

一测多评法在舒肝健脾丸质量控制中的应用

董宇, 陈新*

(长春中医药大学药学院, 长春 130117)

[摘要] **目的:**建立舒肝健脾丸一测多评的测定方法,验证此方法在舒肝健脾丸质量评价中应用的准确性、适应性和可行性。**方法:**将舒肝健脾丸为研究对象,以橙皮苷为内参物,建立橙皮苷与柚皮苷、柑属苷B的相对校正因子,并将校正因子应用于橙皮苷、柚皮苷和柑属苷B的含量测定,实现一测多评;同时采用外标法测定上述3种黄酮类成分的含量,比较计算值与实测值的差异。**结果:**线性考察 $Y_{\text{橙皮苷}} = 56\ 644X - 2\ 272.9 (r = 0.999\ 8)$; $Y_{\text{柚皮苷}} = 41\ 070X + 779.59 (r = 0.999\ 9)$; $Y_{\text{柑属苷B}} = 33\ 619X + 2\ 289.8 (r = 0.999\ 9)$,线性关系良好;校正因子,柚皮苷 RSD 0.286%,柑属苷B RSD 0.259%;阴性无干扰,专属性良好;精密度,橙皮苷 RSD 0.48%,柚皮苷 RSD 1.02%,柑属苷B RSD 0.97%;重复性,橙皮苷 RSD 0.94%,柚皮苷 RSD 0.89%,柑属苷B RSD 1.27%;回收率,橙皮苷平均回收率 99.26%,RSD 0.90%,柚皮苷平均回收率 99.30%,RSD 0.92%,柑属苷B平均回收率 98.34% RSD 0.78%,该方法准确、可靠;一测多评法柚皮苷含量为 6.11,6.09,6.13 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,柑属苷B为 4.96,4.93,4.99 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,外标法柚皮苷含量为 6.12,6.08,6.17 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,柑属苷B为 4.98,4.95,5.01 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,两种方法含量测定结果差异不显著。**结论:**一测多评法可同时对疏肝健脾丸中的橙皮苷、柚皮苷和柑属苷B进行含量测定,该方法简便、准确、可靠,可有效提高疏肝健脾丸的质量水平。

[关键词] 一测多评; 高效液相色谱; 相对校正因子; 舒肝健脾丸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0070-04

[doi] 10.11653/syfy2014040070

Application of QAMS in the Quality Control of Shuganjianpi Pill

DONG Yu, CHEN Xin*

(College of Pharmacy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the measurement method of the multi-component with a single-marker (QAMS) of Shuganjianpi pill, and verify the accuracy, adaptability, geasibility of QAMS in the quality control. **Method:** Shuganjianpi pill was used as the research object and the hesperidin was used as the internal reference. The relative correlation factor (RCF) of naringin and citrus genus glycosides B were established, and the RCF in the determination of naringin and citrus genus glycosides B was adopted. The external standard method (ESM) was used to determin the naringin and citrus genus glycosides B, and the results of the two determination methods were compared. **Result:** Linear experiment, hesperidin: $Y = 56\ 644X - 2\ 272.9 (r = 0.999\ 8)$, naringin: $Y = 41\ 070X + 779.59 (r = 0.999\ 9)$, citrus genus glycosides B: $Y = 33\ 619X + 2\ 289.8 (r = 0.999\ 9)$, linear relationship was good; RCF, naringin: RSD 0.286%, citrus genus glycosides B: RSD 0.259%; there was no negative interference, specificity was good; precision enperiment, hesperidin: RSD 0.48%, naringin: RSD 1.02%, citrus genus glycosides B: RSD 0.97%; repeatability enperiment, hesperidin: RSD 0.94%, naringin: RSD 0.89%, citrus genus glycosides B: RSD 1.27%; recovery experiment, hesperidin: average recovery was 99.26%, RSD 0.90%, naringin: average recovery was 99.30%, RSD 0.92%, citrus genus glycosides B:

