

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)18-0085-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.18.018



一测多评法同时测定结石通片中7种成分含量

聂溶, 蔡林雪, 孟倩颖

(中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院, 福建 福州 350000)

摘要:目的 建立同时测定结石通片中7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 Waters SunFire C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 - 0.15% 甲酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长分别为 330 nm(夏佛塔苷、异夏佛塔苷、异牡荆苷、绿原酸、芒果苷和大车前苷)和 210 nm(茯苓酸), 柱温为 35 °C, 进样量为 10 μL。以绿原酸为内参物, 计算其他6种成分的相对校正因子, 测定含量并与外标法测定结果比较。结果 夏佛塔苷、异夏佛塔苷、异牡荆苷、绿原酸、芒果苷、大车前苷和茯苓酸质量浓度分别在 1.54~38.61 μg/mL、0.53~13.14 μg/mL、1.17~29.24 μg/mL、2.05~51.28 μg/mL、1.61~40.37 μg/mL、1.16~29.03 μg/mL、0.92~23.09 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r > 0.999$, $n = 6$); 检测限分别为 0.13, 0.06, 0.11, 0.19, 0.15, 0.10, 0.08 μg/mL, 定量限分别为 0.46, 0.19, 0.37, 0.65, 0.48, 0.29, 0.24 μg/mL, 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0% ($n = 6$); 平均加样回收率分别为 99.84%, 98.45%, 98.76%, 100.35%, 99.07%, 99.13%, 99.29%, RSD 分别为 1.05%, 0.68%, 0.98%, 0.84%, 1.11%, 0.54%, 1.26% ($n = 6$)。夏佛塔苷、异夏佛塔苷、异牡荆苷、芒果苷、大车前苷、茯苓酸的相对校正因子分别为 1.325, 1.684, 1.944, 1.957, 1.251, 1.342; 在不同型号仪器(不同色谱柱)、柱温条件下测定结果的 RSD 均小于 2.0%。QAMS 法与外标法7种成分含量的测定结果无显著差异($P > 0.05$)。结论 所建立的 QAMS 法操作简便、结果准确, 可用于结石通片多指标成分的质量控制。

关键词:一测多评法; 结石通片; 高效液相色谱法; 相对校正因子; 含量测定; 质量控制

Simultaneous Determination of Seven Components in Jieshitong Tablets by QAMS

NIE Rong, CAI Linxue, MENG Qianying

(The 900th Hospital of the Joint Logistics Support Force of Chinese PLA, Fuzhou, Fujian, China 350000)

Abstract: Objective To establish a quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) method for the simultaneous determination of seven components in Jieshitong Tablets. **Methods** High-performance liquid chromatography (HPLC) method was adopted, the chromatographic column was Waters SunFire C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.15% formic acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelengths were 330 nm (schaftoside, isoschaftoside, isovitexin, chlorogenic acid, mangiferin, plantamajoside) and 210 nm (pachymic acid) respectively, the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 10 μL. The relative correction factors of schaftoside, isoschaftoside, isovitexin, mangiferin, plantamajoside and pachymic acid to the internal reference chlorogenic acid were calculated, the contents were determined and compared with those determined by the external standard method (ESM). **Results** The linear ranges of schaftoside, isoschaftoside, isovitexin, chlorogenic acid, mangiferin, plantamajoside and pachymic acid were 1.54 - 38.61 μg/mL, 0.53 - 13.14 μg/mL, 1.17 - 29.24 μg/mL, 2.05 - 51.28 μg/mL, 1.61 - 40.37 μg/mL, 1.16 - 29.03 μg/mL, 0.92 - 23.09 μg/mL respectively ($r > 0.999$, $n = 6$). The limits of detection of the above seven components were 0.13, 0.06, 0.11, 0.19, 0.15, 0.10, 0.08 μg/mL respectively, and their limits of quantitation were 0.46, 0.19, 0.37, 0.65, 0.48, 0.29, 0.24 μg/mL respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0% ($n = 6$). The average recovery rates of the above seven components were 99.84%, 98.45%, 98.76%, 100.35%, 99.07%, 99.13%, 99.29% respectively, with RSDs of 1.05%, 0.68%, 0.98%, 0.84%, 1.11%, 0.54%, 1.26% ($n = 6$) respectively. The relative correction factors (RCFs) of schaftoside, isoschaftoside, isovitexin, mangiferin, plantamajoside and pachymic acid were 1.325, 1.684, 1.944, 1.957, 1.251 and 1.342 respectively. The RSDs of the results under different models of instruments (different chromatographic columns) and column temperatures were lower than 2.0%. There was no significant difference between the contents of seven components determined by QAMS and ESM ($P > 0.05$). **Conclusion** The established QAMS method is simple and accurate, which can be used for the quality control of multi-indicator components in Jieshitong Tablets.

