

“一测多评”法同时测定清清颗粒中 10 种指标成分

张梅¹, 柴彦², 任爱农^{1*}, 杨玉兰¹, 赵妍¹ (1.江苏省中医药研究院, 南京 210028; 2.江苏中豪医药有限公司, 南京 210036)

摘要: 目的 建立“一测多评”法测定清清颗粒中 10 种主要活性成分的高效液相色谱分析方法。方法 以黄芩苷为内参物, 建立其与其他 9 种成分(没食子酸、白芍苷、芍药苷、甘草苷、甘草酸、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、小檗碱)的相对校正因子, 并用该校正因子进行计算, 实现一测多评; 同时采用外标法对这 10 种成分进行含量测定, 通过比较 2 种方法的结果来验证该方法的准确性。结果 “一测多评”法的计算值与外标法实测值之间没有明显差异。结论 “一测多评”法可用于清清颗粒中 10 种成分的含量测定, 方法可靠, 结果准确, 能有效、快速控制该制剂质量。

关键词: 清清颗粒; 一测多评; 相对校正因子; 高效液相色谱法; 质量控制

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)03-0318-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.03.016

Simultaneous Determination of Ten Constituents in Qingqing Granule by Quantitative Analysis of Multi-components by Single-marker

ZHANG Mei¹, CHAI Yan², REN Ainong^{1*}, YANG Yulan¹, ZHAO Yan¹ (1.Jiangsu Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 2.Jiangsu Zhonghao Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210036, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for simultaneous determination of ten bioactive components in Qingqing granule by quantitative analysis of multi-components by single-marker(QAMS). **METHODS** Qingqing granule was chosen as the research object, baicalin as index, relative correction factors of gallic acid, albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, glycyrrhizic acid, wogonoside, baicalein, wogonin and berberine were established by HPLC and calculated to achieve QAMS. The contents of 10 components in the samples were determined with the external standard method. The accuracy of the method was validated by compare the results of the above two methods. **RESULTS** No significant differences were found between the calculated results by QAMS and the measured results by external standard method. **CONCLUSION** The described method is reliable, accurate, and can be used to control the quality of ten bioactive components of Qingqing granule.

KEY WORDS: Qingqing granule; quantitative analysis of multi-components by single-marker; relative correction factor; HPLC; quality control

目前中药质量控制模式已逐渐由单一成分质量控制发展到对多种有效成分进行控制的多指标评价模式, 但此模式需要对照品的种类和数量均较大, 且部分不易获得或价格较昂贵, 一些进行多组分质量控制的标准甚至难以执行。鉴于此, 王智民等^[1]提出了“一测多评”的多指标质控模式, 即以样品中对照品价廉易得的典型成分为内标, 建立该成分与其他成分间的相对校正因子, 再通过相对校正因子计算出其他成分的量。

清清颗粒是由江苏省中医药研究院自主研发的中药复方制剂, 由黄连、干姜、黄芩、姜半夏、白芍、木香、紫苏梗、海螵蛸、甘草等 9 味中药组成, 具有清热化湿、理气和中之功效, 主治湿热内蕴型 HP 相关胃炎, 反流性食管炎、溃疡性结

肠炎引起的脘腹疼痛、嗳气饱胀、大便泄泻等症^[2]。原制剂仅以单指标成分小檗碱来进行质量控制, 但中药复方的多成分、多功效的作用特点, 决定着单味中药成分难以表达中药复方的整体质量。故本实验在君、臣、佐和使药中各选一代表药材, 即黄连、黄芩、白芍和甘草, 以其主要活性成分作为检测指标。现代研究表明, 小檗碱、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、没食子酸、白芍苷、芍药苷、甘草苷、甘草酸分别是黄连、黄芩、白芍和甘草中的主要活性成分^[3-6], 因此选取这 10 个成分作为指标成分对清清颗粒进行质量控制。为了提高工作效率, 节约检测成本, 本实验以黄芩苷为内参物, 利用“一测多评”法测定其他 9 种成分的含量。

作者简介: 张梅, 女, 硕士生 Tel: 18252066367 E-mail: 1031513781@qq.com
18913948273 E-mail: lyyy-0@126.com

