

一测多评法测定咽炎片玄参中3种主要成分含量

邱学伟,张春辉,卢京光,吴爱英

(山东省青岛市食品药品检验研究院,山东 青岛 266071)

摘要:目的 采用一测多评法建立同时测定咽炎片玄参中3种主要成分含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 以肉桂酸为内标,建立其与哈巴昔、哈巴俄昔的相对校正因子,采用HPLC法进行含量测定,计算3种成分的含量,实现一测多评。结果 建立的相对校正因子重复性良好,采用相对校正因子计算的含量与外标法实测值无显著性差异,哈巴昔、哈巴俄昔、肉桂酸的加样回收率分别为97.16%,98.81%,99.33%,RSD分别为1.52%,0.62%,0.95%($n=6$)。结论 一测多评法可用于咽炎片玄参中主要成分的含量测定。

关键词:咽炎片;玄参;一测多评法;含量测定

中图分类号:R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)06-0014-04

Simultaneous Determination of Three Main Components of *Radix Scrophulariae* in Yanyan Tablets by Quantitative Analysis of Multi-Components by Single-Marker

Qiu Xuewei, Zhang Chunhui, Lu Jingguang, Wu Aiyang

(Qingdao Research Institute for Food and Drug Control, Qingdao, Shandong, China 266071)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for content determination of three main components of *Radix Scrophulariae* in Yanyan Tablets by quantitative analysis of multi-components by single-marker(QAMS). **Methods** Cinnamic acid was used as the internal standard, and the relative correction factors(RCFs) of harpagide and harpagoside were established. The content of the three components was calculated by HPLC method. **Results** The repeatability of RCF was good. There was no significant difference between the content calculated by the RCF and the measured value by the external standard method. The average recovery rates were 97.16%, 98.81%, 99.33%, and the RSDs were 1.52%, 0.62%, 0.95% ($n=6$). **Conclusion** QAMS can be used for content determination of main components of *Radix Scrophulariae* in Yanyan Tablets.

Key words: Yanyan Tablets; *Radix Scrophulariae*; quantitative analysis of multi-components by single-marker; content determination

一测多评技术(quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS)是指在对中药进行多指标质量评价时,以样品中某一典型组分(有对照品供应者)为内标,建立该组分与其他组分之间的相对校正因子(relative correction factor, RCF),通过相对校正因子计算其他组分的含量^[1-3]。中药具有多成分、多功效的作用特点,单一成分难以反映其质量,故多成分含量测定成为当前广泛认可的质量评价模式。由于标准物质昂贵而不易获得,外标法存在对照品消耗量大、操作复杂的缺陷,每多测定1种成分都将使检验成本大幅提高,从而限制了这些方法的广泛应用,而一测多评技术是当前解决这一矛盾的重要途径之一^[4-9]。咽炎片由玄参等12味中药组方,收载于《卫生部药品标准·中药成方制剂(第2册)》,具有养阴润肺、清热解毒等功效。目前,咽炎片各标准中尚无玄参的含量测定方法,笔者结合2016年国家药品评价性抽验工作,建立了仅以肉桂酸为对照,同时测定哈巴昔、哈巴俄昔和肉桂酸3种成分含量的一测多评法,并考察了该方法的适用性和可行

性,结果该方法简便、结果准确,可在降低检验成本的同时较全面地控制该品种的内在质量^[10-11]。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司); 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司)。

1.2 试剂

哈巴昔对照品(批号111729-201506,纯度为95.9%),哈巴俄昔对照品(批号111730-201508,纯度为96.0%),肉桂酸对照品(批号110786-200503),均购自中国食品药品检定研究院,供含量测定用;乙腈(色谱纯,批号为JA056730)由德国默克公司提供;水为蒸馏水;其他试剂均为分析纯;咽炎片为2016年度国家药品评价性抽验的部分样品,分别来自10家生产企业(厂家代号分别为BJJL, CDDK, CDSK, HNHL, HRSJ, WT-GK, SXDT, SCZF, SCYY, YCYY),共10批次(批号分别为160502, 151207, 160602, 160501, 1607006Z, 151202, 5K026601, 151101, 151019, 15038031)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相:以乙腈为流动相 A, 以 0.03% 磷酸溶液为流动相 B, 梯度洗脱:(0 ~ 10 min, 3% → 10% A; 10 ~ 20 min, 10% → 33% A; 20 ~ 25 min, 33% → 50% A; 25 ~ 30 min, 50% → 80% A; 30 ~ 35 min, 80% A; 35 ~ 37 min, 80% → 3% A); 流速:1.0 mL/min; 检测波长:210 nm; 柱温:30 °C; 进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

