

一测多评法同时测定扶正固本颗粒中6种成分的含量^Δ

仝立国*, 牛艳艳, 王若瑜, 吉海杰, 宋美卿, 冯玛莉, 夏召弟, 汪欣文[#](山西省中医药研究院, 太原 030012)

中图分类号 R944.2⁷;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)02-0225-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.02.17

摘要 目的:建立扶正固本颗粒中2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷、黄芩苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素等6种成分含量的测定方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Dikma Diamonsil C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(梯度洗脱),检测波长为275 nm(0~8 min)、320 nm(8~9 min)和275 nm(9~33 min),流速为1.0 mL/min,柱温为25 ℃,进样量为10 μL。以黄芩苷为基准物,采用多点校正法和斜率校正法分别计算另外5种成分的相对校正因子(f_{ks}),并采用保留时间差值法对待测成分进行色谱峰定位,比较上述两种一测多评法所得计算值与外标法实测值的差异。结果:2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷、黄芩苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素检测进样量的线性范围分别为0.053~2.12、0.163~6.52、0.059~2.36、0.021 6~0.864、0.03~1.2、0.021~0.84 μg($r>0.999$),精密度、稳定性(12 h)、重复性试验的RSD均小于3%;平均加样回收率为98.72%~99.82%(RSD为0.89%~1.24%, $n=9$)。以黄芩苷为基准物,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素多点校正法的 f_{ks} 分别为1.172、0.528、1.479、1.820、2.534,斜率校正法的 f_{ks} 分别为1.234、0.550、1.559、1.939、2.664;3种方法测得10批扶正固本颗粒中6种成分含量的RSD为0.29%~2.77%($n=10$);两种一测多评法测得结果与外标法的Pearson相关系数均不低于0.999 9($P<0.001$)。结论:成功建立了可用于同时测定扶正固本颗粒中6种成分含量的一测多评法。

关键词 一测多评法;扶正固本颗粒;2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷;黄芩苷;淫羊藿苷;汉黄芩苷;黄芩素;汉黄芩素;含量

Simultaneous Determination of the Contents of 6 Components in Fuzheng Guben Granules by QAMS

TONG Ligu, NIU Yanyan, WANG Ruoyu, JI Haijie, SONG Meiqing, FENG Mali, XIA Zhaodi, WANG Xinwen (Shanxi Academy of TCM, Taiyuan 030012, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for content determination of 6 components in Fuzheng guben granules, such as 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene glucoside, baicalin, icariin, scutellarin, baicalein and wogonin. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Dikma Diamonsil C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were set at 275 nm (0-8 min), 320 nm(8-9 min) and 275 nm(9-33 min). The column temperature was set at 25 ℃, and sample size was 10 μL. With baicalin as reference material, the relative correction factors (f_{ks}) of other five components were calculated by multi-point

- 抗氧化功能研究[J].植物生理学报,2019,55(12):1785-1796.
- [14] 陈石梅,黄比翼,黄锁义.草果醇提取物不同极性部位的体外抗氧化活性研究[J].中国药房,2020,31(8):953-956.
- [15] 罗燕,和兴萍,李雪,等.几种细胞脂肪变性模型的建立与比较分析[J].中华中医药学刊,2017,35(8):2074-2077.
- [16] 樊岫珊.羟基自由基诱导DNA损伤机理研究进展[J].生物学杂志,2017,34(1):80-84.
- [17] 张蕊,仝媛媛,陈龙,等.天然来源的抗氧化剂的临床应用及研究进展[J].山东化工,2020,49(22):48-52.
- [18] 马丹丹,汪雯翰,薛蓓,等.桦褐孔菌降糖活性成分及治疗糖尿病机制研究进展[J].南京师大学报(自然科学版),2019,42(4):111-117.
- [19] 刘玉婷,李井雷.多糖体外抗氧化活性研究进展[J].食品研究与开发,2019,40(6):214-219.
- [20] 李婧雯,包怡红.不同溶剂的蒲公英根提取物的抗氧化活性及降糖能力比较分析[J].现代食品科技,2020,36(5):64-72.
- [21] SAGAR NA, PAREEK S, GONZALEZ-AGUILAR GA. Quantification of flavonoids, total phenols and antioxidant properties of onion skin: a comparative study of fifteen Indian cultivars[J]. J Food Sci Tech, 2020, 57 (7) : 2423-2432.
- [22] 张丹,周波,邓溢,等.非诺贝特对非酒精性脂肪性肝病小鼠模型肠道菌群多样性的影响[J].临床肝胆病杂志,2020,36(4):829-834.