***通信作者:** 任爱农, 女, 硕士, 研究员 Tel:

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Promosil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Akasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Alltima C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 梅特勒电子分析天平(瑞士梅特勒公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Millipore 超纯水器(美国 Millipore 公司)。

1.2 试药

清清颗粒(江苏省中医药研究院自制); 对照品: 没食子酸(批号: 110831-201204)、芍药苷(批号: 110736-200732)、甘草苷(批号: 111610-201005)、甘草酸单铵盐(批号: 731-9202)、黄芩苷(批号: 0715-9708)、黄芩素(批号: 111595-201306)、汉黄芩素(批号: 111514-200403)、盐酸小檗碱(批号: 0713-9906), 均购自中国食品药品检定研究院; 白芍苷(上海中药标准化研究中心, 批号: 12-1002); 汉黄芩苷(成都瑞芬思生物科技有限公司, 批号: H-019-110325)。上述对照品经 HPLC 面积归一化法检测其质量分数均>98%, 可供含量测定用。测定用甲醇和乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 方法学考察

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Promosil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~10 min, 5%A→18%A; 10~20 min, 18%A→20%A; 20~30 min, 20%A→30%A; 30~40 min, 30%A→50%A; 40~50 min, 50%A→5%A); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 35 ℃; 分段变波长测定(0~18 min, 230 nm, 检测没食子酸、白芍苷及芍药苷; 18~24 min, 237 nm, 检测甘草苷; 24~32 min, 280 nm, 检测黄芩苷; 32~34 min, 345 nm, 检测小檗碱; 34~40.4 min, 280 nm, 检测汉黄芩苷、黄芩素; 40.4~42 min, 237 nm, 检测甘草酸; 42~50 min, 280 nm, 检测汉黄芩素。在上述色谱条件下, 各组分离度良好, 阴性无干扰, 结果见图 1。

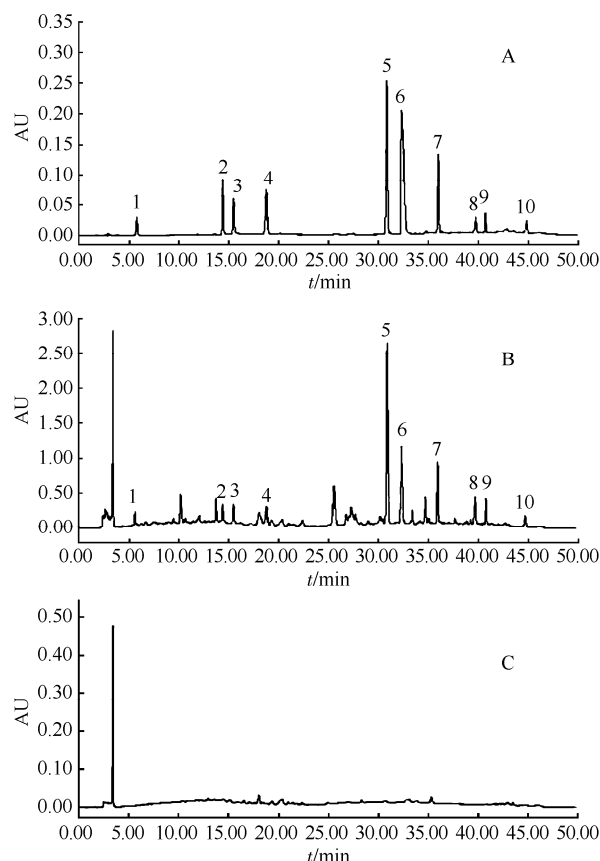


图 1 HPLC 色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液; C-阴性溶液; 1-没食子酸; 2-白芍苷; 3-芍药苷; 4-甘草苷; 5-黄芩苷; 6-小檗碱; 7-汉黄芩苷; 8-黄芩素; 9-甘草酸; 10-汉黄芩素。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-standard solution; B-sample solution; C-negative solution; 1-gallic acid; 2-albiflorin; 3-paeoniflorin; 4-liquiritin; 5-baicalin; 6-berberine; 7-wogonoside; 8-baicalein; 9-glycyrrhizic acid; 10-wogonin.