对照品溶液:取哈巴苷、哈巴俄苷和肉桂酸对照品各适量,精密称定,加 30% 甲醇制成每 1 mL 含哈巴苷 60 μg、哈巴俄苷 20 μg、肉桂酸 20 μg 的混合溶液,即得。

供试品溶液:取本品 20 片,除去包衣,称定质量,研细,取约 2.5 g,精密称定,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,超声处理(功率 240 W,频率 45 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 25 mL,通过中性氧化铝柱(100 ~ 200 目,10 g,内径 1 cm),用 50% 甲醇 80 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加 50% 甲醇适量溶解,转移至 25 mL 容量瓶中,用 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液:按处方比例称取除玄参外的其他药材适量,按咽炎片的制法和供试品溶液的制备方法制备阴性对照品溶液。

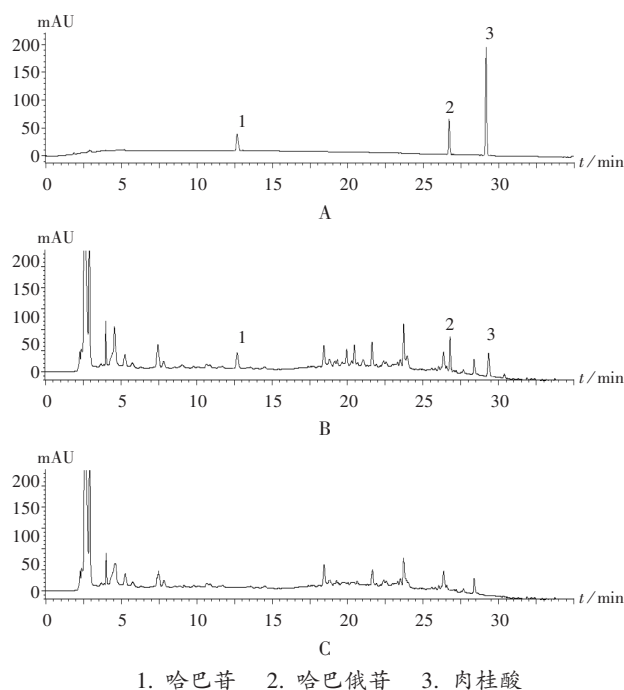
2.3 方法学考察

专属性考察:精密吸取 2.2 项下 3 种溶液各 10 μL,注入色谱仪,按 2.1 项下色谱条件测定,记录色谱图。阴性对照品溶液色谱中,在各指标成分相应保留时间处均无干扰,结果见图 1(λ = 210 nm)。

线性关系考察:分别吸取对照品溶液 1, 5, 10, 15, 20, 25 μL,按 2.1 项下色谱条件进行测定,以对照品溶液质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,得回归方程,哈巴苷为 $Y = 5 \times 10^6 X - 317.02$,线性范围为 0.012 ~ 0.15 g/L, $r = 0.9998$ ($n = 6$);哈巴俄苷为 $Y = 2 \times 10^7 X - 3312.9$,线性范围为 0.004 0 ~ 0.050 g/L, $r = 0.9999$ ($n = 6$);肉桂酸为 $Y = 5 \times 10^7 X - 3382.2$,线性范围为 0.004 5 ~ 0.057 g/L, $r = 0.9999$ ($n = 6$)。

