

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.18.017

一测多评法测定礞石滚痰丸中6种成分含量

赵新红, 范 珊, 齐永秀[△]

(山东第一医科大学·山东省医学科学院, 山东 泰安 271016)

摘要:目的 建立同时测定礞石滚痰丸中6种成分含量的一测多评法。方法 色谱柱为 Thermo ODS Hypersil 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 30 ℃。以大黄素为内参物, 建立大黄素与黄芩苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚的相对校正因子。采用一测多评法测定礞石滚痰丸中6种成分的含量; 同时以外标法进行验证试验。结果 大黄素与黄芩苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚的相对校正因子分别为 0.26, 1.47, 0.11, 2.13, 0.34, 在不同试验条件下相对校正因子重复性良好, 6种成分含量的计算值与实测值无显著差异($P>0.05$)。结论 所建立的方法科学、简便、成本较低, 可用于同时测定礞石滚痰丸中多种有效成分的含量。

关键词:一测多评法; 相对校正因子; 礞石滚痰丸; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)18-0069-05

Simultaneous Determination of Six Components in Mengshiguntan Pills by QAMS

ZHAO Xinhong, FAN Shan, QI Yongxiu

(Shandong First Medical University · Shandong Academy of Medical Sciences, Tai'an, Shandong, China 271016)

Abstract: **Objective** To establish a quantitative analysis of multi-components by single-marker(QAMS) method for the simultaneous determination of six components in Mengshiguntan Pills. **Methods** The chromatographic column was Thermo ODS Hypersil column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.1% phosphoric acid solution(gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, and the column temperature was 30 ℃. With emodin as the internal reference material, the relative correction factors of emodin and baicalin, aloe-emodin, rhein, chrysophanol and physcion were established. The contents of six components in Mengshiguntan Pills were determined by the QAMS method. At the same time, the external standard method(ESM) was used for the verification test. **Results** The relative correction factors of emodin and baicalin, aloe-emodin, rhein, chrysophanol and physcion were 0.26, 1.47, 0.11, 2.13 and 0.34, respectively. Under different experimental conditions, the reproducibility of the relative correction factors was good, and there was no significant difference between the calculated values and the measured values of the six components ($P>0.05$). **Conclusion** The established method is scientific, simple with low cost, which can be used for the simultaneous determination of multiple effective components in Mengshiguntan Pills.

Key words: QAMS; relative correlation factor; Mengshiguntan Pills; content determination

礞石滚痰丸由金礞石(煅)、熟大黄、黄芩、沉香等中药组方^[1], 其中君药大黄有效成分为大黄素、大黄酸、大黄酚、芦荟大黄素、大黄素甲醚, 臣药黄芩有效成分为黄芩苷, 金礞石为佐药, 沉香为使药, 全方具有祛痰降火功效, 临床多用于治疗抑郁症、单纯性肥胖症(胃湿热阻证)、中风等^[2-3]。中药材成分复杂, 其质量受多种因素影响, 仅凭某一成分评价中药材的质量过于片面。一测多评法不仅可实现多成分的质量控制, 还能解决对照品价格昂贵的问题, 广泛用于多个处方制剂的质量评价。通过选定合适的内参物, 根据处方制剂各种成分间存在的线性或比例关系, 建立内参物与其他成分间的相对校正因子^[4-7], 仅需测定内参物的含量, 通过校正因子计算其他成分含量。本研究中建立了大黄素与大黄酚、大黄酸、黄芩苷、大黄素甲醚和芦荟大黄素的相对校正因

子($f_{s/i}$), 通过外标法测定大黄素的含量, 根据大黄素与其他成分间的相对校正因子测定其他各成分含量, 既可节省检测成本, 又可减少检测时间, 能较好地反映制剂质量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); LC-20AD 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); KQ-500E 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); FR224CN 型电子天平(奥豪斯仪器上海有限公司, 精度为万分之一); 离心机(盐城凯特实验仪器有限公司); GM 0.33A 型隔膜真空泵(天津市津腾实验设备有限公司)。

1.2 试剂

礞石滚痰丸(保定中药制药股份有限公司, 国药准

第一作者: 赵新红, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为药物分析, (电子信箱)18754807130@163.com。

