

一测多评法同时测定妇乐颗粒中 4 种成分的含量

徐容(江苏省南通卫生高等职业技术学校, 江苏 南通 226000)

摘要: 目的 采用一测多评法同时测定妇乐颗粒中绿原酸、大黄素、大黄酚与延胡索乙素的含量。方法 采用 Agilent ZORBAX Eclipse XDB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-0.2%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0~8.0 min, 85%B; 8.0~15.0 min, 85%→45% B; 15.0~30.0 min, 45%→20% B; 分段变波长测定: 0~8.0 min 为 327 nm, 8.0~15.0 min 为 254 nm, 15.0~30.0 min 为 280 nm; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 30 ℃。测定大黄素与绿原酸、大黄酚和延胡索乙素间的相对校正因子, 考察其重复性, 比较计算值与测得值的差异。结果 用一测多评法对 6 批妇乐颗粒中绿原酸、大黄素、大黄酚与延胡索乙素进行测定, 与外标法实测值基本一致。结论 该方法可靠, 结果准确, 可用于妇乐颗粒的质量控制。

关键词: 一测多评法; 妇乐颗粒; 绿原酸; 大黄素; 大黄酚; 延胡索乙素

中图分类号: R284.1; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)03-0403-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.03.022

Simultaneous Determination of 4 Constituents in Fule Granula by Quantitative Analysis of Multi-components by Single Marker(QAMS)

XU Rong(Nantong Health College of Jiangsu Province, Nantong 226000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a method of quantitative analysis of multi-components by single marker(QAMS) for determination of chlorogenic acid, emodin, chrysophanol, dl-tetrahydropalmatine in Fule granula. **METHODS** The Agilent ZORBAX Eclipse XDB C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was used; mobile phase was acetonitrile (A)-0.2% phosphoric acid solution(B). Gradient elution: 0~8.0 min, 85% B; 8.0~15.0 min, 85%→45% B; and 15.0~30.0 min, 45%→20% B. Wavelengths: 0~8.0 min was 327 nm, 8.0~15.0 min was 254 nm and 15.0~30.0 min was 280 nm. Flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ with column temperature 30 ℃. Relative correction factors of chlorogenic acid, chrysophanol and tetrahydropalmatine were determined with emodin as internal standard. The method was evaluated for reproducibility, and the difference between calculated and measured values was compared. **RESULTS** No significant differences were found in the quantitative results of chlorogenic acid, emodin, chrysophanol, dl-tetrahydropalmatine determined by using QAMS and external standard method. **CONCLUSION** The QAMS method was reliable and accurate, which might be used for the quality control of Fule granula.

KEY WORDS: quantitative analysis of multi-components by single marker(QAMS); Fule granula; chlorogenic acid; emodin; chrysophanol; tetrahydropalmatine

妇乐颗粒是由忍冬藤、大血藤、甘草、大青叶、蒲公英、牡丹皮、赤芍、川楝子、醋延胡索和熟地黄等 10 味药材组成, 具有清热凉血、化瘀止痛之功效。临床多用于治疗瘀热蕴结所致的带下病, 症见带下量多、色黄、少腹疼痛、慢性盆腔炎等症候^[1]。其中君药忍冬藤具有清热解毒、消肿的功效; 据文献报道, 其主要活性成分为环烯醚萜苷类和有机酸类; 绿原酸在忍冬藤中含量较高, 它具有一定的抗菌、抗感染作用, 为其主要活性成分之一^[2-3]。延胡索为罂粟科紫堇属植物延胡索的块茎, 其活性成分之一延胡索乙素具有较强镇痛功效^[4-5]。大黄具有利湿退热、利尿通淋的作用, 为清火的重剂, 其主要活性成分为大黄素和大黄酚。中国药典 2015 年版已收载该药质控方法, 但仅对大黄素和大黄酚做出了定量要求, 不

能较全面控制该药品质量。相关文献^[6-7]对妇乐颗粒的研究也仅限于单个成分研究, 而且大都需要多种对照品, 试验成本较高。为全面考察妇乐颗粒, 本实验采用一测多评法^[8](quantitative analysis of multi-components by single marker, QAMS), 以大黄素对照品为参照物, 建立其与大黄酚、绿原酸和延胡索乙素间的校正因子, 同时测定这 4 种有效成分的含量, 考察妇乐颗粒内各活性成分含量, 为制定质控方法提供参考。