Δ 基金项目:山西省中药现代化关键技术研究振东专项基金项目(No.2016ZD0302)

* 主管药师,硕士。研究方向:中药药效物质基础及质量标准。E-mail: dboy-007@163.com

通信作者:副主任医师。研究方向:肿瘤内科学。E-mail: zf-xfdy@163.com

(收稿日期:2020-09-13 修回日期:2020-12-13)
(编辑:邹丽娟)

correction method and slope correction method; the retention time difference method was used to locate the chromatographic peaks; the calculation values obtained by above 2 QAMS were compared with measured values of external standard method. RESULTS: The linear range of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene glucoside, baicalin, icariin, scutellarin, baicalein and wogonin were 0.053-2.12, 0.163-6.52, 0.059-2.36, 0.021 6-0.864, 0.03-1.2, 0.021-0.84 μg ($r>0.999$), respectively. RSDs of precision, stability (12 h) and reproducibility tests were all lower than 3%. Average recoveries were 98.72%-99.82% (RSDs were 0.89%-1.24%, $n=9$). Using baicalin as reference material, f_{ks} of multi-point correction method for 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene glucoside, icariin, scutellarin, baicalein and wogonin were 1.172, 0.528, 1.479, 1.820 and 2.534, respectively; f_{ks} of slope correction method were 1.234, 0.550, 1.559, 1.939, 2.664. RSDs of 6 components in 10 batches of Fuzheng guben granules by 3 methods were 0.29%-2.77% ($n=10$), respectively. Pearson correlation coefficient was not lower than 0.999 9 ($P<0.001$) in measured values between QAMS and external standard method. CONCLUSIONS: QAMS method is established successfully for simultaneous determination of 6 components in Fuzheng guben granules.

KEYWORDS QAMS; Fuzheng guben granules; 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene glucoside; Baicalin; Icariin; Scutellarin; Baicalein; Wogonin; Content

扶正固本颗粒由黄芩、淫羊藿、何首乌等8味中药组成,具有益气养阴、凉血解毒的功效,可作为食管癌以及胃寒气阴两虚兼热毒症患者放、化疗的合并用药,其制剂标准被载于国家药品监督管理局国家药品标准[WS-5250(B-0250)-2002]中。目前,扶正固本颗粒多用于肿瘤患者的辅助治疗。虽然,中药并非是公认的肿瘤治疗的有效手段,但随着中药补益作用和抗肿瘤作用研究的逐渐深入,其在肿瘤治疗中的地位越来越高,应用也日益广泛^[1-2]。扶正固本颗粒现行质量标准中含量测定仅以黄芩苷单一成分为指标^[3],难以全面控制其质量,而采用传统方法对多成分同时进行测定又会使检测成本大幅增加。一测多评法在控制检测成本的同时,对多成分进行了控制,可以全面评价中药及其制剂的质量^[4]。本课题组前期采用网络药理学方法对扶正固本颗粒药效物质基础进行了分析,其有效成分主要集中于黄芩、淫羊藿、何首乌、女贞子以及茜草中。基于此,本研究拟选择黄酮类、蒽醌类、裂环环烯醚萜苷类以及二苯乙烯苷类等成分作为待测指标,采用一测多评法进行含量测定,旨在为更全面控制扶正固本颗粒的质量提供方法依据。

1 材料

1.1 仪器

本文所用实验仪器有:Aglient 1200型高效液相色谱仪(包括真空脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Chemstation B.04.02型色谱工作站,美国Aglient公司)、XS105型分析天平(瑞士Mettler Toledo公司)、明澈-D24UV型超纯水器(美国Millipore公司)、S60H型超声波清洗机(德国Elma公司)。