Key words: quantitative analysis of multi-components by single-marker; Jieshitong Tablets; HPLC; relative correction factor; content determination; quality control

结石通片由广金钱草、石韦、玉米须、车前草、茯苓、鸡骨草、白茅根、海金沙草8味药材组方, 具有清热

第一作者: 聂溶, 女, 大学本科, 药师, 研究方向为药物制剂分析及药理学, (电子信箱) woshinierong2022@163.com。

利湿、通淋排石、镇痛止血功效,临床用于治疗泌尿系统感染、尿路结石、血尿、肾炎水肿等病症^[1]。其现行质量标准中仅有广金钱草的薄层色谱鉴别项及片剂通则检查项,且文献报道仅对有效成分绿原酸进行了定量控制^[2],难以全面评价该制剂的质量。一测多评(QAMS)法能通过建立相对易得且稳定成分与其他组分之间的相对校正因子(RCF),同步实现多指标含量测定^[3-4]。2020年版《中国药典(一部)》收录了咳特灵胶囊、银杏叶滴丸等中成药含量测定的QAMS法^[5],亦有研究采用QAMS法评价中药制剂质量^[6-8]。本研究中采用QAMS法同时测定结石通片中7种成分的含量,以期为提升该制剂的质量提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司,配有2689型VWD紫外检测器);XP505型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.01mg);KQ-500DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

结石通片(陕西康惠制药股份有限公司,批号分别为20211019, 20211126, 20211222, 220314, 220507, 220620);夏佛塔苷对照品(批号为111912-202204,含量94.9%),绿原酸对照品(批号为110753-202119,含量96.3%),芒果苷对照品(批号为111528-202210,含量96.6%),大车前苷对照品(批号为11557-202003,含量98.9%),均购自中国食品药品检定研究院;异夏佛塔苷对照品(批号为TT20022384,含量92.8%),异牡荆苷对照品(批号为TT2108367,含量97.6%),茯苓酸对照品(批号为TT2205121,含量99.1%),均购自上海同田生物技术有限公司;甲醇、乙腈均为色谱纯,其余

试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

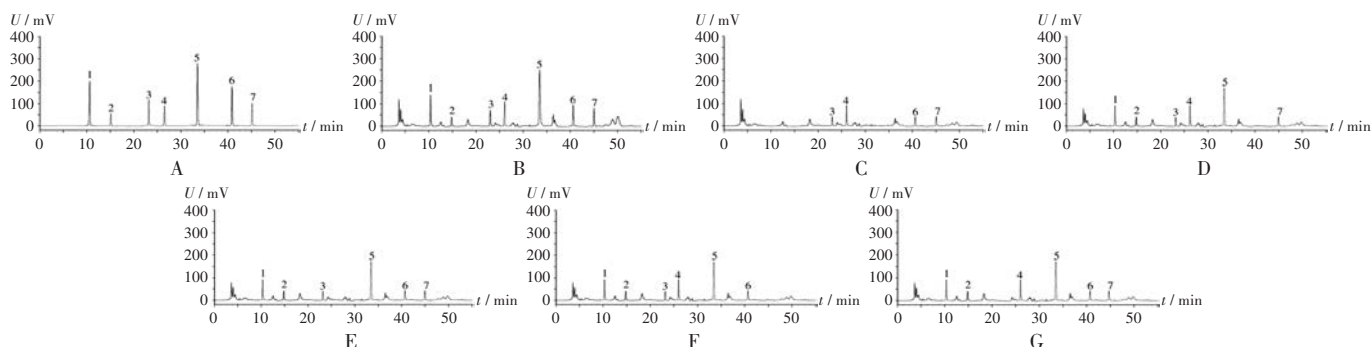
色谱柱:Waters SunFire C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A) - 0.15% 甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~20 min时12%A → 26%A, 20~30 min时26%A → 35%A, 30~38 min时35%A, 38~44 min时35%A → 40%A, 44~55 min时40%A → 85%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:330 nm(0~44 min时,夏佛塔苷、异夏佛塔苷、异牡荆苷、绿原酸、芒果苷、大车前苷),210 nm(44~55 min时,茯苓酸);柱温:35℃;进样量:10 μL^[9-11]。

