

双标线性校正技术用于天麻多成分色谱峰的定性分析

周亚楠¹, 张元元¹, 李会军², 刘永利^{1*}, 孙磊³, 马双成^{3*}

(1. 河北省药品医疗器械检验研究院, 河北 石家庄 050227; 2. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210009;
3. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: 建立天麻药材中6种成分的高效液相色谱方法, 并采用双标线性校正法计算保留时间, 考察预测保留时间的准确性和色谱柱符合率, 用于辅助色谱峰的定性分析。选用24根不同品牌和型号的C₁₈色谱柱, 测定天麻中6种成分的保留时间, 计算平均值得到标准保留时间(SRT), 以峰3巴利森苷E和峰6巴利森苷A两个成分为参照物, 使用双标线性校正法(LCTRS)预测保留时间, 并在4根其他品牌和型号的C₁₈色谱柱上进行方法的验证。同时以巴利森苷E为参照物, 计算校正因子, 使用相对保留时间法(RRT)预测保留时间。比较双标线性校正法和相对保留时间法的优劣。结果表明, 与相对保留时间法相比, 双标线性校正法具有更高预测保留时间准确率和色谱柱符合率, 色谱柱的适用范围更广。双标线性校正法具有更好地辅助色谱峰定性作用, 具有广阔的应用前景。

关键词: 天麻; 双标线性校正法; 相对保留时间法; 色谱峰定性

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)07-1797-07

Identification of *Gastrodiae Rhizoma* chromatographic peaks identification by liner calibration with two reference substances assisted

ZHOU Ya-nan¹, ZHANG Yuan-yuan¹, LI Hui-jun², LIU Yong-li^{1*}, SUN Lei³, MA Shuang-cheng^{3*}

(1. Hebei Institute for Drug and Medical Device Control, Shijiazhuang 050227, China; 2. China Pharmaceutical University of Traditional Chinese Pharmacy, Nanjing 210009, China; 3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: This study aimed to establish a method for positioning six chromatographic peaks occurred in HPLC profile of *Gastrodiae Rhizoma*. The "liner calibration with two reference substances" (LCTRS) method was used to calculate the retention time so as to assist in positioning of chromatographic peaks in terms of the prediction accuracy of retention time and the coincidence rate of chromatographic column. A total of 24 C₁₈ chromatographic columns from different brands and types available were used to determine the retention times of six components in *Gastrodiae Rhizoma*, then the average retention time of each component was obtained as standard retention time (SRT). Parishin E (peak 3) and Parishin A (peak 6) were simultaneously taken as reference substance to forecast the retention time of the other four components by using the LCTRS method. Four different C₁₈ columns were employed to verify the method. Meanwhile, for the purpose of comparison, the relative retention time (RRT) method was applied to forecast the retention time, by using Parishin E as the single reference substance. The comparison between LCTRS and RRT methods indicated that the former was more accurate in predicting the retention time and more applicable in utilization of chromatographic columns. This study demonstrated that the LCTRS method shows the superior performance in positioning of chromatographic peak, and therefore has

收稿日期: 2021-04-14; 修回日期: 2021-06-24.

基金项目: “十三五”国家重大新药创制 (2018ZX09735-006).

*通讯作者 Tel: 86-311-69086006, E-mail: liuyongli2008@126.com;

Tel: 86-10-53852076, E-mail: masc@nifdc.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0526

a good prospect of application.

Key words: Gastrodiae Rhizoma; liner calibration with two reference substances; relative retention time; chromatographic peak positioning

由于中药成分复杂,如何科学准确地评价中药质量一直是行业关注的热点与难点问题,随着分析技术的发展,多成分含量测定已成为中药质量评价与质量控制的重要手段^[1-8],但这需要大量标准物质的支持,对于药品生产企业和检验机构,大量标准物质的使用提高了检验成本,并时常会因为缺乏标准物质而无法完整地执行既定的药品标准,限制了中药质量标准的推广与应用。替代对照品法、一测多评法是目前减少对对照品的常用方法,《中华人民共和国药典》2020年版中收录了“一测多评法”对丹参、黄连等品种进行多成分含量测定的方法,但采用一个对照品利用相对保留时间(relative retention time, RRT)给色谱峰定位常常会因为色谱柱的差异出现定位不准确,“双标线性法(liner calibration with two reference substances, LCTRS)”采用一个定量对照品以相对校正因子法定量,两个对照品采用双标线性校正法进行色谱峰定位,显著提高了定位的准确度和色谱柱的适用性。