1.2 药品与试剂

扶正固本颗粒(批号20160603、20161104、20170806、20170401、20171012、20180302、20180601、20181002、20190301、20190603,规格15 g/袋)和黄芩、淫羊藿、女贞

子、何首乌、地黄、茜草、黄精、人参药材均由山西振东开元制药有限公司提供,药材经山西省药品检验所高天爱主任药师鉴定并确定为真品。

黄芩苷对照品(批号110715-201318,纯度93.3%)、黄芩素对照品(批号111595-200604,纯度100%)、淫羊藿苷对照品(批号110737-201516,纯度94.2%)、汉黄芩素对照品(批号111514-201706,纯度100%)、汉黄芩苷对照品(批号112002-201702,纯度98.5%)、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷对照品(批号110844-201109,纯度94.7%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

以Dikma Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱;以乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~8 min, 20% A→22.5% A; 8~18 min, 22.5% A→35% A; 18~22 min, 35% A; 22~26 min, 35% A→55% A; 26~30 min, 55% A; 30~31 min, 55% A→20% A; 31~33 min, 20% A);检测波长为275 nm(0~8 min)、320 nm(8~9 min)和275 nm(9~33 min);流速为1.0 mL/min;柱温为25 $^{\circ}\text{C}$;进样量为10 μL 。

2.2 供试品溶液制备

取扶正固本颗粒约2 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入80%甲醇50 mL,称定质量,超声(功率250 W,频率40 kHz)处理30 min,放冷至室温,再次称定质量,用80%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 对照品溶液制备

分别称取2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷、黄芩苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品各适量,置于同一量瓶中,用80%甲醇溶解并稀释,制成

质量浓度分别为106、326、118、43.2、60.0、42.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液,备用。另称取2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷对照品15.93 mg、黄芩苷对照品34.3 mg、淫羊藿对照品10.81 mg、黄芩素对照品13.61 mg,分别置于10 mL量瓶中;再称取汉黄芩苷对照品21.04 mg、汉黄芩素对照品18.4 mg,分别置于20 mL量瓶中;均用80%甲醇溶解并稀释至刻度,制成单一对照品贮备液,备用。

2.4 阴性对照溶液制备

按处方比例和制剂工艺分别制备不含黄芩、淫羊藿、何首乌及以上3个都不含的阴性样品,再按“2.2”项下方法制备成相应的阴性对照溶液,备用。

2.5 专属性考察

分别精密吸取上述混合对照品溶液、供试品溶液(批号20170806)和各阴性对照溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷、黄芩苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的保留时间分别为8.298、16.367、19.063、20.710、27.061、31.088 min,分离度均大于1.5,阴性对照溶液在相应位置无干扰,详见图1。

