

一测多评法测定前列癃闭通片中 8 种成分

崔璐¹, 包永睿^{1,2}, 孟宪生^{1,2}, 郝延军³, 康廷国^{1*}

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600;

2. 辽宁省组分中药工程技术研究中心, 辽宁省现代中药研究工程实验室, 辽宁大连 116600;

3. 辽宁省药品检验检测院, 沈阳 110023)

[摘要] **目的:**采用一测多评(QAMS)的方法同时测定前列癃闭通片中 8 种成分(虎杖苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷)的含量,为了能更全面的评价该药的质量,采用全时段多波长融合技术对 270, 283, 306 nm 波长下的色谱图进行融合。**方法:**对前列癃闭通片进行研究,以新橙皮苷作为内参物,分别建立虎杖苷、柚皮苷、橙皮苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷与新橙皮苷的相对校正因子(RCF),内参物新橙皮苷的含量利用外标法(EMS)来计算,再根据 RCF 计算其他 7 种成分的含量,并将 QAMS 的结果与 EMS 的结果进行比较。**结果:**4 批前列癃闭通片根据 QAMS 法计算的各有效成分的值与 EMS 法计算的值基本一致,从而验证了一测多评方法的可行性和准确性。**结论:**QAMS 的方法满足前列癃闭通片中 8 种指标成分同步质量评价的要求。

[关键词] 一测多评; 前列癃闭通片; 全时段多波长融合; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0089-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050089

Determination of Eight Components in Qianlielong Bitong Tablets by QAMS

CUI Lu¹, BAO Yong-rui^{1,2}, MENG Xian-sheng^{1,2}, HAO Yan-jun³, KANG Ting-guo^{1*}

(1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. Component Medicine Engineering Research Center of Liaoning Province,

Liaoning Province Modern Chinese Medicine Research Engineering Laboratory, Dalian 116600, China;

3. Liaoning Institute for Drug Control, Shenyang 110023, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a quantitative analysis of multi-components with a single-marker (QAMS) method for the determination of eight components in Qianlielong Bitong tablets (polydatin, naringin, hesperidin, neohesperidin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin) and make more comprehensive assessment of the quality of the drug under 270, 283 and 306 nm wavelengths of chromatogram using full-time multi-wavelength fusion technology. **Method:** With Qianlielong Bitong tablets as the research object and neohesperidin as the internal reference substances, the relative correlation factors (RCF) of polydatin, naringin, hesperidin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin to neohesperidin were calculated and established. The content of neohesperidin in the samples of Qianlielong Bitong tablets was determined by using the external standard method, and the contents of the other seven ingredients were calculated by their RCFs. The QAMS results were then compared with the external standard method results. **Result:** The values of 8 active constituents in four batches of Qianlielong Bitong tablets calculated by QAMS method were basically the same with the values calculated by external standard method, thus verify the feasibility and accuracy of QAMS method. **Conclusion:** The QAMS

[收稿日期] 20150914(019)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX090507005)

[第一作者] 崔璐,在读硕士,从事中药鉴定与品质评价研究,Tel:18602412689,E-mail:1031706465@qq.com

[通讯作者] *康廷国,博士,教授,博士生导师,从事中药鉴定与品质评价研究,Tel:0411-85890185,E-mail:kangtg@luntem.edu.cn

method is feasible and credible, and could be used to determine the multiple components in Qianlielong Bitong tablets.

[Key words] quantitative analysis of multi-components by single marker; Qianlielong Bitong tablets; full-time multi-wavelength fusion; HPLC

前列癃闭通片是在复方前列癃闭胶囊的基础上改剂型而成的现代中药制剂,其收载于国家食品药品监督管理局《国家中成药标准汇编》内科肾系分册。主要由黄芪、土鳖虫、冬葵果、桃仁、淫羊藿、枳壳、虎杖、川牛膝等 11 味药材经水煎煮、浓缩等工艺精制而成,具有补肾、益气温阳、利水活血的功效。临床用于治疗肾虚、气滞血瘀,症见腰膝疲软无力、尿频、排尿延缓、尿后余沥等,亦可用于具有上述证候的慢性前列腺炎患者。虎杖苷为虎杖提取物的主要活性成分,枳壳提取物的主要活性成分为柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷,朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 以及淫羊藿苷为淫羊藿提取物的主要活性成分。现行的质量标准中前列癃闭通片仅有淫羊藿的有效成分淫羊藿苷的含量测定方法^[1-4]。另据文献报道,董桃杏等^[5]采用 RP-HPLC 测定前列癃闭通片中枳壳的有效成分柚皮苷、新橙皮苷的含量。除此之外,对方中其他主要药材成分没有含量测定的文献报道。本实验在前期药效及成分指认研究的基础上,通过进一步研究发现,上述 8 种成分可在同一个色谱条件下同时分离测定,可为全面控制前列癃闭通片的质量提供了科学依据。