2.1.2 对照品溶液的制备 分别取没食子酸、白芍苷、芍药苷、甘草苷、甘草酸单铵盐、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、盐酸小檗碱对照品适量, 精密称定, 加甲醇制得浓度分别为 0.223, 0.748, 0.118, 0.665, 1.980, 2.600, 1.060, 0.128, 0.226, 1.570 mg·mL⁻¹ 的各对照品单一储备溶液。再分别精密吸取各对照品储备溶液 1.0, 0.5, 1.5, 1.0, 1.0, 1.0, 1.0, 1.0, 1.0, 1.0 mL, 置同一 10 mL 量瓶中, 混匀, 制得混合对照品溶液(没食子酸 0.022 3 mg·mL⁻¹, 白芍苷 0.037 4 mg·mL⁻¹, 芍药苷 0.017 7 mg·mL⁻¹, 甘草苷 0.066 5 mg·mL⁻¹, 甘草酸单铵盐 0.198 0 mg·mL⁻¹, 黄芩苷 0.260 0 mg·mL⁻¹, 汉黄芩苷 0.106 0 mg·mL⁻¹, 黄芩素 0.012 8 mg·mL⁻¹, 汉黄芩素 0.022 6 mg·mL⁻¹, 盐酸小檗碱 0.157 0 mg·mL⁻¹)。将上述混标保存于 4 ℃ 冰箱中, 备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 取清清颗粒适量，研细，取细粉约 1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入稀乙醇 25 mL，称定重量，超声处理(功率 300 W，频率 40 kHz)30 min，放冷，再称定重量，用稀乙醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.1.4 阴性溶液的制备 按处方药材称取各药材，除去黄连、黄芩、白芍、甘草药材，按制备工艺制备成阴性样品，再按供试品溶液的制备项下制备成阴性对照溶液。

2.1.5 线性范围 精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 μL 进样分析，以峰面积(Y)为纵坐标，进样量(X , μg)为横坐标绘制标准曲线。结果见表 1。

表 1 各组分标准曲线

Tab. 1 Standard curve of ten constituents

组 分	线性范围	线性方程	r
没食子酸	0.044 6~0.669 0	$Y=2.00\times 10^6 X+92.83\times 10^2$	0.999 5
白芍苷	0.074 8~1.122 0	$Y=2.68\times 10^6 X-5.93\times 10^3$	0.999 9
芍药苷	0.035 4~0.531 0	$Y=2.37\times 10^6 X-0.27\times 10^5$	0.999 8
甘草苷	0.133 0~1.995 0	$Y=2.16\times 10^6 X-1.11\times 10^2$	0.999 9
甘草酸	0.396 0~5.940 0	$Y=4.87\times 10^5 X+1.05\times 10^4$	0.999 9
黄芩苷	0.520 0~7.800 0	$Y=3.83\times 10^6 X+2.54\times 10^5$	0.999 9
汉黄芩苷	0.212 0~3.180 0	$Y=4.75\times 10^6 X+9.68\times 10^4$	0.999 9
黄芩素	0.025 6~0.384 0	$Y=6.14\times 10^6 X-4.98\times 10^4$	0.999 9
汉黄芩素	0.045 2~0.678 0	$Y=7.08\times 10^6 X+7.16\times 10^2$	0.999 9
小檗碱	0.314 0~4.710 0	$Y=4.51\times 10^6 X+2.64\times 10^4$	0.999 9

2.1.6 仪器精密度试验 取上述混合对照品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次，测定没食子酸、白芍苷、芍药苷、甘草苷、甘草酸、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、小檗碱峰面积，其 RSD 分别为 0.40%，0.29%，1.01%，0.28%，0.34%，0.38%，0.35%，0.29%，0.38%，0.34%，表明仪器的精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一供试品溶液，分别于配制后的 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样，测得没食子酸、白芍苷、芍药苷、甘草苷、甘草酸、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、小檗碱峰面积的 RSD 分别为 1.73%，0.73%，0.64%，1.56%，1.83%，0.60%，1.38%，0.52%，1.37%，0.98%，表明供试品溶液中的 10 个待测成分在室温放置 24 h 内基本稳定。

