

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.15.015

一测多评法测定栀榆洗剂中4个组分含量

许庆, 安艳苏, 毕秋左

(云南省曲靖市食品药品检验检测中心, 云南 曲靖 655000)

摘要:目的 建立测定栀榆洗剂中4种成分含量的一测多评(QAMS)法。方法 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸溶液(5:95, V/V), 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 238 nm, 进样量为 5 μL。以栀子苷为内标物, 分别建立没食子酸、升麻素苷、大黄酸相对于栀子苷的相对校正因子, 分别采用外标(ESM)法和 QAMS 法测定制剂中4个组分的含量, 并通过相对偏差及 Pearson 系数比较2种方法测定结果的相对误差。结果 栀子苷、没食子酸、升麻素苷、大黄酸进样量分别在 201.97 ~ 1 211.82 ng, 562.05 ~ 3 372.30 ng, 38.48 ~ 230.88 ng, 23.28 ~ 139.68 ng 范围内与峰面积线性关系良好; 没食子酸、升麻素苷、大黄酸相对于栀子苷的相对校正因子分别为 0.552, 1.450, 2.622; 在不同试验条件下的重复性良好(RSD < 1%); QAMS 法和 ESM 法的测定结果无显著差异。结论 QAMS 法可为栀榆洗剂提供一个快捷、简易的多指标同步质量评价模式与方法。

关键词: 栀榆洗剂; 一测多评法; 相对校正因子; 栀子苷; 没食子酸; 升麻素苷; 大黄酸; 高效液相色谱法

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)15-0058-04

Content Determination of Four Components in Zhiyu Lotion by QAMS

XU Qing, AN Yansu, BI Qiuzuo

(Qujing Food and Drug Inspection and Testing Center, Qujing, Yunnan, China 655000)

Abstract: **Objective** To establish a quantitative analysis of multi-components by single-marker(QAMS) method for the determination of four components in Zhiyu Lotion. **Methods** High performance liquid chromatography(HPLC) was performed on an Agilent Eclipse Plus C₁₈ column. The mobile phase was gradient elution of methanol-0.1% phosphoric acid solution(5:95, V/V). The flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was 30 ℃. The detection wavelength was 238 nm, and the injection volume was 5 μL. The relative correction factors of gallic acid, cohosphinoside and rhubarb acid relative to gardenoside were established with gardenoside as the internal standard. The contents of the four components in the preparation were determined by external standard method(ESM) and QAMS method, respectively. The relative errors of the results were compared by relative deviation and Pearson coefficient. **Results** The linear relationships of gardenoside, gallic acid, cohosphinoside and rhubarb acid were good in the ranges of 201.97 - 1 211.82 ng, 562.05 - 3 372.30 ng, 38.48 - 230.88 ng, 23.28 - 139.68 ng, respectively. The relative correction factors of gallic acid, cohosphinoside and rhubarb acid relative to gardenoside were 0.552, 1.450 and 2.622, respectively. And the reproducibility was good under different experimental conditions (RSD < 1%). There was no significant difference between the calculation results of QAMS method and the results of ESM method. **Conclusion** QAMS method can provide a quick and easy method for simultaneous quality evaluation of Zhiyu Lotion.

Key words: Zhiyu Lotion; quantitative analysis of multi-components by single-marker; relative correction factor; geniposide; gallic acid; cohosphinoside; rhubarb; high performance liquid chromatography