基于多指标的质量控制需要对照品的数量较大,且有一些对照品不易得到,价格也比较昂贵(朝藿定 A、朝藿定 B 等),所以应用一测多评(QAMS)的方法。“QAMS”即指通过只测定一个成分的含量(内参物的含量),就能实现多种成分含量的同时测定。该方法已经广泛的应用于多种单味中药^[6-8]和中药复方制剂^[9-11]中。本文应用 QAMS 对前列癃闭通片中 8 种有效成分进行同时测定,并采用 UPLC 和 HPLC 共 2 种色谱系统,以新橙皮苷为内参物,分别建立虎杖苷、柚皮苷、橙皮苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷与新橙皮苷的相对校正因子(RCF)。并用 ESM 法测定新橙皮苷的含量,再根据 RCF,计算其他 7 种成分的含量,并且将 QAMS 的结果与 ESM 的结果进行比较。为了防止单一波长不能全面、完整地前列癃闭通片进行评价,本文还应用了全时段多波长融合技术^[12],不仅可以克服单一波长单一指标检测时信息量不足、定量不准确等问题,而且可以较完善地反映中药材和中药复方制剂

的内在质量。本方法科学有效的提高前列癃闭通片的质量标准,节约分析时间,为前列癃闭通片质量控制提供依据。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪(由 G1311A 四元泵、光电二极管阵列检测器和 G1322A 在线脱气机组成),1290 型超高效液相色谱仪(配有在线脱气机、二元泵、自动进样器、二极管阵列检测器)均由美国 Agilent 公司提供。AE X40 型电子天平(上海梅特勒仪器有限公司),KQ-500E 型超声波清洗器(上海精密仪器有限公司)。色谱柱有 Ulimate Lp-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Diamonsil C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Kromasil 100-5-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Eclipse Plus C₁₈ RRHD(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm), ZORBAX Extend-C₁₈ 600 Bar(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm)。

虎杖苷(批号 111575-200502),柚皮苷(批号 110722-201312),橙皮苷(批号 110721-201316),新橙皮苷(批号 111857-201102),朝藿定 C(批号 111780-201302),淫羊藿苷(批号 110737-200415)对照品均购自中国食品药品检定研究院。朝藿定 A(批号 GZDD-0477),朝藿定 B(批号 GZDD-0478)对照品均购自贵州迪大生物科技有限责任公司。前列癃闭通片由沈阳神龙药业有限公司提供,批号为 20130101,20140301,20140302,20140401。

甲醇、乙腈均为色谱纯,水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

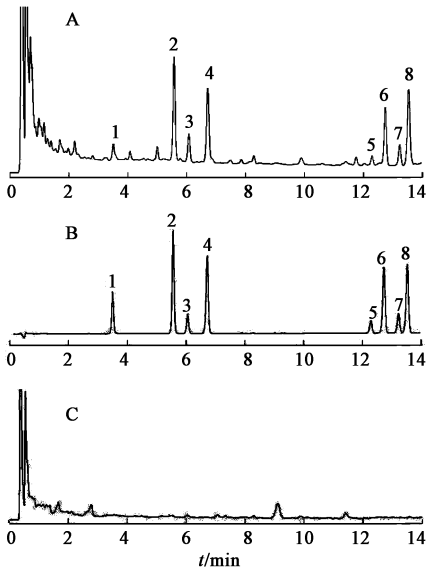
2 方法与结果

2.1 同时测定 8 种成分的色谱方法和方法学考察

2.1.1 HPLC 色谱条件 Ulimate Lp-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 18% A; 10 ~ 35 min, 18% ~ 25% A; 35 ~ 38 min, 25% ~ 28% A; 38 ~ 55 min, 28% A),柱温 30 °C,体积流量 1 mL · min⁻¹,检测波长 270, 283, 306 nm 融合,进样量 12 μL。

2.1.2 UPLC 色谱条件 Eclipse Plus C₁₈ RRHD 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B)梯度洗脱(0 ~ 4.33 min, 12% ~

18% A; 4.33 ~ 12.67 min, 18% ~ 25% A; 12.67 ~ 14 min, 25% ~ 28% A), 柱温 30 ℃, 体积流量 0.3 mL·min⁻¹, 检测波长 270, 283, 306 nm 融合, 进样量 3.5 μL。色谱图见图 1。



A. 全时段多波长融合供试品; B. 全时段多波长融合混合对照品; C. 阴性供试品(缺虎杖、枳壳、淫羊藿); 1. 虎杖苷; 2. 柚皮苷; 3. 橙皮苷; 4. 新橙皮苷; 5. 朝藿定 A; 6. 朝藿定 B; 7. 朝藿定 C; 8. 淫羊藿苷