1 仪器与试剂

UltiMate 3000 系列高效液相色谱仪(美国 DIONEX, SRD-3400A 分析泵、WPS-3000 自动进样器、TCC-3000SD 柱温箱、VDW-3000 检测器、Chromleon© Dionex 色谱工作站); Waters 2695-2489 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司, 2695

作者简介: 徐容, 女, 讲师 Tel: 13773603639 E-mail: 2484014252@qq.com

分离单元、2489 紫外/可见光检测器、Empower 色谱工作站); LC-10tvp 高效液相色谱仪(日本 SHIMADZU, LC-10tvp 输液泵、SPD-10Avp(紫外/可见光检测器、SIL-10ADvp 自动进样器、CLASS-VP 色谱工作站)。色谱柱: Sunfire ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent ZORBAX Eclipse XDB C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Thermo C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和 SHIMADZU C₁₈(250 mm×4.6 mm, 4.5 μm); AB-135S 型电子天平(德国 METTLER-TOLEDO, D=0.01 mg); Binder VD23 真空干燥箱(德国宾得公司)。

妇乐颗粒(湖北襄阳隆中药业集团有限公司, 批号: 141113, 141114, 141202, 141211, 141212, 141225, 规格: 每袋 6 g); 大黄素对照品(批号: 110756-200110, 含量: 100.0%)、大黄酚对照品(批号: 110796-201017, 含量: 99.6%)、延胡索乙素对照品(批号: 110765-200609, 供含量测定用)、绿原酸对照品(批号: 110753-200413, 供含量测定用)均购自中国食品药品鉴定研究院; 甲醇、乙腈为色谱纯; 水为纯化水(Ω=18.2); 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse XDB C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.2%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0~8.0 min, 85% B; 8.0~15.0 min, 85%→45% B; 15.0~30.0 min, 45%→20% B; 分段变波长测定: 0~8.0 min 为 327 nm, 8.0~15.0 min 为 254 nm, 15.0~30.0 min 为 280 nm; 柱温: 30 °C。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取经 P₂O₅ 真空干燥 24 h 大黄素对照品、大黄酚对照品、绿原酸对照品和延胡索乙素对照品各适量, 用甲醇制成每 1 mL 中分别含大黄素 3 μg、大黄酚 6 μg、绿原酸 50 μg 和延胡索乙素 30 μg 的混合对照溶液, 混匀, 置 4 °C 冰箱备用。

2.3 供试品溶液的制备

取本品内容物混匀, 研细, 取约 0.3 g, 精密称定, 置烧瓶中, 加 8% 盐酸溶液 10 mL, 再加三氯甲烷 25 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 混合液转移至分液漏斗中, 并用少量三氯甲烷洗涤容器, 洗液并入同一分液漏斗中, 分取三氯甲烷, 酸液用三氯甲烷振摇提取 3 次, 每次 10 mL, 合并三氯甲烷液, 减压回收三氯甲烷至干, 残渣加适量甲醇使溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度,

摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 系统适应性实验 取混合对照溶液和供试品溶液按“2.1”项下色谱条件进行分析, 记录色谱图, 结果见图 1。绿原酸、大黄素、大黄酚和延胡索乙素与其相邻色谱峰的分离度均>1.5, 理论板数均>3 000, 各组分峰形对称, 拖尾因子为 0.95~1.05。

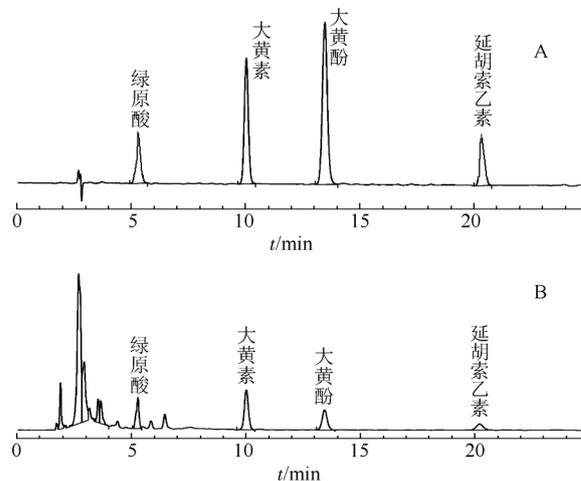


图 1 高效液相色谱图

A—对照品; B—样品。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A—mixed standard; B—sample.