[收稿日期] 20130824(014)

[基金项目] 吉林省科技发展计划重点项目(20100906)

[第一作者] 董宇,在读硕士,从事中药药效物质基础开发与应用研究,Tel:13214377757

[通讯作者] *陈新,教授,从事中药药效物质基础开发与应用研究,Tel :0431-86172153,E-mail:chenxinjl@126.com

average recovery was 98.34%, RSD 0.78%. The method was accurate and reliable; determination result of QAMS: naringin 6.11, 6.09, 6.13 mg·g⁻¹, citrus genus glycosides B 4.96, 4.93, 4.99 mg·g⁻¹; ESM: naringin 6.12, 6.08, 6.17 mg·g⁻¹, citrus genus glycosides B 4.98, 4.95, 5.01 mg·g⁻¹, there was no significant difference in the results of determination between the two methods. **Conclusion:** Using QAMS can determine the hesperidin, naringin and citrus genus glycosides B in the Shuganjianpi pills simultaneously with convenience preciseness and reliability, which effectively improve the level of Shuganjianpi pill quality control.

[Key words] multi-component with a single-marker (QAMS); HPLC; relative correction factor (RCF); Shuganjianpi pill

舒肝健脾丸由枳实、川芎等8味中药组成的复方制剂,具有疏肝理气、健脾和胃的功效,用于消化不良、胃脘嘈杂、腹胀肠鸣、胁肋胀痛、头晕乏力、恶心呕吐等症,对慢性胃炎、肝炎出现上述症候者有效。枳实中的黄酮类成分橙皮苷、柚皮苷、柑属苷B均为活性药理成分^[1-3],其中橙皮苷对照品较易得到,而柑属苷B对照品价高。本试验采用高效液相色谱法同时测定了枳实中的橙皮苷、柚皮苷和柑属苷B的含量^[4],利用上述3种黄酮类成分内在的函数关系和比例关系,采用“一测多评”的方法^[6],以橙皮苷对照品为指标成分,建立柚皮苷、柑属苷B与橙皮苷之间的相对校正因子^[5],用校正因子计算出这3种黄酮类成分的含量,为真实评价舒肝健脾丸的质量提供准确性和科学性的分析模式。

1 材料

1.1 仪器 Aglient 1100型高效液相色谱仪, Aglient 1200型高效液相色谱仪, LC-15C型高效液相色谱仪(日本岛津), PB303-S型1/10万天平(梅特勒-托利多仪器有限公司), KQ-250B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂 舒肝健脾丸由长春中医药大学提供;橙皮苷对照品购自中国药品生物制品检定所,批号110721-200613;柚皮苷对照品购自中国药品生物制品检定所,批号110722-200309;柑属苷B,上海同田生物技术股份有限公司,批号105279105;水为纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 方法原理^[6] 假设某样品中含有*i*个组分,则校正因子 $f_i = W_i/A_i$ ($i = 1, 2, \dots, k, \dots, m$), 式中 A_i 为组分峰面积, W_i 为组分浓度。选取其中一组*k*为内标,建立组分*k*与其他组分*m*之间的相对校正因子。 $f_{km} = f_k/f_m = W_k \times A_m/W_m \times A_k$,由此可以导出定量计算公式: $W_m = W_k \times A_m/f_{km} \times A_k$,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。

2.2 一测多评方法学考察

2.2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈(2)色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-乙腈-0.1%磷酸溶液(12:13:75), 流速1.0 mL·min⁻¹, 检测波长284 nm, 柱温36℃, 理论板数按橙皮苷峰计算不低于3000。上述色谱条件下各组分分离度良好。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取橙皮苷、柚皮苷及柑属苷B各对照品适量分别置于25 mL量瓶中, 制得各对照品的单一溶液。再分别精密吸取各对照品适量, 置同一10 mL量瓶中, 甲醇溶液稀释至刻度, 制得混合对照品溶液(橙皮苷50.05 mg·L⁻¹, 柚皮苷40.0 mg·L⁻¹, 柑属苷B30.30 mg·L⁻¹)。