图 1 前列癃闭通片的 UPLC

Fig. 1 UPLC chromatograms of Qianlielong Bitong tablets

2.1.3 供试品溶液的制备 取前列癃闭通片 20 片, 除去薄膜衣, 称定质量, 研细, 取 0.6 g, 精密称定, 精密加入 50% 甲醇溶液 25 mL, 称定质量, 超声处理(功率 300 W, 频率 50 kHz) 45 min, 放冷, 用 50% 甲醇溶液补足减失的质量, 过滤, 取续滤液, 即得。

2.1.4 混合对照品溶液的制备 取虎杖苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 分别含有 0.012 26, 0.052 26, 0.010 7, 0.039 4, 0.008 34, 0.040 04, 0.012 54, 0.038 96 mg 的混合对照品储备溶液。

2.1.5 阴性供试品溶液的制备 按照处方的比例, 加适量的水煎煮、浓缩等工艺制备缺虎杖、枳壳、淫羊藿的阴性样品, 并按 2.1.3 项下方法制备阴性供试品溶液, 即得。

2.1.6 线性关系考察 取混合对照品溶液, 进 HPLC 仪器, 按 2.1.1 项下色谱条件, 分别自动进样 2, 4, 8, 10, 12, 16 μL, 记录色谱图。峰面积为纵坐标 Y, 进样量为横坐标 X, 进行线性回归, 回归方程及线性范围见表 1。在 UPLC 仪器上, 按 2.1.2 项下色谱

条件, 分别自动进样 0.7, 1.4, 2.8, 3.5, 4.2, 5.6 μL, 记录色谱图。回归方程及线性范围见表 2。结果表明在线性范围内上述 8 种有效成分的进样量和峰面积呈良好的线性关系。

表 1 前列癃闭通片中 8 个活性成分 HPLC 的回归方程和线性范围
Table 1 Regression equations and linear ranges for eight active ingredients in Qianlielong Bitong tables by HPLC

成分	回归方程	r	线性范围 /μg
虎杖苷	$Y = 1\,495.9X + 0.72$	0.999 8	0.024 5 ~ 0.196 2
柚皮苷	$Y = 1\,757X + 15.310$	0.999 8	0.104 5 ~ 0.836 2
橙皮苷	$Y = 1\,648.9X + 5.994$	0.999 4	0.021 4 ~ 0.171 2
新橙皮苷	$Y = 1\,997.2X + 7.312$	1.000 0	0.078 8 ~ 0.630 4
朝藿定 A	$Y = 1\,630.2X + 0.816$	1.000 0	0.016 7 ~ 0.133 5
朝藿定 B	$Y = 1\,827.3X + 3.086$	1.000 0	0.080 1 ~ 0.640 6
朝藿定 C	$Y = 1\,716.4X + 1.213$	1.000 0	0.025 1 ~ 0.200 6
淫羊藿苷	$Y = 2\,063.9X + 2.864$	1.000 0	0.077 9 ~ 0.623 4

表 2 前列癃闭通片中 8 个活性成分 UPLC 的回归方程和线性范围
Table 2 Regression equations and linear ranges for eight active ingredients in Qianlielong Bitong tables by UPLC

成分	回归方程	r	线性范围 /μg
虎杖苷	$Y = 5\,078.1X + 3.120\,0$	0.999 8	0.008 6 ~ 0.068 7
柚皮苷	$Y = 6\,245X - 10.076$	0.999 6	0.036 6 ~ 0.292 7
橙皮苷	$Y = 6\,174.2X - 1.595\,0$	0.999 9	0.007 5 ~ 0.059 9
新橙皮苷	$Y = 6\,593.7X + 23.945$	0.999 3	0.027 6 ~ 0.220 6
朝藿定 A	$Y = 5\,486.5X + 1.367\,4$	1.000 0	0.005 8 ~ 0.046 7
朝藿定 B	$Y = 6\,157.4X + 3.449\,0$	1.000 0	0.028 0 ~ 0.224 2
朝藿定 C	$Y = 5\,854.4X - 0.440\,0$	1.000 0	0.008 8 ~ 0.070 2
淫羊藿苷	$Y = 6\,909.5X + 4.823\,0$	1.000 0	0.027 3 ~ 0.218 2

2.1.7 精密度试验 取同一混合对照品的溶液, 按上述色谱条件, 连续自动进样 6 次, 记录色谱图, 分别测定 8 种成分的峰面积值, 计算峰面积的 RSD。在 HPLC 仪器上虎杖苷, 柚皮苷, 橙皮苷, 新橙皮苷, 朝藿定 A, 朝藿定 B, 朝藿定 C 和淫羊藿苷峰面积的 RSD 分别为 0.8%, 0.7%, 0.9%, 0.7%, 0.8%, 0.1%, 0.2%, 0.1%, 在 UPLC 仪器上 8 种成分峰面积的 RSD 分别为 0.1%, 0.1%, 0.2%, 0.1%, 0.4%, 0.1%, 0.2%, 0.1%, 表明 HPLC 和 UPLC 两种仪器精密度良好。

