

双标线性校正法辅助色谱峰定性用于 双黄连制剂的多组分分析

陈蓉¹, 张超¹, 张华锋¹, 孙磊^{2,3}, 顾炳仁^{1*}, 周坚¹

(1. 苏州市药品检验检测研究中心, 江苏 苏州 215104; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050;
3. 新疆维吾尔自治区食品药品检验所, 乌鲁木齐 830004)

[摘要] 目的:建立 4 种常用双黄连制剂中 9 种成分的高效液相色谱方法,采用双标线性校正法计算保留时间,考察预测准确性和色谱柱符合率,以辅助色谱峰定性分析。方法:选用 28 根不同品牌和型号的 C₁₈ 色谱柱,测定双黄连制剂中 9 种成分的实际保留时间,计算平均值得到标准保留时间(SRT),以峰 1 绿原酸和峰 9 汉黄芩素 2 个成分为双标化合物,使用双标线性校正法预测保留时间,并在 5 根其他品牌和型号的 C₁₈ 色谱柱上进行了方法验证。同时以中间峰黄芩苷为参照物,计算校正因子,使用相对保留时间法预测保留时间。比较双标线性校正法和相对保留时间法,2 种替代对照品定性方法的优劣。结果:与相对保留时间法相比,双标线性校正法具有更高的保留时间预测正确率和色谱柱符合率,能够适用于更多的色谱柱。但在标准化和实用性方面,仍需继续深入研究。能否推广到其他品种,也需实验论证。结论:双标线性校正法能较好地辅助色谱峰定性,是一种新的替代对照品方法,具有广阔的应用前景。

[关键词] 双黄连制剂; 双标线性校正法; 相对保留时间法; 色谱峰定性

[中图分类号] R284.1;R22;R2-03 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)08-0040-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180715

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180111.0908.013.html>

[网络出版时间] 2018-01-12 10:00

Determination of Multiple Components in Shuanghuanglian Preparations by Liner Calibration with Two Reference Substances Assisted with Chromatographic Peaks Identification

CHEN Rong¹, ZHANG Chao¹, ZHANG Hua-feng¹, SUN Lei^{2,3}, GU Bing-ren^{1*}, ZHOU Jian¹

(1. Suzhou Institute for Drug Control, Suzhou 215104, China;

2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China;

3. Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute for Food and Drug Control, Urumqi 830004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an analysis method of Shuanghuanglian preparations for determination of multiple components by HPLC chromatographic, in order to assist the peak identification, and detect the prediction accuracy and column suitability. **Method:** The retention time of the nine components in Shuanghuanglian preparations were determined on 28 C₁₈ columns of different brands and types. The standard retention time (SRT) was calculated. Both chlorogenic acid (peak 1) and wogonin (peak 9) were taken as the linear calibration standards to forecast the retention time of the other seven components. Other 5 C₁₈ columns of different brands and types were used for validation. In comparison of liner calibration with the two reference substances, baicalin was used as the reference substance for the determination of relative correction factors of other

[收稿日期] 20170919(004)

[基金项目] 苏州市科技计划项目(SYS201781)

[第一作者] 陈蓉,主管中药师,从事中药质量控制,E-mail:kedingyu@126.com

[通信作者] *顾炳仁,主任药师,从事药物分析研究,E-mail:gubinren@126.com

eight components. **Result:** Liner calibration with two reference substances is more accurate for predicting the retention time and suitable for more kinds of chromatographic columns than the relative retention time method. Further studies shall be made for the standardization and practicability. **Conclusion:** The method of liner calibration with two reference substances can be used to assist the chromatographic peak identification, with a broad practical prospect.

[**Key words**] Shuanghuanglian preparations; liner calibration with two reference substances; relative retention time; chromatographic peak identification

药品质量控制贯穿药品研发、生产、流通、监管的全过程。目前,无论是企业、地方还是国家药品标准较以往都有明显提升,检测项目越来越完善,方法先进性和仪器精度要求越来越高。药品质量标准已从早期的外观形状、理化反应、经验鉴别上升到指标成分定性定量的层面。这当中,常常需要大量的标准物质(reference standards)的支持。化学药对照品主要用于含量测定和杂质检查,一般通过合成制得。相比而言,中药是复杂的多成分物质,其对照物质提纯难度高,量少而昂贵,有些物质性质不稳定,或者毒性大,如农药、黄曲霉毒素对照品,使用和保管风险较大^[1]。此外,对于企业和药品检验机构,对照品带来的检验成本的不断提高也是沉重的压力,时常会因为缺乏对照物质,无法完整地执行既定的药品标准。如何用最少的对照物质来解决药品质量控制的问题,是当前研究的热点^[2-4]