2.2.3 供试品溶液的制备 取舒肝健脾丸, 研细, 过三号筛, 取约0.5 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 精密加入甲醇100 mL, 称定质量, 置水浴上加热回流1 h, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取上述混合对照品溶液2, 4, 8, 10, 15, 20 μL进样分析, 分别以对照品进样量*X*(μg)为横坐标, 峰面积*Y*为纵坐标, 绘制标准曲线并进行线性回归计算处理, 分别得各对照品的标准曲线回归方程及线性范围, 表明3种对照品在相应范围内线性关系良好, 结果见表1。

表1 线性关系考察

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/μg
橙皮苷	$Y = 56\ 644X - 2\ 272.9$	0.999 8	0.100 1 ~ 1.001
柚皮苷	$Y = 41\ 070X + 779.59$	0.999 9	0.080 0 ~ 0.800
柑属苷B	$Y = 33\ 619X + 2\ 289.8$	0.999 9	0.060 6 ~ 0.606

2.2.5 校正因子计算 以橙皮苷为内标, 按2.1项下公式计算橙皮苷对柚皮苷和柑属苷B的相对校正因子(*f*), 结果见表2。

2.2.6 专属性试验 按处方量称取各药材, 除去枳实药材, 按制备工艺制备成阴性供试品, 再按供试品

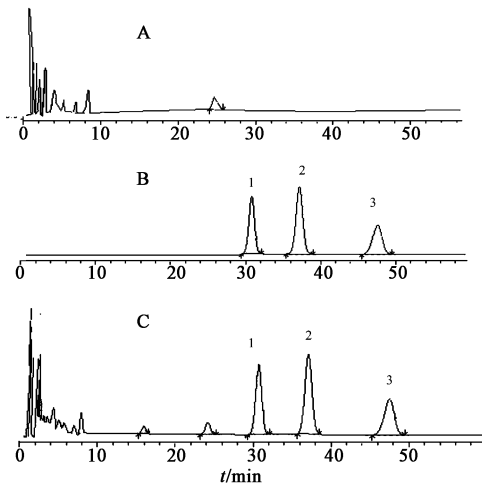
表2 橙皮苷对柚皮苷和柑属苷B的校正因子

进样体积/ μL	$f_{\text{橙皮苷/柚皮苷}}$	$f_{\text{橙皮苷/柑属苷B}}$
2	0.911	1.004
4	0.909	1.003
8	0.907	1.001
10	0.913	1.006
15	0.912	1.008
20	0.914	1.002
平均值	0.911	1.004
RSD/%	0.286	0.259

表3 舒肝健脾丸中3个成分加样回收率试验($n=9$)

成分	No.	取样品	加入量	测得量	回收率		RSD	
		/g	/mg	/mg	/%	/%		
橙皮苷	1	0.202	1.46	1.43	2.88	99.30	99.26	0.90
	2	0.204	1.48	1.43	2.89	98.60		
	3	0.206	1.49	1.48	2.93	100.70		
	4	0.257	1.86	1.77	3.61	98.87		
	5	0.253	1.85	1.77	3.59	98.31		
	6	0.255	1.84	1.77	3.60	99.44		
	7	0.306	2.22	2.14	4.37	100.47		
	8	0.314	2.21	2.14	4.31	98.13		
	9	0.308	2.23	2.14	4.36	99.53		
柚皮苷	1	0.202	1.23	1.21	2.45	100.83	99.30	0.92
	2	0.204	1.26	1.21	2.46	99.17		
	3	0.206	1.24	1.21	2.43	98.35		
	4	0.257	1.57	1.49	3.05	99.33		
	5	0.253	1.56	1.49	3.06	100.67		
	6	0.255	1.55	1.49	3.02	98.66		
	7	0.306	1.86	1.83	3.66	98.36		
	8	0.314	1.87	1.83	3.68	98.91		
	9	0.308	1.88	1.83	3.70	99.45		
柑属苷B	1	0.202	1.01	0.98	1.97	97.96	98.34	0.78
	2	0.204	1.02	0.98	1.99	98.98		
	3	0.206	1.03	0.98	1.98	97.01		
	4	0.257	1.28	1.25	2.52	99.20		
	5	0.253	1.27	1.25	2.50	98.40		
	6	0.255	1.26	1.25	2.48	97.60		
	7	0.306	1.52	1.47	2.98	99.32		
	8	0.314	1.51	1.47	2.96	98.64		
	9	0.308	1.53	1.47	2.97	97.96		