2.1.8 稳定性试验 取同一制备好的供试品溶液(沈阳神龙药业, 批号 20130101), 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 按上述色谱条件, 分别在制备后的 0, 2, 4,

6, 8, 12, 24 h 进行 HPLC 分析, 记录色谱图, 结果虎杖苷, 柚皮苷, 橙皮苷, 新橙皮苷, 朝藿定 A, 朝藿定 B, 朝藿定 C 和淫羊藿苷峰面积的 RSD 分别为 0.5%, 0.1%, 0.5%, 0.5%, 0.5%, 0.4%, 0.4%, 0.6%, 进行 UPLC 分析, 8 种成分峰面积的 RSD 分别为 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.4%, 0.8%, 0.9%, 0.9%, 0.4%, 表明放置在室温 24 h 内 8 个待测成分基本保持稳定。

2.1.9 重复性试验 取同一批号的前列腺闭通片样品(沈阳神龙药业, 批号 20130101), 称定质量, 研细, 每份取约 0.6 g 共 6 份, 精密称定, 分别按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件分别进样。测定样品中的虎杖苷, 柚皮苷, 橙皮苷, 新橙皮苷, 朝藿定 A, 朝藿定 B, 朝藿定 C 和淫羊藿苷平均质量分数值分别为 0.609, 2.362, 0.763, 1.964, 0.302, 1.586, 0.634, 1.964 mg · g⁻¹, RSD 分别为 0.3%,

0.1%, 0.5%, 0.5%, 0.5%, 0.4%, 0.5%, 0.6%。UPLC 测定 8 种成分的平均质量分数为 0.602, 2.427, 0.690, 2.061, 0.282, 1.618, 0.597, 2.009 mg · g⁻¹, RSD 分别为 0.4%, 1.0%, 0.9%, 0.5%, 1.6%, 1.5%, 0.8%, 0.6%。表明其重复性良好。

2.1.10 回收率试验 取已知含量的前列腺闭通片样品(沈阳神龙药业, 批号 20130101) 粉末 6 份, 每份 0.3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入虎杖苷(0.192 0 g · L⁻¹) 1 mL, 柚皮苷(0.230 7 g · L⁻¹) 3 mL, 橙皮苷(0.206 g · L⁻¹) 1 mL, 新橙皮苷(0.280 8 g · L⁻¹) 2 mL, 朝藿定 A(0.109 6 g · L⁻¹) 1 mL, 朝藿定 B(0.242 8 g · L⁻¹) 2 mL, 朝藿定 C(0.111 6 g · L⁻¹) 2 mL, 淫羊藿苷(0.204 7 g · L⁻¹) 3 mL, 精密加入甲醇溶液 10 mL, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按上述 2 种色谱条件分别进样, 测定各成分的峰面积值再进行计算, 结果见表 3。

表 3 前列腺闭通片中 8 个活性成分回收率数据

Table 3 Recovery tests for eight active ingredients in Qianlielong Bitong tables

成分	HPLC					UPLC				
	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均回收率 /%	RSD /%	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均回收率 /%	RSD /%
虎杖苷	0.182 7	0.192 0	0.374 2	99.73	1.0	0.180 6	0.192 0	0.375 7	101.72	1.7
柚皮苷	0.708 6	0.692 0	1.409 1	101.20	1.2	0.728 1	0.692 0	1.431 0	101.50	1.7
橙皮苷	0.228 9	0.206 0	0.438 1	101.40	1.0	0.207 0	0.206 0	0.415 5	101.21	1.5
新橙皮苷	0.589 2	0.561 6	1.149 8	99.83	1.0	0.618 3	0.651 6	1.265 6	99.31	1.9
朝藿定 A	0.090 6	0.109 6	0.203 2	103.31	1.3	0.084 6	0.109 6	0.193 1	98.70	1.2
朝藿定 B	0.475 8	0.485 6	0.955 2	98.70	1.1	0.323 6	0.485 6	0.820 1	103.37	2.1
朝藿定 C	0.190 2	0.232 0	0.417 6	97.58	1.5	0.179 1	0.232 0	0.418 4	104.08	1.0
淫羊藿苷	0.589 2	0.614 0	1.217 3	102.39	1.8	0.602 7	0.614 0	1.233 1	102.72	1.3