精密度试验:每 3 h 测定 1 次,以对照品溶液连续进样 6 次。结果哈巴苷、哈巴俄苷和肉桂酸峰面积积分值的 RSD 分别为 1.1%, 0.5%, 0.6% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取 BJLL 厂家样品(批号为 160502)6 份,每份称取约 2.5 g,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,进样测定。结果哈巴苷、哈巴俄苷和肉桂酸含量的 RSD 分别为 0.8%, 0.7%, 0.5% ($n = 6$),表明方法重



1. 哈巴苷 2. 哈巴俄苷 3. 肉桂酸
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液
图 1 咽炎片高效液相色谱图

复性良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,分别在 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 时连续进样 6 次,记录 24 h 内峰面积。结果哈巴苷、哈巴俄苷和肉桂酸峰面积积分值的 RSD 分别为 0.6%, 0.4%, 0.5% ($n = 6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

加样回收试验:取“重复性试验”项下已知含量样品 1.25 g,精密称定,精密加入等量的哈巴苷、哈巴俄苷和肉桂酸对照品,共 6 份,分别制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行分析。结果见表 1。

2.4 方法验证

2.4.1 色谱柱及高效液相色谱仪考察

取 2.2 项下制备的对照品溶液,除以下条件不同外,其余按 2.1 项下色谱条件操作,分别进样 2, 5, 10, 15, 20, 25 μL 测定,考察相对校正因子(RCF)在不同色谱柱和不同仪器上的重复性。按公式(1)计算内标肉桂酸与哈巴苷和哈巴俄苷之间的 RCF:

$$f_{s/k} = (W_s \times A_k) / (W_k \times A_s) \quad (1)$$

$f_{s/k}$ 为内标肉桂酸与组分 k 之间的 RCF, A_s 为内标肉桂酸的峰面积, W_s 为内标肉桂酸的质量(或浓度), A_k 为组分 k 的峰面积, W_k 为组分 k 的质量(或浓度)。

内标肉桂酸的含量用外标法测定,其他组分的含量可根据公式(2)计算得到:

$$W'_k = (W'_s \times A'_k) / (f_{s/k} \times A'_s) \quad (2)$$

W'_k 为样品中组分 k 的含量, W'_s 为外标法测得的供试品中内标肉桂酸的含量, A'_s 和 A'_k 分别为供试品

表1 哈巴昔、哈巴俄昔、肉桂酸加样回收试验结果($n=6$)

样品含量(mg)			加入量(mg)			测得量(mg)			回收率(%)			$\bar{X}(\%)$			RSD(%)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0.057 85	0.578 54	0.342 30	0.057 55	0.570 5	0.338 1	0.115 8	1.131 0	0.678 4	100.70	96.84	99.41						
0.057 72	0.577 15	0.341 48	0.057 55	0.570 5	0.338 1	0.114 7	1.128 0	0.676 8	99.01	95.56	99.18						
0.057 76	0.577 57	0.341 73	0.057 55	0.570 5	0.338 1	0.114 8	1.143 0	0.673 5	99.11	99.11	98.13	99.33	97.16	98.81	0.95	1.52	0.62
0.057 73	0.577 29	0.341 57	0.057 55	0.570 5	0.338 1	0.114 2	1.129 0	0.674 1	98.12	96.71	98.35						
0.057 70	0.578 32	0.342 17	0.057 55	0.570 5	0.338 1	0.114 6	1.141 0	0.678 5	98.87	98.63	99.48						
0.057 74	0.577 43	0.341 65	0.057 55	0.570 5	0.338 1	0.115 4	1.120 0	0.674 1	100.19	95.10	98.33						

注:A为肉桂酸,B为哈巴昔,C为哈巴俄昔。

中内标肉桂酸和组分k的峰面积, $f_{s/k}$ 为内标肉桂酸与组分k之间的RCF。

试验考察 Shimadzu LC-20AT 和 Agilent 1260 2 种高效液相色谱系统及 Phenomenex-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Ecosil-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和 Agilent TC-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 3 种色谱柱的 RCF, 结果见表 2。

