

# 一测多评法测定复方土荆皮酊中 3 种二萜类成分的含量

李晓翠, 苗爱东\*

(北京军区联勤部药品仪器检验所, 北京 100071)

**[摘要]** **目的:** 建立一测多评法(QAMS)同步测定复方土荆皮酊中土荆皮乙酸-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷(PABG)、土荆皮丙酸(PAC)和土荆皮乙酸(PAB)3种二萜类成分的含量。**方法:** 以土荆皮乙酸为内参物, 建立其与土荆皮乙酸-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷和土荆皮丙酸的相对校正因子(RCF)(分别是 0.681 4 和 1.225 3), 利用该校正因子计算其他 2 种二萜类成分的含量, 实现一测多评; 同时采用外标法测定 17 批次复方土荆皮酊中 3 种二萜类成分的含量, 比较计算值与实测值间的差异, 验证一测多评法的准确性和可行性。**结果:** 可以采用一测多评法对 17 批次复方土荆皮酊中的 3 种二萜类成分进行测定, 其计算值与实测值间无显著差异, 实验所得的校正因子可信。**结论:** 建立的一测多评法同步测定复方土荆皮酊中 3 种二萜类成分的含量是可行的、准确的, 可用于复方土荆皮酊的质量评价。

**[关键词]** 一测多评; 相对校正因子; 高效液相色谱; 复方土荆皮酊; 二萜类成分

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0077-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013170077

## Quantitative Method Using One Marker for Simultaneous Assay of Three Diterpenoids in Fufang Tujingpiding

LI Xiao-cui, MIAO Ai-dong\*

(Institute for Drug and Instrument Control of Beijing Military Area Command, Beijing 100071, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method of multi-assay by single-marker (QAMS) for simultaneous determination of pseudolaric acid B-*O*- $\beta$ -*D*-glucoside (PABG), pseudolaric acid C (PAC) and pseudolaric acid B (PAB) in Fufang Tujingpiding. **Method:** Using pseudolaric acid B as the internal reference substance, the relative correction factors (RCF) of the other two diterpenoids were 0.681 4 and 1.225 3 respectively. The other two diterpenoids were simultaneously calculated according to their RCFs. The content of these two diterpenoids in 17 samples was also determined by external standard method, comparing two methods to validate the accuracy and feasibility of the new method. **Result:** Three diterpenoids in 17 batches of Fufang Tujingpiding were determined by the new method, and there were no significant differences between the calculated values and the measured values. **Conclusion:** The new method is feasible and accurate to evaluate the content of three diterpenoids in Fufang Tujingpiding, which can be used as the quality control of Fufang Tujingpiding.

**[Key words]** quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS); relative correction factor; HPLC; Fufang Tujingpiding; diterpenoid components

复方土荆皮酊为《中国人民解放军医疗机构制剂规范》收录的中药复方制剂, 同时被《卫生部药品标准 中药成方制剂第 13 册》收录, 具有抗表皮真菌和止痒等作用, 临床上常用于手癣、脚癣和体癣等的治疗。中药多成分、多功效、多靶点的特点决定着单一成分难以全面控制其质量, 以 2010 年版《中国药典》为代表的质量标准已经向多指标成分、药效成

**[收稿日期]** 20130410(027)

**[基金项目]** 军队十二五规划项目

**[第一作者]** 李晓翠, 硕士生, 从事药物分析研究, Tel: 010-66870541, E-mail: lengzhu\_1986@163.com

**[通讯作者]** \* 苗爱东, 博士, 副主任药师, 副研究员, 从事药物分析研究, Tel: 010-66870541, E-mail: miaoaidong@sina.com

分研究的方向发展,并逐步为国际上所认可的质量控制模式。一测多评法多指标成分同步控制的模式<sup>[1]</sup>已在多种中药和中成药中得到了应用<sup>[2-8]</sup>,一方面可以解决对照品供应相对不足的难题,另一方面也可以为科研和监管提供参考。本文应用一测多评法实现了复方土荆皮酊的多指标质量控制,以价廉易得的土荆皮乙酸为内参物,建立其与土荆皮乙酸-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷和土荆皮丙酸的相对校正因子进行含量计算,并与常规的外标法进行了对比。

## 1 材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪(包括低压梯度四元泵 G1311A、自动进样器 G1329A、恒温箱 G1316A、DAD 检测器 G1315D 和脱气机 G1322A、Chem Station 色谱工作站,美国安捷伦科技有限公司),Agilent 1100 高效液相色谱仪(包括低压梯度四元泵 G1311A、自动进样器 G1313A、恒温箱 G1316A、VWD 检测器 G1314A 和脱气机 G1322A、Chem Station 色谱工作站,美国安捷伦科技有限公司),Shimadzu LC-20A 高效液相色谱系统(高压梯度二元泵 LC-20AB、自动进样器 SIL-20A、SPD-M20A 二极管阵列检测器和脱气机 DGU-20A3、LC Solution 色谱工作站,日本岛津公司),Mettler Toledo AG 285 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

苯甲酸(批号 100419-200301)、水杨酸(批号 100106-201104,含量 99.9%)、土荆皮乙酸对照品(批号 110880-201003,含量 99.1%)均购自中国药品生物制品检定所。土荆皮乙酸-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷对照品(批号 101224)和土荆皮丙酸对照品(批号 101223)均购自四川成都普瑞法科技开发有限公司。市售的 4 个厂家共 17 批次的复方土荆皮酊, A, B, C 厂各 1 批次, D 厂 14 批次。乙腈为色谱纯,水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

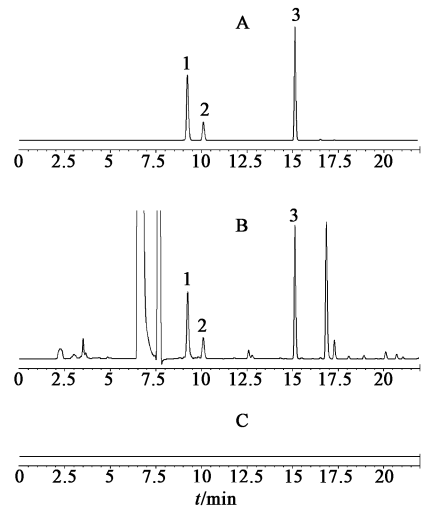
**2.1 基本原理** 在一定范围(线性范围)内成分的量(质量或浓度)与检测器响应成正比,即  $W = f \cdot A$ , 可得响应因子  $f = \frac{W}{A}$ 。在多指标质量评价时,以药材中某一典型有效组分(有对照品供应者)为内参物( $s$ ),建立该组分与其他组分( $i$ )之间的相对校正因子,然后通过校正因子计算其他组分的含量。

$$RCF_{si} = \frac{f_s}{f_i} = \frac{W_s \cdot A_i}{A_s \cdot W_i}$$

### 2.2 方法学考察

**2.2.1 色谱条件** Agilent Zorbax SB C<sub>18</sub> 色谱柱

(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相乙腈(A)-0.09% 甲酸(B)水溶液, 梯度洗脱(0 ~ 8 min, 30% ~ 40% A; 8 ~ 22 min, 40% ~ 100% A), 柱温 35  $^{\circ}$ C, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长 262 nm, 进样量 10  $\mu$ L。在此色谱条件下, 土荆皮乙酸-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、土荆皮丙酸、土荆皮乙酸和土荆皮甲酸与其他相邻色谱峰的分度均良好, 阴性对照无干扰, 见图 1。



A. 混合对照品; B. 供试品; C. 阴性样品;

1. 土荆皮乙酸-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷; 2. 土荆皮丙酸; 3. 土荆皮乙酸

图 1 复方土荆皮酊 HPLC

**2.2.2 对照品溶液的制备** 取土荆皮乙酸-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、土荆皮丙酸和土荆皮乙酸的对照品适量, 精密称定, 分别置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇配制成单一对照品储备液(质量浓度分别为 231.965, 84.402, 368.652 mg · L<sup>-1</sup>)。精密量取各对照品储备液适量至同一量瓶中, 制成含土荆皮乙酸-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、土荆皮丙酸和土荆皮乙酸分别为 81.223, 13.504, 73.730 mg · L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 精密量取复方土荆皮酊样品 5.0 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用 60% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 用 0.45  $\mu$ m 的微孔滤膜过滤, 即得。

**2.2.4 空白对照溶液的制备** 按处方比例和工艺制备<sup>[9]</sup> 不含土荆皮药材的阴性样品, 按 2.2.3 项下方法制成阴性对照溶液。

**2.2.5 线性关系考察** 分别精密吸取上述对照品储备液适量, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇配制成含土荆皮乙酸-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷为 11.598 ~ 82.845 mg · L<sup>-1</sup>, 土荆皮丙酸为 1.206 ~ 27.009 mg · L<sup>-1</sup>, 土荆皮乙酸为 14.746 ~ 126.392 mg · L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。精密吸取上述对照品溶液 10  $\mu$ L 按 2.2.1 项下

色谱条件依次进样分析。以质量浓度  $X(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$  为横坐标,峰面积积分值  $Y$  为纵坐标,绘制标准曲线,土荆皮乙酸-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、土荆皮丙酸和土荆皮乙酸的线性方程分别为  $Y = 27.036X - 2.1016$  ( $r = 0.9998$ ),  $Y = 46.889X + 6.1901$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y = 39.925X - 19.141$  ( $r = 0.9998$ )。表明3种二萜类成分在各浓度范围内与色谱峰面积的线性关系良好。

**2.2.6 校正因子的计算** 以土荆皮乙酸为内参物,计算土荆皮乙酸-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷和土荆皮丙酸的相对校正因子,结果见表1。

表1 复方土荆皮酊中2种二萜类成分的相对校正因子

No.	相对校正因子/RCF	
	RCF <sub>PAB/PABG</sub>	RCF <sub>PAB/PAC</sub>
1	0.663 2	1.350 1
2	0.697 5	1.246 6
3	0.692 9	1.198 6
4	0.675 8	1.203 0
5	0.671 5	1.204 4
6	0.693 7	1.196 5
7	0.675 3	1.178 0
平均值	0.681 4	1.225 3

**2.2.7 精密度** 取2.2.3项下供试品溶液10  $\mu\text{L}$ 注入高效液相色谱仪中,在2.2.1项色谱条件下,连续进样3日,每日6次,计录土荆皮乙酸-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、土荆皮丙酸和土荆皮乙酸的色谱峰面积,3种二萜类化合物日内精密度的RSD分别是0.09%,0.15%,0.06%;日间精密度的RSD分别是0.32%,

0.16%,0.29%。

**2.2.8 重复性** 按照2.2.3项下的方法制备6份复方土荆皮酊供试品溶液,在2.2.1项色谱条件下进样10  $\mu\text{L}$ ,测定土荆皮乙酸-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、土荆皮丙酸和土荆皮乙酸的含量,其RSD值分别为0.31%,0.33%,0.27%,表明该方法的重复性良好。

**2.2.9 稳定性** 取同一供试品溶液10  $\mu\text{L}$ ,分别于1,2,3 d在2.2.1项色谱条件下进样分析,记录各色谱峰面积值,经计算土荆皮乙酸-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、土荆皮丙酸和土荆皮乙酸峰面积的RSD分别为0.27%,0.19%,0.29%,表明供试品溶液在3 d内的稳定性良好。

**2.2.10 加样回收率** 精密量取已知含量的复方土荆皮酊(批号20110402)6份,每份2.5 mL,分别加入适量的混合对照品溶液,按照2.2.3项下的方法制备供试品溶液,在2.2.1项色谱条件下进样10  $\mu\text{L}$ ,结果土荆皮乙酸-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、土荆皮丙酸和土荆皮乙酸的加样回收率是99.0%,99.5%,101.5%,RSD分别是0.29%,0.15%,0.17%。

**2.3 相对校正因子的重复性考察** 取2.2.2项下的混合对照品溶液,进样10  $\mu\text{L}$ 测定,并计算土荆皮乙酸对土荆皮乙酸-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷和土荆皮丙酸的校正因子。该试验考察了不同高效液相色谱系统(Agilent 1200,Agilent 1100和岛津LC-20A)及不同色谱柱Inertsil ODS-3(4.6 mm  $\times$  250 mm,5  $\mu\text{m}$ )对校正因子的影响,结果见表2,表明相对校正因子在不同色谱系统和不同品牌色谱柱下具有良好的适应性。

表2 不同仪器和色谱柱测得的相对校正因子

仪器	色谱柱	相对校正因子/RCF	
		RCF <sub>PAB/PABG</sub>	RCF <sub>PAB/PAC</sub>
Agilent 1200	Agilent ZORBAX SB C <sub>18</sub>	0.681 4	1.225 3
	Inertsil ODS-3	0.676 1	1.222 7
Agilent 1100	Agilent ZORBAX SB C <sub>18</sub>	0.674 0	1.222 7
Shimadzu LC-20A	Agilent ZORBAX SB C <sub>18</sub>	0.685 7	1.219 4

**2.4 一测多评法与常规外标法结果的比较** 按照2.2.3项下方法制备了17批次复方土荆皮酊供试品溶液,分别精密吸取10  $\mu\text{L}$ 进样分析。采用外标法和“一测多评”法分别计算土荆皮乙酸-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、土荆皮丙酸和土荆皮乙酸的含量。结果见表3。采用 $t$ 检验对所得结果进行比较,表明2种含量测定方法的结果无显著性差异,将一测多评法用

于复方土荆皮酊中二萜类化合物的质量评价是可行的。

### 3 讨论

建立了复方土荆皮酊中3种二萜类成分的一测多评法,同步检测土荆皮乙酸-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷,土荆皮丙酸和土荆皮乙酸。这3种成分均为复方土荆皮酊中的特征成分<sup>[10-11]</sup>,由于土荆皮乙酸-*O*- $\beta$ -*D*-葡

表 3 外标法和一测多评法测定样品中 3 种二萜类成分含量

mg·L<sup>-1</sup>

生产 厂家	批号	土荆皮乙酸- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷		土荆皮丙酸		
		b	a	b	a	b
A	100602	62.910	23.994	23.601	5.074	5.102
B	20110718	123.275	54.592	53.697	25.920	26.061
C	20110303	-	-	-	-	-
D	20110204	89.247	80.568	79.248	14.902	14.984
	20101101	105.670	71.563	70.390	5.831	5.863
	20100502	84.847	90.844	89.355	9.309	9.360
	20110305	96.209	91.616	90.114	14.600	14.680
	20110307	72.081	71.919	70.741	13.050	13.121
	20100712	120.914	73.085	71.887	5.725	5.756
	20101103	116.723	80.512	79.192	7.079	7.118
	20101002	119.018	79.973	78.662	5.866	5.898
	20091102	93.934	81.033	78.776	8.025	8.077
	20110306	91.307	87.175	85.746	13.971	14.047
	20101003	118.095	79.332	78.031	5.431	5.460
	20091001	114.395	65.871	64.791	6.552	6.588
	20110309	83.435	83.147	81.784	15.084	15.166
	20110402	84.842	83.240	81.876	15.369	15.453

葡萄糖苷和土荆皮丙酸提取纯化难度大,对照品不易得到,而土荆皮乙酸对照品廉价易得且在复方土荆皮酊中的含量较高,因此选择土荆皮乙酸为内参物。

对市售的复方土荆皮酊样品进行检测时发现,不同厂家生产的复方土荆皮酊中 3 种二萜类成分的含量差异较大,可能与土荆皮药材的产地、采收时间和制剂的生产工艺等不同有关。在中药和中成药多成分质量控制模式下,用其中任一成分作为指标都不能够准确反映该药材或制剂的质量。而在常规的多指标质量控制中,由于对照品不易制备,储存不稳定,对照品供应不足等因素限制了其在科研、生产、药品检验中的应用,而一测多评法不仅从量上阐明了同类成分之间的相互关系,对不同类型的成分也同样有效<sup>[12-14]</sup>,在只有一个对照品时,通过计算出的 RCF,即能实现对其他指标成分进行含量测定,再结合色谱峰峰位的定性研究,即可对其他成分进行准确的测定。一测多评法的应用,保证了药品质

量的安全、有效、稳定和可控,并为中成药多指标同步质量评价提供了新的研究思路。

### [参考文献]

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 朱晶晶,王智民,匡艳辉,等.一测多评法同步测定人参和三七药材中多种人参皂苷的含量[J].药学报,2008,43(12):1211.
- [4] 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.
- [5] 冯伟红,王智民,张启伟,等.一测多评法测定秦皮药材与饮片中香豆素类成分的含量[J].中国中药杂志,2011,36(13):1782.
- [6] 孔晶晶,朱晶晶,王智民,等.一测多评技术在中成药香连制剂质量评价中的应用[J].中国中药杂志,2011,36(11):1445.
- [7] 张锴镔,冯伟红,王智民,等.一测多评法与外标法测定新清宁片中大黄蒽醌类成分含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(11):61.
- [8] 魏凤环,吴桂欣,朱清利,等.一测多评法测定湿疹软膏中欧前胡素、异欧前胡素的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(21):125.
- [9] 中华人民共和国卫生部.卫生部颁药品标准中药成方制剂.第13册[S].2007:142.
- [10] 李晓翠,苗爱东.HPLC测定复方土荆皮酊中3种成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(19):108.
- [11] 李晓翠,苗爱东.HPLC法同时测定复方土荆皮酊中4种二萜类成分[J].中成药,2012,34(11):2124.
- [12] 王瑞,黄山君,王峥涛.一测多评法测定赤芍中不同类型成分的含量[J].沈阳药科大学学报,2011,28(8):594.
- [13] 孔晶晶,朱晶晶,王智民,等.一测多评法测定连翘中多种不同类型成分的含量[J].中国药学杂志,2010,45(17):1301.
- [14] 丁黎艳,周璐,王丽娜,等.一测多评法测定补骨脂中不同类型成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(5):152.

[责任编辑 顾雪竹]