2.2 相对校正因子的确定

2.2.1 多点校正法(以多个质量的浓度点来计算) 以新橙皮苷(A)为内参物, 取 2.1.4 项下的混合对照品溶液, 按确定的色谱条件进不同的体积, 测定各成分的峰面积。根据相对校正因子计算公式: $f_{k/m} = f_k / f_m = (W_k \times A_m) / (W_m \times A_k)$ 其中内参物峰面积为 A_k , 内参物浓度为 W_k , 其他组分 m 峰面积为 A_m , 其他组分 m 浓度为 W_m , 分别计算虎杖苷(B), 柚皮苷(C), 橙皮苷(D), 朝藿定 A(E), 朝藿定 B(F), 朝藿定 C(G) 及淫羊藿苷(H) 的 RCF, 结果见表 4。

2.2.2 斜率校正法 根据公式 $(W_k \times A_m) / A_k = f_{k/m} \times W_m$, 以 W_m 对 $W_k \times A_m / A_k$ 作线性回归, 所得回归曲线的斜率即为 RCF。参考文献方法^[11], 根据线性回归方程 $Y = aX + b, X = (Y - b) / a = Y / a - b / a$, 在 a/b 值 > 100 时, b/a 值可以忽略不计, 此时可以

根据 $X = Y/a$ 直接计算。故 $f_{k/m}$ 的值可以用二者的斜率比来计算, 即 $f_{k/m} = a_k / a_m$, 可以通过内参物来推算出其他成分的含量。在 HPLC 仪器上, 以斜率校正法计算了虎杖苷, 柚皮苷, 橙皮苷, 朝藿定 A, 朝藿定 B, 朝藿定 C, 淫羊藿苷的 RCF, 结果分别为 0.749, 0.880, 0.826, 0.810, 0.910, 0.860, 1.033。UPLC 测定结果为 0.770, 0.947, 0.936, 0.832, 0.934, 0.888, 1.048。

2.2.3 $f_{k/m}$ 重复性考察 本试验考察了 Agilent 1260 HPLC 和 Agilent 1290 UPLC 两个不同的色谱条件, 在 HPLC 上考察了 Ulimate Lp-C₁₈, Diamonsil C₁₈, Kromasil 100-5-C₁₈ 3 个不同的色谱柱; 在 UPLC 上考察了 Eclipse Plus C₁₈ RRHD 和 ZORBAX Extend-C₁₈ 色谱柱对 $f_{k/m}$ 的影响, 结果 RSD 均 < 2%, 表明在不同仪器、不同色谱系统和不同色谱柱下具有良好的重复性, 结果见表 5。

表 4 以新橙皮苷为参照的相对校正因子(多点校正法)

Table 4 RCFs with neohesperidin as reference(multi-point correction method)

进样体积		其他成分相对新橙皮苷的 $f_{k/m}$ (HPLC)						进样体积		其他成分相对新橙皮苷的 $f_{k/m}$ (UPLC)					
$/\mu\text{L}$	$f_{a/b}$	$f_{a/c}$	$f_{a/d}$	$f_{a/e}$	$f_{a/f}$	$f_{a/g}$	$f_{a/h}$	$/\mu\text{L}$	$f_{a/b}$	$f_{a/c}$	$f_{a/d}$	$f_{a/e}$	$f_{a/f}$	$f_{a/g}$	$f_{a/h}$
2	0.764	0.904	0.879	0.817	0.911	0.858	1.020	0.7	0.809	0.925	0.915	0.825	0.919	0.872	1.031
4	0.759	0.915	0.887	0.820	0.912	0.857	1.023	1.4	0.814	0.927	0.927	0.819	0.923	0.876	1.039
6	0.771	0.880	0.900	0.838	0.924	0.887	1.019	2.1	0.818	0.934	0.921	0.827	0.924	0.868	1.045
8	0.748	0.878	0.876	0.829	0.921	0.868	1.034	2.8	0.765	0.931	0.918	0.836	0.897	0.907	1.029
10	0.743	0.898	0.898	0.822	0.932	0.894	1.038	3.5	0.769	0.937	0.930	0.837	0.921	0.869	1.034
12	0.763	0.865	0.915	0.839	0.938	0.862	1.023	4.2	0.779	0.945	0.936	0.832	0.931	0.885	1.015
16	0.757	0.895	0.912	0.821	0.912	0.865	1.024	5.2	0.778	0.955	0.938	0.835	0.936	0.889	1.048