中药临床验方形成的医院制剂具有“多成分、多靶向、君臣佐使协同作用”的特点, 仅利用单一成分或指标性成分对其进行分析, 难以实现对某味药材或制剂整体质量的控制, 需要建立良好的多指标质量控制评价模式^[1], 但中药制剂进行多组分定量测定时, 所需对照品短缺、价格昂贵, 又制约了这一发展趋势。一测多评(QAMS)法采用只测定药材或制剂中某个代表性成分(易得、价廉、有效), 同时又可计算其他待测成分的含量, 可有效克服对照品短缺这一问题, 还能对药材或制剂进行多指标质量控制^[2-12]。栀榆洗剂是曲靖市中医院的验方制剂, 由栀子、地榆、马齿苋、苦参、大黄、白鲜皮、地肤子、豨莶草、荆芥、防风、白矾 11 种中药组方, 具有清热解毒凉血、祛风燥湿止痒功效, 临床主要用于治疗湿疹、银屑病、各种皮炎。皮肤病复杂且易反复发作, 故栀榆洗剂处方中采用君臣佐使协同配伍, 临床疗效确切。但现行质量标准较简单, 未采用定量方法对制剂进行质量控制。本研究中分别

选取地榆(君药)中没食子酸, 栀子和大黄(臣药)中栀子苷、大黄酸、没食子酸, 防风(佐药)中升麻素苷为指标成分, 参照文献[13-14], 建立了高效液相色谱(HPLC)法, 以栀子苷为内标物, 计算出其余组分的相对校正因子, 并考察方法的耐用性及系统适用性, 以验证 QAMS 法在栀榆洗剂多指标质量控制中应用的可行性。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent1260 型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司, 检测器为 DAD); 岛津 20AD 型高效液相色谱仪(日本岛津公司, 检测器为 DAD); XPR2003SC 型梅特勒电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司, 双量程 0.1 mg/0.01 mg); HHS226 型恒温水浴锅(江苏省医疗器械厂); 密理博超纯水机(美国密理博公司)。

1.2 试剂

栀子苷对照品(批号为 110749-201919, 含量以

第一作者: 许庆, 男, 大学本科, 主管药师, 主要从事食品药品检验检测工作, (电子信箱)114204205@qq.com。

97.1%计),升麻素苷对照品(批号为111522-201712,含量以96.2%计),没食子酸对照品(批号为110831-201605,含量以90.8%计),大黄酸对照品(批号为110757-201607,含量以99.3%计),均由中国食品药品检定研究院提供;甲醇(色谱纯,默克股份两合公司,批号为11046707936);磷酸(优级纯,成都市科隆化学有限公司,批号为201703241);梔子洗剂(批号分别为SC2018002, SC2018003, SC2019001, SC2019002, SC2019003, SC2019004),缺梔子、缺防风、缺大黄、缺地榆-大黄(缺没食子酸)阴性对照品均由曲靖市中医院制剂室提供。

2 方法与结果

2.1 QAMS 方法学考察

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse Plus C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~11 min 时 5% A, 11~15 min 时 5% A→30% A, 15~60 min 时 30% A, 60~65 min 时 30% A→70% A, 65~80 min 时 70% A, 80~81 min 时 5% A, 81~91 min 时 5% A);流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:238 nm;进样量:5 μL。

2.1.2 溶液制备

取梔子苷、没食子酸、升麻素苷、大黄酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为201.97, 562.05, 38.48, 23.28 μg/mL 的混合对照品溶液。精密量取上述溶液各10 mL,置具塞锥形瓶中,于水浴上蒸干,精密加入甲醇10 mL,密塞,称定质量,水浴回流1.5 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,

取续滤液,即得供试品溶液。取缺梔子、缺防风、缺大黄、缺地榆-大黄(缺没食子酸)阴性对照品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

专属性试验:精密吸取上述3种溶液各5 μL,进样分析。结果各成分与邻峰的分离度均大于1.5,理论板数按梔子苷峰计在3 000以上。阴性对照品溶液在与梔子苷、升麻素苷、大黄酸、没食子酸峰相同保留时间处无相应色谱峰,阴性对照无干扰。结果见图1。