“替代对照品法”^[5]或者称为“一测多评法”是目前解决对照品缺乏的常用方法。2015年版,《中国药典》也已收录了“一测多评法”^[6]对丹参、黄连等品种进行了多组分的含量测定^[7-8]。其原理是使用一个或少数几个对照品,通过一定的算法,测定另外一个或多个待测成分,宗旨是减少对照品的数量和成本。孙磊等^[9]提出对照品替代测定法,根据替代对照品的性质可分为化学单体法、对照提取物法和混合法三类;或者根据替代对照品使用的数量可分为一测多评法、双标多测法和多替代标准物质法三类。其中一测多评等方法均通过相对保留时间定性,计算相对校正因子来定量。虽然能够从一定程度上应对对照品不足的问题,但这些方法仅仅通过一个成分定位多个成分的保留时间,在不同色谱柱和不同色谱仪上重现存在一定的偏差,常常需要明确色谱柱的型号^[10]。若是在定性阶段就不准确,很难保证正确定量目标成分,并且,目前这方面的研究仍然较少,没有完善的指导原则^[11]。

“双标多测法”^[12-13]是一种新的替代对照品模式的多指标分析测定技术,原理是使用 2 个对照品

进行双标线性校正法进行色谱峰定性。相较一测多评等方法,双标多测法虽增加了一个对照品,但仅用于定性,用量较少,又能提高定性的准确度,扩展了色谱柱的适用范围,是值得推广的方法。

双黄连制剂由金银花、黄芩、连翘 3 味药材组方而成,具有疏风解表、清热解毒之功效。用于外感风热所致的感冒,症见发热、咳嗽、咽痛^[14]。该制剂用药历史悠久,剂型多样。方中金银花能清风温之热,又可解血中之毒,主要成分为绿原酸、咖啡酸、木犀草素、木犀草苷和 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸等;黄芩以清肺热为专长,又能安胎,主要成分为黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素等;连翘能清心泻火,去上焦各种热证,主要成分为连翘苷等。现行的 2015 年版《中国药典》中,双黄连口服液、片剂、胶囊剂、滴眼液要求对黄芩苷、连翘苷和绿原酸进行含量测定,颗粒剂和栓剂则要求测定黄芩苷和连翘苷的含量。方法均为高效液相色谱法,但需要采用不同流动相系统,并不方便,而且以单一成分反应制剂的质量并不全面^[15]。本文提出以高效液相色谱法梯度洗脱,以双标线性校正法辅助色谱峰定性,同步定位双黄连口服液、双黄连胶囊、双黄连片、双黄连颗粒 4 种制剂中绿原酸、咖啡酸、木犀草素、木犀草苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、连翘苷和 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 9 种成分。结果表明,与相对保留时间法相比,双标线性校正法具有更高的预测准确性和方便性,表明该方法在中药多指标成分定性方面有较好的实用前景。

1 材料

LC-2010CHT 型高效液相色谱仪(包括紫外检测器,日本岛津公司);28 根色谱柱(编号 col 1 ~ col 28),型号分别为 Sepax Amethyst C₁₈-H, Shiseido Capcellpak C₁₈, Boston Green ODS, Dikma Diamonsil Plus C₁₈-A, Dikma Diamonsil Plus C₁₈, Dikma Diamonsil C₁₈, Agilent SB-Aq, Agilent SB-C₁₈, GL Science Wondasil C₁₈-WR, Agilent Extend C₁₈, Agilent Eclipse Plus C₁₈, Agilent Eclipse XDB C₁₈, GL Science

Inertsil OSD-3, Thermo Hypersil C₁₈, Waters Symmetry Shield RP18, GL Science Inertsil OSD-SP, Turner Kromasil C₁₈, Phenomenex Gemini C₁₈, Thermo Synchronis C₁₈, Waters Xterra RP18, Waters Symmetry C₁₈, Phenomenex Luna C₁₈, Aces C₁₈, Agela Venusil MP C₁₈, Sepax Bio-C₁₈, Sepax GP-C₁₈, Sepax Sapphire C₁₈, YMC Pack Pro C₁₈。色谱柱规格均为 4.6 mm × 250 mm, 5 μm。

对照品连翘苷(批号 110821-201112, 纯度 94.9%), 黄芩苷(批号 110715-201318, 纯度 93.5%), 黄芩素(批号 111595-200905, 纯度 98.5%), 汉黄芩素(批号 111514-201605, 纯度 100%), 绿原酸(批号 110753-201415, 纯度 96.2%), 咖啡酸(批号 110885-200802, 纯度 99.7%), 木犀草素(批号 111520-201605, 纯度 99.6%), 木犀草苷(批号 111720-201609, 纯度 94.9%), 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸(批号 111782-201204, 纯度 92.0%)均购自中国食品药品检定研究院。

双黄连制剂来源于不同市售厂家,分别为双黄连口服液(河南福森药业有限公司,批号 16061922;黑龙江瑞格制药有限公司,批号 150108;河南太龙药业股份有限公司,批号 130108112),双黄连胶囊(河南天方药业中药有限公司,批号 01150802, 130902, 121210),双黄连片(哈尔滨圣泰制药股份有限公司,批号 1503001, 1405003, 1406012),双黄连颗粒(哈尔滨儿童制药厂有限公司,批号 160601, 151230, 151017)。