2.4.2 线性关系的考察 精密吸取放置至室温混合对照溶液 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μL, 注入液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件进行试验, 记录色谱图, 以各对照品进样量(X)为横坐标, 各对照品峰面积积分值(Y)为纵坐标进行线性回归, 结果见表 1。

表 1 4 个化合物的回归方程

Tab. 1 Calibration curves of four compounds

化合物	回归方程	r	线性范围/μg
绿原酸	$Y=6.56X+1.01$	0.999 2	0.00 62~0.150 2
大黄素	$Y=3.46X+0.07$	0.999 3	0.012 1~0.311 9
大黄酚	$Y=5.03X+2.23$	0.999 2	0.101 4~2.501 2
延胡索乙素	$Y=3.76X+1.06$	0.999 2	0.061 8~1.502 9

2.4.3 稳定性试验 取同一批供试品溶液, 分别在 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 h 测定。结果表明, 绿原酸、大黄素、大黄酚和延胡索乙素的峰面积 RSD 分别为 0.9%, 0.2%, 0.7% 和 0.8%, 表明在 24 h 内供试品溶液稳定。

2.4.4 仪器精密度试验 取混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 结果绿原酸、大黄素、大黄酚和延胡索乙素

的 RSD 分别为 0.4%, 0.9%, 1.1% 和 0.7%, 表明仪器精密良好。

2.4.5 重复性试验 取同一批供试品, 精密称定, 按“2.3”项下方法, 平行制备 6 份, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图。结果绿原酸、大黄素、大黄酚和延胡索乙素的 RSD 分别为 0.3%, 0.5%, 0.6% 和 0.4%, 表明本研究方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 取已知含量的妇乐颗粒 6 份, 每份约 0.3 g, 精密称定, 分别精密加入样品含有量相当的绿原酸、大黄素、大黄酚和延胡索乙素对照品, 按“2.1”项下的色谱条件测定, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 回收率测定结果(n=6)

Tab. 2 Results of recovery test(n=6)

品名	取样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测出量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
绿原酸	0.302 1	0.803 1	0.753 1	1.545 2	99.29	99.7	0.2
	0.312 5	0.823 1	0.831 1	1.648 2	99.64		
	0.298 7	0.800 3	0.750 3	1.548 3	99.85		
	0.321 5	0.842 3	0.850 3	1.690 8	99.89		
	0.312 5	0.831 2	0.781 2	1.611 4	99.93		
	0.299 8	0.810 3	0.818 3	1.626 7	99.89		
大黄素	0.302 1	0.098 0	0.106 0	0.203 5	99.75	99.2	0.5
	0.312 5	0.095 3	0.103 3	0.195 6	98.49		
	0.298 7	0.096 8	0.095 8	0.191 6	99.48		
	0.321 5	0.102 3	0.110 3	0.209 1	98.35		
	0.312 5	0.100 3	0.099 3	0.198 4	99.40		
	0.299 8	0.099 1	0.107 1	0.205 2	99.52		
大黄酚	0.302 1	0.072 4	0.073 4	0.144 6	99.16	99.5	0.2
	0.312 5	0.076 1	0.075 1	0.150 4	99.47		
	0.298 7	0.071 2	0.071 8	0.142 2	99.44		
	0.321 5	0.079 2	0.078 2	0.156 4	99.36		
	0.312 5	0.073 6	0.081 6	0.154 7	99.68		
	0.299 8	0.070 5	0.078 5	0.148 8	99.88		
延胡索乙素	0.302 1	0.235 6	0.231 6	0.456 2	97.65	99.2	0.6
	0.312 5	0.243 6	0.251 6	0.489 2	98.79		
	0.298 7	0.229 1	0.223 1	0.449 9	99.49		
	0.321 5	0.250 4	0.246 4	0.495 0	99.64		
	0.312 5	0.247 2	0.243 2	0.489 4	99.79		
	0.299 8	0.220 1	0.228 1	0.446 3	99.59		

2.5 QAMS

2.5.1 相对校正因子计算 本实验以大黄素为内参物, 计算其与绿原酸、大黄酚和延胡索乙素之间的相对校正因子(f)。按文献给定公式^[5]计算: $f=f_s/f_i=A_sC_i/A_iC_s$ 。式中 A_i 为各待测成分峰面积, C_i 为各待测成分浓度, A_s 代表内参物大黄素对照品峰面积, C_s 为内参物的浓度。精密量取 5, 10, 12, 15, 25, 30 μ L, 按“2.1”项下的色谱条件进行试验, 记录色谱图, 计算出绿原酸、大黄酚和延胡索乙素的相对校正因子分别为 1.025, 2.023 和 0.842, RSD 分别为 0.5%, 1.0% 和 0.2%。