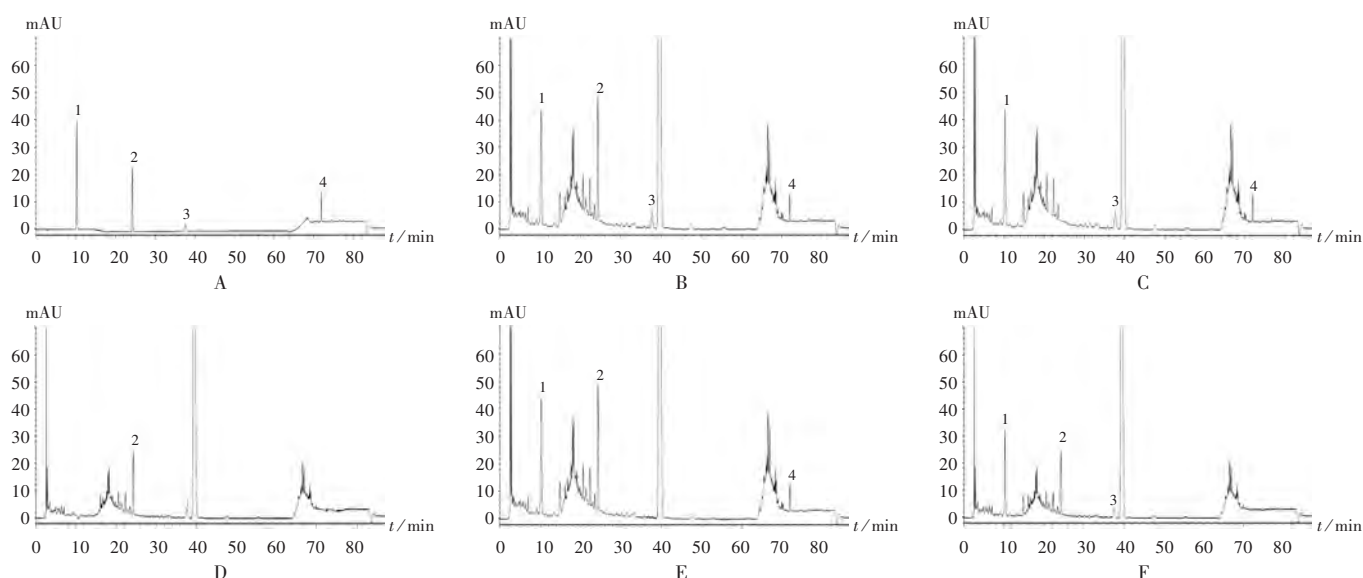
线性关系考察:精密吸取上述混合对照品溶液1,2,3,4,5,6 μL,注入色谱仪,按拟订色谱条件进样测定,以进样量(X)对峰面积(Y)进行线性回归,得梔子苷、没食子酸、升麻素苷、大黄酸的标准曲线方程。结果见表1,表明各化合物进样量在相应范围内与峰面积线性关系良好。

表1 4种成分的线性关系考察结果(n=6)

成分	标准曲线方程	线性范围(ng)	r
梔子苷	$Y = 1.461X + 6.8667$	201.97 ~ 1 211.82	0.999 9
没食子酸	$Y = 0.805X + 14.4$	562.05 ~ 3 372.3	0.999 9
升麻素苷	$Y = 2.1117X + 2.2667$	38.48 ~ 230.88	0.999 9
大黄酸	$Y = 3.8292X + 3$	23.28 ~ 139.68	0.999 9

精密度试验:精密吸取2.1.2项下混合对照品溶液2 μL,连续进样6次,记录各组峰面积。结果峰面积的RSD分别为0.81%, 0.92%, 0.56%, 1.11% (n=6),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为SC2018003),依法制备供试品溶液,分别于0,2,4,8,12,24 h时进样测定。结果梔子苷、没食子酸、升麻素苷、大黄酸峰面积的



1. 没食子酸 2. 梔子苷 3. 升麻素苷 4. 大黄酸

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 缺梔子阴性对照品溶液 D. 缺地榆-大黄阴性对照品溶液

