAMS-calculated values were compared with those obtained by the external standard method (ESM), and no significant differences were observed in the quantification of the six components between the two methods. **Conclusion** The HPLC fingerprint and QAMS method developed in this study demonstrate good reproducibility and operational simplicity, and can be effectively applied for the quality evaluation of *C. chinensis* rootlets.

Key words: *Coptis chinensis* Franch. rootlet; fingerprint; chemometrics; quantitative analysis of multi-components by single marker; quality control; groenlandicine; jatrorrhizine; columbamine; epiberberine; coptisine; palmatine

黄连是毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.、三角叶黄连 *C. deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao 或云连 *C. teeta* Wall. 的干燥根茎^[1], 主要分布于四川、重庆、湖北等地^[2]。作为我国大宗药材之一, 黄连具有降血糖、抗菌、抗氧化、消炎、调血脂、抗肿瘤等药理活性^[3], 其主要药效成分为生物碱, 包括小檗碱、巴马汀、黄连碱等^[4]。黄连须为黄连的干燥须根, 收载于《广东省中药材标准》^[5], 但实际在中医临床上基无使用, 成为黄连加工的副产物。据统计, 每年黄连须的废弃量占黄连产量的 15%, 而废弃的黄连须中含有大量的生物碱类成分, 因此黄连须可作为小檗碱的重要来源, 从药效物质深入挖掘和资源综合利用角度有必要对黄连须药材质量开展深入研究。目前已有多篇针对黄连须的成分测定和药效作用的研究报道^[6-8], 但有关黄连须多成分、多方法的质量评价未见报道。

中药所含成分复杂, 以特征图谱和多指标成分定量测定来进行中药材的质量评价已被广泛应用^[9-11], 传统的药材成分含量测定方法为外标法, 存在成本高且操作复杂的问题^[12], 一测多评 (quantitative analysis of multicomponents by single-marker, QAMS) 是由王智民提出的多指标质量控制方法, 通过药材组分含量之间的联系, 确定一种易得且低廉的标志性组分, 对其他组分进行定量, 具有快速、准确、环保等特点, 应用前景广阔^[13-14]。本研究收集四川、重庆、湖北不同产地 18 批黄连须, 利用高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱, 结合化学计量学^[15], 比较不同产地黄连须的质量差异, 并寻找质量差异物, 为黄连须的质量控制奠定基础, 以小檗碱为内参物, 首次采用指纹图谱结合 QAMS 测定黄连须中 7 种生物碱类成分含量, 有效节约了检测时间以及成本, 以期对黄连须的质量评价方法进行进一步完善, 并为黄连须的质量控制和黄连资源利用提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 包括真空脱气机 G1322A JP62356715; 四元泵 G1311A DE62959222; 自动进样器 G1329A DE64760202; 柱温箱 G1316A DE63060935; DAD 检测器 G1315B DE63057698 及 ChemStation 工作站 (美国 Agilent 公司); KQ-250DB 型数控超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司); XY-100MW-A 型卤素水分测定仪 (常州市幸运电子设备有限公司)。

1.2 试药

对照品格兰地新 (批号 CYR-G0046220901)、非洲防己碱 (批号 CYR-F0034231201)、药根碱 (批号 CYR-Y0011231201)、表小檗碱 (批号 CYR-B0043220609)、黄连碱 (批号 CYR-H0057220202)、巴马汀 (批号 CYR-H0076231201)、小檗碱 (批号 CYR-X0024210628), 质量分数均大于 98%, 由四川萃益润生物科技有限公司提供。甲醇 (HPLC 级)、乙腈 (HPLC 级) 购自美国 TEDIA 公司, 盐酸、甲醇 (AR 级) 购自重庆川东化工有限公司, 氨水、三乙胺、碳酸氢铵购自山东科源生化有限公司。所有药材经重庆市中药研究院李隆云研究员鉴定为黄连 *C. chinensis* Franch. 的干燥须根。样品信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

精密称取黄连须粉末 (过 60 目筛) 0.20 g, 精密称定, 置 50 mL 锥形瓶中, 精密加入 50 mL 甲醇-盐酸 (100:1) 溶液, 称定质量后超声处理 (功率 250 W、频率 40 kHz) 30 min。放冷, 再称定质量, 用甲醇-盐酸 (100:1) 补足减失的质量, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液即为供试品溶液。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取格兰地新、药根碱、非洲防己碱、表

表 1 18 批黄连须样品信息

Table 1 Sample information of 18 batches of *C. chinensis* rootlet samples

编号	采集日期	品种	来源
S1	2023-10-24	黄连	四川省彭州市通济镇春芽村
S2	2023-10-24	黄连	四川省彭州市通济镇春芽村
S3	2023-10-26	黄连	四川省绵阳市北川县片口乡
S4	2023-10-27	黄连	四川省绵阳市安州区高川乡
S5	2023-10-27	黄连	四川省绵阳市安州区高川乡
S6	2023-10-29	黄连	四川省成都大邑县邮江镇
S7	2023-10-29	黄连	湖北省恩施宣恩县椿木营乡割藤湾
S8	2023-10-30	黄连	湖北省恩施州利川市汪营镇
S9	2023-10-30	黄连	湖北省恩施州利川市汪营镇天上坪村
S10	2023-11-01	黄连	湖北省恩施州利川市汪营镇鱼泉口村
S11	2023-11-02	黄连	湖北省恩施州利川市建南镇凤凰沟村
S12	2023-11-02	黄连	湖北省恩施州利川市建南镇龙塘沟村
S13	2023-11-03	黄连	重庆市石柱县枫木镇昌坪村
S14	2023-11-09	黄连	重庆市石柱县黄水镇洋洞村
S15	2023-11-09	黄连	重庆市石柱县黄水镇万胜坝村
S16	2023-11-10	黄连	重庆市石柱县中义乡建峰村
S17	2023-11-11	黄连	重庆市石柱县中义乡全兴村
S18	2023-11-11	黄连	重庆市石柱县沙子镇龙源村