2.5.2 不同色谱仪及色谱柱对校正因子的影响 分别考察 SHIMADZU LC-10tvp、DIONEX UltiMate 3000 和 Waters 2695-2489 高效液相色谱仪, 考察 Sunfire C₁₈(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m)、Thermo C₁₈(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) 和 SHIMADZU C₁₈(4.6 mm \times 250 mm, 4.5 μ m) 色谱柱对相对校正因子的影响, 结果见表 3。

表 3 高效液相色谱仪及色谱柱对相对校正因子的影响

Tab. 3 Influence of high performance liquid chromatograph and chromatographic column on the relative correction factor

高效液相色谱仪	色谱柱	相对校正因子		
		绿原酸	大黄酚	延胡索乙素
DIONEX	Sunfire C ₁₈	1.025	2.023	0.897
UltiMate 3000	Thermo C ₁₈	1.035	2.011	0.893
	SHIMADZU C ₁₈	1.045	2.034	0.891
SHIMADZU LC-10tvp	Sunfire C ₁₈	1.035	2.018	0.901
	Thermo C ₁₈	1.015	2.018	0.886
Waters 2695-2489	SHIMADZU C ₁₈	1.026	2.019	0.891
	Sunfire C ₁₈	1.019	2.021	0.872
	Thermo C ₁₈	1.018	2.025	0.862
	SHIMADZU C ₁₈	1.028	2.018	0.891
	平均值	1.027	2.021	0.887
	RSD/%	0.7	0.2	1.0

从表 3 可以看出, 通过采用 3 台不同型号仪器, 每台仪器逐次使用 3 根不同厂家色谱柱。结果绿原酸、大黄酚和延胡索乙素 RSD 分别为 0.7%, 0.2% 和 1.0%, 相对校正因子基本不变, QAMS 可以用作妇乐颗粒中绿原酸、大黄素、大黄酚和延胡索乙素等 4 种成分的质控方法, 方法简单实用, 耐用性强。

2.5.3 色谱峰专属性考察 QAMS 应用的前提必须是色谱峰能够准确定位, 本实验结合各成分色谱图整体特征采用相对保留时间进行定位, 并采用不同型号高效液相色谱仪及不同型号色谱柱对相对保留时间进行考察, 结果见表 4。

表 4 不同色谱仪及色谱柱对相对保留时间的影响

Tab. 4 Different chromatographic column chromatograph and the influence of the relative retention time

高效液相色谱仪	色谱柱	相对保留时间		
		绿原酸	大黄酚	延胡索乙素
DIONEX	Sunfire C ₁₈	0.519	1.342	2.101
UltiMate 3000	Thermo C ₁₈	0.512	1.344	2.100
	SHIMADZU C ₁₈	0.517	1.340	2.105
SHIMADZU LC-10tvp	Sunfire C ₁₈	0.513	1.341	2.098
	Thermo C ₁₈	0.513	1.346	2.097
Waters 2695-2489	SHIMADZU C ₁₈	0.516	1.340	2.102
	Sunfire C ₁₈	0.515	1.341	2.104
	Thermo C ₁₈	0.520	1.338	2.108
	SHIMADZU C ₁₈	0.515	1.339	2.106
	平均值	0.516	1.341	2.102
	RSD/%	0.4	0.1	0.1

从表 4 可以看出, 以大黄素为参考, 绿原酸、大黄酚和延胡索乙素相对保留时间 RSD 分别为 0.4%, 0.1% 和 0.1%, 偏差很小, 相对保留时间比较稳定, 可以用来定位各有效成分。

2.6 样品测定

取 6 批妇乐颗粒, 按“2.1”项下色谱条件进行试验, 分别采用外标法和 QAMS 计算妇乐颗粒中绿原酸、大黄酚和延胡索乙素含量, 结果见表 5。

表 5 样品的测定结果

Tab. 5 The determination results of the samples

样品	大黄素含量/ mg·g ⁻¹	绿原酸含量/mg·g ⁻¹		大黄酚含量/mg·g ⁻¹		延胡索乙素含量/mg·g ⁻¹	
		外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS
1	0.312 4	0.982 5	0.984 5	0.241 5	0.243 5	0.098 2	0.100 2
2	0.313 5	0.992 4	0.993 4	0.243 6	0.244 6	0.102 1	0.103 1
3	0.301 2	0.981 2	0.982 4	0.250 1	0.251 3	0.982 5	0.983 7
4	0.308 9	0.972 5	0.970 9	0.240 8	0.239 2	0.992 4	0.9908
5	0.312 5	1.010 1	1.008 5	0.241 9	0.240 3	0.981 2	0.979 6
6	0.315 8	0.982 5	0.981 0	0.251 2	0.249 7	0.983 5	0.982 0