E. 缺防风阴性对照品溶液 F. 缺大黄阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

RSD 分别为 0.73% , 0.94% , 1.23% , 1.01% ($n=6$) , 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验:精密量取样品(批号为 SC2018003)10mL, 共 5 份,依法制备供试品溶液,进样测定。结果梔子苷、没食子酸、升麻素苷、大黄酸的含量分别为 81.78, 225.64, 13.10, 7.33 $\mu\text{g/mL}$, RSD 分别为 0.58% , 0.82% , 1.16% , 1.33% ($n=5$)。

加样回收试验:精密量取同一批(批号为 SC2018003)已知含量的样品 5 mL,共 6 份,分别置具塞锥形瓶中,精密加入质量浓度梔子苷为 420.2 $\mu\text{g/mL}$ 、没食子酸为 1128.7 $\mu\text{g/mL}$ 、升麻素苷为 67.1 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄酸为 36.8 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液 1 mL,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,并计算加样回收率。结果见表 2。

表 2 加样回收试验结果($n=6$)

成分	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
梔子苷	408.9	420.2	820.1	97.86	97.52	1.54
	408.9	420.2	814.9	96.62		
	408.9	420.2	816.6	97.03		
	408.9	420.2	821.1	98.10		
	408.9	420.2	810.5	95.57		
	408.9	420.2	828.9	99.95		
没食子酸	1128.2	1128.7	2236.3	98.17	97.66	1.19
	1128.2	1128.7	2211.3	95.96		
	1128.2	1128.7	2248.9	99.29		
	1128.2	1128.7	2221.2	96.84		
	1128.2	1128.7	2236.7	98.21		
	1128.2	1128.7	2228.9	97.52		
升麻素苷	65.5	67.1	129.8	95.83	98.21	1.54
	65.5	67.1	131.1	97.76		
	65.5	67.1	130.9	97.47		
	65.5	67.1	132.4	99.70		
	65.5	67.1	132.5	99.85		
	65.5	67.1	131.7	98.66		
大黄酸	36.7	36.8	73.7	100.54	98.78	1.47
	36.7	36.8	72.5	97.28		
	36.7	36.8	72.9	98.37		
	36.7	36.8	73.3	99.46		
	36.7	36.8	73.5	100.00		
	36.7	36.8	72.4	97.01		

2.1.4 相对校正因子计算

参照文献[2,7],以混合对照品溶液多个浓度点分别进样,计算所得相对校正因子的平均值 f_{km} 。本试验中以梔子苷为内标物,按公式 $f_{km} = f_k / f_m = W_k \times A_m / W_m \times A_k$ (式中 W_k 为内标物浓度, W_m 为其他待测组分浓度, A_m 为其他待测组分峰面积, A_k 为内标物峰面积)分别计算 3 种待测组分与梔子苷的 f_{km} ,结果见表 3。

表 3 梔子苷对没食子酸、升麻素苷、大黄酸的相对校正因子

进样体积	$f_{\text{梔子苷/没食子酸}}$	$f_{\text{梔子苷/升麻素苷}}$	$f_{\text{梔子苷/大黄酸}}$
1 μL	0.552	1.441	2.582
2 μL	0.554	1.452	2.654
3 μL	0.552	1.449	2.611
4 μL	0.553	1.456	2.659
5 μL	0.552	1.451	2.608
6 μL	0.551	1.446	2.619
$\bar{X}$	0.552	1.450	2.622
RSD (%)	0.19	0.36	1.12

2.2 相对校正因子重复性考察

取 2.1.2 项下混合对照品溶液,分别进样 1.0, 1.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 μL ,按 2.1.4 项下公式计算梔子苷对没食子酸、升麻素苷、大黄酸的相对校正因子。考察了 2 台不同型号的高效液相色谱系统(Agilent1260 型及岛津 20AD 型)及 3 种色谱柱[Agilent Eclipse Plus C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),依利特 Hypersil ODS2 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),Thermo Hypersil GOLD C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)],柱间相对校正因子的 $RSD < 1\%$,表明相对校正因子在不同仪器和色谱柱上的耐用性均较好。详见表 4。