小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱的对照品适量，分别置于 10 mL 量瓶中，加甲醇-盐酸（100：1）溶解，配制成质量浓度依次为 72.0、45.0、33.0、32.1、40.8、107.1、78.6 μg/mL 的混合对照品溶液，低温避光保存，备用。

2.3 色谱条件

Welch Xtimate C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；以乙腈为流动相 A，以 30 mmol/L 碳酸氢铵溶液（每 1 000 mL 碳酸氢铵溶液含 7 mL 氨水，1 mL 三乙胺）为流动相 B，梯度洗脱：0~15 min，10%~25% A；15~25 min，25%~30% A；25~40 min，30%~45% A；40~45 min，45%~10% A；45~55 min，10% A；柱温 30 ℃，体积流量 1.0 mL/min；检测波长为 270 nm；进样量 10 μL。

2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 精密度试验 称取黄连须粉末（S1）适量，按“2.1”项方法制备供试品溶液，并按“2.3”项色谱条件进样 6 针，以小檗碱峰为参照峰，计算其余共有峰的相对保留时间。格兰地新、药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀的相对保留时间 RSD 分别为 0.09%、0.21%、0.38%、0.04%、0.17%、0.15%，RSD 均小于 1.0%，相对峰面积 RSD 分别

为 1.25%、0.50%、2.03%、0.96%、1.11%、1.28%，均小于 3.0%，表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 称取黄连须粉末（S1）适量，按“2.1”项下方法平行制备供试品溶液 6 份，按“2.3”项下色谱条件进样分析，以小檗碱峰为参照峰，格兰地新、药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀的相对保留时间 RSD 分别为 0.31%、0.29%、0.39%、0.03%、0.13%、0.11%，RSD 均小于 1.0%，相对峰面积 RSD 分别为 1.43%、1.21%、1.62%、0.89%、0.74%、1.95%，均小于 2.0%，表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 称取黄连须粉末（S1）适量，按“2.1”项方法制备供试品溶液，并按“2.3”项色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24、48 h 进样分析，以小檗碱峰为参照峰，格兰地新、药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀的相对保留时间 RSD 分别为 0.37%、0.39%、0.61%、0.04%、0.18%、0.15%，RSD 均小于 1.0%，相对峰面积 RSD 分别为 1.85%、1.77%、2.77%、1.17%、1.41%、1.71%，均小于 3.0%，表明该供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.4.4 HPLC 指纹图谱的建立及相似度评价 分别

取不同产地 18 批黄连须药材 (S1~S18) 按 “2.1” 项下方法制备成供试品溶液, 于 “2.3” 项色谱条件下进样分析, 得到不同产地黄连须药材 (S1~S18) HPLC 色谱图, 将色谱数据以 AIA 格式导入 “中药色谱指纹图谱相似度评价软件” (2012 版)。选择样品 S1 作为参照图谱, 采用中位数法, 时间窗宽度设置为 0.2 min, 经多点校正和自动峰匹配后生成对照指纹图谱 (R), 共标定 10 个共有峰, 见图 1。通过与混合对照品色谱图比对, 指出 7 个共有峰 (图 2), 其中 1 号峰为格兰地新, 2 号峰为药根碱, 3 号峰为非洲防己碱, 4 号峰为表小檗碱, 5 号峰为黄连碱, 6 号峰为巴马汀, 7 号峰为小檗碱 (参照峰 S)。以 18 批黄连须样品的高效液相对照指纹图谱 (R) 为参照, 采用相似度软件计算 18 批黄连色谱图相似度, 结果见表 2, 不同产地黄连须指纹图谱相似

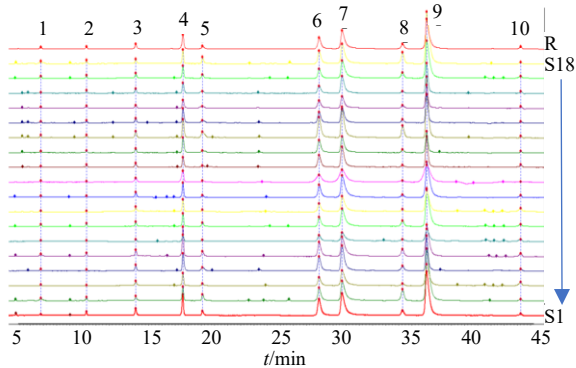
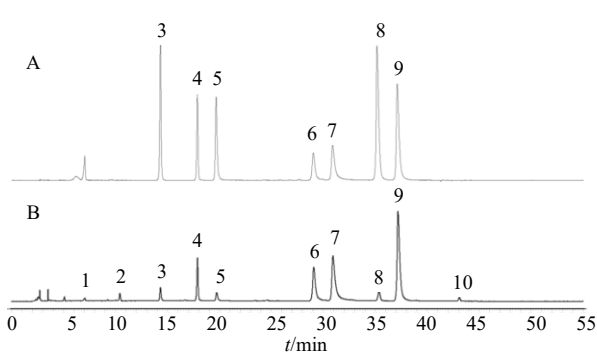


图 1 18 批黄连须样品的叠加指纹图谱
Fig. 1 HPLC superimposed fingerprints of 18 batches of *C. chinensis* rootlet samples



3-格兰地新; 4-药根碱; 5-非洲防己碱; 6-表小檗碱; 7-黄连碱;
8-巴马汀; 9-小檗碱。
3-groenlandicine; 4-jatrorrhizine; 5-columbamine; 6-epiberberine; 7-
coptisine; 8-palmatine; 9-berberine.