溶液的制备方法制备成阴性对照溶液。分别精密吸取混合对照溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各10 μL ,注入液相色谱仪中,测定,色谱图见图1,试验结果表明,阴性对照无干扰,专属性良好。



A. 阴性对照; B. 对照品; C. 供试品;
1. 柚皮苷; 2. 橙皮苷; 3. 柑属苷B

图1 舒肝健脾丸HPLC

2.2.7 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液10 μL ,连续进样6次,记录峰面积,橙皮苷、柚皮苷和柑属苷B峰面积的RSD分别为0.48%, 1.02%, 0.97%,表明精密度试验结果良好。

2.2.8 重复性试验 取舒肝健脾丸约0.5 g,平行6份,精密称定,按供试品溶液处理方法制备,测定,橙皮苷、柚皮苷和柑属苷B平均含量为7.26, 6.12, 4.98 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD分别为0.94%, 0.89%, 1.27%。

2.2.9 加样回收率试验 精密称定已知含量样品9份,分别按各成分在制剂中的含量精密加入对照品溶液,再按供试品溶液处理方法制备样品,测定,计算加样回收率,结果见表3。

2.2.10 样品测定 分别精密吸取供试品、混合对照品及单一对照品(橙皮苷)溶液各5, 10, 15 μL 注入高效液相色谱仪,测定。分别采用一测多评法和

外标一点法计算舒肝健脾丸中橙皮苷、柚皮苷、柑属苷B的含量,结果见表4,采用一测多评方法及外标法所测得的舒肝健脾丸中橙皮苷、柚皮苷、柑属苷B的含量基本一致,说明本方法可行。

2.3 校正因子重复性考察 精密吸取上述混合对照品溶液2, 4, 8, 10, 15, 20 μL 进样分析,计算橙皮苷对柚皮苷和柑属苷B的相对校正因子。考察了3种高效液相系统和3种不同色谱柱,结果见表5。结果证明,在不同高效液相系统和不同色谱柱上3种对照品间的相对校正因子有较好的重复性,可以实现一测多评对3种黄酮类成分的同步测定。

2.4 待测组色谱峰的定位 同样成分在不同的色谱仪器中的保留时间会存在差异,但他们的光谱

表4 舒肝健胃丸中橙皮苷、柚皮苷、柑属苷 B 含量 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

批次	橙皮苷	柚皮苷		柑属苷 B	
		一测多评法	外标法	一测多评法	外标法
1	7.23	6.11	6.12	4.96	4.98
2	7.26	6.09	6.08	4.93	4.95
3	7.29	6.13	6.17	4.99	5.01

表5 不同色谱柱测得的相对校正因子

仪器	色谱柱	相对校正因子	
		RCF(橙皮苷/柚皮苷)	RCF(橙皮苷/柑属苷 B)
Agilent 1100	Diamonsil C ₁₈	0.913	1.006
	Inertsil C ₁₈	0.919	1.003
	Eclipse XDB-C ₁₈	0.915	1.001
LC-15C	Diamonsil C ₁₈	0.921	1.017
	Inertsil C ₁₈	0.927	1.021
	Eclipse XDB-C ₁₈	0.933	1.025
Agilent 1200	Diamonsil C ₁₈	0.912	1.035
	Inertsil C ₁₈	0.917	1.027
	Eclipse XDB-C ₁₈	0.923	1.019
	平均值	0.924	1.017
	RSD%	1.17	1.14