甲醇、乙腈、磷酸(色谱纯,德国 Merck 公司),水由 Milli-Q 系统(美国 Millipore 公司)制备,其余试剂为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件 采用上述 28 根色谱柱,以乙腈为流动相 A,0.1% 磷酸溶液为流动相 B,梯度洗脱(0~5 min, 15%~25% A;5~20 min, 25%~30% A;20~25 min, 30%~40% A;25~35 min, 40% A;35~45 min, 40%~60% A),检测波长 280 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 35 °C,进样量为 10 μL,理论板数按黄芩苷计不得少于 10 000。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取连翘苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、绿原酸、咖啡酸、木犀草素、木犀草苷和 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸对照品适量,加 50% 甲醇制成每 1 mL 各含上述对照品约 100 μg 的混合溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备^[16] 双黄连口服液:精密量取口服液 1 mL,置 50 mL 量瓶中,加 50% 甲醇适量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放置至室温,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,取上清液以 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

双黄连胶囊:取胶囊内容物,研细,取约 0.5 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加 50% 甲醇适量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放置至室温,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,取上清液以 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

双黄连片:取片剂,研细,取约 0.5 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加 50% 甲醇适量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放置至室温,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,取上清液以 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

双黄连颗粒:取颗粒 5 g,研细,取约 1 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加 50% 甲醇适量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放置至室温,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,取上清液以 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 随机抽取 4 种制剂样品各 1 批,按照 2.3 项下方法处理,在 2.1 项色谱条件下,以 col 1 色谱柱连续进样 6 次,对 9 个对照品成分色谱峰的保留时间和峰面积进行统计,结果表明保留时间基本一致,峰面积 RSD 均 < 1.5%,符合分析要求。

2.4.2 重复性试验 随机抽取 4 种制剂样品各 1 批,每批各取 6 份,按照 2.3 项下方法处理,在 2.1 项色谱条件下,以 col 1 色谱柱进样,对 9 个对照品成分色谱峰的保留时间和峰面积进行统计,结果表明保留时间基本一致,以峰面积计算含量, RSD 均 < 1.0%,符合分析要求。

2.4.3 稳定性试验 随机抽取 4 种制剂样品各 1 批,按照 2.3 项下方法处理,在 2.1 项色谱条件下,以 col 1 色谱柱进样,于 0, 1, 2, 3, 5, 8, 10, 24, 36 h 进样,对 9 个对照品成分色谱峰的保留时间和峰面积进行统计,结果表明保留时间基本一致,峰面积 RSD 均 < 2.0%,样品稳定性良好,符合分析要求。

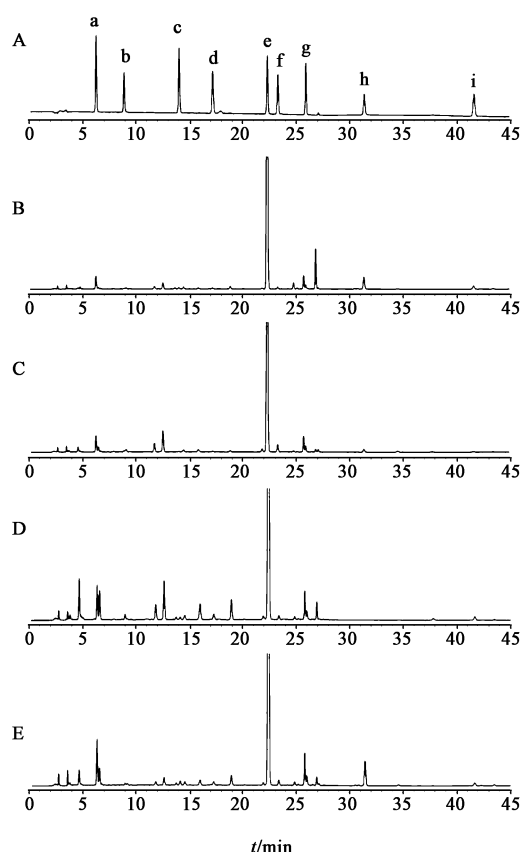
2.4.4 色谱柱耐用性试验 随机抽取 4 种制剂样品各 1 批,按照 2.3 项下方法处理,在 2.1 项色谱条件下,以上述 28 根色谱柱进样, col 15, col 18 黄芩苷与连翘苷出峰顺序颠倒, col 20 连翘苷与木犀草素峰重叠,其余色谱柱均可将 9 个对照品色谱峰

分离。

2.4.5 双标线性校正法定性研究 将采集的色谱数据导入 DRS Origin 软件,通过关联对照品,设定双标成分,进行双标线性校正法分析,得到保留时间预测准确率和色谱柱符合率。同时,与相对保留时间法比较,判断两种方法的优劣。

3 结果与分析

本实验预先对样品提取条件进行优化,考察了不同溶剂(不同比例甲醇和乙醇)以及回流、超声 2 种提取方法,结果表明用 50% 甲醇超声 30 min 的提取基本可以达到实验要求。同时,通过考察不同流动相系统,根据色谱峰峰型及分离状况,最终选择乙腈-0.1% 磷酸水溶液进行梯度洗脱。4 种制剂样品经分析记录 45 min,收集数据。4 种制剂的代表性图谱见图 1(示 col 1)。样品在 280 nm 波长下对于上述 9 种成分的分析较为有利,便于考察双标线性校正法的可行性。



A. 对照品; B. 双黄连口服液(16061922); C. 双黄连胶囊(01150802); D. 双黄连片(1503001); E. 双黄连颗粒(160601); a. 绿原酸; b. 咖啡酸; c. 木犀草苷; d. 3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸; e. 黄芩苷; f. 连翘苷; g. 木犀草素; h. 黄芩素; i. 汉黄芩素