图 2 混合对照品 (A) 和样品 (B) 对照指纹图谱特征峰归属
Fig. 2 Characteristic peak attribution of fingerprint of mixed reference substances (A) and sample (B)

表 2 18 批不同产地黄连须样品的相似度
Table 2 Similarity of 18 batches of *C. chinensis* rootlet samples from different origins

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.998	S10	0.993
S2	0.983	S11	0.993
S3	0.982	S12	0.976
S4	0.987	S13	0.993
S5	0.997	S14	0.999
S6	0.987	S15	0.998
S7	0.996	S16	0.990
S8	0.966	S17	0.993
S9	0.979	S18	0.982

度均>0.9, 具有良好的相似度, 表明 18 批黄连须质量相对稳定, 整体性良好, 所建立的指纹图谱方法可用于黄连须的质量控制。

2.5 化学计量学分析

2.5.1 聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA) 利用 SPSS 26.0 软件对 18 批黄连须 (S1~S18) 的 10 个共有峰峰面积进行 HCA, 采用组间联接系统聚类法, 以平方欧式距离为度量标准进行分类, 聚类谱系树状图见图 3。当平方欧式距离为 10 时, 显示 18 批的黄连须一共可聚为 3 类, 样品 S1~S3、S13 聚为第 I 类, S4、S5、S10、S18 聚为第 II 类, S6~S9、S11、S12、S14~S17 聚为第 III 类。结果显示, 不同产地的药材在聚类时有一定的交叉, 表明不同产地的黄连须在化学成分上存在差异, 但重庆产地黄连须质量较为接近。

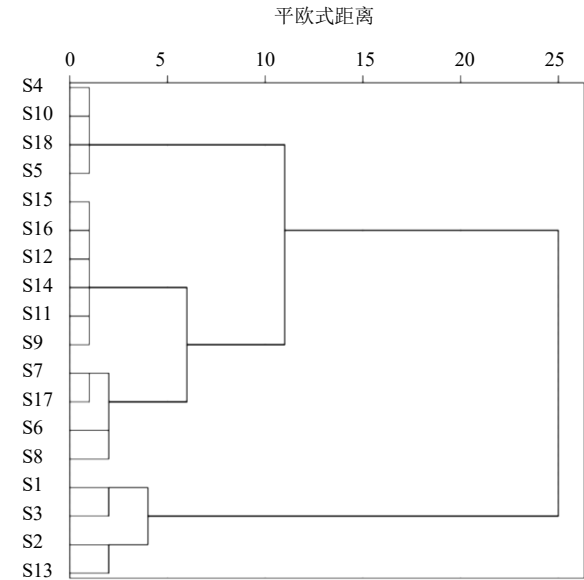


图 3 HCA 谱系树状图
Fig. 3 HCA genealogy tree diagram

2.5.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) PCA 本质是将数据的多元变量抽取少量主成分, 从而在能保留原始数据中绝大多数信息的情况下, 以少数主成分来表征复杂的原始数据^[16]。通过 SIMCA 14.1 和 SPSS 26.0 软件对 18 批黄连须的 10 个共有峰的峰面积进行“降维”处理, 以成分特征值 >1 为标准得到 2 个主成分, 累积方差贡献率为 81.556%, 表明 2 个主成分在 PCA 中占主导地位, 结果见表 3。得分图见图 4, 与聚类结果相似, 直观显示出不同样品之间的差异性。

表 3 主成分特征值和方差贡献率
Table 3 Principal component eigenvalue and variance contribution rate

主成分	特征值	方差百分比/%	累积方差贡献率/%
成分 1	7.052	70.516	70.516
成分 2	1.104	11.040	81.556

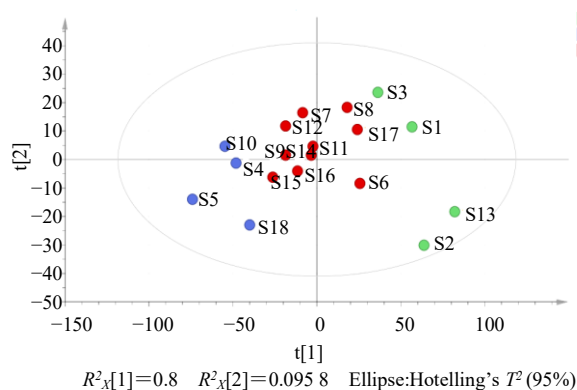


图 4 PCA 得分图
Fig. 4 PCA score plot

2.5.3 正交偏最小-二乘判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 为更准确分析不同地区黄连须的质量差异, 通过 SIMCA 14.1 软件在 PCA 基础上对 18 批黄连须的 10 个共有峰的峰面积进行 OPLS-DA, 结果见图 5, 结果与 HCA 和 PCA 结果相似。其中模型参数 R^2_X 、 R^2_Y 和 Q^2 分别为 0.933 (>0.5)、0.638 (>0.5) 和 0.459 (>0.4), 表明所建立的数学模型具有较准确的预测性。为找出引起质量差异的主要成分, 以 $VIP>1$ 为筛选标准, 6 号峰 (表小檗碱)、7 号峰 (黄连碱)、8 号峰 (巴马汀) 和 9 号峰 (小檗碱) 的 VIP 值分别为 1.609 15、1.050 25、1.068 30 和 1.832 87, 均大于 1, 这 4 个成分可作为黄连须的潜在差异标志物, 结果见图 6。对 OPLS-DA