[△]通信作者: 齐永秀, 女, 教授, 研究方向为体内药物分析, (电子信箱)yxqi@sdfmu.edu.cn。

字 Z13021937, 批号分别为 190405, 200101, 200305, 200307, 200408); 大黄素甲醚对照品(批号为 TA0421FA14, 含量 $\geq 98\%$), 芦荟大黄素对照品(批号为 T28D6F8264, 含量 $\geq 97\%$), 均购自上海源叶生物科技有限公司; 黄芩苷对照品(批号为 110715-200514, 含量 $\geq 98\%$), 大黄素对照品(批号为 110756-200110, 含量 $\geq 98\%$), 大黄酸对照品(批号为 0757-200206, 含量 $\geq 98\%$), 均购自中国食品药品检定研究院; 大黄酚对照品(天津西玛科技有限公司, 批号为 09T18, 含量 $\geq 98\%$); 甲醇为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Thermo ODS Hypersil 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇(A)-0.1% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~52 min 时 36.7% A $\rightarrow$ 91.6% A, 52~54 min 时 91.6% A $\rightarrow$ 36.7% A, 54~60 min 时 36.7% A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L。

2.2 溶液制备

分别取芦荟大黄素、黄芩苷、大黄素甲醚、大黄酚、大黄素、大黄酸对照品各适量, 精密称定, 加入甲醇超声(功率为 300 W, 频率为 40 kHz, 下同)溶解, 制成质量浓度分别为 11.34, 314.40, 26.02, 15.34, 4.60, 3.84 μ g/mL

的混合对照品溶液^[8]。取样品适量, 研成粉末, 过筛, 精密称取 0.3913 g, 置 50 mL 棕色容量瓶中, 甲醇定容, 超声处理 40 min, 放冷至室温, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 3 000 r/min 离心 5 min, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液^[9]。按礞石滚痰丸处方和工艺分别制备缺黄芩和大黄的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液^[10]。

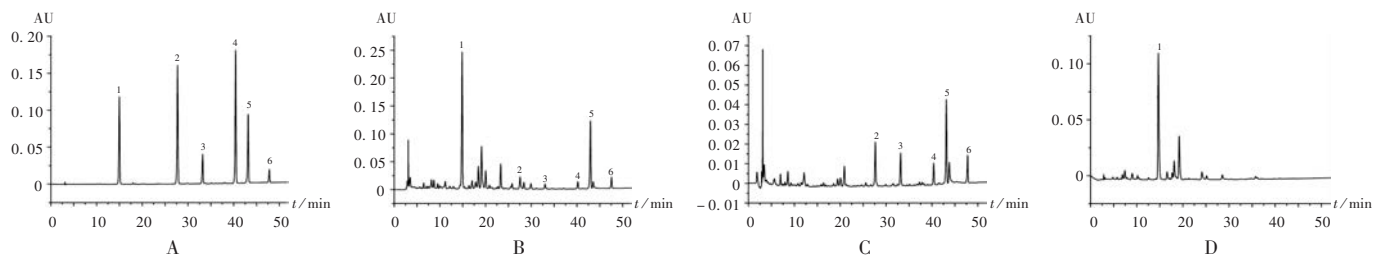
2.3 方法学考察

系统适用性试验: 取 2.2 项下 4 种溶液各适量, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。理论板数以黄芩苷峰计为 8 731, 各成分与相邻组分分离较好。详见图 1。

线性关系考察: 分别精密量取 2.2 项下混合对照品溶液各适量, 制成系列混合对照品溶液^[11], 各量取 10 μ L, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以待测成分质量浓度(X , μ g/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程与线性范围。详见表 1。

精密密度试验: 取供试品溶液(批号为 190405)适量, 按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果见表 1, 可见方法精密密度良好。

稳定性试验: 取供试品溶液(批号为 190405)适量, 分别于室温下放置 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 时按 2.1 项



1. 黄芩苷 2. 芦荟大黄素 3. 大黄酸 4. 大黄素 5. 大黄素甲醚 6. 大黄酚

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 缺黄芩的阴性对照品溶液 D. 缺大黄的阴性对照品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. baicalin 2. aloe-emodin 3. rhein 4. emodin 5. physcion 6. chrysophanol

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution without Scutellariae Radix D. Negative reference solution without Rhei Radix et Rhizoma