表 5 各种因素对相对校正因子的影响

Table 5 Effects of various factors on RCFs

影响因素		$f_{a/b}$	$f_{a/c}$	$f_{a/d}$	$f_{a/e}$	$f_{a/f}$	$f_{a/g}$	$f_{a/h}$
不同体积流量	0.24 mL·min ⁻¹	0.761	0.894	0.891	0.811	0.908	0.859	1.013
	0.3 mL·min ⁻¹	0.765	0.893	0.890	0.819	0.904	0.851	1.017
	0.36 mL·min ⁻¹	0.759	0.893	0.890	0.815	0.904	0.857	1.018
不同柱温	25 °C	0.761	0.892	0.887	0.821	0.905	0.847	1.011
	28 °C	0.764	0.894	0.889	0.818	0.907	0.851	1.019
	30 °C	0.765	0.893	0.890	0.819	0.904	0.851	1.017
	32 °C	0.759	0.893	0.892	0.820	0.906	0.852	1.019
	35 °C	0.763	0.892	0.890	0.818	0.905	0.851	1.018
不同仪器	Agilent 1260	0.762	0.895	0.881	0.820	0.912	0.861	1.022
	Agilent 1290	0.746	0.895	0.883	0.791	0.893	0.844	1.009
不同色谱柱	Ultimate Lp-C ₁₈	0.762	0.895	0.881	0.820	0.912	0.861	1.022
	Diamonsil C ₁₈	0.753	0.893	0.861	0.809	0.907	0.855	1.021
	Kromasil C ₁₈	0.763	0.895	0.870	0.822	0.920	0.864	1.028
	Eclipse Plus C ₁₈	0.746	0.895	0.883	0.791	0.893	0.844	1.009
	ZORBAX C ₁₈	0.747	0.891	0.877	0.791	0.890	0.841	1.005

2.2.4 不同体积流量对 $f_{k/m}$ 的影响 在 UPLC 上,考察了不同体积流量(0.24, 0.30, 0.36 mL·min⁻¹),对各相对校正因子的影响,结果各成分 RSD 分别为 0.4%, 0.1%, 0.1%, 0.5%, 0.3%, 0.5%, 0.3%, 表明微小的改变体积流量对各成分的 RCF 没有显著的影响。

2.2.5 不同柱温对 $f_{k/m}$ 的影响 在 UPLC 上,考察了不同的柱温(25, 28, 30, 32, 35 °C),对各 RCF 的影响,结果各成分 RSD 分别为 0.3%, 0.1%, 0.2%, 0.2%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 表明柱温的改变对各成分的 RCF 无显著影响。

2.3 待测组分色谱峰的定位 对相对保留时间($r_{i/s} = t_{Ri}/t_{Rs}$)和保留时间差($\Delta t_{i/s} = t_{Ri} - t_{Rs}$)^[13] 这 2

种测定方法均进行了考察,考察了其在 HPLC 和 UPLC 上以及不同型号色谱柱中的重复性,结果表明,各待测成分相对保留值和保留时间差值 RSD 均 < 5%,但相对保留时间值的相对偏差值较小一些,所以采用相对保留时间用于待测成分色谱峰的定位,结果见表 6。

2.4 一测多评法与常规法测定结果的比较 分别取 4 个不同批次的样品,按 2.1.3 项制备供试品溶液,进 HPLC 和 UPLC 仪器进行测定,先用外标法对前列癸闭通片中 8 种不同成分进行含量同时测定,再用 QAMS 法建立待测成分间的 RCF 并对其他成分的含量进行计算,比较 2 种方法的计算结果,以验证 QAMS 法用于前列癸闭通片中 8 种成

分多指标质量评价的准确性。结果表明,2 种方法测得的 8 种成分含量没有显著性差异,相对偏

差 < 5%,说明建立的方法具有较好的可信度,结果见表 7。

表 6 以新橙皮苷为参照的不同色谱柱的相对保留时间

Table 6 Differences in relative retention time with neohesperidin as reference determined on different columns

色谱柱	b/a	c/a	d/a	e/a	f/a	g/a	h/a
Ulfimate Lp-C ₁₈	0.525	0.827	0.895	1.696	1.793	1.892	1.984
Diamonsil C ₁₈	0.528	0.818	0.898	1.753	1.786	1.897	1.985
Kromasil C ₁₈	0.515	0.792	0.875	1.757	1.796	1.898	1.998
Eclipse Plus C ₁₈	0.521	0.828	0.901	1.731	1.837	1.972	2.017
ZORBAX C ₁₈	0.518	0.816	0.901	1.795	1.857	2.056	2.106

表 7 QAMS 法与 ESM 法同步测定前列癸闭通片中 8 种成分的质量分数 (n=3)