图 1 双黄连制剂 HPLC 色谱(col 1)

Fig.1 HPLC chromatograms of Shuanghuanglian preparations(col 1)

3.1 双标的选择和 SRT 的计算 液相色谱中,化学成分在不同色谱仪和不同色谱柱上的保留时间具有线性关系^[17]。通过对照品保留时间进行色谱峰定位,得到样品实际保留时间,以 25 根色谱柱(除去不符合要求的 col 15, col 18, col 20)得到的样品保留时间平均值作为预测保留时间(standard retention time,简称 SRT)。以 9 种成分的 SRT 为横坐标,分别为绿原酸 5.973 min,咖啡酸 8.440 min,木犀草苷 13.463 min,3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸 16.432 min,黄芩苷 21.642 min,连翘苷 22.695 min,木犀草素 25.138 min,黄芩素 30.848 min,汉黄芩素 40.570 min,以实际保留时间为纵坐标,得到各色谱柱的拟合结果,见图 2。各色谱柱的线性方程和相关系数见表 1。由图 2 和表 1 可见,双黄连制剂各成分在 col 4 和 col 10 两根色谱柱上与拟合直线有偏离,说明成分在这些色谱柱上的保留时间与其余色谱柱差异较大。其余 23 根色谱柱的保留时间的线性关系良好。

3.2 双标化合物的确定和优化 9 个成分中,选择 2 个作为双标成分,有很多种方案。试验中,通过 DRS Origin 软件的计算,筛选出了 10 种双标选择方案,能保证色谱柱符合率达到 95%,其中峰 1~峰 9 组合的预测正确率为 100%,色谱柱符合率为 97.78%。按双标选择尽量分布在保留时间两端的原则^[12],运行双标对照品溶液和供试品溶液,将绿原酸和汉黄芩素作为双黄连制剂液相色谱的双标化合物,以这 2 个成分的 SRT 为纵坐标,实际保留时间(以未知色谱柱 col 29 为例),绿原酸 5.552 min,汉黄芩素 39.317 min 为横坐标,得到两点绿原酸(5.552,5.973)和汉黄芩素(39.317,40.570),做一直线,得到方程 $Y = 1.0246X + 0.2842$,然后将其余 7 个成分的 SRT 值代入方程(Y 值),得到预测保留时间分别为咖啡酸 7.960 min,木犀草苷 12.863 min,3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸 15.760 min,黄芩苷 20.845 min,连翘苷 21.873 min,木犀草素 24.257 min,黄芩素 29.830 min。实际保留时间依次为 8.053, 12.952, 15.616, 20.930, 21.957, 24.323, 29.637 min。偏差的绝对值依次为 0.10, 0.10, 0.14, 0.08, 0.08, 0.07, 0.19 min,满足单纯度条件下,预测保留时间与实测保留时间的误差应不超过 0.5 min 的要求,说明该双标选择在 col 29 上预测效果良好,见图 3。