Fig. 1 HPLC chromatograms

表 1 方法学考察结果

Tab. 1 Results of the methodological investigations

成分	回归方程	r	线性范围 (μ g)	精密密度试验 RSD(%)	稳定性试验 RSD(%)	重复性试验		加样回收试验	
						含量(mg/g)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
黄芩苷	$Y_1 = 1.2952 \times 10^4 X_1 - 8822.6$	0.9999	15.720~314.40	0.85	1.17	16.01	0.25	98.09	1.31
芦荟大黄素	$Y_2 = 5.4347 \times 10^4 X_2 - 4304.1$	0.9999	0.567~11.34	0.89	1.26	0.62	0.30	97.95	2.53
大黄酸	$Y_3 = 3.6040 \times 10^3 X_3 + 5726.8$	0.9993	0.192~3.84	0.54	2.91	2.39	0.98	104.12	1.07
大黄素	$Y_4 = 3.6151 \times 10^4 X_4 + 6630.3$	0.9991	0.230~4.60	0.98	0.64	0.42	2.10	97.69	1.62
大黄酚	$Y_5 = 8.5327 \times 10^4 X_5 - 2144.0$	0.9999	0.767~15.34	0.41	1.47	1.72	0.28	96.01	0.73
大黄素甲醚	$Y_6 = 1.2810 \times 10^4 X_6 + 2529.3$	0.9991	1.301~26.02	0.62	0.37	1.63	0.52	100.86	1.41

下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果见表1,可见,供试品溶液在室温下放置12 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为190405)适量,各6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果见表1,可见,方法重复性良好。

加样回收试验^[12]:取已知含量的样品(批号为190405)适量,共6份,分别加入一定浓度的对照品溶液,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,并计算回收率。结果见表1。

2.4 $f_{s/i}$ 的建立

2.4.1 $f_{s/i}$ 的耐用性评价

根据公式 $f_{s/i} = (c_s \times A_i) / (A_s \times c_i)$ 计算一测多评的相对校正因子^[13]。式中, A_s 代表内标物大黄素峰面积, c_s 代表内标物大黄素质量浓度, A_i 代表其他组分峰面积, c_i 代表其他组分质量浓度;以大黄素(d)为内参物,计算其与黄芩苷(a)、芦荟大黄素(b)、大黄酸(c)、大黄酚(e)和大黄素甲醚(f)的 $f_{s/i}$ 分别为0.263, 1.478, 0.111, 2.010, 0.340^[14]。

高效液相色谱系统和色谱柱的影响:取样品适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件[分别设置色谱系统为Waters e2695型、Shimadzu LC-20AD型高效液相色谱系统,色谱柱为Thermo ODS Hypersil柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Venusil MP C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)和Waters C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)]进样测定,记录各成分峰面积并计算 $f_{s/i}$ 。结果各成分在不同色谱系统和不同色谱柱上的 $f_{s/i}$ 的RSD均小于7%^[15],表明不同色谱系统和不同色谱柱对各成分 $f_{s/i}$ 无显著影响。详见表2。

进样量的影响:取样品适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件(分别设置进样量为8,9,10,11 μL)进样测定,记录各成分峰面积,并计算 $f_{s/i}$ 。结果各成分 $f_{s/i}$ 的RSD均小于2%,表明不同进样量对各成分 $f_{s/i}$ 无显著影响。详见表3。

色谱柱柱温的影响:取样品适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件(分别设

表2 不同色谱系统和色谱柱对 $f_{s/i}$ 的影响

Tab. 2 Effects of different chromatographic systems and columns on $f_{s/i}$

仪器型号	色谱柱	$f_{d/a}$	$f_{d/b}$	$f_{d/c}$	$f_{d/e}$	$f_{d/f}$
Waters e2695 型	Thermo ODS Hypersil 柱	0.26	1.49	0.11	2.13	0.26
	Venusil MP C ₁₈ 柱	0.26	1.49	0.12	2.18	0.25
	Waters C ₁₈ 柱	0.23	1.47	0.11	2.15	0.30
Shimadzu LC-20AD 型	Thermo ODS Hypersil 柱	0.25	1.48	0.11	2.13	0.27
	Venusil MP C ₁₈ 柱	0.25	1.49	0.12	2.17	0.25
	Waters C ₁₈ 柱	0.23	1.47	0.11	2.15	0.29
$\bar{x}$		0.25	1.48	0.11	2.15	0.27
RSD(%)		5.54	0.67	4.56	0.94	6.93

置色谱柱柱温为28,29,30℃),进样测定,记录各成分峰面积,并计算 $f_{s/i}$ 。结果各成分 $f_{s/i}$ 的RSD均小于2%,表明不同色谱柱柱温对各成分 $f_{s/i}$ 无显著影响。详见表3。

流动相流速的影响:取样品适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件(分别设置流速为0.8,0.9,1.0,1.1 mL/min)进样测定,记录各成分峰面积并计算 $f_{s/i}$ 。结果各成分 $f_{s/i}$ 的RSD均小于4%,表明流速对各成分 $f_{s/i}$ 无显著影响。详见表3。