天麻为兰科植物天麻(*Gastrodia elata* Bl.)的干燥块茎,具有息风止痉、平抑肝阳、祛风通络的功效,主要用于小儿惊风、癫痫抽搐、破伤风、头痛眩晕、手足不遂、肢体麻木、风湿痹痛^[9]。本文采用高效液相色谱法,以双标线性校正法辅助色谱峰定性,同时定位天麻中天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷A、巴利森苷B、巴利森苷C和巴利森苷E等6种成分,与相对保留时间法相比,双标线性校正法具有更高的准确性。

材料与方 法

材料与试剂 Waters e2695 型高效液相色谱仪

(美国 Waters 公司,包括 Alliance 2695 型四元梯度泵、Alliance 2695 自动进样器、可降温柱温箱、2498 型紫外检测器); Mettler Toledo XS105DU 电子分析天平(Mettler Toledo, 瑞士); 数控超声清洗机(KQ-700DE型, 昆山超声仪器有限公司); Milli-Q 纯水机(Millipore, 美国); 28 根色谱柱(编号 Col 1~28), 色谱柱规格均为 250 mm×4.6 mm (5 μm), 不同色谱柱型号信息见表 1。

对照品天麻素(批号: 110807-201809, 纯度 96.7%), 对羟基苯甲醇(批号: 111970-201702, 纯度 99.4%), 购自中国食品药品检定研究院。巴利森苷 A(批号: 62499-28-9, 纯度 98.0%), 巴利森苷 B(批号: 174972-79-3, 纯度 95.0%), 巴利森苷 C(批号: 174972-80-6, 纯度 98.0%), 巴利森苷 E(批号: 952068-57-4, 纯度 98.0%), 均购自上海诗丹德标准技术服务有限公司。天麻样品批号分别为 TIANMA-02, TIANMA-04, TIANMA-07, 购自药材市场。甲醇、乙腈(色谱纯, Merck 公司, 美国), 其余试剂为分析纯。

色谱条件 采用上述编号 Col 1~24 色谱柱, 以乙腈为流动相 A, 0.1% 磷酸溶液为流动相 B, 梯度洗脱(0~25 min, 3%→18% A; 25~35 min, 18% A; 35~37 min, 18%→95% A), 检测波长 220 nm, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样量为 5 μL。

对照品溶液的制备 精密称取天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷 A、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 E 对照品适量, 加 50% 甲醇制成每 1 mL 各含上述对照品约 100 μg 的混合溶液, 即得。

供试品溶液的制备 取本品粉末(过四号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇

Table 1 The detailed information of different column types

Column No.	Company	Column type	Column No.	Company	Column type
Col 1	Agilent	SB-AQC ₁₈	Col 15	Waters	Symmetry C ₁₈
Col 2	Shiseido	Capcell pak C ₁₈ AQ	Col 16	Halo	90A C ₁₈
Col 3	Boston	Green ODS 120A	Col 17	Agilent	Zorbax Eclipse Plus C ₁₈
Col 4	Boston	Green ODS-AQ 120A	Col 18	Agilent	HC-C ₁₈
Col 5	Cosmosil	Cosmosil MS II	Col 19	Dikma	Diamonsil C ₁₈ (2)
Col 6	GL Scienceslms	Inertsil ODS-3	Col 20	Phenomenex	Titank C ₁₈
Col 7	Inertsil	Inertsil ODS-sp	Col 21	Agilent	Zorbax SB C ₁₈
Col 8	Phenomenex	Luna 5μ C ₁₈ (2)	Col 22	Agilent	TC-C ₁₈
Col 9	Pickerina	Laboratories	Col 23	Dikma	Inspire C ₁₈
Col 10	Shimadzu	up-ODS	Col 24	Agilent	Eclipse XDB-C ₁₈
Col 11	Thermo	Acclaim 120	Col 25	Shimadzu	Shim-pack GIST C ₁₈
Col 12	Waters	X bridge C ₁₈	Col 26	TechMate	C ₁₈ ST 120A
Col 13	Waters	X Terra C ₁₈	Col 27	Phenomenex	Luna C ₁₈
Col 14	Exmere	Exsil Mono 100 C ₁₈	Col 28	Shiseido	Capcell pak MG C ₁₈