3.3 双标线性校正法与相对保留时间法的对比 对双标线性校正法与相对保留时间法两者在双黄连

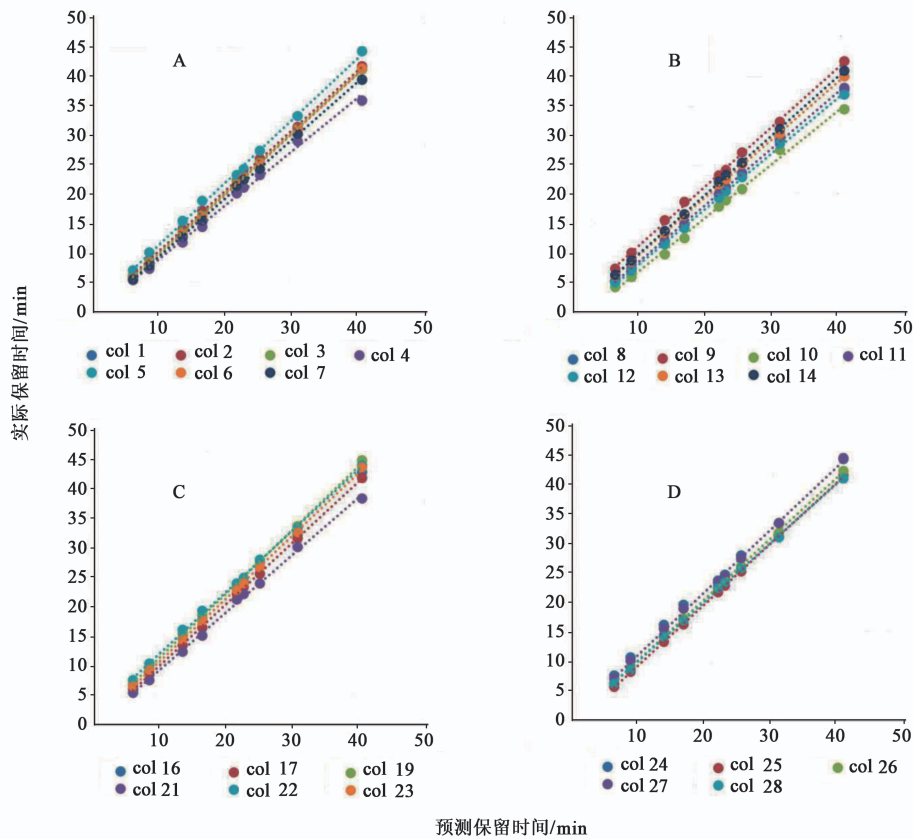


图 2 不同色谱柱保留时间关系

Fig.2 Plots of retention times on different columns

表 1 不同色谱柱保留时间的线性方程及相关系数

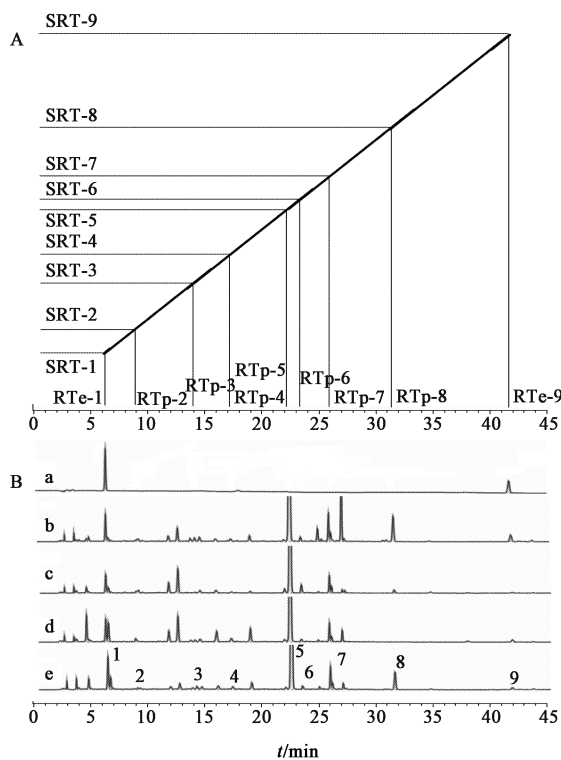
Table 1 Linear equation and correlation coefficients of retention times on different columns

色谱柱	线性方程	r	色谱柱	线性方程	r
col 1	$Y = 1.0136X + 0.4472$	0.9996	col 14	$Y = 0.9879X + 0.0207$	0.9999
col 2	$Y = 0.9844X - 0.2916$	0.9999	col 16	$Y = 0.9846X - 0.2915$	0.9999
col 3	$Y = 0.9881X + 0.0235$	0.9999	col 17	$Y = 0.9862X + 0.5718$	0.9999
col 4 ¹⁾	$Y = 1.0956X + 0.1105$	0.9981	col 19	$Y = 0.9478X - 0.3198$	0.9997
col 5	$Y = 0.9495X - 0.9032$	0.9993	col 21	$Y = 1.0503X + 0.7309$	0.9990
col 6	$Y = 0.9772X + 0.5067$	0.9999	col 22	$Y = 0.9843X - 1.3659$	0.9995
col 7	$Y = 1.0140X + 0.3854$	0.9996	col 23	$Y = 0.9622X + 0.1426$	0.9998
col 8	$Y = 1.0422X + 0.9540$	0.9998	col 24	$Y = 0.9700X - 1.7383$	0.9990
col 9	$Y = 0.9844X - 1.3187$	0.9995	col 25	$Y = 0.9772X + 0.4877$	0.9999
col 10 ¹⁾	$Y = 1.0882X + 2.3277$	0.9979	col 26	$Y = 0.9776X - 0.3597$	0.9999
col 11	$Y = 1.0327X + 0.9768$	0.9998	col 27	$Y = 0.9497X - 0.9137$	0.9993
col 12	$Y = 1.0512X + 1.3315$	0.9996	col 28	$Y = 1.0051X - 0.4936$	0.9998
col 13	$Y = 1.0118X - 0.0119$	0.9999			

注：¹⁾ col 4, col 10 为拟合偏离较大的色谱柱。

制剂液相色谱中定性的优劣进行比较。双标线性校正法以色谱图两端的绿原酸和汉黄芩素为双标化合物,相对保留时间法以中间位置的黄芩苷为参照物,相对保留时间的均值分别为绿原酸 0.275,咖啡酸

0.388,木犀草苷 0.620,3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸 0.757,连翘苷 1.049,木犀草素 1.162,黄芩素 1.427,汉黄芩素 1.875。表 2 为 2 种方法在 25 根色谱柱上的比较结果,与相对保留时间法比较,双标线



a. 对照品; b. 双黄连口服液(16061922); c. 双黄连胶囊(01150802); d. 双黄连片(1503001); e. 双黄连颗粒(160601); 1. 绿原酸; 2. 咖啡酸; 3. 木犀草苷; 4. 3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸; 5. 黄芩苷; 6. 连翘苷; 7. 木犀草素; 8. 黄芩素; 9. 汉黄芩素; A. 双标线性示意; B. 原始图谱