Table 7 Contents of eight components in Qianlielong Bitong tables by external standard method and QAMS (n=3)

mg·g⁻¹

批号	新橙皮苷		虎杖苷		柚皮苷		橙皮苷			朝藿定 A			
	ES	ES	QAMS	RD/%	ES	QAMS	RD/%	ES	QAMS	RD/%	ES	QAMS	RD/%
20130101	2.053 8	0.604 3	0.603 8	-0.9	2.435 4	2.460 2	-2.8	0.688 2	0.703 6	-2.5	0.290 1	0.290 6	-1.0
20140301	2.066 6	0.592 2	0.592 0	-0.8	2.422 8	2.447 9	-2.8	0.678	0.693 3	-2.5	0.279 4	0.279 9	-1.0
20140302	2.044 0	0.585 5	0.585 2	-0.8	2.378 1	2.401 9	-2.8	0.691 4	0.706 9	-2.5	0.282 5	0.283 0	-1.0
20140401	2.060 4	0.600 2	0.599 9	-0.8	2.431 3	2.456 3	-2.8	0.693	0.708 6	-2.5	0.276 7	0.277 3	-1.0

批号	新橙皮苷		朝藿定 B		朝藿定 C			淫羊藿苷		
	ES	ES	QAMS	RD/%	ES	QAMS	RD/%	ES	QAMS	RD/%
20130101	2.053 8	1.641 7	1.642 3	-1.7	0.601 8	0.600 6	-2.2	2.002 0	1.999 2	-1.7
20140301	2.066 6	1.636 1	1.636 9	-1.7	0.590 1	0.589 1	-2.2	2.012 9	2.010 4	-1.7
20140302	2.044 0	1.601 8	1.602 5	-1.7	0.596 9	0.595 8	-2.2	2.003 5	2.000 6	-1.7
20140401	2.060 4	1.608 3	1.604 0	-2.0	0.592 6	0.591 5	-2.2	1.990 2	1.987 6	-1.7

3 讨论

3.1 提取条件的选择 比较了回流提取方法和超声提取方法对 8 个成分提取效率的考察,回流提取方法使得柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的峰面积加大,但其他 5 个成分的峰面积均减小很多,超声提取不会使其他 5 个成分的峰面积减小,且超声提取操作简单,因此选择超声提取;提取溶剂考察了稀乙醇、乙醇、50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇,结果显示采用 50% 甲醇提取时能将各成分提取完全,因此选择用 50% 甲醇作为提取溶剂;同时对 50% 甲醇用量 25, 50 mL 以及超声时间 15, 30, 45, 60 min 进行考察,结果表明 25 mL 的 50% 甲醇超声处理 45 min 即可完全提取。

3.2 流动相的确定 分别考察了甲醇-水,乙腈-水,乙腈-0.1% 甲酸水,乙腈-0.5% 甲酸水溶液系统,结果在采用乙腈-0.5% 甲酸水溶液系统时,所得色谱图基线有波动不平整,对比乙腈-水,乙腈-0.1% 甲酸水系统的峰型更好,没有拖尾现象,分离效果更

理想,最终选择乙腈-0.1% 甲酸水系统。

3.3 全时段多波长融合技术的选择 中成药中化学成分复杂,紫外吸收差异较大,单一波长下难以全面反映各类化学成分的全部信息,因此本试验通过 DAD 全波长扫描,确定采样波长,并利用软件对各波长进行融合,以全面反应该药中各类成分的信息。采用 DAD 二极管阵列检测器在 200 ~ 400 nm 对混合对照品进行扫描,选择能够满足 8 个活性成分的峰面积最大值,经过扫描得到检测波长为 306 nm 时虎杖苷有最大吸收;283 nm 柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷有最大吸收;270 nm 朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷有最大吸收。因此确定融合的波长为 306, 283, 270 nm。再将 306, 283, 270 nm 的 dif 格式数据文件从 Agilent 1260 和 Agilent 1290 色谱工作站中导出,使用 Matlab 软件编程,融合 306, 283, 270 nm 的 dif 格式数据文件,得到一张融合后的色谱图,能够将 3 个波长下的信息同时反映出来。

3.4 内参物的选择 在待测的 8 个成分中柚皮苷、

新橙皮苷和淫羊藿苷相对含量较高且相对独立,对照品比较便宜以及化学性质相对稳定,所以这 3 种成分都可以作为内参物。但在进行 RCF 的耐用性试验时发现:以柚皮苷或淫羊藿苷为内参物时,某些成分的 RCF 大小相差甚远;以新橙皮苷为内参物时,各成分间的 RCF 相对较稳定。故内参物选新橙皮苷。

3.5 相对校正因子的计算 本试验采用了两种方法(多点校正法和斜率校正法)来计算待测成分间的 RCF,结果不尽相同。但在采用多点校正法计算时,普遍存在一个弊端,由于多个点可能不在一条线上就会出现在线性范围两端的点,其结果可能会有很大的偏差,从而影响 RCF 的确定;而采用斜率法计算,即使有几个点的结果有较大偏差,也不会对整个标准曲线的斜率有太大的影响,测得的 RCF 相对较准确,计算较简便且重复性好,所以采用斜率法。