25 mL, 称定重量, 超声处理 (功率 500 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 50% 甲醇溶液补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

精密度 精密吸取混合对照品溶液, 在上述色谱条件下, 以色谱柱 Col 1 连续进样 6 次, 对 6 个对照品成分色谱峰的保留时间和峰面积进行统计, 计算 RSD 值。

重复性 取样品 (批号: TIANMA-07) 6 份, 按照供试品溶液的制备方法处理, 在上述色谱条件下, 以色谱柱 Col 1 进样, 对 6 种成分色谱峰的峰面积进行统计, 以峰面积计算 6 种成分的含量, 并计算 RSD 值。

稳定性 取样品 (批号: TIANMA-07), 按照供试品溶液的制备方法处理, 在上述色谱条件下, 采用 Col 1 色谱柱分别于 0、1、3、6、12、16 和 24 h 进样, 对 6 个对照品成分色谱峰的保留时间和峰面积进行统计, 计算 RSD 值。

色谱柱耐用性 取样品 (批号: TIANMA-07), 按照供试品溶液的制备方法处理, 在上述色谱条件下, 采用上述 24 根色谱柱分别进样, 考察 6 种成分的分离情况。

双标线性校正法定性研究 将采集的色谱数据导入 DRS Origin 软件, 通过关联对照品, 设定双标成分, 进行分析, 得到保留时间预测准确率和色谱柱符合率, 并在 4 根其他品牌和型号色谱柱 (Col 25~28) 上进行验证。同时与相对保留时间法比较, 判断两种方法的优劣。

结果

1 方法学考察

1.1 精密度 对天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷 A、巴利森苷 B、巴利森苷 C 和巴利森苷 E 对照品成分色

谱峰的保留时间和峰面积进行统计, 结果其保留时间基本一致, 峰面积 RSD 均 < 1.5%, 表明仪器精密度良好。

1.2 重复性 天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷 A、巴利森苷 B、巴利森苷 C 和巴利森苷 E 的含量分别为 0.34%、0.061%、1.90%、0.73%、0.19% 和 0.49%, RSD 均 < 2.0%, 表明重复性良好。

1.3 稳定性 对天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷 A、巴利森苷 B、巴利森苷 C 和巴利森苷 E 的色谱峰保留时间和峰面积进行统计, 结果保留时间基本一致, 峰面积 RSD 均 < 2.0%, 表明样品稳定性较好。

1.4 色谱柱耐用性 按照供试品溶液的制备方法处理, 在上述色谱条件下, 以上述 24 根色谱柱进样, 全部色谱柱均可将 6 个成分色谱峰分离, 表明方法适用性较好。样品的代表性图谱见图 1、2。

2 双标的选择和 SRT 的计算

液相色谱中, 化学成分在不同色谱仪和不同色谱柱上的保留时间具有线性关系^[10,11]。通过对照品保留时间进行色谱峰定位, 得到样品实际保留时间, 以 24 根色谱柱得到的样品保留时间平均值作为预测保留时间 (standard retention time, SRT)。以 6 种成分的 SRT 为横坐标, 分别为天麻素为 9.721 min, 对羟基苯甲醇为 14.580 min, 巴利森苷 E 为 19.992 min, 巴利森苷 B 为 27.510 min, 巴利森苷 C 为 29.451 min, 巴利森苷 A 为 34.268 min。以实际保留时间为纵坐标, 得到各色谱柱的拟合结果, 见图 3。各色谱柱的线性方程和相关系数见表 2。由图 3 和表 2 可见, 天麻各成分在 Col 7 和 Col 16 两根色谱柱上与拟合直线有偏离, 说明成分

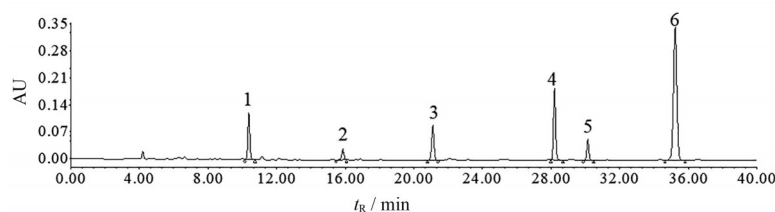


Figure 1 High performance liquid chromatography of Gastrodiae Rhizoma (Col 1). 1: Gastrodin; 2: *p*-Hydroxybenzyl alcohol; 3: Parishin E; 4: Parishin B; 5: Parishin C; 6: Parishin A