图 3 双标线性校正法示意

Fig. 3 Schematic of linear calibration using two reference

表 2 不同色谱柱 2 种方法不同成分保留时间预测值的绝对偏差

Table 2 Absolute deviation of retention times predicted of different components by different colour of two methods

min

色谱柱	双标线性校正法								
	绿原酸	咖啡酸	木犀草苷	3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸	黄芩苷	连翘苷	木犀草素	黄芩素	汉黄芩素
col 1	-	-0.125	-0.197	-0.356	0.467	0.465	-0.080	0.332	-
col 2	-	0.101	0.124	0.229	0.022	-0.074	0.042	-0.327	-
col 3	-	-0.021	-0.032	-0.166	0.119	0.214	-0.134	-0.172	-
col 4	-	-0.121	-0.089	-0.082	0.667 ¹⁾	0.091	0.357	0.543 ¹⁾	-
col 5	-	0.366	0.317	0.516 ¹⁾	-0.619 ¹⁾	-0.734 ¹⁾	-0.276	-0.514 ¹⁾	-
col 6	-	-0.025	-0.151	-0.278	-0.207	-0.176	-0.301	-0.350	-
col 7	-	-0.119	-0.157	-0.309	0.483	0.315	-0.059	0.323	-
col 8	-	-0.261	-0.315	-0.232	-0.062	0.137	0.270	0.356	-
col 9	-	0.184	0.291	0.337	-0.112	-0.297	0.221	-0.383	-
col 10	-	0.017	-0.391	-0.559 ¹⁾	0.256	0.403	0.103	-0.556 ¹⁾	-
col 11	-	-0.235	-0.336	-0.271	-0.038	0.074	0.173	0.333	-
col 12	-	-0.333	-0.443	-0.464	-0.094	0.116	0.244	0.397	-
col 13	-	-0.066	-0.114	-0.034	0.213	-0.005	0.188	-0.262	-

性校正法的保留时间预测值的绝对偏差波动范围较小,且绝对偏差较低。表 3 为 2 种方法的结果对比。最大绝对偏差是指预测保留时间与实际保留时间的偏差,以各色谱柱的各成分中最大的绝对值为考察指标。最大相对偏差是指最大绝对偏差与实际保留时间的比值。分别优选绝对偏差 ≤ 0.5 min 和相对偏差 $\leq 5\%$ 的色谱柱作为适用色谱柱。综上所述,双标线性校正法明显优于相对保留时间法,其预测精度更高,适用的色谱柱数量更多。

3.4 样品分析 用 5 根新的色谱柱(col 29, col 30, col 31, col 32, col 33),按照 2.3 项下方法处理样品,按 2.1 项下色谱条件测试 4 种双黄连制剂,双标线性校正法和相对保留时间法均能很好预测各成分在 col 29, col 32, col 33 上的保留时间,但相对保留时间法在 col 30, col 31 的预测误差偏大。表 4 表明双标线性校正法比相对保留时间法预测更为精确。不同制剂可用同一条件进行分析,并由峰形的不同来区别。

4 讨论

含量测定的前提是目标成分的准确定位^[18],因此在中药研究中,定性较普通的定量更有意义。本实验结果表明,双标线性校正法可适用于双黄连制剂的多组分定性分析,能较好定位双黄连制剂中的 9 种主要成分,与相对保留时间法相比,双标线性校正法更能提高成分定位的预测精度,扩大色谱柱的

续表 2

色谱柱	双标线性校正法								
	绿原酸	咖啡酸	木犀草苷	3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸	黄芩苷	连翘苷	木犀草素	黄芩素	汉黄芩素
col 14	-	-0.025	-0.033	-0.166	0.120	0.217	-0.138	-0.165	-
col 16	-	0.099	0.120	0.222	0.023	-0.069	0.043	-0.323	-
col 17	-	0.004	-0.263	-0.345	0.005	0.034	-0.273	-0.145	-
col 19	-	0.239	0.131	0.126	-0.342	-0.455	-0.399	-0.486	-
col 21	-	-0.224	-0.262	-0.422	0.322	0.624	0.037	0.313	-
col 22	-	0.193	0.613	0.304	-0.107	-0.300	0.224	-0.368	-
col 23	-	0.108	-0.061	-0.097	-0.449	-0.446	-0.357	-0.236	-
col 24	-	0.431	0.603 ¹⁾	0.842 ¹⁾	-0.502 ¹⁾	-0.617 ¹⁾	0.027	-0.484	-
col 25	-	-0.021	-0.144	-0.261	-0.207	-0.187	-0.302	-0.355	-
col 26	-	0.028	0.210	0.043	0.078	0.135	-0.109	-0.360	-
col 27	-	0.355	0.323	0.517 ¹⁾	-0.379	-0.315	-0.265	-0.516 ¹⁾	-
col 28	-	-0.133	0.402	0.175	0.394	0.345	0.255	-0.209	-