2.2 溶液制备

取各对照品适量,精密称定,加甲醇,制成夏佛塔苷、异夏佛塔苷、异牡荆苷、绿原酸、芒果苷、大车前苷、茯苓酸质量浓度分别为0.386 1, 0.131 4, 0.292 4, 0.512 8, 0.403 7, 0.228 5, 0.230 9 mg/mL的混合对照品贮备液;精密量取样品2 mL,置50 mL棕色容量瓶中,加甲醇定容,即得混合对照品溶液,室温避光贮藏。取样品10片,除去包衣,研匀,取1.0 g,精密称定,置100 mL棕色容量瓶中,加75%甲醇85 mL,超声(功率450 W、频率40 kHz,下同)处理45 min,放冷,加75%甲醇定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液,室温避光贮藏。按结石通片处方及工艺,分别制备缺广金钱草、石韦、玉米须、车前草、茯苓的单一阴性样品,按供试品溶液制备方法制备各阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性及专属性试验:取2.2项下3种溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图(见图1)。结果理论板数按各成分色谱峰计均大于3 500,分离度均大于1.5;阴性对照均无干扰,表明专属性良好。



1. 夏佛塔苷 2. 异夏佛塔苷 3. 异牡荆苷 4. 大车前苷 5. 绿原酸 6. 芒果苷 7. 茯苓酸
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C - G. 阴性对照品溶液(分别缺广金钱草、石韦、车前草、茯苓、玉米须)

图1 高效液相色谱图

1. Schaftoside 2. Isoschaftoside 3. Isovitisin 4. Plantamajoside 5. Chlorogenic acid 6. Mangiferin 7. Pachymic acid

A. Mixed reference solution B. Test solution

C - G. Negative reference solution (lack of *Desmodii Styracifolii Herba*, *Pyrrhosiae Folium*, *Plantaginis Herba*, *Poria*, *Maydis Stigma*, respectively)

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 方法学考察结果

Tab. 1 Results of methodological investigation

待测成分	线性关系考察(n=6)			定量限 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	检测限 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	RSD(% , n=6)				加样回收试验(% , n=6)	
	回归方程	r	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			日内精 密度	日间精 密度	稳定性	重复性	\bar{X}	RSD
夏佛塔苷	$Y_1 = 101.68X_1 - 26.34$	0.9997	1.54~38.61	0.46	0.13	0.74	1.23	0.59	0.97	99.84	1.05
异夏佛塔苷	$Y_2 = 83.45X_2 + 11.69$	0.9993	0.53~13.14	0.19	0.06	0.96	0.97	0.86	1.24	98.45	0.68
异牡荆苷	$Y_3 = 69.37X_3 + 22.71$	0.9992	1.17~29.24	0.37	0.11	1.08	0.88	0.93	1.08	98.76	0.98
大车前苷	$Y_4 = 73.26X_4 + 15.44$	0.9994	1.16~29.03	0.29	0.10	1.13	0.92	0.74	1.31	99.13	0.54
绿原酸	$Y_5 = 153.59X_5 - 30.85$	0.9998	2.05~51.28	0.65	0.19	0.54	1.19	0.66	0.89	100.35	0.84
芒果苷	$Y_6 = 70.13X_6 + 28.22$	0.9996	1.61~40.37	0.48	0.15	0.63	1.06	1.05	1.16	99.07	1.11
茯苓酸	$Y_7 = 92.08X_7 + 10.07$	0.9995	0.92~23.09	0.24	0.08	0.82	1.15	1.01	1.44	99.29	1.26

线性关系考察:精密量取2.2项下混合对照品贮备液0.2, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别加甲醇制成系列混合对照品溶液, 按2.1项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。以待测成分质量浓度($X, \mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表1。

检测限与定量限考察:取2.2项下对照品溶液适量, 用甲醇逐级稀释, 按2.1项下色谱条件进样测定, 以信噪比(S/N)约为3:1、10:1时待测成分的质量浓度为检测限和定量限。结果见表1。

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液适量, 按2.1项下色谱条件连续进样测定6次, 记录峰面积。取同一批供试品溶液(批号为220314)适量, 按2.1项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 连续3 d, 每日进样3次。结果的RSD均小于2.0%($n=6$), 详见表1, 表明仪器日内精密度良好, 方法日间精密度良好。