2.1.8 重复性试验 取批号为 20140510 的清清颗

粒，研细，取细粉约 1 g，平行 6 份，精密称定，按“2.1.3”项下方法制备样品，结果测定没食子酸、白芍苷、芍药苷、甘草苷、甘草酸、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、小檗碱的平均浓度分别为 0.723, 0.284, 0.464, 1.019, 2.629, 9.306, 2.013, 0.563, 0.554, 2.055 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，其 RSD 分别为 1.14%，1.18%，2.67%，0.58%，0.80%，0.77%，1.35%，0.47%，0.63%，0.61%，表明本法重复性较好。

2.1.9 加样回收率试验 取已知含量(批号：20140510)的样品(没食子酸、白芍苷、芍药苷、甘草苷、甘草酸、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、小檗碱的含量分别为 0.723, 0.284, 0.464, 1.019, 2.629, 9.306, 2.013, 0.563, 0.554, 2.055 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)粉末 6 份，每份 0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，分别精密加入含 0.365 mg 没食子酸、0.144 mg 白芍苷、0.235 mg 芍药苷、0.507 mg 甘草苷、1.32 mg 甘草酸、4.63 mg 黄芩苷、1.02 mg 汉黄芩苷、0.282 mg 黄芩素、0.275 mg 汉黄芩素、1.022 mg 小檗碱的对照品溶液各 1 mL，按“2.1.3”项下制备供试品溶液，并按“2.1.1”项下色谱条件进样分析，计算回收率。结果没食子酸、白芍苷、芍药苷、甘草苷、甘草酸、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、小檗碱的平均加样回收率分别为 97.04%，97.33%，96.77%，96.07%，96.93%，97.28%，96.32%，98.09%，96.70%，98.60%，其 RSD 分别为 1.57%，1.74%，1.74%，1.03%，1.08%，1.35%，0.87%，1.73%，0.89%，0.94%，表明该方法准确度较好。

2.2 相对校正因子的计算

以黄芩苷为内标，在上述特定的范围内按照公式 $f_{k/m}=f_k/f_m=(W_k\times A_m)/(W_m\times A_k)^{[1]}$ (式中 A_k 为内参物峰面积， W_k 为内参物浓度， A_m 为其他组分 m 峰面积， W_m 为其他组分 m 浓度)，分别计算没食子酸、白芍苷、芍药苷、甘草苷、甘草酸、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、小檗碱的相对校正因子，结果见表 2。

2.3 相对校正因子的重复性考察

2.3.1 色谱柱及高效液相色谱仪考察 取“2.1.2”项下混合对照品溶液分别进样 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 μL ，计算黄芩苷对没食子酸、白芍苷、芍药苷、甘草苷、甘草酸、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、小檗碱的相对校正因子。实验考察了

Waters 2695、Agilent 1100 2 种高效液相色谱系统, Promosil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Akasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Alltima C₁₈(250 mm

×4.6 mm, 5 μm)3 种色谱柱, 所得的相对校正因子及其 RSD 见表 3。结果显示, 不同的仪器及不同的色谱柱的相对校正因子差异并不显著。

表 2 以黄芩苷为参照的相对校正因子

Tab. 2 RCFs with baicalin as reference

进样体积/μL	其他成分相对于黄芩苷的相对校正因子值								
	没食子酸	白芍苷	芍药苷	甘草苷	甘草酸	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	小檗碱
2	0.517 7	0.653 6	0.532 6	0.534 4	0.131 0	1.238 7	1.614 5	1.730 1	1.133 8
5	0.521 4	0.659 6	0.549 8	0.542 8	0.126 1	1.232 7	1.622 7	1.715 7	1.147 9
10	0.492 3	0.671 9	0.544 7	0.548 8	0.125 6	1.237 5	1.657 5	1.664 9	1.155 3
15	0.528 1	0.678 0	0.562 4	0.553 2	0.125 6	1.238 2	1.562 2	1.681 4	1.157 7
20	0.512 3	0.683 3	0.548 0	0.557 2	0.126 3	1.240 3	1.584 6	1.650 5	1.171 8
25	0.500 4	0.687 6	0.542 7	0.561 3	0.127 1	1.243 0	1.609 2	1.703 4	1.180 5
30	0.516 1	0.689 8	0.555 7	0.562 5	0.127 5	1.242 1	1.631 1	1.753 7	1.184 2
平均值	0.512 6	0.674 8	0.548 0	0.551 5	0.127 1	1.238 9	1.611 7	1.700 0	1.161 6
RSD/%	2.41	2.06	1.74	1.85	1.48	0.27	1.93	2.16	1.57