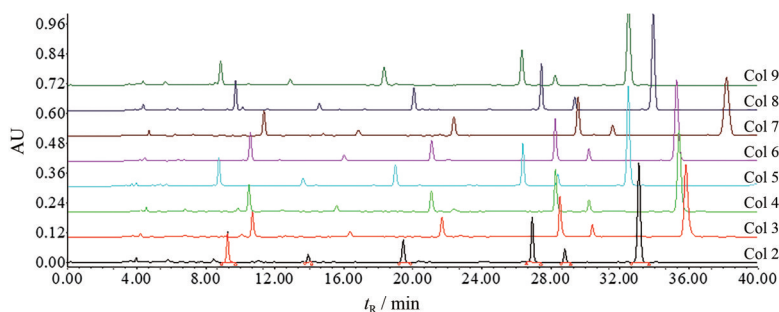
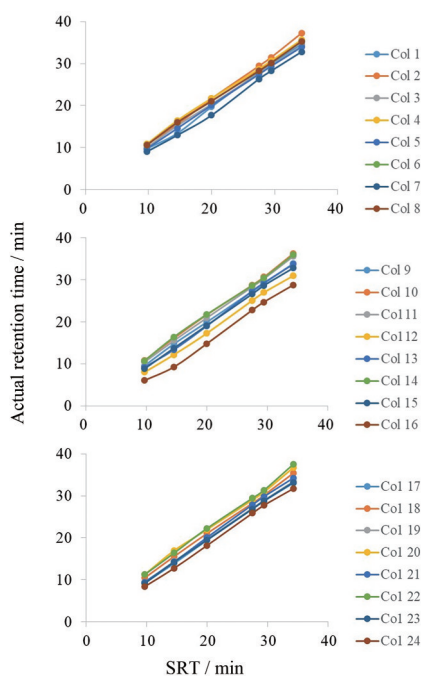


Figure 2 HPLC chromatograms of Gastrodiae Rhizoma by different chromatography columns (Col 2-9)

Table 2 Linear equation and correlation coefficient of retention time on different chromatographic columns. *Chromatographic column with a large deviation of fitting

Column	Calibration curve	<i>r</i>	Column	Calibration curve	<i>r</i>
Col 1	$y = 0.5198x + 0.593$	0.9988	Col 13	$y = 0.5319x + 0.6228$	0.9993
Col 2	$y = 0.5073x - 0.0305$	0.9996	Col 14	$y = 0.5437x - 0.7331$	0.9991
Col 3	$y = 0.5568x - 0.3839$	0.9998	Col 15	$y = 0.5531x + 0.3522$	0.9997
Col 4	$y = 0.5480x - 0.8319$	0.9995	Col 16	$y = 0.5642x + 2.3171$	0.9980*
Col 5	$y = 0.5512x - 0.0945$	0.9999	Col 17	$y = 0.5562x + 0.148$	0.9998
Col 6	$y = 0.5505x - 0.653$	0.9996	Col 18	$y = 0.5428x - 0.4243$	0.9998
Col 7	$y = 0.5473x + 0.7348$	0.9984*	Col 19	$y = 0.5554x + 0.0221$	0.9998
Col 8	$y = 0.5505x - 0.653$	0.9996	Col 20	$y = 0.5407x - 0.9209$	0.9989
Col 9	$y = 0.5536x - 0.0948$	0.9999	Col 21	$y = 0.5332x + 0.2479$	0.9997
Col 10	$y = 0.5364x - 0.5741$	0.9995	Col 22	$y = 0.5204x - 0.5368$	0.9991
Col 11	$y = 0.5379x - 0.3294$	0.9998	Col 23	$y = 0.5557x + 0.1067$	0.9998
Col 12	$y = 0.5688x + 0.8943$	0.9993	Col 24	$y = 0.5609x + 0.6629$	0.9995

**Figure 3** Retention time relationship of chromatographic peaks on different chromatographic columns (A, B and C). SRT: Standard retention time