3 讨论

本实验样品制备过程中, 分别比较了几种不同的提取方法, 最后确定参考中国药典 2015 年版一部标准, 采用加热回流和萃取相结合方法能实现各成分完全提取, 与其他提取方法相比, 提取效率最大可提高 65%。通过在紫外分光光度计上对混合对照溶液进行全波长扫描可以看出, 在 215, 254, 280, 327, 350 nm 处有最大吸收, 反复比较 DAD 检测器采集的色谱图发现, 4 种成分在上述任一波长都无法达到定量计算要求信号量, 所以, 结合参考文献最终选择三波长变换方法来开展实验。

在选择待测成分定位方法时, 分别比较了保留时间差值和相对保留时间 2 种方法。在利用不同色谱柱考察保留时间差值时, 出现 RSD 达到 2.1% 的现象, 实验误差较大, 重复性不高, 可能与妇乐颗粒所含成分复杂, 色谱图包含信息量大等原因所致, 所以选择放弃。而选择相对保留时间进行成分定位时, 偏差较小, 能达到理想效果。

目前, 不少文献采用 QAMS 对中成药进行了研究^[9-12], 本实验首次采用 QAMS 同时测定妇乐颗粒 4 种有效成分的方法, 操作简单、灵敏, 可对妇乐颗粒进行质量控制。

REFERENCES

[1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 896.
[2] LU S A. The chemical composition of the caulis *Lonicerae* and

根据表 5 结果, 为确定一致性评价法准确性, 考察 QAMS 与外标法之间存在的差异, 笔者采用 2 种方法进行考察: ①通过比较 2 种方法所测含量的夹角余弦值^[8], 绿原酸、大黄酚和延胡索乙素夹角余弦值分别为 0.999 7, 0.999 5 和 0.999 8; ②考察 2 种方法测得结果相对偏差, 结果 RSD 值均 <0.8%, 可以认为 2 种方法测得结果基本一致。通过上述考察可见 QAMS 在妇乐颗粒的这 4 种成分质量评价中应用是可行的。

pharmacological application research progress [J]. *J Linyi Teacher's Coll*(临沂大学学报), 2012, 34(3): 132-134.
[3] ZHANG C, YIN Z Q, YE W C, et al. Chemical constituents from stems of *Lonicera japonica* [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2009, 34(23): 3051-3053.
[4] WANG H X, NG T B. Examination of lectins, polysaccharopeptide, polysaccharide, alkaloid, coumarin and trypsininhibitors for inhibitory activiy against human immunodeficiency virus reverse transcriptase and glycohydrolases [J]. *Planta Med*, 2001, 67(7): 669-672.
[5] 龙全江, 徐雪琴, 王晓阁. 延胡索化学成分、药理作用与产地加工技术研究概况[J]. *甘肃中医学院学报*, 2014, 31(5): 78-80.
[6] 杨慈海, 宋军. 高效液相色谱法测定妇乐颗粒中马钱苷的含量[J]. *中国药事*, 2013, 16(12): 1939-1940.
[7] HUANG Y L, LI Z T, LVY Q. Determination of paeonin in *Fule Granula* by HPLC [J]. *Drugs Clin*(现代药物与临床), 2011, 26(4): 316-318.
[8] 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.
[9] 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.
[10] HUA R M, LIU W R, LIU C H, et al. Determination of total lactones content in *Ginkgo Folium* by QAMS [J]. *Pharm Today*(今日药学), 2016, 26(4): 231-234.
[11] CHEN J W, LIU Y, LIU S N, et al. Determination of flavonoids in *Aurantii Immaturus Fructus* by multi-components with single marker [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2015, 46(9): 1374-1377.
[12] LIU Y, WEI H Z, GONG J P, et al. Quantitative analysis of four flavonoids in *Jianpi Pills* by QAMS [J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2015, 37(5): 995-999.

收稿日期: 2016-06-03

(本文责编: 曹粤锋)