性质相似,结合各峰紫外吸收特征及目标峰所在原色谱簇的保留时间等信息,根据目标物与内参物之间的相对保留时间,即能够正确的判断各目标峰的准确定位,结果见表6。

表6 不同仪器测得相对保留时间比值

仪器	t (橙皮苷/柚皮苷)	t (橙皮苷/柑属苷 B)
Agilent 1100	1.98	1.54
LC-15C	2.05	1.27
Agilent 1200	2.01	1.38

3 讨论

王智民^[6]则提出了“一测多评”法的多指标质控模式,利用中药有效成分内在的函数关系和比例关系,来实现多个成分的同步定量测定。朱晶晶等^[7]用一测多评法同时测定黄芩药材中4种黄酮类成分的含量研究;黄帅等^[8]用一测多评法同步测定柴胡药材中3种皂苷的含量研究;林永强等^[9]用一测多评法同步测定银黄片中6种咖啡酰奎宁酸研究。

一测多评法实现了在对照品缺乏的情况下,利用相对校正因子既可实现对中药多成分定量和多指标质量控制^[10],又可以从量上阐明主要成分或药效

成分间的相互关系,显著降低了检测成本,提高了工作效率,进行质量评价,建立统一使用的相对校正因子是该法普适性的关键。本试验以舒肝健脾丸为例,通过方法学试验,一测多评校正因子重复性考察和待测组分色谱峰的定位考察,对应用于中药复方制剂的技术适应性和可行性进行了初步探讨,结果表明一测多评计算的含量结果与外标试验方法所得的含量结果没有显著性差异,试验中在不同仪器和不同色谱柱上所得到的柚皮苷和柑属苷 B 的校正因子具有普适性,可以实现在柚皮苷及柑属苷 B 对照品缺少的情况下,通过较易得到的橙皮苷对照品与柚皮苷、柑属苷 B 之间的相对保留时间差进行色谱峰的定位,再利用橙皮苷对照品及相对校正因子计算含量,以实现对中药复方制剂的多组分的质量控制。

本试验将“一测多评”法应用于中药复方制剂舒肝健脾丸的含量测定中,对中药制剂多成分的质量控制进行有益的研究。

[参考文献]

- [1] 彭国平,牛贺明,徐丽华. 枳实活性成分的研究[J]. 南京中医药大学学报:自然科学版, 2001, 17(2):91.
- [2] 陈振峰. 枳实及其药用有效成分研究[J]. 中国野生植物资源, 2005, 24(4):38.
- [3] 刘振丽,宋志前,张玲,等. 枳实饮片中3类化学成分含量测定[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(17):1425.
- [4] 曾祖平,何薇,崔立山. 高效液相法测定枳实中黄酮类成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(7):9.
- [5] 罗祖良,仇峰,韦日伟,等. 相对校正因子在中药多指标测定中的应用研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(7):1448.
- [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.
- [7] 朱晶晶,王智民,张启伟,等. 一测多评法同时测定黄芩药材中4种黄酮类成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(24):3229.
- [8] 王贞媛,曹玉,刘洁. 穿心莲内酯类成分的“一测多评”[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(10):2321.
- [9] 林永强,徐丽华,王淑华,等. 一测多评法同步测定银黄片中6种咖啡酰奎宁酸[J]. 中草药, 2012, 43(4):706.
- [10] 邹桂欣,尤献民,张颖,等. 一测多评法在冠脉康胶囊多种成分检测中的应用研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(15):1828.

[责任编辑 顾雪竹]