表 3 不同仪器和色谱柱测得的相对校正因子

Tab. 3 RCFs determined by different instructions and columns

仪 器	色 谱 柱	其他成分相对于黄芩苷的相对校正因子值								
		没食子酸	白芍苷	芍药苷	甘草苷	甘草酸	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	小檗碱
Waters 2695	Promosil C ₁₈	0.512 6	0.674 8	0.548 0	0.551 5	0.127 1	1.238 9	1.611 7	1.700 0	1.161 6
	Akasil C ₁₈	0.517 2	0.641 0	0.538 1	0.540 8	0.124 0	1.226 4	1.582 1	1.676 9	1.156 3
	Alltima C ₁₈	0.512 6	0.642 0	0.541 7	0.531 1	0.126 9	1.227 9	1.637 5	1.660 0	1.153 4
Agilent 1100	Promosil C ₁₈	0.523 9	0.677 0	0.535 6	0.549 1	0.125 9	1.233 0	1.644 7	1.695 4	1.152 6
	Akasil C ₁₈	0.522 1	0.675 0	0.539 4	0.547 2	0.125 4	1.231 3	1.606 1	1.654 1	1.152 2
	平均值	0.517 7	0.662 0	0.540 6	0.543 9	0.125 9	1.231 5	1.616 4	1.677 2	1.155 2
	RSD/%	1.01	2.83	0.87	1.51	1.00	0.40	1.56	1.22	0.34

2.3.2 不同实验室考察 在 2 个实验室对建立的“一测多评”试验方法进行复核实验, 同为 Waters 2695 色谱系统及 Promosil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 结果见表 4, 说明了相对校正因子在不同实验室具有良好的可行性。

2.4 待测组分色谱峰的定位

色谱峰准确定位是保证“一测多评”法应用

的前提, 一般采用保留时间差或相对保留值等参数结合色谱图整体特征及每个峰的紫外光谱特征来定位^[7-8]。本研究测定了保留时间差和相对保留值在不同品牌仪器、不同型号色谱柱上的重复性。结果表明, 保留时间差的波动较明显(RSD>5%), 不宜作为色谱峰定位依据; 相对保留值的波动相对较小, 以相对保留值定位, 结果见表 5。