模型进行 200 次置换检验, 如图 7 所示, Q^2 回归线与纵轴的交点小于 0, 没有出现拟合现象, 证实了模型的有效性, 该结果可用于黄连须的差异成分鉴别分析。

2.6 黄连须中 7 个成分的含量测定

2.6.1 标准曲线绘制 准确量取“2.2”项混合对照

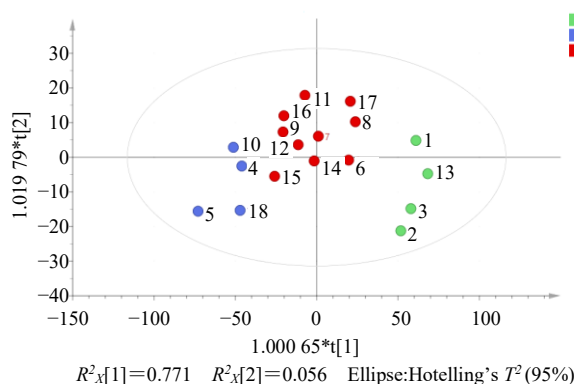


图 5 OPLS-DA 得分图
Fig. 5 OPLS-DA score plot

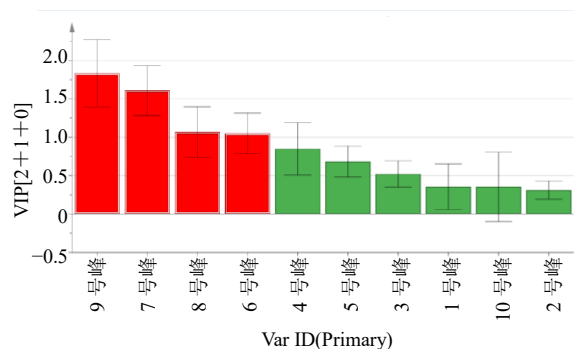


图 6 18 批黄连须的 OPLS-DA 的 VIP 值图
Fig. 6 VIP values of OPLS-DA of 18 batches of *C. chinensis* rootlet samples

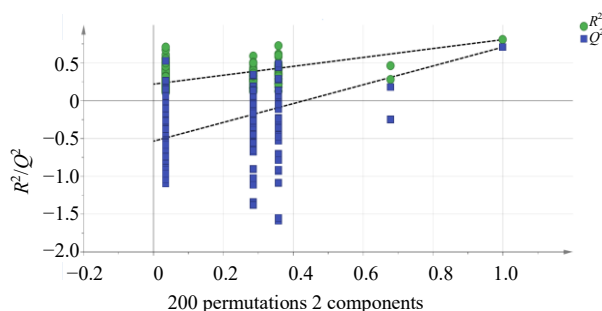


图 7 18 批黄连须的置换检验
Fig. 7 Permutation test plot of 18 batches of *C. chinensis* rootlet samples

品溶液,用甲醇-盐酸(100:1)分别稀释至 5 个不同浓度。自动进样系统分别进样 10 μL ,重复进样 3 针,对收集的格兰地新、药根碱、非洲防己碱、表

小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱峰面积与质量浓度进行线性回归,结果见表 4,其中 7 个成分的相关系数均大于 0.999 0,线性关系良好。

表 4 黄连须中各成分的线性关系

Table 4 Linear relation of each constituent in *C. chinensis* rootlet

成分	回归方程	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	r
格兰地新	$Y=26.162 X-13.288$	0.79~255.00	0.999 7
药根碱	$Y=25.502 X+13.609$	0.34~150.00	0.999 9
非洲防己碱	$Y=44.83 X-31.178$	0.55~110.00	0.999 8
表小檗碱	$Y=28.467 X-13.93$	0.23~107.00	0.999 5
黄连碱	$Y=27.821 X-24.149$	1.15~136.00	0.999 9
巴马汀	$Y=33.895 X+20.35$	1.39~107.10	0.999 9
小檗碱	$Y=37.841 X-30.404$	0.93~262.00	0.999 9

2.6.2 精密度试验 精密吸取“2.2”项下的混合对照品溶液,按“2.3”项色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积并计算其 RSD,格兰地新、药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱峰面积的 RSD 分别为 1.06%、1.13%、1.85%、1.30%、1.61%、1.04%、1.07%,均 $<2.0\%$,表明仪器精密度良好。

2.6.3 重复性试验 取同一批次黄连须粉末(S1)6 份,每份约 0.2 g,精密称定。按“2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件分析。测得出格兰地新、药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱的平均质量分数分别为 2.12、6.21、1.23、10.47、14.26、1.94、19.09 mg/g, RSD 分别为 1.64%、1.71%、1.90%、1.19%、1.33%、1.61%、1.50%,表明该方法的重复性良好。

2.6.4 稳定性试验 精密称取 S1 样品粉末,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项色谱条件,分别于制备溶液后 0、2、4、8、12、24 h 进样分析,记录峰面积。结果格兰地新、药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱峰面积的 RSD 分别为 0.99%、0.84%、1.96%、1.11%、1.42%、1.04%、0.45%, RSD 均小于 2.0%。