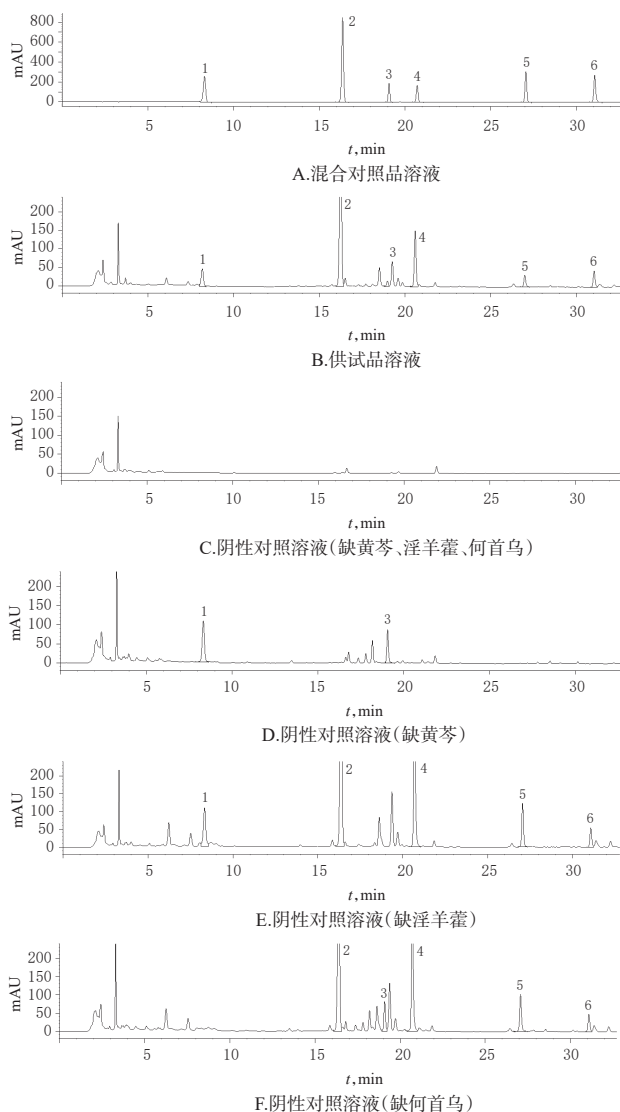
2.6 方法学考察

2.6.1 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、15.0、20.0 μL ,按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积(y)为纵坐标、进样量($x, \mu\text{g}$)为横坐标绘制标准曲线。结果,在各自线性范围内,各待测成分进样量与峰面积均呈良好的线性关系($r > 0.999$),结果见表1。

2.6.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液10 μL ,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,连续测定3 d,记录峰面积并分别计算各待测成分峰面积的RSD。结果,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷、黄芩苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素峰面积的日内RSD分别为0.19%、0.17%、0.19%、0.18%、0.11%、0.09% ($n=6$),日间RSD分别为0.20%、0.11%、0.18%、0.10%、0.11%、0.14% ($n=3$),表明仪器精密度良好。

2.6.3 稳定性试验 取同一批次扶正固本颗粒(批号20170806),按“2.2”项下方法制备供试品溶液,于室温下放置0、1.5、3.5、5.7、8.5、10.5、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并分别计算各待测成分峰面积的RSD。结果,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷、黄芩苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素峰面积的RSD分别为1.66%、0.26%、0.90%、1.69%、0.72%、0.53% ($n=8$),表明供试品溶液在室温下放置12 h内稳定性良好。

2.6.4 重复性试验 取同一批次扶正固本颗粒(批号



注:1.2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷;2.黄芩苷;3.淫羊藿苷;4.汉黄芩苷;5.黄芩素;6.汉黄芩素

Note: 1. 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene glucoside; 2. baicalin; 3. icariin; 4. scutellarin; 5. baicalein; 6. wogonin

图1 扶正固本颗粒中6种成分的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of 6 components in Fuzheng guben granules

表1 扶正固本颗粒中6种成分的线性关系考察结果

Tab 1 Results of linear relationship investigation of 6 components in Fuzheng guben granules

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷	$y=2\ 378.8x+4\ 240.8$	1.000 0	0.053~2.12
黄芩苷	$y=1\ 928.4x+92.122\ 0$	0.999 6	0.163~6.52
淫羊藿苷	$y=1\ 060.7x+0.750\ 7$	1.000 0	0.059~2.36
汉黄芩苷	$y=3\ 006.7x-3.032\ 4$	1.000 0	0.021 6~0.864
黄芩素	$y=3\ 739.7x-9.928\ 3$	1.000 0	0.03~1.2
汉黄芩素	$y=5\ 136.3x-4.403\ 5$	1.000 0	0.021~0.84

20170806),共6份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算含量。结果,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖

苷、黄芩苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素含量的RSD分别为2.25%、1.56%、2.85%、1.89%、2.91%、2.12% (n=6),表明方法重复性良好。

2.6.5 加样回收率试验 取同一批次扶正固本颗粒(批号20170806),共9份,3份1组,每份约1g,分别精密加入“2.3”项下2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷、黄芩苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素单一对照品贮备液适量,加入量为供试品中各待测成分已知量的80%、100%、120%;随后精密加入80%甲醇适量,使总体积为50 mL,按“2.2”项下方法处理后,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率,结果见表2。