表2 不同仪器和不同色谱柱下目标成分的相对校正因子

仪器型号	色谱柱	RCF	
		哈巴昔	哈巴俄昔
Shimadzu LC-20AT	Phenomenex-C ₁₈ 柱	0.088 6	0.359 3
	Ecosil-C ₁₈ 柱	0.088 1	0.357 2
	Agilent TC-C ₁₈ 柱	0.086 6	0.351 2
Agilent 1260	Phenomenex-C ₁₈ 柱	0.088 2	0.358 5
	Ecosil-C ₁₈ 柱	0.086 8	0.356 6
	Agilent TC-C ₁₈ 柱	0.085 7	0.350 5
$\bar{X}$		0.087 3	0.416 0
RSD(%)		1.3	1.1

2.4.2 待测组分色谱峰的定位

考察相对保留值在不同色谱柱和不同仪器上的重复性,结果表明相对保留值 $RSD < 5\%$, 通过相对保留值可以准确定位。因此本方法可根据相对保留值结合各色谱峰的紫外吸收特征判断目标峰的峰位置。结果见表 3。

表3 不同仪器和不同色谱柱下目标成分的相对保留值

仪器型号	色谱柱	相对保留值	
		哈巴昔	哈巴俄昔
Shimadzu LC-20AT	Phenomenex-C ₁₈ 柱	0.436	0.918
	Ecosil-C ₁₈ 柱	0.445	0.901
	Agilent TC-C ₁₈ 柱	0.418	0.904
Agilent 1260	Phenomenex-C ₁₈ 柱	0.435	0.928
	Ecosil-C ₁₈ 柱	0.438	0.904
	Agilent TC-C ₁₈ 柱	0.412	0.886
$\bar{X}$		0.431	0.907
RSD(%)		3.0	1.6

注:相对保留值 $r_{m/k} = t_{Rm}/t_{Rk}$; t_{Rk} 为内参物保留时间, t_{Rm} 为其他成分保留时间。

2.4.3 一测多评法与常规外标法测定结果比较

结果见表 4。两种方法结果无显著性差异,说明用一测多评法对咽炎片玄参中哈巴昔、哈巴俄昔和肉桂酸的含量进行质量评价可行。

表4 一测多评法与常规外标法测定咽炎片中玄参 3 种活性成分含量(mg/片)

厂家	批号	肉桂酸	哈巴昔		哈巴俄昔	
		外标法	外标法	QAMS	外标法	QAMS
BJJL	160502	0.012	0.12	0.12	0.071	0.070
CDDK	151207	0.019	0.15	0.15	0.047	0.048
CDSK	160602	0.022	0.10	0.11	0.010	0.010
HNHL	160501	0.038	0.38	0.37	0.076	0.075
HRSJ	1607006Z	0.017	0.20	0.21	0.045	0.045
WTGK	151202	0.020	0.18	0.18	0.028	0.028
SXDT	5K026601	0.020	0.16	0.16	0.022	0.020
SCZF	151101	0.023	0.20	0.20	0.065	0.065
SCYY	151019	0.012	0.10	0.10	0.012	0.012
YCY	15038031	0.015	0.11	0.10	0.010	0.010

3 讨论

3.1 检测指标选择

玄参主要成分为苯丙素苷类、环烯醚萜苷类和有机酸类^[12]。现代药理学研究表明,哈巴昔、哈巴俄昔和肉桂酸是玄参的主要活性成分,生理活性广泛,包括抗炎、抗病毒、抗氧化和提高免疫力等^[13]。目前,咽炎片执行标准中尚无玄参的含量测定方法,因此测定哈巴昔、哈巴俄昔和肉桂酸的含量更有利于从整体上评价和控制玄参药材的质量。由于肉桂酸为玄参中的主要有效成分,且紫外吸收较强,对照品价廉易得,而其他成分的对照品价格较高,故选用肉桂酸作为内参物进行一测多评试验,可大大降低检验成本。

3.2 耐用性考察

本研究中分别考察了日本岛津 LC-20AT 型高效液相色谱仪、美国安捷伦 1260 型高效液相色谱仪和 3 种不同品牌、同类填料的色谱柱测定肉桂酸与哈巴昔、哈巴俄昔 RCF 的可重复性,并验证了方法的可行