2.6.5 加样回收率试验 取已测定各成分含量的样品(S1)9 份,每份 0.1 g,精密称定,分成 3 组,每组 3 份,分别按照供试品中待测成分的量与对照品量之比为 1:0.8、1:1、1:1.2,精密加入对照品适量,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项色谱条件进样分析,计算加样回收率。格兰地新、药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱的平均加样回收率分别为 99.67%、100.50%、101.39%、100.42%、98.92%、100.70%、99.74%。

各成分加样回收率 RSD 值分别为 1.62%、1.27%、1.74%、2.47%、1.43%、2.18%、1.51%,表示方法的准确性良好。

2.7 QAMS 的建立

2.7.1 相对校正因子(f_{si})的计算 在“2.3”项色谱条件下,取“2.2”项下格兰地新、药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱质量浓度分别为 60.6、33.0、76.5、45.0、32.1、40.8、107.1、78.6 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液分别进样 2、4、6、8、10、12、14 μL ,以小檗碱为内标,按公式 $f_{si} = A_s \times C_i / (A_i \times C_s)$ (A_s 为内标物峰面积, C_i 为待测组分浓度, A_i 为待测物峰面积, C_s 为内标物浓度)^[17] 分别计算小檗碱对格兰地新、药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀的相对校正因子,见表 5。

2.7.2 不同色谱柱对 f_{si} 的影响 取“2.2”项下混合对照品溶液,按“2.3”项色谱条件进样分析,分别考察不同品牌色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) (柱 1: Agilent ZORBAX Extend C₁₈、柱 2: Welch Xtimate C₁₈、柱 3: Waters Atlantis® T3) 对 f_{si} 的影响。结果见表 6。各成分采用不同色谱柱的 f_{si} 的 RSD 均 $<2.0\%$,表明不同色谱柱对相对校正因子的适用性较好。

2.7.3 不同仪器对 f_{si} 的影响 取“2.2”项下混合对照品溶液,按“2.3”项色谱条件进样分析,分别考察了 2 种 HPLC 系统(仪器 1: Agilent-1200、仪器 2: Agilent-1260) 对 f_{si} 的影响。结果见表 7。各成分采用不同仪器的 f_{si} 的 RSD 均 $<2.0\%$,表明不同仪器对 f_{si} 的适用性较好。

2.7.4 不同体积流量对 f_{si} 的影响 取“2.2”项下混合对照品溶液,按“2.3”项色谱条件进样分析,采用 Agilent-1200 高效液相色谱仪, Welch

Xtimate C₁₈ 色谱柱，考察体积流量为 0.8、1.0、1.2 mL/min 时的 $f_{s/i}$ ，结果表明各成分 $f_{s/i}$ RSD 均 < 2.0%，表明在不同体积流量下 $f_{s/i}$ 的适用性较好。见表 8。

2.7.5 不同柱温对 $f_{s/i}$ 的影响 取“2.2”项下混合对照品溶液，按“2.3”项色谱条件进样分析，采用

表 5 6 种成分 $f_{s/i}$
Table 5 Relative correction factors of six components

进样体积/ μ L	$f_{s/i}$					
	格兰地新	药根碱	非洲防己碱	表小檗碱	黄连碱	巴马汀
2	1.370 0	1.448 7	0.770 2	1.413 7	1.288 6	1.076 4
4	1.383 5	1.440 0	0.781 9	1.396 2	1.286 9	1.094 1
6	1.367 2	1.448 8	0.809 8	1.388 3	1.246 9	1.092 6
8	1.400 1	1.448 2	0.787 8	1.406 6	1.254 4	1.082 0
10	1.382 8	1.432 3	0.791 5	1.368 9	1.304 1	1.081 4
12	1.415 4	1.445 6	0.774 5	1.388 8	1.241 4	1.098 8
14	1.405 1	1.405 8	0.765 2	1.415 3	1.275 2	1.086 9
平均值	1.389 2	1.438 5	0.783 0	1.396 8	1.271 1	1.087 5
RSD/%	1.31	1.09	1.93	1.18	1.87	0.74

表 6 不同色谱柱对 $f_{s/i}$ 的影响
Table 6 Effects of different chromatographic columns on $f_{s/i}$

色谱柱	$f_{s/i}$					
	格兰地新	药根碱	非洲防己碱	表小檗碱	黄连碱	巴马汀
柱 1	1.376 8	1.457 9	0.786 5	1.365 5	1.275 5	1.071 6
柱 2	1.370 0	1.448 7	0.791 5	1.368 9	1.268 2	1.076 4
柱 3	1.396 0	1.453 9	0.789 9	1.414 5	1.262 7	1.078 3
平均值	1.380 9	1.453 5	0.789 3	1.383 0	1.268 7	1.075 4
RSD/%	0.98	0.32	0.32	1.98	0.49	0.32

表 7 不同仪器对 $f_{s/i}$ 的影响
Table 7 Effects of different instruments on $f_{s/i}$

仪器	$f_{s/i}$					
	格兰地新	药根碱	非洲防己碱	表小檗碱	黄连碱	巴马汀
仪器 1	1.370 0	1.448 7	0.791 5	1.368 9	1.268 2	1.076 4
仪器 2	1.379 9	1.446 4	0.809 0	1.386 5	1.258 6	1.067 5
平均值	1.375 0	1.447 6	0.800 3	1.377 7	1.263 4	1.072 0
RSD/%	0.51	0.11	1.55	0.9	0.54	0.59