表 4 不同色谱柱和仪器测得相对校正因子

仪器	色谱柱	相对校正因子		
		$f_{\text{梔子苷/没食子酸}}$	$f_{\text{梔子苷/升麻素苷}}$	$f_{\text{梔子苷/大黄酸}}$
Agilent1260 型	Agilent Eclipse Plus C_{18} 柱	0.548	1.447	2.619
	依利特 Hypersil ODS2 柱	0.554	1.441	2.625
	Thermo Hypersil GOLD C_{18} 柱	0.552	1.452	2.620
岛津 20AD 型	Agilent Eclipse Plus C_{18} 柱	0.549	1.456	2.633
	依利特 Hypersil ODS2 柱	0.556	1.450	2.617
	Thermo Hypersil GOLD C_{18} 柱	0.546	1.458	2.625
$\bar{X}$		0.551	1.451	2.623
RSD (%)		0.70	0.43	0.22

2.3 待测组分色谱峰定位

通过相对保留时间进行待测组分峰的定位,结果见表 5。可见,各待测组分相对保留值的 $RSD < 3.0\%$,根

表 5 不同仪器及规格色谱柱下目标成分的相对保留时间

仪器	色谱柱	相对保留时间		
		$\Delta t_{\text{梔子苷/没食子酸}}$	$\Delta t_{\text{梔子苷/升麻素苷}}$	$\Delta t_{\text{梔子苷/大黄酸}}$
Agilent1260 型	Agilent Eclipse Plus C_{18} 柱	2.367	0.634	0.337
	依利特 Hypersil ODS2 柱	2.395	0.668	0.341
	Thermo Hypersil GOLD C_{18} 柱	2.450	0.652	0.344
岛津 20AD 型	Agilent Eclipse Plus C_{18} 柱	2.379	0.649	0.351
	依利特 Hypersil ODS2 柱	2.357	0.662	0.354
	Thermo Hypersil GOLD C_{18} 柱	2.447	0.650	0.332
$\bar{X}$		2.399	0.652	0.343
RSD (%)		1.68	1.80	2.43

表6 ESM法和QAMS法测定桅榆洗剂中4种成分含量比较($\mu\text{g/mL}$, $n=6$)

批号	没食子酸			栀子苷	升麻素苷			大黄酸		
	ESM 法	QAMS 法	RSD(%)		ESM 法	ESM 法	QAMS 法	RSD(%)	ESM 法	QAMS 法
SC2018002	245. 61	246. 15	0. 16	89. 68	11. 06	11. 12	0. 38	5. 01	5. 11	1. 40
SC2018003	226. 34	226. 88	0. 17	81. 47	12. 67	12. 69	0. 11	7. 31	7. 38	0. 67
SC2019001	224. 99	225. 64	0. 20	84. 75	13. 09	13. 12	0. 16	5. 38	5. 47	1. 17
SC2019002	246. 36	246. 93	0. 16	91. 05	17. 61	17. 75	0. 56	9. 54	9. 67	0. 96
SC2019003	253. 66	253. 17	0. 14	87. 69	18. 44	18. 59	0. 57	7. 66	7. 79	1. 19
SC2019004	263. 11	262. 37	0. 20	93. 89	15. 46	15. 69	1. 04	7. 72	7. 65	0. 64
Pearson 系数	0. 999			0. 999			0. 999			