3.6 待测色谱峰的定位 一测多评法成功应用的关键在于待测成分色谱峰是否能准确的定位,本试验分别考察了保留时间差和相对保留时间两种方法的重复性,结果发现不同色谱柱上各成分的出峰时间有所差别,相比之下,相对保留时间的 RSD 变化相对较小,因此前列癃闭通片中 8 个待测成分的色谱峰定位采用相对保留时间法。

3.7 HPLC 与 UPLC 的比较 本实验采用 UPLC 和 HPLC 两种色谱系统对前列癃闭通片中 8 个成分进行含量测定,比较两种色谱系统结果表明所得含量测定结果基本一致。相对于 HPLC, UPLC 具有灵敏度高、分离效果更好、节约分析时间和减少浪费流动相等特点。在保证含量测定结果准确的基础上,采用 UPLC 法能更高效、快速的对前列癃闭通片中 8 个成分的含量进行测定。

3.8 小结 本研究将 QAMS 法与全时段多波长融合技术相结合,应用于前列癃闭通片的多指标质量评价中,通过大量的实验数据建立了以新橙皮苷为内参物来计算不同成分的 f , ($f_{\text{新橙皮苷/虎杖苷}} = 0.77$, $f_{\text{新橙皮苷/柚皮苷}} = 0.947$, $f_{\text{新橙皮苷/橙皮苷}} = 0.936$, $f_{\text{新橙皮苷/朝藿定 A}} = 0.832$, $f_{\text{新橙皮苷/朝藿定 B}} = 0.934$, $f_{\text{新橙皮苷/朝藿定 C}} = 0.888$, $f_{\text{新橙皮苷/淫羊藿苷}} = 1.048$), 考察了 Agilent 1260 HPLC, Agilent 1290 UPLC 2 台液相系统和 5 种不同品牌、型号的色谱柱,以及不同的体积流量、不同的柱温,对新橙皮苷与各成分之间的相对校正因子的影响,结果表明相对校正因子具有良好的重复性。并确立了待测成分色谱峰的定位

($\gamma_{\text{虎杖苷/新橙皮苷}} = 0.521$, $\gamma_{\text{柚皮苷/新橙皮苷}} = 0.816$, $\gamma_{\text{橙皮苷/新橙皮苷}} = 0.894$, $\gamma_{\text{朝藿定 A/新橙皮苷}} = 1.746$, $\gamma_{\text{朝藿定 B/新橙皮苷}} = 1.814$, $\gamma_{\text{朝藿定 C/新橙皮苷}} = 1.943$, $\gamma_{\text{淫羊藿苷/新橙皮苷}} = 2.018$)。QAMS 法测定的结果与传统 EMS 的结果没有明显差异,说明前列癃闭通片中的 8 种有效成分可以用 QAMS 法来同时测定。说明“一测多评”法建立的同类成分间的相对校正因子对中成药进行快速、廉价的质量控制是可行的,为其他中成药能够快速评价质量奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 管燕,肖遐. 前列癃闭通片的定性定量方法研究[J]. 湖南师范大学学报:医学版,2013,10(2):85-87.
- [2] 易萍. HPLC 法测定前列癃闭通片中淫羊藿苷的含量[J]. 中医药导报,2007,13(7):100-101.
- [3] 王慧春,魏玉海. 前列癃闭通胶囊含量测定方法的改进[J]. 中成药,2005,7(27):847-848.
- [4] 田洪根,王洪明. 前列癃闭通胶囊的质量标准研究[J]. 中国药品标准,2007,8(1):64-66.
- [5] 董桃杏,戴月. RP-HPLC 法测定前列癃闭通片中柚皮苷、新橙皮苷的含量[J]. 中国药师,2014,17(8):1338-1340.
- [6] 范玲,严冬,李爽,等. 一测多评法测定虎杖中虎杖苷、白藜芦醇、大黄素及大黄素甲醚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(7):103-107.
- [7] 宇霄,宋静,熊志力,等. 一测多评法测定淫羊藿中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 及淫羊藿苷的含量[J]. 中国中药杂志,2010,35(24):3310-3313.
- [8] 刘建维,刘园,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.
- [9] 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.
- [10] 董宇,陈新. 一测多评法在舒肝健脾丸质量控制中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(4):70-73.
- [11] 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.
- [12] 姚东,孟宪生,王帅,等. 气滞胃痛颗粒全时段多波长融合指纹图谱研究及多成分定量分析[J]. 中国中药杂志,2013,38(10):1513-1517.
- [13] 张亚非,王雪,毕宇安,等. 一测多评法测定热毒宁注射液中 9 种成分[J]. 中草药,2013,44(22):3162-3169.

[责任编辑 顾雪竹]