2.6.6 耐用性试验 分别考察流动相各梯度点比例变化±5%、水相磷酸浓度变化±0.05%、柱温变化±5℃、检测波长变化±5 nm、流速变化±20%以及不同色谱柱[Dimak Diamonsil C₁₈、TIANHE Kromasil C₁₈、ELITE SinaChrom C₁₈(均为250 mm×4.6 mm,5 μm)],其余色谱条件同“2.1”项时分离度和理论板数的变化。结果,各梯度点比例变化±5%、检测波长变化±5 nm以及采用3根色谱柱时,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷、黄芩苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素色谱峰的分离度均大于1.5,理论板数(分别以各待测成分计)均大于15 000;而在水相磷酸浓度变化为-0.05%、柱温变化±5℃、流速变化±20%时,淫羊藿色谱峰的分离度不能满足分析要求,其余5个待测成分色谱峰的分离度均大于1.5,理论板数(分别以各待测成分计)均大于15 000。这表明水相磷酸浓度、柱温以及流速对淫羊藿苷的检测具有较大影响,即该成分检测条件要求较为严格、耐用性稍差;而其余5个待测成分在上述条件变动的情况下仍具有较好的分离度及理论板数,耐用性较好。

2.7 相对校正因子计算

2.7.1 多点校正法 参考文献方法^[5-6],以多个质量浓度点计算所得校正因子的平均值作为相对校正因子。计算公式为:

$$f_{k/s} = \frac{c_s \cdot A_k}{c_k \cdot A_s} \dots\dots\dots \textcircled{1}$$

待测成分质量浓度计算公式为:

$$c_k' = \frac{c_s \cdot A_k'}{f_{k/s} \cdot A_s} \dots\dots\dots \textcircled{2}$$

两式中, $f_{k/s}$ 为相对校正因子; c_s 为参照物质质量浓度; A_s 为参照物质峰面积; c_k 为其他对照组分质量浓度; A_k 为其他对照组分峰面积; c_k' 为待测组分质量浓度; A_k' 为待测组分峰面积。应用此法需先获得一个参照物质的质量浓度 c_s 和峰面积 A_s 。

以黄芩苷为基准峰(即参照物质,黄芩苷含量高且与其他色谱峰的分离度良好,下同),取6种待测成分的

表2 扶正固本颗粒中6种成分的加样回收率试验结果
Tab 2 Results of sample recovery tests of 6 components in Fuzheng guben granules

待测成分	已知量,	加入量,	测得量,	回收率,	平均回收率, RSD,				
	mg	mg	mg	%	%	%			
2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷	0.239	0.191	0.427	98.43	99.08	1.10			
	0.247	0.191	0.434	97.91					
	0.238	0.191	0.430	100.52					
	0.240	0.239	0.478	99.58					
	0.242	0.239	0.483	100.84					
	0.230	0.239	0.465	98.33					
	0.254	0.286	0.535	98.25					
	0.251	0.286	0.532	98.25					
	0.255	0.286	0.540	99.65					
	黄芩苷	3.310	2.608	5.889			98.89	98.82	0.89
		3.419	2.608	5.986			98.43		
		3.297	2.608	5.891			99.46		
		3.326	3.260	6.506			97.55		
		3.356	3.260	6.593			99.29		
		3.179	3.260	6.388			98.44		
3.516		3.912	7.451	100.59					
3.474		3.912	7.312	98.11					
3.524		3.912	7.382	98.62					
淫羊藿苷	0.163	0.130	0.291	98.46	98.72	0.90			
	0.169	0.130	0.298	99.23					
	0.163	0.130	0.289	96.92					
	0.164	0.162	0.324	98.77					
	0.166	0.162	0.326	98.77					
	0.157	0.162	0.318	99.38					
	0.174	0.195	0.367	98.97					
	0.172	0.195	0.363	97.95					
	0.174	0.195	0.369	100.00					
	汉黄芩苷	0.371	0.302	0.673			100.00	99.50	1.01
		0.383	0.302	0.683			99.34		
0.369		0.302	0.671	100.00					
0.373		0.378	0.745	98.41					
0.376		0.378	0.748	98.41					
0.356		0.378	0.739	101.32					
0.394		0.454	0.843	98.90					
0.389		0.454	0.845	100.44					
0.395		0.454	0.843	98.68					
黄芩素		0.079 7	0.068 0	0.148	100.44	98.78	1.12		
		0.082 3	0.068 0	0.149	98.09				
	0.079 4	0.068 0	0.146	97.94					
	0.080 1	0.085 7	0.164	97.90					
	0.080 8	0.085 7	0.165	98.25					
	0.076 6	0.085 7	0.162	99.65					
	0.084 7	0.102	0.184	97.35					
	0.083 7	0.102	0.185	99.31					
	0.084 9	0.102	0.187	100.10					
	汉黄芩素	0.048 0	0.036 8	0.084 2	98.37			99.82	1.24
		0.049 6	0.036 8	0.086 5	100.27				
0.047 8		0.036 8	0.084 1	98.64					
0.048 3		0.046 0	0.094 2	99.78					
0.048 7		0.046 0	0.095 1	100.87					
0.046 1		0.046 0	0.092 4	100.65					
0.051 0		0.055 2	0.105	97.83					
0.050 4		0.055 2	0.106	100.72					
0.051 1		0.055 2	0.107	101.27					