稳定性试验:取同一批(批号为220314)供试品溶液适量, 分别于室温下放置0, 4, 8, 15, 20, 24 h时按2.1项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果的RSD均小于2.0%($n=6$), 详见表1。表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取同一批(批号为220314)样品适量, 按2.2项下方法平行制备供试品溶液6份, 按2.1项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算含量。结果的RSD均小于2.0%($n=6$), 详见表1。表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为220314)0.5 g, 平行6份, 精密称定, 置棕色容量瓶中, 加入混合对照品溶液适量, 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, 记录峰面积, 并计算加样回收率。结果见表1。

2.4 RCF测定

取线性关系考察项下系列混合对照品溶液适量, 按2.1项下色谱条件进样测定, 记录色谱图及峰面积。以绿原酸为内参物, 按公式 $RCF_{k/s} = (C_k \times A_s) / (C_s \times A_k)$

表2 6种成分的相对校正因子(n=6)

Tab. 2 RCFs of six components (n=6)

序号	夏佛塔苷	异夏佛塔苷	异牡荆苷	芒果苷	大车前苷	茯苓酸
1	1.325	1.686	1.947	1.958	1.249	1.347
2	1.318	1.681	1.931	1.976	1.261	1.366
3	1.329	1.661	1.969	1.931	1.253	1.341
4	1.302	1.674	1.953	1.947	1.222	1.329
5	1.341	1.685	1.940	1.951	1.248	1.333
6	1.335	1.699	1.922	1.982	1.276	1.338
\bar{X}	1.325	1.684	1.944	1.957	1.251	1.342
RSD(%)	1.04	0.77	0.86	0.97	1.42	0.99

计算(其中, C 为质量浓度, A 为峰面积, k 指其他6种待测成分之一, s 指内参物)。结果见表2。

2.5 RCF耐用性考察

色谱仪和色谱柱:取2.2项下混合对照品溶液适量, 按2.1项下色谱条件, 采用2种高效液相色谱仪(Waters e2695型和Agilent 1260型)和3种色谱柱(Thermo Scientific Acclaim 160 C_{18} 柱、Waters SunFire C_{18} 柱及Agilent ZORBAX SB C_{18} 柱, 规格均为250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)分别进样测定, 记录峰面积, 并计算RCF。结果夏佛塔苷、异夏佛塔苷、异牡荆苷、芒果苷、大车前苷和茯苓酸的平均RCF分别为1.333, 1.673, 1.948, 1.953, 1.257, 1.350, RSD分别为1.74%, 1.07%, 1.16%, 1.05%, 1.36%, 1.58%。表明色谱仪、色谱柱发生一定变化时本方法能满足试验要求, 耐用性良好。

柱温:取2.2项下混合对照品溶液适量, 按2.1项下色谱条件, 采用不同柱温(25, 30, 35 $^{\circ}\text{C}$)进样测定, 记录峰面积并计算RCF。结果夏佛塔苷、异夏佛塔苷、异牡荆苷、芒果苷、大车前苷和茯苓酸的平均RCF分别为1.325, 1.667, 1.964, 1.938, 1.253, 1.341, RSD分别为1.14%, 0.94%, 1.12%, 0.88%, 1.54%, 1.09%($n=3$), 表明柱温发生一定程度变化时, 本方法能满足试验要求, 耐用性良好。

表3 样品中7种成分一测多评法和外标法含量测定结果比较 (mg/g, n=3)

Tab. 3 Comparison of content determination of seven components in samples by QAMS and ESM (mg/g, n=3)

批号	绿原酸		夏佛塔苷		异夏佛塔苷		异牡荆苷		芒果苷		大车前苷		茯苓酸	
	ESM法	QAMS法	ESM法	QAMS法	ESM法	QAMS法	ESM法	QAMS法	ESM法	QAMS法	ESM法	QAMS法	ESM法	QAMS法
20211019	1.201		1.015	1.007	0.200	0.201	0.405	0.404	0.611	0.612	0.855	0.858	0.600	0.602
20211126	1.245		1.001	1.016	0.223	0.221	0.404	0.406	0.665	0.665	0.854	0.856	0.602	0.603
20211222	1.212		0.998	1.012	0.210	0.211	0.408	0.408	0.684	0.683	0.853	0.856	0.603	0.604
220314	1.223		1.004	0.999	0.211	0.214	0.406	0.409	0.687	0.689	0.855	0.851	0.601	0.600
220507	1.239		1.026	1.003	0.230	0.234	0.406	0.404	0.671	0.671	0.857	0.851	0.605	0.600
220620	1.221		1.009	0.999	0.257	0.257	0.405	0.408	0.700	0.692	0.852	0.852	0.603	0.604
t值			0.484		0.241		-0.862		0.957		0.181		0.232	
P值			0.649		0.819		0.429		0.383		0.864		0.826	