表 8 不同体积流量对 $f_{s/i}$ 的影响
Table 8 Effects of different flow rates on $f_{s/i}$

体积流量/(mL $\cdot$ min ⁻¹)	$f_{s/i}$					
	格兰地新	药根碱	非洲防己碱	表小檗碱	黄连碱	巴马汀
0.8	1.427 6	1.425 0	0.750 7	1.383 6	1.148 0	1.084 9
1.0	1.382 8	1.414 0	0.760 7	1.368 9	1.173 5	1.069 2
1.2	1.409 2	1.373 0	0.773 7	1.368 7	1.194 0	1.078 3
平均值	1.406 5	1.404 0	0.761 7	1.373 7	1.171 8	1.077 5
RSD/%	1.6	1.94	1.51	0.62	1.97	0.73

Agilent-1200 高效液相色谱仪, Welch Xtimate C₁₈ 色谱柱, 考察柱温为 25、30、35 ℃ 时的 $f_{s/i}$, 结果表明各成分 $f_{s/i}$ RSD 均 < 2.0%, 表明在不同柱温下 $f_{s/i}$ 适用性较好。见表 9。

2.7.6 色谱峰的定位 以相对保留时间 ($r_{i/s}$) 进行

峰定位^[18], $r_{i/s} = t_{R(i)}/t_{R(s)}$ (i 为待测成分, s 为内标物小檗碱), 取“2.2”项混合对照品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 分别计算各个化学成分的相对保留时间 ($r_{i/s}$), 结果见表 10, RSD < 2.0%, 表明可利用 $r_{i/s}$ 对各成分进行定位。

表 9 不同柱温对相对校正因子的影响

Table 9 Effects of different column temperatures on relative correction factor

温度/℃	$f_{s/i}$					
	格兰地新	药根碱	非洲防己碱	表小檗碱	黄连碱	巴马汀
25	1.437 0	1.440 2	0.829 8	1.371 7	1.195 7	1.090 8
30	1.382 8	1.414 0	0.819 0	1.368 9	1.173 5	1.069 2
35	1.414 2	1.408 7	0.806 8	1.417 3	1.182 2	1.092 7
平均值	1.411 3	1.421 0	0.818 5	1.386 0	1.183 8	1.084 2
RSD/%	1.93	1.19	1.4	1.96	0.94	1.2

表 10 不同色谱柱和不同仪器测定黄连须中 7 种成分的相对保留值

Table 10 Relative retention values of seven compounds in *C. chinensis* rootlet by different columns and different instruments

影响因素	型号	$r_{i/s}$					
		格兰地新	药根碱	非洲防己碱	表小檗碱	黄连碱	巴马汀
色谱柱	柱 1	0.392 3	0.514 8	0.518 0	0.786 5	0.812 3	0.927 4
	柱 2	0.385 2	0.503 7	0.530 7	0.765 9	0.828 2	0.938 0
	柱 3	0.393 5	0.499 6	0.522 4	0.784 0	0.826 4	0.949 8
	平均值	0.390 3	0.506 0	0.523 7	0.778 8	0.822 3	0.938 4
	RSD/%	1.15	1.55	1.23	1.44	1.06	1.19
仪器	仪器 1	0.385 2	0.503 7	0.530 7	0.765 9	0.828 2	0.938 0
	仪器 2	0.383 9	0.507 6	0.539 2	0.767 6	0.824 2	0.940 5
	平均值	0.384 6	0.505 7	0.535 0	0.766 8	0.826 2	0.939 3
	RSD/%	0.24	0.55	1.12	0.16	0.34	0.19

2.7.7 QAMS 和 ESM 法结果比较 取 18 批次黄连须样品粉末, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3”项下色谱条件进样测定, 采用外标法 (ESM) 法计算格兰地新、药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱的含量, 再采用 QAMS 计算格兰地新、药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀的含量, 见表 11。将 2 种方法测定的结果经 t 检验比较^[19], $P > 0.05$, 表明 QAMS 和 ESM 法测得的含量无显著性差异, 表明所建立的 QAMS 法准确性良好。

3 讨论

试验前期, 为确定最合适的供试品制备条件, 分别考察了不同提取溶液 (70%乙醇、50%乙醇、体积比为 100:1 的甲醇-盐酸溶液) 和不同超声时间 (30、40、60 min), 最终确定采用甲醇-盐酸 (100:

1) 溶液为溶剂、超声时间为 30 min 时各色谱峰形和分离度较好。同时也考察了不同流动相 (体积比为 50:50 的乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液、乙腈-30 mmol/L 碳酸氢铵溶液) 对色谱峰形和分离度的影响, 其中磷酸二氢钾溶液含有十二磺基硫酸钠, 易对仪器及色谱柱造成损伤且配置复杂^[20-21], 最终选择乙腈-30 mmol/L 碳酸氢铵溶液 (每 1 000 mL 碳酸氢铵溶液含 7 mL 氨水, 1 mL 三乙胺) 作为流动相。为提高试验效率, HPLC 指纹图谱的建立和 QAMS 方法使用同一供试品在同一色谱条件下进行, 数据整合后效果亦较好。

在不同地区的 18 批黄连须 HPLC 指纹图谱建立中, 共标定了 10 个共有峰, 并指认了其中 7 个成分, 在相似度分析中, 18 批样品的相似度均在 0.966 以上, 表明整体性良好, 不同产地黄连须的化