色谱柱	相对保留时间法								
	绿原酸	咖啡酸	木犀草苷	3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸	黄芩苷	连翘苷	木犀草素	黄芩素	汉黄芩素
col 1	0.323	0.441	0.546 ¹⁾	0.718 ¹⁾	-	-0.081	0.569 ¹⁾	0.233	0.601 ¹⁾
col 2	-0.122	-0.228	-0.214	-0.302	-	0.114	-0.072	0.466	0.181
col 3	0.021	0.033	0.066	0.212	-	-0.084	0.284	0.376	0.224
col 4	0.098	0.470	0.671 ¹⁾	0.797 ¹⁾	-	0.005	0.159	-0.229	1.886 ¹⁾
col 5	-0.706 ¹⁾	-1.117 ¹⁾	-1.061 ¹⁾	-1.275 ¹⁾	-	0.133	-0.351	-0.062	-0.627 ¹⁾
col 6	0.219	0.152	0.133	0.174	-	-0.055	0.005	-0.084	-0.750 ¹⁾
col 7	0.302	0.420	0.503 ¹⁾	0.675 ¹⁾	-	-0.073	0.573	0.278	0.661 ¹⁾
col 8	0.446	0.591 ¹⁾	0.473	0.291	-	-0.217	-0.421	-0.671 ¹⁾	-0.682 ¹⁾
col 9	-0.759 ¹⁾	-0.874 ¹⁾	-1.096 ¹⁾	-1.070 ¹⁾	-	0.240	-0.193	0.682 ¹⁾	0.646 ¹⁾
col 10	0.923 ¹⁾	1.202 ¹⁾	1.447 ¹⁾	1.095 ¹⁾	-	-0.207	-0.124	-2.122 ¹⁾	-1.147 ¹⁾
col 11	0.470	0.592 ¹⁾	0.518 ¹⁾	0.352	-	-0.135	-0.309	-0.631 ¹⁾	-0.662 ¹⁾
col 12	0.589 ¹⁾	0.770 ¹⁾	0.649 ¹⁾	0.532	-	-0.237	-0.462	-1.115 ¹⁾	-0.919 ¹⁾
col 13	0.018	0.088	0.188	0.138	-	0.233	0.073	0.605 ¹⁾	0.427
col 14	0.018	0.034	0.066	0.211	-	-0.085	0.289	0.372	0.230
col 16	-0.123	-0.227	-0.211	-0.295	-	0.111	0.018	0.465	0.186
col 17	0.308	0.232	0.396	0.414	-	-0.044	0.220	-0.003	-0.376
col 19	-0.344	-0.663 ¹⁾	-0.632 ¹⁾	-0.680 ¹⁾	-	-0.102	-0.199	-0.173	-0.878 ¹⁾
col 21	0.598 ¹⁾	0.812 ¹⁾	0.861	1.018 ¹⁾	-	0.103	0.668 ¹⁾	0.071	1.214 ¹⁾
col 22	-0.783 ¹⁾	-0.903 ¹⁾	-1.128 ¹⁾	-1.104 ¹⁾	-	0.251	-0.183	0.689 ¹⁾	0.687 ¹⁾
col 23	-0.061	-0.266	-0.233	-0.283	-	-0.036	-0.195	-0.142	-1.004 ¹⁾
col 24	-1.148 ¹⁾	-1.530 ¹⁾	-1.522 ¹⁾	-1.664 ¹⁾	-	0.169	-0.411	0.371	0.206
col 25	0.210	0.140	0.122	0.153	-	-0.043	0.009	-0.073	-0.738 ¹⁾
col 26	-0.174	-0.188	-0.304	-0.093	-	-0.035	0.255	0.622 ¹⁾	0.372
col 27	-0.699 ¹⁾	-1.093 ¹⁾	-1.043 ¹⁾	-1.245 ¹⁾	-	0.158	-0.312	0.005	-0.541 ¹⁾
col 28	-0.149	0.043	-0.325	-0.005	-	0.091	0.265	0.942 ¹⁾	1.030 ¹⁾

注：¹⁾为保留时间预测值与实测值绝对偏差 > 0.5 min (表 4 同)。

表 3 双标线性校正法和相对保留时间法两种方法预测结果比较 ($n=3$)

Table 3 Comparison of results predicted by liner calibration with two reference substances and relative retention time ($n=3$)

方法	最大绝对偏差/min	最大相对偏差/%	百分比(绝对偏差 ≤ 0.5 min)/%	适用柱数量(绝对偏差 ≤ 0.5 min)/个	百分比(相对偏差 $\leq 5\%$)/%	适用柱数量(相对偏差 $\leq 5\%$)/个
双标线性校正法	0.842	4.3	92.0	20	99.4	24
相对保留时间法	2.122	8.4	65.0	5	76.5	10

表 4 col 29 ~ col 33 色谱柱保留时间预测值的绝对偏差

Table 4 Absolute deviation of retention times predicted of col 29-col 33

min

方法	成分	col 29	col 30	col 31	col 32	col 33
双标线性校正法	绿原酸	-	-	-	-	-
	咖啡酸	-0.093	0.031	0.104	0.011	-0.191
	木犀草苷	-0.089	-0.041	-0.012	-0.115	-0.336
	3,5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	0.144	-0.101	-0.055	-0.103	-0.243
	黄芩苷	-0.085	0.166	0.1247	-0.066	-0.114
	连翘苷	-0.084	-0.025	-0.121	-0.025	-0.033
	木犀草素	-0.066	-0.119	-0.137	0.099	0.112
	黄芩素	0.193	-0.061	-0.215	0.004	-0.163
	汉黄芩素	-	-	-	-	-
	相对保留时间法	绿原酸	0.196	-0.281	0.221	-0.322
咖啡酸		0.070	0.414	0.181	0.123	0.230
木犀草苷		0.026	-0.584 ¹⁾	0.234	-0.022	0.126
3,5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸		0.240	0.505 ¹⁾	0.533 ¹⁾	0.333	-0.376
黄芩苷		-	-	-	-	-
连翘苷		-0.002	-0.444	-0.590 ¹⁾	0.135	0.314
木犀草素		-0.009	-0.273	0.222	-0.128	0.257
黄芩素		0.232	-0.202	-0.246	0.210	-0.316
汉黄芩素		-0.071	0.240	0.213	-0.221	0.327