在这些色谱柱上的保留时间与其余色谱柱差异较大。其余22根色谱柱的保留时间的线性关系良好。

3 双标化合物的确定和优化

在6个成分中选择2个作为双标成分,有很多方案。将上述24根色谱柱上采集的HPLC数据导入DRS Origin软件,进行相对保留时间法、双标校正法及大数据算法进行色谱峰替代定性研究。通过软件自有功能进行“双标线性校正法”分析,筛选出了10种双标选择方案,能确保色谱柱符合率达到100%,其中峰3~峰6组合的预测正确率为100%。按双标选择尽量分布在保留时间两端的原则^[12]且预测值与实测值绝对偏差最小的原则综合考虑,以巴利森昔E和巴利森昔A作

为双标化合物。以这两个成分的SRT为纵坐标,实际保留时间(以未知色谱柱Col 25为例),巴利森昔E(20.367 min),巴利森昔A(34.25 min)为横坐标,得到两点巴利森昔E(20.3667, 19.9921)和巴利森昔A(34.25, 34.2675),做一直线,得到方程 $y = 1.0282x - 0.9498$,然后将其余4个成分的SRT值代入方程(Y值),得到预测保留时间分别为天麻素10.378 min,对羟基苯甲醇15.104 min,巴利森昔B 27.680 min,巴利森昔C 29.567 min,实际保留时间依次为10.05、15.53、27.77和29.7 min。偏差的绝对值依次为0.328、0.429、0.087和0.133 min,满足单纯定性条件下,预测保留时间与实测保留时间的误差应不超过0.5 min的要求,说明该双标选择在Col 25上预测效果良好。

4 双标线性校正法与相对保留时间法的对比

对双标线性校正法与相对保留时间法两者在天麻液相色谱中定性的优劣进行比较。双标线性校正法以巴利森昔E和巴利森昔A作为双标化合物,相对保留时间法以中间位置的巴利森昔E为参照物,两种方法在24根色谱柱上的比较结果,双标线性校正法的保留时间预测值的绝对偏差波动范围较小,且绝对偏差较低,见表3。

5 样品分析

用4根新的色谱柱(Col 25~28),按照供试品溶液的制备方法处理样品,测试3种不同批次天麻药材,不同色谱柱色谱图见图4,结果见表4。双标线性校正法能够很好的预测各成分在Col 25~28上的保留时间,但相对保留时间法在Col 26~28的预测误差偏大,表明双标线性校正法比相对保留时间法预测更为精确。

讨论

在多成分含量测定、特征图谱等研究中,色谱峰定位具有重要的意义。本实验研究结果表明,双标线性

Table 3 Absolute deviation of predicted retention time of different components in different chromatographic columns. * Absolute deviation between predicted and measured retention time is more than 0.5 min. -: The retention time is calculated with the component as a reference