流动相组成比例的影响:取样品适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件[分别设置不同流动相组成比例(±0.5%甲醇比例)]进样测定,记录各成分峰面积,并计算 $f_{s/i}$ 。结果各成分 $f_{s/i}$ 的RSD均小于7%^[14],表明流动相组成比例的微小变化对各成分 $f_{s/i}$ 无显著影响。详见表3。

酸水比例流动相的影响:取样品适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件(分别设置流动相磷酸体积分数为0.09%,0.10%,0.11%)进样测定,记录各成分峰面积,并计算 $f_{s/i}$ 。结果各成分 $f_{s/i}$ 的RSD均小于2%,表明不同酸水比例流动相对各成分 $f_{s/i}$ 无显著影响。详见表3。

检测波长的影响:取样品适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件(分别设置检测波长为253,254,255 nm)进样测定,记录各成分的峰面积,并计算 $f_{s/i}$ 。结果各成分 $f_{s/i}$ 的RSD均小于4%,表明检测波长的微小变化对各成分 $f_{s/i}$ 无显著

表3 $f_{s/i}$ 耐用性评价结果

Tab. 3 Results of the durability evaluation of $f_{s/i}$

因子	进样量(μL)						色谱柱柱温(℃)					流动相流速(mL/min)					流动相梯度比例(%)					流动相酸水比例(%)					检测波长(nm)					
	8	9	10	11	$\bar{X}$	RSD(%)	28	29	30	$\bar{X}$	RSD(%)	0.8	0.9	1.0	1.1	$\bar{X}$	RSD(%)	-0.50	0	+0.50	$\bar{X}$	RSD(%)	0.09%	0.10%	0.11%	$\bar{X}$	RSD(%)	253	254	255	$\bar{X}$	RSD(%)
$f_{d/a}$	0.26	0.26	0.26	0.27	0.26	1.00	0.26	0.26	0.25	0.25	1.32	0.27	0.27	0.27	0.25	0.27	3.65	0.25	0.25	0.22	0.24	6.64	0.29	0.28	0.28	0.28	1.65	0.29	0.28	0.30	0.29	3.82
$f_{d/b}$	1.47	1.48	1.47	1.48	1.47	0.37	1.47	1.46	1.46	1.46	0.32	1.47	1.47	1.48	1.46	1.47	0.39	1.45	1.46	1.51	1.47	1.83	1.47	1.48	1.47	1.47	0.12	1.52	1.49	1.55	1.52	1.99
$f_{d/c}$	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	1.73	0.11	0.11	0.11	0.11	0.54	0.11	0.11	0.11	0.10	0.11	2.31	0.11	0.11	0.11	0.11	0.55	0.11	0.11	0.11	0.11	2.00	0.12	0.12	0.12	0.12	2.02
$f_{d/e}$	2.17	2.14	2.15	2.13	2.15	0.83	2.13	2.13	2.14	2.13	0.27	2.15	2.16	2.14	2.17	2.15	0.56	1.87	2.11	1.94	1.97	6.18	2.17	2.15	2.15	2.16	0.48	2.15	2.14	2.17	2.15	0.70
$f_{d/f}$	0.36	0.37	0.37	0.37	0.37	0.86	0.37	0.37	0.37	0.37	0.41	0.36	0.37	0.36	0.36	0.37	0.48	0.36	0.36	0.32	0.35	6.56	0.37	0.36	0.37	0.37	0.74	0.34	0.34	0.35	0.34	1.68

表4 不同色谱系统和色谱柱测定样品中6种成分相对保留值和保留时间差的RSD(%)

Tab. 4 RSD of relative retention value and retention time difference of six components in samples determined by different chromatographic systems and columns(%)

仪器	色谱柱	相对保留值					相对保留时间				
		$t_{d/a}$	$t_{d/b}$	$t_{d/c}$	$t_{d/e}$	$t_{d/f}$	$\Delta t_{d/a}$	$\Delta t_{d/b}$	$\Delta t_{d/c}$	$\Delta t_{d/e}$	$\Delta t_{d/f}$
Shimadzu LC-20AD 型	Thermo ODS Hypersil 柱	2.59	1.43	1.21	0.94	0.85	26.44	13.02	7.34	-2.88	-7.58
	Venusil MP C ₁₈ 柱	2.61	1.40	1.18	0.94	0.84	27.21	12.69	6.83	-3.04	-8.41
	Waters C ₁₈ 柱	2.59	1.40	1.18	0.94	0.84	27.08	12.63	6.82	-3.02	-8.42
Waters e2695 型	Thermo ODS Hypersil 柱	2.80	1.45	1.18	0.92	0.84	28.70	13.94	6.91	-3.72	-8.46
	Venusil MP C ₁₈ 柱	2.76	1.43	1.20	0.93	0.83	26.21	12.34	6.73	-2.96	-8.33
	Waters C ₁₈ 柱	2.78	1.43	1.20	0.93	0.83	26.27	12.35	6.73	-2.95	-8.33
$\bar{X}$		2.60	1.42	1.19	0.93	0.85	27.11	13.11	6.95	-3.21	-8.11
RSD(%)		1.54	0.74	1.14	0.56	0.71	5.31	5.62	3.05	-13.78	-5.95