表 4 不同实验室相对校正因子考察

Tab. 4 RCFs determined by different laboratories

进样 体积/μL	$f_{\text{黄芩苷/没食子酸}}$		$f_{\text{黄芩苷/白芍苷}}$		$f_{\text{黄芩苷/芍药苷}}$		$f_{\text{黄芩苷/甘草苷}}$		$f_{\text{黄芩苷/甘草酸}}$		$f_{\text{黄芩苷/汉黄芩苷}}$		$f_{\text{黄芩苷/黄芩素}}$		$f_{\text{黄芩苷/汉黄芩素}}$		$f_{\text{黄芩苷/小檗碱}}$	
	Lab1	Lab2	Lab1	Lab2	Lab1	Lab2	Lab1	Lab2	Lab1	Lab2	Lab1	Lab2	Lab1	Lab2	Lab1	Lab2	Lab1	Lab2
2	0.517 7	0.490 7	0.653 6	0.623 9	0.532 6	0.535 6	0.534 4	0.506 3	0.131 0	0.124 3	1.238 7	1.222 3	1.614 5	1.663 3	1.730 1	1.669 6	1.133 8	1.121 6
5	0.521 4	0.532 4	0.659 6	0.640 1	0.549 8	0.534 6	0.542 8	0.525 2	0.126 1	0.122 8	1.232 7	1.216 0	1.622 7	1.620 2	1.715 7	1.647 8	1.147 9	1.130 2
10	0.492 3	0.510 9	0.671 9	0.650 8	0.544 7	0.532 5	0.548 8	0.534 0	0.125 6	0.123 2	1.237 5	1.217 9	1.657 5	1.596 6	1.664 9	1.680 9	1.155 3	1.135 5
15	0.528 1	0.519 0	0.678 0	0.654 1	0.562 4	0.537 9	0.553 2	0.537 0	0.125 6	0.123 0	1.238 2	1.219 4	1.562 2	1.603 1	1.681 4	1.686 8	1.157 7	1.138 7
20	0.512 3	0.523 6	0.683 3	0.657 3	0.548 0	0.563 3	0.557 2	0.539 7	0.126 3	0.123 7	1.240 3	1.219 1	1.584 6	1.622 5	1.650 5	1.687 3	1.171 8	1.144 6
25	0.500 4	0.516 3	0.687 6	0.662 3	0.542 7	0.540 9	0.561 3	0.541 7	0.127 1	0.124 1	1.243 0	1.222 5	1.609 2	1.654 4	1.703 4	1.696 1	1.180 5	1.150 6
30	0.516 1	0.526 0	0.689 8	0.667 0	0.555 7	0.534 3	0.562 5	0.543 2	0.127 5	0.124 4	1.242 1	1.222 7	1.631 1	1.668 0	1.753 7	1.703 4	1.184 2	1.154 7
平均值	0.512 6	0.517 0	0.674 8	0.650 8	0.548 0	0.539 9	0.551 5	0.532 4	0.127 1	0.123 6	1.238 9	1.220 0	1.611 7	1.632 6	1.700 0	1.681 7	1.161 6	1.139 4
RSD/%	2.41	2.61	2.06	2.25	1.74	1.98	1.85	2.44	1.48	0.53	0.27	0.21	1.93	1.78	2.16	1.09	1.57	1.02

表 5 不同仪器色谱柱相对保留值比较

Tab. 5 Relative retention time determined by different instruments and columns

仪器	色谱柱	相对保留值								
		没食子酸	白芍苷	芍药苷	甘草苷	甘草酸	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	小檗碱
Waters 2695	Promosil C ₁₈	0.181 6	0.464 6	0.500 8	0.606 0	1.334 0	1.104 3	1.292 0	1.411 9	1.023 7
	Akasil C ₁₈	0.191 4	0.463 8	0.512 6	0.640 6	1.324 4	1.196 3	1.280 5	1.397 8	1.020 7
	Alltima C ₁₈	0.194 0	0.467 3	0.541 5	0.644 7	1.321 7	1.167 5	1.284 3	1.448 1	1.045 1
Agilent 1100	Promosil C ₁₈	0.181 1	0.464 8	0.509 3	0.606 4	1.323 4	1.104 6	1.292 5	1.412 1	1.025 9
	Akasil C ₁₈	0.187 3	0.488 2	0.513 5	0.597 2	1.339 6	1.107 1	1.294 1	1.434 6	1.022 8
	平均值	0.187 1	0.469 7	0.517 1	0.619 0	1.328 6	1.136 0	1.288 7	1.420 9	1.027 6
RSD/%		3.07	2.21	3.34	3.55	0.59	3.80	0.46	1.41	0.97

3 “一测多评”法与常规外标法结果的比较研究

取 6 批次清清颗粒, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。分别采用“一测多评”法和外标法计算清

清颗粒中 10 个成分的含量, 并利用相对误差来评价 2 种方法的差异, 结果见表 6。由表知, 2 种方法所得含量无显著性差异, 表明“一测多评”法可用于清清颗粒中待测组分的质量评价。

表 6 外标法和“一测多评”法测定清清颗粒中指标成分含量的比较(n=3)

Tab. 6 Contents of components by external standard method and quantitative analysis of multi-components by single marker (n=3)