Column	Linear calibration with two reference substances										Relative retention time				
	Gastrodin	<i>p</i> -Hydroxybenzyl	Parishin E	Parishin B	Parishin C	Parishin A	Gastrodin	<i>p</i> -Hydroxybenzyl	Parishin E	Parishin B	Parishin C	Parishin A	Parishin C	Parishin B	Parishin A
Col 1	0.414 3	-0.313 5	-	0.203 9	0.175 8	-	0.071 59	-0.529 2*	-	0.488 2	0.528 2*	0.514 3*			
Col 2	0.165 4	-0.110 2	-	-0.224 5	-0.248 5	-	0.115 8	-0.138 1	-	-0.189 1	-0.203 7	0.070 99			
Col 3	-0.223 4	0.071 77	-	0.017 64	0.028 29	-	0.051 76	0.207 8	-	-0.176 9	-0.216 8	-0.367 8			
Col 4	-0.468 5	0.010 69	-	-0.188 7	-0.172 8	-	0.128 8	0.300 1	-	-0.573 6*	-0.663 5*	-0.766 1*			
Col 5	-0.202 4	-0.123 5	-	0.040 2	0.065 69	-	-0.022 1	-0.027 92	-	-0.088 52	-0.0967 3	-0.242			
Col 6	-0.164 4	0.164 4	-	-0.161 8	-0.160 5	-	0.163	0.322 7	-	-0.385 4	-0.444 3	-0.442 1			
Col 7	0.722 0*	0.154 5	-	0.150 9	0.111 6	-	0.247 7	0.032 97	-	1.223*	1.356*	1.535*			
Col 8	-0.164 4	0.164 4	-	-0.161 8	-0.160 5	-	0.163 0	0.322 7	-	-0.385 4	-0.444 3	-0.442 1			
Col 9	-0.193 3	0.058 64	-	-0.007 50	-0.005 80	-	-0.077 87	0.116 3	-	-0.089 03	-0.108 4	-0.155 1			
Col 10	-0.175 3	-0.008 10	-	-0.323 1	-0.341 9	-	0.145 9	0.156 4	-	-0.533 1*	-0.609 7*	-0.432 8			
Col 11	0.021 62	0.072 87	-	-0.158 8	-0.190 0	-	0.132 7	0.130 2	-	-0.237 3	-0.289	-0.155			
Col 12	0.335 6	0.062 68	-	0.341 9	0.381 9	-	-0.249 9	-0.258 5	-	0.835 8*	0.998*	0.865 6*			
Col 13	0.399 2	-0.043 68	-	0.296 3	0.291 0	-	-0.028 36	-0.289 8	-	0.657 6*	0.738 8*	0.639 8*			
Col 14	-0.441 6	0.016 99	-	-0.331 3	-0.363 0	-	0.074 58	0.267 6	-	-0.653 2*	-0.772 6*	-0.665*			
Col 15	-0.273 5	-0.120 5	-	0.171 7	0.274 6	-	-0.272 3	-0.119 9	-	0.170 9	0.273 5	-0.001 60			
Col 16	0.739 3*	-0.129 4	-	0.363 3	0.381	-	-0.839 6*	-1.130*	-	1.813*	2.180*	2.528*			
Col 17	-0.180 5	-0.172 3	-	0.172 3	0.186 5	-	-0.102 9	-0.130 3	-	0.114 9	0.114 7	-0.104 6			
Col 18	-0.102 3	-0.004 15	-	-0.198 5	-0.202 9	-	0.128 5	0.115 4	-	-0.356 4	-0.403 4	-0.315			
Col 19	-0.258 7	-0.021 19	-	0.089 79	0.106 9	-	-0.136 4	0.040 85	-	0.002 33	-0.002 99	-0.162 5			
Col 20	-0.063 72	0.294 8	-	-0.370 3	-0.417 3	-	0.278 2	0.455 1	-	-0.595 4*	-0.703 5*	-0.469 9			
Col 21	-0.196 9	-0.229 6	-	0.198 5	0.219 3	-	-0.143 4	-0.200 3	-	0.158 9	0.169 7	-0.071 86			
Col 22	0.029 93	0.024 8	-	-0.311 2	-0.365 1	-	0.223 6	0.090 8	-	-0.569 4*	-0.671 9	-0.282 4			
Col 23	-0.256 4	-0.024 8	-	0.094 88	0.132 2	-	-0.176 1	0.015 97	-	0.037 4	0.0597 2	-0.106 7			
Col 24	-0.012 7	-0.147 5	-	0.318 6	0.359 8	-	-0.270 1	-0.289 5	-	0.521 2	0.612 9	0.357			

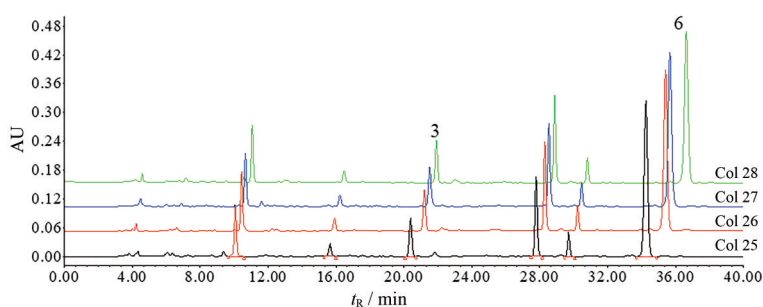


Figure 4 HPLC chromatograms of *Gastrodiae Rhizoma* by different chromatography columns (Col 25–28). 3: Parishin E; 6: Parishin A

Table 4 Comparison of two different methods for predicting retention time of four chromatographic columns. *Absolute deviation between predicted and measured retention time is more than 0.5 min. –: The retention time is calculated with the component as a reference