据不同仪器及规格色谱柱下目标成分的相对保留时间可正确判断目标峰的准确位置。

2.4 QAMS法与外标(ESM)法测定结果比较

精密吸取供试品溶液各5 μL , 注入高效液相色谱仪测定, 采用QAMS法与ESM法计算样品中栀子苷、没食子酸、升麻素苷、大黄酸的含量。结果见表6。采用统计软件计算2种方法的没食子酸、升麻素苷、大黄酸含量之间的Pearson系数。结果表明, 2种方法所测得含量相似度较高; 两组含量的RSD均在2%内, 表明2种方法测得各批次样品的含量无显著差异, QAMS法可应用于桅榆洗剂各组分的含量测定。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法选择

供试品溶液提取时考察了甲醇超声提取与水浴回流提取2种方法, 发现后者提取率更高, 故选择后者。水浴回流提取0.5, 1.0, 1.5, 2.0 h, 结果1.5 h后含量提取变化不大, 故采取甲醇水浴回流1.5 h, 制剂中4个组分提取效率高, 分离度好, 杂质干扰峰较少, 方法简单易行。

3.2 检测波长选择

对栀子苷、没食子酸、升麻素苷、大黄酸进行全波长扫描, 在238 nm和254 nm波长处均有吸收, 并比较238 nm和254 nm波长下的色谱图, 结果238 nm波长处各主成分峰灵敏度高、干扰较少, 被选为检测波长。

3.3 校正因子考察

为验证所建立4个组分QAMS法的适用性及可行性, 本研究中进行了方法学考察及系统适用性试验。通过2台液相色谱仪、3根不同品牌及型号色谱柱的考察, 结果表明没食子酸、升麻素苷、大黄酸与栀子苷之间的相对校正因子具有良好的重复性。

3.4 方法评价

本研究中建立的QAMS法应用于桅榆洗剂的质量评价, 以栀子苷为内标物, 分别确定没食子酸、升麻素苷、大黄酸的相对校正因子, 分别采用ESM法和QAMS

法测定4种成分的含量, 并通过RSD和Pearson系数比较两者的相对误差。QAMS法所得4种成分的含量与传统ESM法测得结果无显著差异, 且与ESM法相比, 可节约检测成本, 有利于制剂的质量控制, 可为医院制剂多成分定量分析提供参考。

参考文献:

- [1] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [2] 王智民, 钱忠直, 张启伟, 等. 一测多评法建立的技术指南[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 657-658.
- [3] 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.
- [4] 罗祖良, 仇峰, 韦日伟, 等. 相对校正因子在中药多指标测定中的应用研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(7): 1448-1452.
- [5] 陆兔林, 石上梅, 蔡宝昌, 等. 基于一测多评的中药多成分定量研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(12): 2525-2529.
- [6] 赵倩, 冯伟红, 张启伟, 等. “一测多评”法用于栀子金花丸多成分含量测定的可行性研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(10): 1826-1833.
- [7] 何兵, 刘艳, 杨世艳, 等. HPLC一测多评法同时测定双青咽喉片中10种成分[J]. 中草药, 2013, 44(8): 974-981.
- [8] 何兵, 刘艳, 李春红, 等. 一测多评法同时测定鱼腥草不同部位中6种活性成分的量[J]. 中草药, 2013, 43(15): 2160-2164.
- [9] 陈建伟, 刘圆, 刘晟楠, 等. 一测多评法测定枳实中4种黄酮类成分[J]. 中草药, 2015, 46(9): 1374-1377.
- [10] 李玲, 赵顺, 罗疆南, 等. 一测多评法测定胃苏颗粒中4种成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(4): 751-757.
- [11] 石伟, 王振中, 倪付勇, 等. 一测多评法在六味地黄软胶囊质量评价中的应用[J]. 中草药, 2015, 46(19): 2880-2886.
- [12] 高慧敏, 宋宗华, 王智民, 等. 适合中药特点的质量评价模式—QAMS研究概述[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(4): 405-416.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 126, 248.
- [14] 国家药典委员会. 中国药典分析检测技术指南[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2017: 174-201.

(收稿日期: 2020-01-08)