样品批次	黄芩苷		没食子酸		白芍苷			芍药苷			甘草苷			
	a		a	b	RSD	a	b	c	a	b	c	a	b	c
20130518	9.217		0.729	0.694	-4.7	0.287	0.288	0.5	0.470	0.477	1.5	0.956	0.965	1.0
20130522	9.233		0.778	0.753	-3.2	0.285	0.287	1.0	0.539	0.556	3.0	0.961	0.971	1.0
20130605	9.221		0.748	0.729	-2.5	0.281	0.283	1.0	0.528	0.543	2.9	0.942	0.951	1.0
20140510	9.217		0.715	0.684	-4.3	0.281	0.283	0.6	0.456	0.473	3.7	0.940	0.950	1.1
20140514	9.573		0.800	0.783	-2.2	0.287	0.289	0.9	0.426	0.430	1.1	0.981	0.993	1.2
20140518	9.639		0.710	0.733	3.1	0.281	0.283	0.6	0.446	0.460	3.3	0.971	0.981	1.0

样品批次	甘草酸			汉黄芩苷			黄芩素			汉黄芩素			小檗碱		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
20130518	2.639	2.668	1.1	2.022	2.041	0.9	0.540	0.547	1.2	0.548	0.548	0.1	2.060	2.080	1.0
20130522	2.809	2.833	0.9	2.026	2.044	0.9	0.540	0.546	1.2	0.544	0.544	0.1	2.046	2.065	0.9
20130605	2.606	2.633	1.1	2.005	2.021	0.8	0.542	0.550	1.4	0.536	0.536	0.1	2.082	2.102	1.0
20140510	2.616	2.643	1.0	1.995	2.014	1.0	0.560	0.546	1.1	0.532	0.536	0.7	2.082	2.103	1.0
20140514	2.753	2.781	1.0	2.046	2.066	1.0	0.586	0.594	1.4	0.554	0.555	0.1	2.142	2.163	1.0
20140518	2.809	2.836	1.0	2.064	2.083	0.9	0.586	0.594	1.4	0.556	0.557	0.3	2.178	2.200	1.0

注: a-外标法; b-一测多评法; c-相对误差=(b-a)/a×100%。

Note: a-external standard method; b-quantitative analysis of multi-components by single marker; c-relative error=(b-a)/a×100%.

4 讨论

4.1 重复性试验考察

在考察相对校正因子的重复性试验中, 分别考察了 Waters 2695 HPLC, Agilent 1100 HPLC 2 台液相色谱仪和 5 根不同品牌、型号的色谱柱, 其中 Promosil C₁₈ 柱、Akasil C₁₈ 柱、Alltima C₁₈ 柱的色谱行为相近, 相对校正因子有较好的重复性, 而 Thermo C₁₈ 柱和 Ultimate XB-C₁₈ 柱所得的

色谱图中各成分的保留时间有较大的波动, 且小檗碱的出峰顺序发生改变, 故不同填料或色谱行为差异较大的色谱柱会对相对校正因子有一定的影响, 所以, 采用“一测多评”法制定中药复方药品标准时应确定色谱柱的品牌、型号等。

4.2 内参物的选择

本实验因黄芩苷含量较高、性质稳定且较易获得而被选作内参物。

4.3 分离条件的优化

本实验曾分别以甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.5%冰醋酸、乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相,综合考察基线噪音、拖尾、分离度等因素,最终选择乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相。

本试验以清清颗粒为例,通过方法学验证、“一测多评”准确性的评价和方法的耐用性考察,对“一测多评”法应用于中药复方制剂的技术适用性及可行性进行了探讨。结果表明,采用“一测多评”法计算的结果与外标法所得结果无显著性差异,说明建立的不同化合物之间的校正因子具有较高的可信度,可在仅有1个对照品时,实现同步测定复方中多指标成分,为清清颗粒多指标质量控制模式提供新方法。