2.6 QAMS法与外标(ESM)法测定结果比较

取6批样品各适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,平行3份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录夏佛塔苷、异夏佛塔苷、异牡荆苷、绿原酸、芒果苷、大车前苷、茯苓酸的峰面积,分别采用ESM法和QAMS法计算各成分含量,组间比较行t检验。结果表明,2种测定方法的结果无显著差异(P>0.05)。详见表3。

3 讨论

结石通片中广金钱草清热利尿、通淋利湿,为君药;石韦利尿通淋、凉血止血,车前草清热利尿、通淋止痛,茯苓淡渗利湿、通利膀胱,共为臣药;玉米须利尿通淋,为佐药;鸡骨草、白茅根、海金沙草清热利尿解毒,共为使药。研究表明,广金钱草中药效成分主要为夏佛塔苷、异夏佛塔苷黄酮类化合物和绿原酸酚酸类化合物^[12];石韦中芒果苷属双苯吡酮类化合物,具有利尿护肾、抗炎等作用^[13];车前草中大车前苷属苯乙醇苷类化合物^[14-15],具有抗氧化、抗菌、免疫调节等药理作用,是2020年版《中国药典(一部)》中评价车前草质量的代表性成分;茯苓主要药效成分为三萜类和多糖类,三萜类中茯苓酸含量较高,具有利尿、促进神经伸展等作用^[16];玉米须中主要药效成分为黄酮类成分异牡荆苷^[17]。因所需对照品种多、价格昂贵,且不易获得,在日常检验中较难同时测定7种成分含量,故采用QAMS法,以绿原酸为内参物,测定其余6种成分的RCF,并计算含量,从而实现结石通片的多指标质量评价。

QAMS法和ESM法的测定结果差异不明显,提示本研究所建立的方法结果准确,可用于结石通片的多有效成分的含量测定。但目标成分含量存在一定的批间差异,如芒果苷含量为0.611~0.700 mg/g,异夏佛塔苷含量为0.200~0.257 mg/g,可能与制剂的原药材产地、采收、加工等有关,故建立多指标成分评价模式有助于确保结石通片质量的稳定。

综上所述,本研究中建立了同时测定结石通片中7种成分含量的QAMS法,且操作简便、结果准确,可用于结石通片多指标成分的质量控制,继而为全面评价该制剂质量提供参考。

参考文献

- [1] WS₃-B-2589-97,卫生部药品标准·中药成方制剂[S].
- [2] 甘勇强,罗轶,甘盛. 高效液相色谱法测定结石通胶囊中绿原酸含量[J]. 食品与药品,2014,16(4):279-282.
- [3] 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,2020:1273,1385.
- [4] 闫艳,杜晨晖. 一测多评法在中药质量控制中的应用及研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2022,24(6):2378-2387.
- [5] 符海邨,张倩睿,熊蕊,等. 指纹图谱结合一测多评模式在中药质量评价中的应用进展[J]. 中国药师,2022,25(5):861-867.
- [6] 张永昕,李莎恩,蔡琴琴,等. 一测多评法同时测定补中益气丸中6种成分的含量[J]. 中国药业,2021,30(23):71-75.
- [7] 丁玉莲,林李雁,陈丹青,等. 一测多评法结合双波长法分析不同产地、栽培和加工铁皮石斛黄酮类成分的含量[J]. 中国中药杂志,2021,46(14):3605-3613.
- [8] SU CN, LI CH, SUN K, et al. Quantitative analysis of bioactive components in walnut leaves by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS combined with QAMS [J]. Food Chemistry, 2020, 331(1):127180.
- [9] 王婧宁,姚建华,赵志国,等. HPLC法同时测定结石通胶囊中夏佛塔苷等成分的含量[J]. 药学与临床研究,2020,28(1):35-37.
- [10] 张哲,孙卓然,潘鹏超,等. 复方金钱草颗粒化学成分的UHPLC-Q-TOF/MS分析[J]. 药学实践杂志,2022,40(2):146-156.
- [11] 陆绍铭,徐鑫,薛倩倩,等. 基于超高效液相色谱-紫外检测定量指纹图谱结合化学模式识别的复方金钱草颗粒质量评价[J]. 色谱,2022,11(8):493-499.
- [12] 黄盼,周政莲,周文良,等. 广金钱草的化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J]. 中华中医药学刊,2021,39(7):