Methods	Composition	Col 25	Col 26	Col 27	Col 28
Liner calibration with two reference substances	Gastrodin	-0.183 7	-0.151 3	-0.377 4	-0.292 3
	P-hydroxybenzyl	0.297 1	0.070 56	0.035 34	0.054 74
	Parishin E	–	–	–	–
	Parishin B	0.049 55	-0.397 5	-0.248 8	-0.207 5
	Parishin C	0.075 04	-0.440 0	-0.243 7	-0.206 2
	Parishin A	–	–	–	–
Relative retention time	Gastrodin	0.078 69	0.195 8	0.099 44	0.064 21
	P-hydroxybenzyl	0.417 5	0.244 4	0.267 9	0.230 0
	Parishin E	–	–	–	–
	Parishin B	-0.138 7	-0.620 9*	-0.555 9*	-0.443 0
	Parishin C	-0.162 4	-0.724 7*	-0.635 7*	-0.505 8*
	Parishin A	-0.353 2	-0.469 7	-0.620 9*	-0.471 0

校正法适用于天麻药材的多组分定性分析,能较好定位天麻中的6种成分。与相对保留时间法相比,双标线性校正法能准确地预测各成分的保留时间,扩大色谱柱的适用范围,提高检验的效率,降低检验成本。

本实验选择所有双标的组合,综合考虑了预测准确率和色谱柱符合率,避免选择在色谱柱拟合过程中偏离较大的成分,以减小保留时间的预测误差,最终选择了峰3与峰6组合的巴利森昔E和巴利森昔A两个成分为双标参照物。

建立方法时,本实验考察了24根不同品牌、型号的色谱柱对待测成分分离情况的影响,基本符合建模要求。本实验仅考察了双标线性校正法用于天麻药材中6种成分的色谱峰定性,是否适用于其他多组分中药的分析,还需进一步的拓展研究。

作者贡献:周亚楠主要完成方法建立,不同色谱柱的测定及撰写文章并对编辑部修改意见进行核修等工作。张元元主要完成数据分析等工作。李会军主要完成色谱方法的建立、方法学考察。刘永利负责对实验思路、数据处理、撰写文章等进行专业指导。孙磊负责双标线性校正法技术指导。马双成对本文的选题的设计、实验思路等进行指导。

利益冲突:无任何利益冲突。

References

- [1] Lu D, Luo F, Chi YM, et al. Determination of nucleosides in *Rhizoma Pinelliae* by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr (色谱)*, 2011, 29: 83-86.
- [2] Luo Y, Yang L, She XQ, et al. HPLC simultaneous determination of 7 organic acids in *Lonicera macranthoides* Hand. Mazz [J]. *Cent South Pharm (中南药学)*, 2018, 16: 1283-1286.
- [3] Yao J, Sun XG, Dong R, et al. Simultaneous quantitative analyses of six components in *Astragalus membranaceus* based on HPLC-CAD and quantitative analysis of multi-components with a single-marker [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 557-563.
- [4] Li J, Li YL, Yu JD, et al. Quality control of *Arnebiae Radix* based on characteristic chromatogram and QAMS [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2020, 40: 1209-1216.
- [5] Kong JJ, Zhu JJ, Wang ZM, et al. Quantitative analysis of poly-type components in *Forsythia suspense* by QAMS Method [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2010, 45: 1301-1304.
- [6] Liu ZH, Gu W, Chang XJ, et al. Quantitative analysis of poly-type components in *Maizhenhua Granules* by QAMS [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2012, 34: 2342-2347.
- [7] Cao HT, Lu J, Lin RC, et al. Analysis of four saponins in *Rhizoma Paridis* with substitution method of reference substance [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2011, 31: 1641-1645.
- [8] Xu J, Jin HY, Sun L, et al. Determination of loureirin A and

- loureirin B in *Dracaena cochinchinensis* by substitute reference substance [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2011, 31: 2058-2062.
- [9] State Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 Ed. Part I. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 735-740.
- [10] Wang LX, Xiao HB, Liang XM, et al. A new method for improving the reproducibility of chromatographic fingerprint retention time [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2003, 31: 1232-1236.
- [11] Chen R, Zhang C, Zhang H, et al. Determination of multiple components in Shuanghuanglian preparations by liner calibration with two reference substances assisted with chromatographic peaks identification [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2018, 24: 40-48.
- [12] Sun L, Jin H, Pang Y, et al. Two reference substances for determination of multiple components (I): linear calibration using two reference substances for identification of chromatographic peaks [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2013, 33: 1424-1430.