表 11 QAMS 与 ESM 含量结果
Table 11 Content results of QAMS and ESM

序号	格兰地新/(mg·g ⁻¹)		药根碱/(mg·g ⁻¹)		非洲防己碱/(mg·g ⁻¹)		表小檗碱/(mg·g ⁻¹)		黄连碱/(mg·g ⁻¹)		巴马汀/(mg·g ⁻¹)		小檗碱/(mg·g ⁻¹)
	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	
S1	2.032 7	2.039 3	6.360 4	6.381 1	1.163 9	1.168 1	11.067 3	11.064 6	14.475 7	14.474 3	1.946 3	1.940 0	19.643 1
S2	1.375 0	1.388 6	4.387 6	4.383 7	1.757 2	1.760 7	8.825 8	8.826 8	13.174 0	13.175 1	5.065 4	5.064 7	25.073 8
S3	2.316 9	2.315 8	9.572 1	9.588 1	1.454 9	1.466 2	9.843 5	9.834 2	13.398 5	13.392 5	3.155 3	3.150 4	14.451 8
S4	0.805 1	0.800 6	2.099 7	2.052 4	0.312 6	0.313 3	3.980 3	3.983 4	6.342 9	6.344 2	0.740 0	0.741 6	5.845 3
S5	0.248 7	0.253 3	0.434 7	0.426 7	0.183 4	0.190 8	1.386 7	1.388 0	2.356 6	2.351 7	0.641 6	0.645 9	3.744 9
S6	1.483 8	1.491 6	3.954 4	3.940 5	0.890 1	0.882 5	6.765 0	6.761 9	12.273 5	12.275 1	2.650 9	2.655 6	17.772 7
S7	1.698 2	1.694 4	3.977 8	3.930 8	0.466 2	0.462 1	5.566 3	5.564 4	11.066 7	11.069 6	0.862 9	0.863 3	10.735 9
S8	1.646 3	1.652 6	4.753 2	4.751 2	0.495 7	0.493 5	9.358 7	9.359 1	15.773 2	15.775 6	1.133 4	1.131 3	17.532 4
S9	1.036 5	1.035 8	2.294 6	2.286 7	0.327 6	0.319 1	7.277 6	7.278 4	9.726 5	9.722 6	1.229 3	1.229 4	9.440 3
S10	1.065 3	1.035 8	1.927 3	1.924 4	0.235 4	0.238 6	2.908 5	2.913 1	6.748 6	6.747 6	0.353 5	0.356 7	4.147 2
S11	1.308 5	1.315 1	2.894 1	2.900 2	0.182 3	0.185 5	6.559 9	6.553 8	12.243 7	12.247 7	0.840 3	0.840 2	12.936 0
S12	1.333 5	1.324 2	4.323 2	4.334 0	0.240 3	0.237 1	6.685 2	6.689 2	9.575 5	9.578 5	1.130 8	1.135 8	8.543 5
S13	1.965 4	1.977 9	5.340 4	5.344 7	1.561 2	1.567 9	11.234 0	11.231 2	16.363 4	16.365 7	4.732 1	4.731 3	26.309 5
S14	1.520 9	1.523 8	4.367 0	4.353 0	0.681 4	0.686 2	6.568 4	6.564 9	9.992 0	9.989 8	1.480 1	1.486 4	12.346 9
S15	0.929 9	0.936 4	2.601 9	2.618 2	0.522 8	0.517 5	4.614 4	4.619 9	7.450 5	7.453 9	1.069 5	1.055 2	10.066 9
S16	1.348 4	1.353 9	3.032 3	3.064 3	0.541 7	0.538 3	3.581 8	3.585 2	10.630 6	10.634 8	0.778 6	0.783 3	12.572 1
S17	1.805 9	1.810 6	5.081 3	5.201 6	0.844 6	0.845 0	7.926 6	7.923 3	15.349 2	15.343 7	2.115 7	2.110 8	14.777 6
S18	0.553 6	0.562 1	1.359 7	1.362 5	0.638 1	0.636 8	2.762 5	2.769 1	4.941 3	4.942 8	1.709 5	1.706 8	9.784 7

学成分基本相似。结合化学模式识别对样品中共有峰的差异性进行分析,以 18 批样品的 10 个共有峰峰面积为变量,通过 HCA、PCA 和 OPLS-DA 均可将 18 批黄连须划分为 3 类。我国目前黄连主要分布于四川、湖北、重庆等地,本研究所用黄连须根样品 S1~S6 为四川产地,S7~S12 为湖北产地,S13~S18 为重庆产地。通过聚类分析发现,样品 S1~S3、S13 聚为第 I 类,S4、S5、S10、S18 聚为第 II 类,S6~S9、S11、S12、S14~S17 聚为第 III 类。与产地信息对比可见,聚类结果与产地分布并不完全一致,相同产地的样品未必聚为同一类,不同产地的样品也可能聚为一类,产地间存在一定的交叉现象。PCA 结果显示 2 个主成分累积方差贡献率为 81.556%。为确定造成差异的标志成分,利用 OPLS-DA,以 VIP>1 为标准,筛选出 4 个化学差异标志物,分别是表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱。本研究构建的黄连须特征图谱,能进一步完善黄连须的定性辨识,但结果表明 18 批黄连须并没有明显的地域性差异,这可能与生长年限、初加工方式等密切相关,同时气候环境、经纬度、海拔、土壤等影响也会导致成分含量上的变化,18 批药材代表性强度不足,后期研究可增加样品批次来确定产地

是否能作为评价黄连须质量的标准,并结合理化和药效等指标进行综合评价。

将指认出的 7 种成分进行定量分析,7 种成分在相应的浓度范围内线性关系良好 ($r>0.999\ 0$),平均加样回收率 RSD 为 1.27%~2.47%,建立 QAMS 法,其中小檗碱的出峰结果最为理想,保留时间稳定,分离度较好,且非药用部位中小檗碱的生物积累量最高^[22],参考 QAMS 法建立的技术指南,因此选择小檗碱为内参物。计算校正因子并进行方法学考察,不同设备、色谱柱、柱温、进样体积、流速等色谱条件下耐用性良好,将 QAMS 法含量测定数据与 ESM 法测定数据进行对比,结果表明无显著性差异,故可用 QAMS 法代替 ESM 法对黄连须中的格兰地新、药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀进行含量测定,测定 18 批黄连须中格兰地新、药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱的平均质量分数分别为 0.14%、0.39%、0.07%、0.66%、1.08%、0.17%、1.34%。

综上所述,本实验建立了黄连须的 HPLC 指纹图谱,并通过化学计量学分析筛选出 4 个主要差异性成分;同时,建立了高效且低成本的黄连须生物碱成分 QAMS 法。研究成果为黄连须后续质量深入

研究提供了可靠的技术支持,有助于黄连资源的综合利用与开发。课题组下一步将继续研究不同环境因素对黄连须成分积累的影响。

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. 2025: 482-483.
- [2] 丰秀存, 周莲. 不同产地黄连药用成分的灰色关联及聚类分析 [J]. 广东化工, 2019, 46(14): 13-14.
- [3] Wang J, Wang L, Lou G H, *et al.* *Coptidis Rhizoma*: A comprehensive review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 193-225.
- [4] Meng F C, Wu Z F, Yin Z Q, *et al.* *Coptidis Rhizoma* and its main bioactive components: Recent advances in chemical investigation, quality evaluation and pharmacological activity [J]. *Chin Med*, 2018, 13: 13.
- [5] 商素菲, 王进, 陈仁寿. 基于文献计量学探讨黄连的研究进展及前沿趋势 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(10): 2970-2988.
- [6] 彭晓婷, 杨丽宏, 袁子文, 等. 黄连及黄连须、黄连茎叶体外抗氧化活性的谱效关系研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2021, 40(1): 25-31.
- [7] 田谷正男, 周鑫超, 颜若童, 等. 黄连须多糖降血糖活性及结构表征 [J]. 中草药, 2023, 54(6): 1825-1832.
- [8] 张永欣, 朱童, 杨丹, 等. 黄连须提取物生物碱类成分及抑菌活性研究 [J]. 世界中医药, 2021, 16(17): 2556-2561.
- [9] 任华忠, 朱丽金, 何毓敏. 珠子参总皂苷的 HPLC 特征图谱及化学成分研究 [J]. 中成药, 2022, 44(9): 2885-2890.
- [10] Chen Y R, Pan G J, Xu W F, *et al.* Spectrum-effect relationship study between HPLC fingerprints and antioxidant activity of *Sabia parviflora* [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2020, 1140: 121970.
- [11] 李海燕, 王慧然, 那丽莎, 等. 基于主成分分析、正交偏最小二乘判别分析及加权逼近理想解排序-灰色关联度融合模型评价不同产地珠子参质量 [J]. 中草药, 2024, 55(9): 3116-3126.
- [12] 李灿琳, 刘海洋, 李思, 等. 一测多评法测定大花龙胆中环烯醚萜类和黄酮类成分的含量 [J]. 中草药, 2024, 55(2): 614-621.
- [13] Zhang R T, Qing W W, Yang L, *et al.* Fingerprint combining with quantitative analysis of multi-components by single marker for quality control of Chenxiang Huaqi Tablets [J]. *Phytochem Anal*, 2022, 33(3): 335-343.
- [14] Cao X Q, Li M C, Ma L C, *et al.* Quality assessment of *Artemisia rupestris* L. using quantitative analysis of multi-components by single marker and fingerprint analysis [J]. *Molecules*, 2022, 27(9): 2634.
- [15] 丁曼, 毛艳, 赵学佳, 等. 基于指纹图谱和一测多评联合化学计量学及熵权 TOPSIS 法对顶羽菊药材质量评价 [J]. 中草药, 2024, 55(16): 5627-5638.
- [16] 石岩, 魏锋, 马双成. 关于主成分分析在中药和天然药物分析研究中应用的探讨 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(14): 3031-3035.
- [17] 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.
- [18] 毛艳, 蔡晓翠, 古丽白热木·玉素因, 等. 一测多评法同时测定新疆软紫草中 6 种蒽醌类成分 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4170-4175.
- [19] 董双涛, 徐丽霞, 高建平, 等. 基于一测多评结合熵权逼近理想解排序法对绵马贯众炭的质量评价 [J]. 中草药, 2024, 55(7): 2397-2404.
- [20] 张纯刚, 唐静雅, 于琛琛, 等. 黄连五种主要生物碱的提取纯化及含量测定 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(9): 1146-1149.
- [21] 何冬梅, 王鹏, 曹翠萍, 等. 一测多评法同时测定黄连解毒汤中 7 种生物碱的含量 [J]. 中成药, 2025, 47(3): 727-732.
- [22] 李春燕, 张学敏, 岳璐, 等. 黄连四个部位中五种生物碱含量和生物积累量分析研究 [J]. 中医药学报, 2018, 46(2): 29-32.

[责任编辑 时圣明]