REFERENCES

- [1] WANG Z M, GAO H M, FU X T, et al. Multi-components quantitation by one marker new method for quality evaluation of Chinese herbal medicine [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2006, 31(23): 1925-1928.
- [2] REN A N, GAO R, TIAN Y Z. Optimization of extraction technology for Qingqing granule by multi-index comprehensive evaluation method [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2008, 30(7): 1059-1062.
- [3] BAO T D, LI Y J, YANG Q, et al. LC/MS determination of berberine and palmatin in rats plasma after oral administration of extracts Rhizoma Coptidis and its pharmacokinetics study [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2010, 16(13): 186-189.
- [4] SHU J F. Determination of scopoletin, baicalin, baicalein and farrerol in Qinbaohong Zhike capsule by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(9): 1114-1117.
- [5] YANG L, XU Y J, TIAN R T, et al. HPLC fingerprinting of Radix Paeoniae Alba [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2007, 42(1): 71-74.
- [6] WANG Y, YUAN J, XIAO J, et al. Pharmacokinetics of activeingredient of Radix Glycyrrhizae in rats with oral administration of Banxia Xinxin decoction and its different compatibilities [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(8): 1331-1338.
- [7] DING L Y, ZHOU L, WANG L N, et al. Multi-components quantitation by one marker for simultaneous content determination of four components in *Psoralea corylifolia* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(5): 152-154.
- [8] LAI Z F, XIA L Z. Determination of costuslactone in Muxiang Shunqi pills by QAMS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(4): 421-424.

收稿日期: 2014-06-11

衍生化 LC-MS 测定人血浆中消旋卡多曲活性代谢物浓度及生物等效性

俞佳¹, 马珂^{2*}, 袁京群³, 祁金文¹, 郑水莲¹, 毛小红¹ (1.浙江省人民医院药学部, 杭州 310014; 2.浙江大学医学院附属邵逸夫医院药剂科, 杭州 310016; 3.浙江大学分析测试中心, 杭州 310029)

摘要: 目的 建立一种衍生化 LC-MS 检测人血浆中消旋卡多曲活性代谢物 thiorphan(TP)浓度,同时评价消旋卡多曲2种规格散剂(10 mg·袋⁻¹和30 mg·袋⁻¹)和国产颗粒剂在健康人体内的药动力学及生物等效性。方法 采用3制剂3周期二重3×3拉丁方设计,18名健康男性志愿者交叉单剂量口服受试制剂2种规格消旋卡多曲散(10 mg·袋⁻¹和30 mg·袋⁻¹)和参比制剂消旋卡多曲颗粒剂各300 mg后,采用衍生化 LC-MS 测定不同时间血浆中活性代谢物 TP 浓度,用 DAS 药动学程序进行药动力学参数的计算及生物等效性评价。血浆样品中加入 p-BPB 衍生化试剂,得到稳定的 TP 衍生化产物,经乙酸乙酯萃取后,选替米沙坦作内标。色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈(150 mm×2.1 mm, 5 μm);流动相为 5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵(甲酸调节 pH 至 3.0)-乙腈(45:55);流速为 0.2 mL·min⁻¹;采用 ESI+SRM 方式监测;TP 衍生化产物 *m/z* 452.10[M+H]⁺,内标替米沙坦 *m/z* 515.30[M+H]⁺。结果 TP 线性范围为 6.28~1 256 ng·mL⁻¹,最低检测浓度为 6.28 ng·mL⁻¹,提取回收率在 77.5%~80.4%,日内、日间精密度 RSD<15%。受试制剂消旋卡多曲散(10 mg·袋⁻¹),消旋卡多曲散(30 mg·袋⁻¹)和参比制剂消旋卡多曲颗粒剂的主要药动力学参数: *T*_{max} 分别为(1.8±1.2), (1.9±1.3)和(0.7±0.2)h, *t*_{1/2} 分别为(1.4±0.4), (1.2±0.7)和(1.1±0.8)h, *C*_{max} 分别为(802.0±356.5), (804.2±459.8)和(845.6±285.8)ng·mL⁻¹, *AUC*₀₋₈ 分别为(1 617.0±532.6), (1 628.9±672.1)和(1 621.0±532.2)ng·h·mL⁻¹, *AUC*_{0-∞} 分别为(1690.8±567.2), (1673.8±681.7)和(1 649.4±561.4)ng·h·mL⁻¹。2种受试制剂的相对生物利用度分别为 99.8%和 100.5%。结论 本方法灵敏,有效,可准确检测人体血浆中 TP 的浓度。2种受试制剂和

作者简介: 俞佳,女,硕士,副主任药师
(0571)86006800 E-mail: srrshmake@126.com

Tel: (0571)85893117

E-mail: ymfzhhz@126.com

*通信作者: 马珂,女,主任药师

Tel: