

· 化学与分析 ·

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

张锴铤^{1,2}, 冯伟红^{1,2*}, 王智民^{1,2*}, 张启伟^{1,2}, 李霞³, 杨菲^{1,2,4}, 李东影^{1,2,4}, 吉丽娜^{1,2,4}
(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
2. 中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700;
3. 中国中医科学院实验药厂, 北京 100700; 4. 天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] 目的:采用“一测多评”法与外标法测定新清宁片中 4 种大黄蒽醌类成分的含量,并对测定结果进行比较。方法:采用 RP-HPLC, Accurasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.4% 磷酸水溶液(85:15), 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 检测波长 254 nm。结果:20 批新清宁片中 4 种蒽醌类成分 QAMS 计算值与 ESM 实测值无显著性差异, RSD < 5%。结论:在一定色谱条件下, QAMS 确定的相对校正因子可作为常数用于含大黄制剂的质量评价。
[关键词] “一测多评”法; 新清宁片; 蒽醌; 相对校正因子; 相对保留值; 外标法
[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)11-0061-05

Determination of Rhubarb Anthraquinones in Xinqingning Tablets by QAMS and External Standard Method

ZHANG Kai-bing^{1,2}, FENG Wei-hong^{1,2*}, WANG Zhi-min^{1,2*}, ZHANG Qi-wei^{1,2},
LI Xia³, YANG Fei^{1,2,4}, LI Dong-ying^{1,2,4}, JI Li-na^{1,2,4}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Herbal Medicines, Beijing 100700, China; 3. Affiliated Pharmaceutical Factory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 4. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] Objective: To determine the contents of four kinds of anthraquinone components in Xinqingning tablet by quantitative analysis of multi-component with a single-marker (QAMS) and external standard method (ESM) respectively, and compare results by this two methods. Method: RP-HPLC determination was performed at 30 ℃ with Accurasil C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), mobile phase of methanol-0.4% phosphoric acid (85:15), detection wavelength at 254 nm, and flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. Result: There was no significant difference between calculated value of QAMS and measured value of ESM for four kinds of anthraquinone components from Xinqingning tablet, RSD < 5%. Conclusion: Under certain chromatographic conditions, relative correlation factor could be used as a constant for quality evaluation of *Rheum palmatum* preparation which was determined by QAMS.
[Key words] quantitative analysis of multi-components by single marker; Xinqingning tablet; anthraquinone; relative correlation factor (RCF); relative retention value (RT_R); external standard method

[收稿日期] 20120129(002)
[基金项目] 2007 年中医药行业科技专业项目(200707009), 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09301-005, 2009ZX09308-003)
[第一作者] 张锴铤, 硕士研究生, E-mail: kaibinzhang@163.com
[通讯作者] * 冯伟红, 副研究员, 从事中药质量分析研究, Tel/Fax: 010-84014128, E-mail: weihong_bj@126.com
* 王智民, 从事中药化学与质量控制研究, E-mail: zhmw123@263.net

新清宁片是由熟大黄制成的中药制剂,目前其质量评价方法相对比较单一,据文献报道^[1]及 2010 年版《中国药典》记载,均采用大黄素、大黄酚作为检测指标,难以体现中医药整体性的特点,且多指标质量评价由于检测成本高,不适合广泛推广。“一测多评”法^[2](QAMS)是基于多指标质量控制的研究思路,在降低检测成本的同时解决了对照品供需不足的问题,日渐成为中药及其制剂质量评价的新模式。

本课题组在前期三黄片“一测多评”质量评价方法^[3]的基础上,将试验中确定的大黄蒽醌类成分间的相对校正因子和相对保留值用于新清宁片的质量评价,并与外标法(ESM)进行比较,以期进一步探讨 QAMS 的可行性和适用性。

1 材料

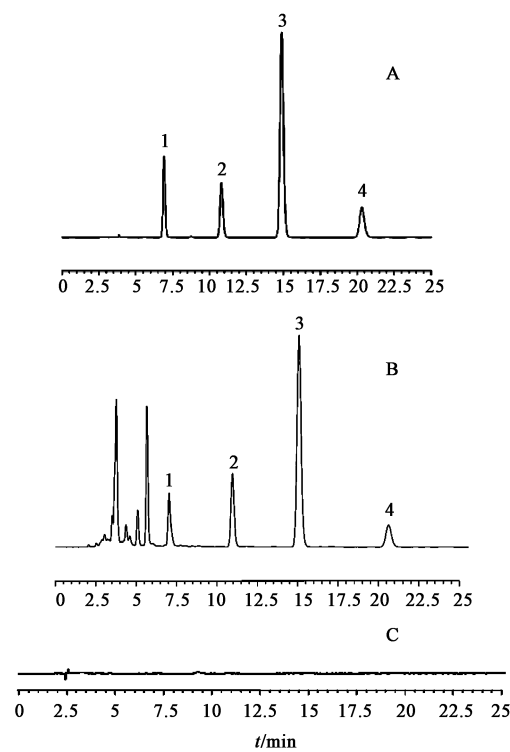
Shimadzu LC20A 型高效液相色谱仪(SIL-20A 自动进样器,SPD-M20A 二极管阵列检测器,LC Solution 色谱工作站,日本岛津公司),大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品(均购自中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号分别为 110757-200206, 100756-200210, 110796-201017, 110758-201013),新清宁片(中国中医科学院实验药厂),甲醇为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[3] Accurasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.4% 磷酸水溶液(85:15),流速 1 mL · min⁻¹,柱温 30 ℃,检测波长 254 nm,进样量 10 μL。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品 10.10,10.30,32.30,9.20 mg,置 250 mL 量瓶中,用少量三氯甲烷溶解,加甲醇稀释至刻度,摇匀,配成质量浓度分别为 0.040 4,0.041 2,0.129 2,0.036 8 g · L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备^[4] 取新清宁 20 片,除去包衣,研细(过三号筛),取细粉约 0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,密塞,称定质量,置水浴上加热回流 1.5 h,取出,放冷,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 25 mL,回收甲醇至干,残渣加盐酸溶液(2 ~ 27)27 mL,加入三氯甲烷 20 mL,置水浴中加热回流 30 min,立即冷却,移至分液漏斗中,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



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性供试品;
1. 大黄酸;2. 大黄素;3. 大黄酚;4. 大黄素甲醚

图 1 新清宁片 HPLC

烷层,水液用三氯甲烷振摇提取 3 次(15,10,10 mL),弃去水液,合并三氯甲烷液,以无水硫酸钠适量脱水,滤过,滤液回收三氯甲烷至干,残渣加乙酸乙酯 2 mL 使溶解,定量转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性供试品溶液的制备 根据新清宁片处方组成制备缺熟大黄的阴性样品,按 2.3 项下方法制备阴性供试品溶液,备用。

2.5 线性范围 分别精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液 0.5,2,5,10,15,20,25,50 μL 注入高效液相色谱仪,测定峰面积。以测得的峰面积积分值对被测物的进样量,用最小二乘法进行线性回归,得到各成分的回归方程及线性范围。结果见表 1。

表 1 新清宁片中大黄蒽醌的回归方程和线性范围

成分	回归方程	r	线性范围/μg
大黄素	$Y = 3.68 \times 10^6 X - 1.85 \times 10^4$	0.999 9	0.020 6 ~ 2.06
大黄酸	$Y = 4.09 \times 10^6 X - 2.10 \times 10^4$	0.999 9	0.020 2 ~ 2.02
大黄酚	$Y = 5.31 \times 10^6 X - 1.58 \times 10^5$	0.999 9	0.064 6 ~ 6.46
大黄素甲醚	$Y = 3.71 \times 10^6 X - 1.78 \times 10^4$	0.999 9	0.018 4 ~ 1.84

2.6 精密度试验 精密吸取同一份供试品溶液(批号 91202)10 μL,注入高效液相色谱仪,连续进样 6 次,测定大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的

峰面积。结果上述 4 种蒽醌类成分峰面积的 RSD 分别为 0.45% ,0.15% ,0.094% ,0.18% ,表明仪器的精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一批新清宁片(批号 91202)约 0.1 g,平行 6 份,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别进样 10 μL,测得新清宁片中大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量分别为 0.135% ,0.300% ,0.768% ,0.146% ,RSD 分别为 2.7% ,2.6% ,2.5% ,2.7% ,表明该方法的重复性良好。

2.8 稳定性试验 取同一份供试品溶液(批号 91202),分别于制备后 0,1,2,3,6,9,12,15,18,24 h 取样,精密吸取 10 μL 进样,测定大黄酸、大黄素、大

黄酚、大黄素甲醚的峰面积,计算 RSD。结果供试品溶液中上述 4 种蒽醌类成分峰面积的 RSD 分别为 0.77% ,0.42% ,0.29% ,0.46% ,表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.9 加样回收试验 取已知含量的新清宁片(批号 91202)粉末约 0.05 g,精密称定,平行 6 份,分别按成分含量-对照品加入量(1:1)的比例加入大黄酸(0.001 38 g · L⁻¹),大黄素(0.002 98 g · L⁻¹),大黄酚(0.007 70 g · L⁻¹),大黄素甲醚(0.001 46 g · L⁻¹)对照品溶液 50 mL,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取 10 μL 进样,测定峰面积,计算加样回收率及 RSD。结果见表 2。结果表明该方法的准确度良好。

表 2 新清宁片中蒽醌类成分的加样回收率试验

成分	称样	样品中含量/g	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
大黄酸	0.050 17	0.067 93	0.069	0.135 5	97.98	101.8	2.8
	0.050 50	0.068 38	0.069	0.138 3	101.3		
	0.050 58	0.068 49	0.069	0.140 1	103.8		
	0.050 17	0.067 93	0.069	0.139 8	104.2		
	0.050 50	0.068 38	0.069	0.136 6	98.88		
	0.050 17	0.067 93	0.069	0.139 9	104.3		
大黄素	0.050 17	0.150 3	0.149	0.301 5	101.5	99.86	2.4
	0.050 17	0.150 3	0.149	0.302 2	102.0		
	0.050 25	0.150 6	0.149	0.302 2	101.8		
	0.050 00	0.149 8	0.149	0.296 1	98.14		
	0.050 25	0.150 6	0.149	0.293 5	95.92		
	0.050 25	0.150 6	0.149	0.299 3	99.84		
大黄酚	0.050 17	0.385 4	0.385	0.789 3	104.9	102.1	3.2
	0.050 17	0.385 4	0.385	0.787 0	104.3		
	0.050 25	0.386 1	0.385	0.783 8	103.3		
	0.050 25	0.386 1	0.385	0.786 9	104.1		
	0.050 00	0.384 2	0.385	0.762 8	98.36		
	0.050 25	0.386 1	0.385	0.761 8	97.58		
大黄素甲醚	0.050 67	0.074 2	0.073	0.145 8	98.15	101.8	2.5
	0.050 25	0.073 6	0.073	0.145 8	98.98		
	0.050 25	0.073 6	0.073	0.149 0	103.3		
	0.049 58	0.072 6	0.073	0.148 2	103.5		
	0.049 58	0.072 6	0.073	0.148 1	103.4		
	0.049 58	0.072 6	0.073	0.148 1	103.4		

2.10 相对校正因子和相对保留值的测定^[5] 取 2.2 项下的大黄蒽醌对照品混合溶液,分别进样 0.5,2.5,10,15,20,25,50 μL,测定大黄蒽醌的峰面

积和保留时间,分别计算大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚与内参物大黄素之间的相对校正因子和相对保留值。结果见表 3。

由表 3 可知,测定结果与课题组前期确定的相对校正因子($f_{\text{大黄酸/大黄素}} = 1.13, f_{\text{大黄酚/大黄素}} = 1.46, f_{\text{大黄酸甲醚/大黄素}} = 1.01$)和相对保留值($r_{\text{大黄酸/大黄素}} = 0.66, r_{\text{大黄酚/大黄素}} = 1.41, r_{\text{大黄素甲醚/大黄素}} = 1.94$)^[3]相比,无显著性差异,RSD < 5%。证明 QAMS 建立的上述 RCF 和 RT_R 准确可靠,可用于含大黄蒽醌类成

分的中药及其制剂的含量测定。
2.11 QAMS 与 ESM 测定结果比较 取 20 批新清宁片,按 **2.3** 项下方法制备供试品溶液。精密吸取对照品溶液与供试品溶液进样含量测定。分别采用 ESM 和 QAMS 对新清宁片中 4 种蒽醌类成分进行定位并计算含量,结果见表 4,5。

表 3 大黄蒽醌类成分的相对校正因子和相对保留值

进样量/μL	相对校正因子(RCF)			相对保留值		
	$f_{\text{大黄酸/大黄素}}$	$f_{\text{大黄酚/大黄素}}$	$f_{\text{大黄素甲醚/大黄素}}$	$r_{\text{大黄酸/大黄素}}$	$r_{\text{大黄酚/大黄素}}$	$r_{\text{大黄素甲醚/大黄素}}$
0.5	1.080	1.411	1.018	0.641	1.374	1.879
2	1.100	1.416	1.011	0.641	1.374	1.878
5	1.105	1.417	1.013	0.641	1.376	1.879
10	1.107	1.418	1.014	0.640	1.378	1.882
15	1.107	1.419	1.014	0.640	1.381	1.884
20	1.107	1.421	1.016	0.640	1.382	1.885
25	1.107	1.423	1.017	0.640	1.384	1.887
50	1.107	1.438	1.016	0.640	1.383	1.882

表 4 QAMS 与 ESM 对 4 种大黄蒽醌类成分色谱峰的定位($n = 2$)

min

批号	大黄素	大黄酸			大黄酚			大黄素甲醚		
	μ_s	μ_i	X_i	相对误差/%	μ_i	X_i	相对误差/%	μ_i	X_i	相对误差/%
090201	11.01	7.04	7.03	-0.19	15.11	15.63	3.4	20.71	21.38	3.2
090301	10.94	7.02	6.99	-0.42	15.05	15.53	3.2	20.58	21.25	3.3
090901	10.90	6.98	6.96	-0.35	15.00	15.47	3.2	20.51	21.16	3.2
091001	10.83	6.96	6.92	-0.63	14.89	15.38	3.3	20.32	21.04	3.5
091002	11.00	7.04	7.03	-0.21	15.13	15.62	3.3	20.70	21.37	3.3
091201	11.01	7.05	7.03	-0.20	15.11	15.63	3.4	20.72	21.39	3.2
091202	9.53	6.01	6.29	4.7	13.71	13.44	-1.9	19.14	18.50	-3.3
100402	10.84	6.96	6.93	-0.50	14.92	15.39	3.2	20.36	21.06	3.4
100303	10.99	7.04	7.02	-0.26	15.09	15.60	3.4	20.66	21.35	3.4
100403	10.87	6.98	6.94	-0.56	14.91	15.43	3.5	20.38	21.11	3.6
100404	11.00	7.04	7.02	-0.17	15.10	15.61	3.4	20.68	21.36	3.3
100501	10.80	6.94	6.90	-0.66	14.84	15.33	3.4	20.25	20.98	3.6
100502	10.79	6.94	6.89	-0.70	14.82	15.32	3.3	20.22	20.96	3.6
100503	10.98	7.03	7.01	-0.31	15.07	15.59	3.5	20.65	21.33	3.3
100504	11.00	7.04	7.02	-0.18	15.10	15.61	3.4	20.68	21.36	3.3
101003	10.79	6.94	6.89	-0.69	14.82	15.31	3.3	20.23	20.95	3.6
101004	10.78	6.93	6.88	-0.74	14.81	15.30	3.3	20.21	20.93	3.6
101103	11.10	7.09	7.09	0.05	15.22	15.76	3.5	20.88	21.56	3.3
101104	11.00	7.03	7.02	-0.10	15.09	15.62	3.5	20.68	21.37	3.3
101201	11.00	7.03	7.02	-0.09	15.09	15.61	3.4	20.68	21.36	3.3

注: $X_i = \mu_s \times r_{i/s}$,相对误差 = $(X_i - \mu_i) / \mu_i \times 100\%$, X 为 QAMS 法计算相对保留时间值, μ 为外标法实测值, i 为待测物, s 为内参物, r 为相对保留值, $r_{\text{大黄酸/大黄素}} = 0.66, r_{\text{大黄酚/大黄素}} = 1.41, r_{\text{大黄素甲醚/大黄素}} = 1.94$ (表 5 同)。

表 5 QAMS 与 ESM 测得的 4 种大黄蒽醌类成分 (n = 2)

mg · g⁻¹

批号	大黄素	大黄酸			大黄酚			大黄素甲醚		
	μ_s	μ_i	Y_i	相对误差/%	μ_i	Y_i	相对误差/%	μ_i	Y_i	相对误差/%
090201	2.95	1.65	1.60	-3.0	7.61	7.35	-3.4	1.63	1.67	2.5
090301	3.31	2.28	2.21	-3.1	10.8	10.41	-3.3	1.98	2.03	2.5
090901	2.83	1.62	1.57	-3.1	7.61	7.36	-3.3	1.54	1.58	2.6
091001	2.67	1.46	1.42	-2.7	7.26	7.02	-3.3	1.46	1.50	2.7
091002	2.77	1.46	1.42	-2.7	6.83	6.60	-3.4	1.37	1.41	2.9
091201	2.58	1.46	1.41	-3.4	6.57	6.35	-3.4	1.26	1.29	2.4
091202	2.98	1.35	1.34	-0.74	7.67	7.43	-3.13	1.49	1.54	3.36
100402	2.12	1.46	1.42	-2.8	3.05	2.94	-3.6	0.80	0.82	2.5
100303	2.06	1.45	1.41	-2.8	3.11	3.00	-3.5	0.77	0.79	2.6
100403	2.12	1.43	1.39	-2.8	2.99	2.88	-3.7	0.73	0.75	2.7
100404	2.00	1.37	1.33	-2.9	2.91	2.81	-3.4	0.77	0.79	2.6
100501	2.04	1.36	1.32	-2.9	2.88	2.79	-3.1	0.74	0.76	2.7
100502	2.00	1.37	1.33	-2.9	2.78	2.69	-3.2	0.68	0.70	2.9
100503	1.77	1.23	1.19	-3.3	2.50	2.42	-3.2	0.65	0.66	1.5
100504	1.83	1.28	1.24	-3.1	2.64	2.55	-3.4	0.68	0.70	2.9
101003	1.96	1.35	1.31	-3.0	2.73	2.64	-3.3	0.69	0.70	1.5
101004	2.08	1.37	1.33	-2.9	2.90	2.80	-3.5	0.72	0.74	2.8
101103	2.03	1.41	1.37	-2.8	2.95	2.85	-3.4	0.74	0.76	2.7
101104	1.89	1.34	1.30	-3.0	2.82	2.73	-3.2	0.76	0.78	2.6
101201	2.03	1.43	1.39	-2.8	2.94	2.84	-3.4	0.76	0.78	2.6

注: $Y_i = \frac{\mu_s}{f_{i/s}} \times \frac{A_i}{A_s}$, 相对误差 = $(Y_i - \mu_i) / \mu_i \times 100\%$, Y 为 QAMS 法计算成分质量分数值, A 为峰面积, i, s, r, μ 同表 4。 $f_{\text{大黄酸/大黄素}} = 1.13$, $f_{\text{大黄酚/大黄素}} = 1.46$, $f_{\text{大黄素甲醚/大黄素}} = 1.01$ 。

由表 4,5 结果可知,2 种方法所得的含量及对色谱峰的定位均无显著性差异,RSD < 5%。表明 QAMS 可用于新清宁片的质量评价。

3 讨论

本文测定的 20 批新清宁片不同批次样品中 4 种大黄蒽醌类成分的含量波动不大,大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的质量分数分别在 1.23 ~ 2.28,1.77 ~ 3.3,2.5 ~ 10.8,0.65 ~ 1.98 mg · g⁻¹,相邻批次的含量相对较稳定。本实验将课题组前期建立的三黄片中大黄蒽醌类成分的 QAMS^[3]直接应用于新清宁片中相同成分的含量测定,取得了满意的效果。结果表明,将经过系统适用性考察的 QAMS 相对校正因子和相对保留值直接用于含相同化学成分中药制剂的质量控制是可行的。“一测多评”作为新的质量评价模式具有广阔的发展前景,尤其在中药复方制剂中,可更好地发挥其快速、准

确、简便、价廉的优势。

[参考文献]

[1] 刘颖,韩曼雪,张小茜. HPLC 测定新清宁片中大黄蒽醌类成分的含量[J]. 中国中药杂志,2006,31(22):1899.

[2] 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.

[3] 王钰莹,冯伟红,杨菲,等. “一测多评”法测定三黄片中大黄蒽醌类成分含量[J]. 中国中药杂志,2012,37(2):212.

[4] 中国药典. 一部[S]. 2010:1200.

[5] 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.

[责任编辑 仝燕]