表5 外标法与一测多评法测定礞石滚痰丸中6种成分含量比较(mg/g)

Tab. 5 Comparison of content determination of six components in Mengshiguntan Pills by ESM and QAMS method(mg/g)

批号	大黄素		黄芩苷		芦荟大黄素			大黄酸			大黄酚			大黄素甲醚		
	ESM	ESM	QAMS	RSD(%)	ESM	QAMS	RSD(%)	ESM	QAMS	RSD(%)	ESM	QAMS	RSD(%)	ESM	QAMS	RSD(%)
190405	0.40	16.14	16.61	2.03	0.64	0.60	3.70	2.45	2.28	4.88	1.69	1.76	2.60	1.66	1.56	4.47
200101	0.41	16.19	16.62	1.82	0.64	0.63	1.43	2.40	2.24	4.99	1.70	1.75	2.24	1.67	1.56	4.70
200305	0.40	16.17	16.64	2.00	0.64	0.61	3.70	2.40	2.24	4.98	1.69	1.75	2.52	1.67	1.57	4.51
200307	0.45	15.78	16.29	2.22	0.59	0.56	3.40	2.39	2.24	4.65	1.93	2.01	3.00	1.57	1.49	3.98
200408	0.42	15.85	16.29	1.92	0.58	0.55	3.72	2.40	2.24	4.96	1.79	1.86	2.69	1.57	1.48	4.28

注:ESM 为外标法,QAMS 为一测多评法。

Note: ESM = external standard method, QAMS = quantitative analysis of multi-components by single-marker.

影响。详见表3。

2.4.2 待测组分色谱峰定位

一测多评法多采用相对保留值($t_{s/i}$)或保留时间差($\Delta t_{s/i}$)进行定位。考察在不同色谱系统和色谱柱中各待测成分色谱峰与参照峰的保留时间差和相对保留值,结果见表4。通过比较, $t_{s/i}$ 的RSD更小,对色谱峰定位更准确,因此以相对保留值进行色谱法定位^[16]。

2.5 一测多评法与外标法测定结果比较

分别取5批样品各适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定各成分的峰面积。以大黄素为内参物,计算大黄素与其他5种成分的 $f_{s/i}$,并以此计算各自的含量。再以外标法计算6种成分的含量,并对比2种方法所得结果的差异。结果外标法与一测多评法所得结果的RSD均小于5%,无显著差异,表明一测多评法可用于礞石滚痰丸中多种成分含量的测定。详见表5。

3 讨论

礞石滚痰丸中主要有效成分为黄芩苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚,其中大黄素对照品简单易得,性质较稳定,且保留时间居于中间位置,故以此为内参物,进而计算大黄素与黄芩苷、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、大黄酸的 $f_{s/i}$ 。

本预试验中考察了不同比例的甲醇、乙腈、甲酸、冰醋酸、磷酸作流动相对试验结果的影响^[12],分析发现,乙腈洗脱能力高于甲醇,使得样品峰中多个组分无法达到好的分离效果。通过比较不同酸的种类及比例之后,发现0.5%磷酸可使色谱峰峰形较好,分离效果较好,故最终选择甲醇-0.5%磷酸水溶液作流动相。

黄芩中黄芩苷在215.6,277.2,316.5 nm波长处,大黄中大黄酚在226,257,286.7 nm波长处,大黄素在216.8,253.4,291.5 nm波长处,大黄酸在228.6,258.2 nm波长处,大黄素甲醚在222.7,265.3,286.7 nm波长处,芦荟大黄素在225.0,255.8,286.7 nm波长处,均有较大吸收。经Waters e2695型HPLC系统紫外3D波长扫描可得,在波长为254 nm时,样品中6个成分均具有较好的吸收,故选择254 nm作为吸收波长。

综上所述,本研究中通过外标法与相对校正因子法同时测定礞石滚痰丸中6种成分的含量,2种方法的结果无显著差异,证明一测多评法可用于礞石滚痰丸中多种成分含量的测定,本研究为其质量标准的制订提供了参考。

参考文献

- [1] 蒋楠. 藏药金礞石研究进展[J]. 新中医, 2019, 51(1): 26-29.