适用范围,提高检验的效率,同时也并不显著提高对照品成本。

然而,双标线性校正法的定量准确性还需结合相对校正因子进行考察,并且该方法推广到其他药品是否适用,尚需实验验证。目前双标线性校正法属于理论研究和初步试验时期,现阶段的研究在相对校正因子的定量、指标成分的色谱峰定性,尤其是方法的实用性和标准化方面仍存在一些问题。

双标线性校正法适用于高效液相、气相等色谱法。本实验中仅使用了配备普通紫外检测器的液相进行考察,在不采用光谱和质谱辅助定性的情况下,基本符合预测保留时间与实测保留时间的绝对误差不超过 0.5 min,相对偏差不超过 5% 的规定。

运用双标线性校正法进行色谱峰定性时,本实验选择了峰 1 ~ 峰 9 组合的绿原酸和汉黄芩素,同

时也考察了其他双标的组合,综合考虑了预测正确率和色谱柱符合率,决定双标成分的保留时间尽量分布于两端,避免选择在色谱柱拟合过程中偏离较大的成分,以减小保留时间的预测误差。

建立方法时,本实验考察了 28 根不同品牌、型号的色谱柱对待测成分分离情况的影响,同时考察了 4 种制剂共计 12 批不同来源供试品,以确保方法的适用性。基本符合了大量色谱柱和一定量样品的建模要求。需要注意的是,必须选择经过检定的色谱仪。各成分的最大吸收波长应尽量相近,以保证单波长情况下响应值的稳定。最大吸收相差大的成分,亦可选用全波长扫描或切换波长技术。

本实验仅考察了双标线性校正法用于 4 种双黄连制剂的色谱峰定性,是否适用于其他多组分中药的分析,还需进一步的拓展研究。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 76, 304, 333-353.
- [2] XIE P S, MA S C, TU P F, et al. The prospect of application of extractive reference substance of Chinese herbal medicines [J]. Chin Med, 2013, 4(4): 125-136.
- [3] 陆兔林, 翟为民, 蔡宝昌, 等. 对照提取物在中药质量控制中的应用[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(3): 462-465.
- [4] GAO W, WANG R, LI D, et al. Comparison of five Lonicera flowers by simultaneous determination of multi-components with single reference standard method and principal component analysis [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 5(117): 345-351.
- [5] 谢元超, 金少鸿. 替代对照品法用于丹参和复方丹参片含量测定的研究[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(4): 497-502.
- [6] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925-1928.
- [7] 汪坤, 张振凌, 贾秀梅. 一测多评法优选黄连最佳提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 9-11.
- [8] 耿燕娜, 张文鑫. 一测多评法同时测定复方丹参片中人参皂苷 R_{g_1} , R_e , R_b_1 和三七皂苷 R_1 含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 69-72.
- [9] 孙磊, 金红宇, 马双成, 等. 中药标准物质替代测定法技术指导原则[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(4): 284-286.
- [10] 张伟清, 胡昌勤. 反相 C_{18} 液相色谱柱选择性理论及其应用[J]. 药学报, 2010, 45(5): 555-559.
- [11] 魏锋, 程显隆, 马玲云, 等. 药品标准中替代对照品研究技术要求探讨[J]. 中国药品标准, 2012, 13(1): 12-15.
- [12] 孙磊, 金红宇, 逢瑜, 等. 双标多测法 I—双标线性校正技术用于色谱峰的定性[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(8): 1424-1430.
- [13] 孙磊, 逢瑜, 金红宇, 等. 双标多测法 II—检测波长选择对定量分析的影响[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(9): 1578-1586, 1616.
- [14] 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, 2015: 735-740.
- [15] 李玉因. 高效液相色谱法同时测定双黄连粉针剂中 5 种组分含量的方法分析[J]. 中国处方药, 2015, 13(2): 35-36.
- [16] 汤须崇, 肖美添, 叶静. HPLC 法同时测定双黄连制剂中绿原酸、黄芩苷和连翘苷的含量[J]. 江西中医学报, 2010, 22(3): 64-66.
- [17] 王龙星, 肖红斌, 梁鑫淼. 一种提高色谱指纹谱保留时间重现性的新方法[J]. 分析化学, 2003, 31(10): 1232-1236.
- [18] 逢瑜, 孙磊, 金红宇, 等. 替代对照品法在中药多指标含量测定中的应用与技术要求探讨[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(1): 169-177.

[责任编辑 顾雪竹]