混合对照品溶液按“2.1”项下色谱条件进样测定,进样量分别为0.5、1、2、5、10、15 μL,记录峰面积,按公式①计算

2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的相对校正因子,结果见表3。

表3 以黄芩苷为基准峰计算的其余5种成分的相对校正因子(多点校正法)

Tab 3 Relative correction factors of other 5 components calculated with baicalin as reference peak (multi-point correction method)

待测成分	进样量, μL						平均值	RSD, %
	0.5	1	2	5	10	15		
2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷	1.188	1.188	1.186	1.188	1.186	1.096	1.172	3.171
淫羊藿苷	0.523	0.527	0.522	0.525	0.531	0.538	0.528	1.181
汉黄芩苷	1.441	1.48	1.467	1.475	1.491	1.521	1.479	1.797
黄芩素	1.763	1.791	1.804	1.822	1.856	1.884	1.820	2.419
汉黄芩素	2.534	2.487	2.506	2.526	2.55	2.597	2.534	1.506

2.7.2 斜率校正法 参考文献方法^[3-4],标准曲线回归方程 $y=ax+b$ 中, $x=(y-b)/a=y/a-b/a$,由于 b 值通常为误差所致,在 a/b 值大于100时, b/a 值可以忽略不计,此时可以直接用 $x=y/a$ 计算含量。校正因子可以二者的斜率 a 之比直接计算,相对校正因子计算公式为:

$$f_{k/s} = \frac{a_k}{a_s} \dots\dots\dots \textcircled{3}$$

待测成分质量浓度计算公式为:

$$c_k' = \frac{A_k'}{a_s \cdot f_{k/s}} \dots\dots\dots \textcircled{4}$$

两式中, a_s 为参照物质斜率; a_k 为其他对照组分斜率。

以黄芩苷为基准峰,将“2.6.1”项下6种待测成分回归方程的相应数据,代入公式③计算2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的相对校正因子,结果见表4。

表4 以黄芩苷为基准峰计算的其余5种成分的相对校正因子(斜率校正法)

Tab 4 Relative correction factors of other 5 components calculated with baicalin as reference peak (slope correction method)

待测成分	斜率	相对校正因子
2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷	2.378.8	1.234
淫羊藿苷	1.060.7	0.550
汉黄芩苷	3.006.7	1.559
黄芩素	3.739.7	1.939
汉黄芩素	5.136.3	2.664

2.8 待测组分色谱峰定位

2.8.1 相对保留时间法 参考文献方法^[7-8],利用相对保留时间及二极管阵列检测器测定的紫外吸收光谱对各组分进行定位及确认,以各待测组分色谱峰与黄芩苷色谱峰的保留时间之比计算相对保留时间。以黄芩苷为基准峰,计算得“2.6.6”项不同测试条件下2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩

素、汉黄芩素的相对保留时间分别为0.526、1.164、1.261、1.643、1.893,其RSD分别为6.52%、0.97%、1.61%、2.66%、2.56%($n=13$)。

2.8.2 保留时间差值法 参考文献方法^[7],利用相对保留时间及二极管阵列检测器测定的紫外吸收光谱对各组分进行定位及确认,以各待测组分色谱峰与黄芩苷色谱峰的保留时间的差值计算相对保留时间。以黄芩苷为基准峰,计算得“2.6.6”项不同测试条件下2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的相对保留时间分别为-7.886、2.712、4.343、10.697、14.864,其RSD分别为3.21%、3.15%、2.68%、1.35%、1.46%($n=13$)。

对比两种方法结果的RSD值发现,保留时间差值法计算的相对保留时间的精密度总体更高,故后续以保留时间差值法对待测组分进行定位。

2.9 含量测定比较

取10批扶正固本颗粒,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,分别用外标法和两种一测多评法测定或计算2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷、黄芩苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的含量,再计算RSD值;以及两种一测多评法的测定结果分别与外标法的Pearson相关系数(r),上述统计学处理均由SPSS 22.0软件完成,结果见表5。

由表5结果显示,两种一测多评法与外标法所得各待测成分含量的RSD分别为2.77%、2.58%、0.14%、0.51%、0.96%、0.29%,两者相关性好(r 均不低于0.999 9, $P<0.001$),说明两种一测多评法与外标法结果基本一致。

3 讨论

本研究选择2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷、黄芩苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素等6种成分进行一测多评分析研究,其成分主要来源于黄芩、淫羊藿、何首乌等3味中药,是扶正固本颗粒的主要药效成分^[9-11]。在前期试验过程中,本课题组曾对何首乌中的毛蕊花糖苷、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、大黄酚、淫羊藿中的宝藿苷I,女贞子中的女贞苷和特女贞苷,茜草中的大叶茜草素、羟基茜草素等成分进行检测,发现毛蕊花糖苷、女贞苷、特女贞苷、大叶茜草素、羟基茜草素等成分在该色谱条件下未被检出,大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、大黄酚、宝藿苷I等成分在该色谱条件下响应较低,故选择了成分含量相对较高且分离度较好的6种成分。

一测多评法的两个关键问题:(1)对各成分的定位。本文比较了相对保留时间和保留时间差值两种较为简单的方法对各成分进行定位的效果。结果显示,保

表5 多点校正法、斜率校正法与外标法测定结果比较

Tab 5 Comparison of multi-point calibration method, slope correction method and external standard method

批号	2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷含量,mg/g			黄芩苷含量,mg/g			淫羊藿苷含量,mg/g			汉黄芩苷含量,mg/g			黄芩素含量,mg/g			汉黄芩素含量,mg/g		
	多点校正	斜率校正	外标法	多点校正	斜率校正	外标法	多点校正	斜率校正	外标法	多点校正	斜率校正	外标法	多点校正	斜率校正	外标法	多点校正	斜率校正	外标法
20160603	0.185	0.184	0.176	2.771	2.897	2.771	0.109	0.109	0.109	0.444	0.440	0.444	0.036	0.035	0.035	0.079	0.079	0.079
20161104	0.165	0.164	0.157	2.830	2.958	2.830	0.112	0.112	0.112	0.329	0.326	0.329	0.089	0.088	0.089	0.056	0.056	0.056
20170806	0.246	0.245	0.234	3.239	3.385	3.239	0.160	0.160	0.160	0.363	0.360	0.363	0.078	0.077	0.078	0.047	0.047	0.047
20170401	0.184	0.183	0.175	2.725	2.848	2.725	0.108	0.108	0.108	0.437	0.433	0.437	0.050	0.049	0.050	0.078	0.078	0.078
20171012	0.178	0.177	0.169	2.813	2.940	2.813	0.109	0.109	0.109	0.398	0.394	0.398	0.059	0.058	0.059	0.070	0.069	0.070
20180302	0.193	0.192	0.183	2.914	3.046	2.914	0.125	0.125	0.125	0.333	0.330	0.333	0.084	0.082	0.083	0.051	0.051	0.051
20180601	0.226	0.224	0.215	3.078	3.217	3.078	0.136	0.136	0.136	0.412	0.408	0.412	0.067	0.065	0.066	0.064	0.063	0.064
20181002	0.197	0.196	0.188	2.922	3.055	2.922	0.123	0.124	0.123	0.369	0.365	0.369	0.077	0.075	0.076	0.060	0.060	0.060
20190301	0.210	0.209	0.200	3.050	3.188	3.050	0.128	0.128	0.128	0.391	0.388	0.392	0.072	0.071	0.072	0.063	0.063	0.063
20190603	0.202	0.201	0.192	2.890	3.021	2.890	0.120	0.121	0.120	0.407	0.404	0.408	0.063	0.062	0.062	0.069	0.069	0.069
r	1.000 0	1.000 0		1.000 0	1.000 0		1.000 0	1.000 0		1.000 0	1.000 0		0.999 9	1.000 0		1.000 0	0.999 9	
P	<0.001	<0.001		<0.001	<0.001		<0.001	<0.001		<0.001	<0.001		<0.001	<0.001		<0.001	<0.001	

留时间差值法的RSD值小于相对保留时间法的RSD值,提示保留时间差值法能够相对更好地对待测成分进行定位;(2)相对校正因子的计算。本文比较了多点校正法、斜率校正法以及外标法对各成分测定的结果。结果,3种方法所得的各成分含量之间无显著差异,提示多点校正法和斜率校正法计算的相对校正因子均可满足其余5种成分的定量要求。

随着中药现代研究的不断深入,中药药效成分的多样性和复杂性使得其多指标定量分析成为必然趋势,然而按照传统定量模式,势必存在对照品消耗量大,检验成本升高,计算繁琐、易出现误差等不利因素^[6]。中药一测多评质量评价模式则克服了以上缺点,尤其适合于企业或一些实验室对某类长期生产和需重复测定样品的例行检测,此法可提升分析检测的准确性和效率,并可大大地降低分析检测的成本^[7]。本研究借助高效液相色谱法对扶正固本颗粒中6种成分的一测多评方法进行研究,结果表明,通过两种一测多评法计算出的含量与外标法实际测量的含量相关性好,提示以黄芩苷为参照物质,采用一测多评法测定扶正固本颗粒中2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的含量具有良好的准确性和可操作性。该方法可用于相关企业及实验室的日常检验工作。

参考文献

[1] 李露露,张婵,焦士洁,等.扶正固本颗粒治疗晚期结肠癌合并贫血的临床研究[J].癌症进展,2017,15(9):1048-1051.

[2] 陈东基,李小军,付国翠,等.同期放化疗联合扶正固本颗粒治疗中晚期食管癌临床观察[J].中成药,2012,34(3):406-409.

[3] 朱艳容,李媛媛,倪艳,等.扶正固本颗粒的质量标准研究[J].中国药房,2011,22(23):2179-2181.

[4] 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.

[5] 何兵,杨世艳,张燕.一测多评中待测成分校正和定位的新方法研究[J].药学报,2012,47(12):1653-1689.

[6] 吕晓霞,陈宗良,陈桂茜,等.一测多评法在仙灵骨葆胶囊中多成分检测的应用研究[J].中草药,2016,47(24):4374-4378.

[7] 陈俊,许浚,张静雅,等.基于一测多评法对延胡索中生物碱类成分的质量控制研究[J].中草药,2016,47(3):493-498.

[8] 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):1448-1452.

[9] 王浩,杨健,周良云,等.何首乌化学成分与药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(13):192-205.

[10] 朱亚南,杨七妹,张硕,等.黄芩苷与黄芩素药理作用及机制研究进展[J].时珍国医国药,2020,31(4):921-925.

[11] 何丽君,江金井,陈豪,等.淫羊藿药理作用和临床应用的研究进展[J].中医临床研究,2020,12(2):17-20.

(收稿日期:2020-07-27 修回日期:2020-11-17)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