

一测多评法测定清热解毒口服液中4种成分的含量^Δ

张振巍^{1*}, 张娜娜², 白丹丹¹, 于秋影¹, 石磊¹, 李月梅^{1#}(1.解放军第155中心医院, 河南开封 475003; 2.开封市中医院, 河南开封 475003)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)28-2676-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.28.29

摘要 目的:建立清热解毒口服液中4种主要活性成分的一测多评含量测定方法。方法:以黄芩苷为内标物,采用高效液相色谱法,建立其与其他3种成分绿原酸、连翘苷、栀子苷的相对校正因子,并用该校正因子进行计算,实现一测多评;同时采用外标法对4种成分进行含量测定,通过比较两法结果验证该方法的准确性。结果:建立的校正因子重复性较好,采用校正因子计算的含量值与外标法实测值偏差较小。结论:以黄芩苷、绿原酸、连翘苷、栀子苷为指标,采用一测多评法控制清热解毒口服液制剂的质量是可行的。

关键词 一测多评法;外标法;高效液相色谱法;校正因子;清热解毒口服液;含量测定

Content Determination of 4 Components in Qingre Jiedu Oral Liquid by QAMS

ZHANG Zhen-wei¹, ZHANG Na-na², BAI Dan-dan¹, YU Qiu-ying¹, SHI Lei¹, LI Yue-mei¹(1.No. 155 Central Hospital of PLA, Henan Kaifeng 475003, China; 2.Kaifeng Hospital of TCM, Henan Kaifeng 475003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop QAMS method for the content determination of 4 active components in Qingre jiedu oral liquid. METHODS: Using baicalin as internal standard, relative correction factors of baicalin to caffeotannic acid, forsythin and jasmunoidin were established by HPLC and calculated to achieve QAMS. The contents of 4 components in the samples were determined with the external standard method. The accuracy of the method was validated by compare the results of 2 method. RESULTS: Established correction factors showed sound reproducibility. No significant differences between the quantitative results of QAMS method and external standard method were observe. CONCLUSIONS: Using baicalin, caffeotannic acid, forsythin and jasmunoidin as index, QAMS is feasible for quality control of Qingre jiedu oral liquid.

KEY WORDS QAMS; External method; HPLC; Correction factor; Qingre jiedu oral liquid; Content determination

清热解毒口服液^[1]是《中国药典》2010年版(一部)成方制剂目录里收录的非处方药,含有黄芩、金银花、栀子、连翘等12味中药,具有清热解毒之功效,用于热毒壅盛所致的发热面赤、烦躁口渴、咽喉肿痛以及流感、上呼吸道感染见上述证候者。药典中该药含量测定部分以黄芩苷的含量作为评价指标,但处方中金银花、连翘、栀子作为臣药对其清热解毒功效的发挥亦起着重要作用。因此,本研究对金银花、连翘、栀子中主要活性成分也进行了定量,从多指标的角度来考察制剂的质量。

一测多评法(QAMS)是一种用于多成分质量控制的研究方法,目前已用于解决中药质量控制中缺乏对照品这一瓶颈问题。黄连^[2]的QAMS标准已纳入《中国药典》2010年版。高效液相色谱(HPLC)法以其分离效率高、峰容量大、灵敏度高优点已广泛用于中药复杂体系的研究。本研究通过应用HPLC法对市售的清热解毒口服液活性成分含量进行整体控制,即以供应量大、价格较低的黄芩苷对照品为内标物,通过建立其与另3种活性成分绿原酸、连翘苷、栀子苷的相对校正

因子进行含量计算,实现一测多评。

1 材料

LC2010CHT型HPLC仪(包含四元泵、在线脱气机、自动冷却装置、全自动进样器、紫外检测器)、UV-2010PC型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);AB135-S型双量程电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);AS10200ADT型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司,频率:40 kHz,功率:800 W)。

黄芩苷、绿原酸、栀子苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110715-201016、110753-200413、110749-200714);连翘苷对照品(科翔生物科技有限公司,批号:08-2011,经检测质量分数>98%);清热解毒口服液(来源于市售5家生产企业共10个批次,批号:S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S9、S10);甲醇(山东禹王实业有限公司化工分公司,批号:20110103061,色谱纯);其他试剂均为分析纯,实验用水采用双重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Shim-Pack VP-ODS C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Spherigel ODS C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), Kromasil C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),后2根色谱柱用于确定相对校正因子;流动相:甲醇-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱,0→5 min为30%甲醇等度;5→40 min为30%→70%甲醇);柱温:30℃;流速:1.0 ml/min;检测波长:227 nm;进样量:10 μl。

^Δ 济南军区后勤科研计划项目(No.CJN10L067)

* 药师。研究方向:中药新药及质量标准。E-mail: zhenwei_981@163.com

通信作者:副主任药师。研究方向:医院药学。电话:0378-3932729。E-mail: ccdrllyuemei@163.com

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称定黄芩苷、绿原酸、连翘苷、栀子苷对照品适量,置于5 ml量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,得到4种成分质量浓度分别为0.450、0.598、0.428、0.460 mg/ml的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密吸取清热解暑口服液2.00 ml,置于200 ml量瓶中,用甲醇稀释并定容至刻度,再精密吸取2.00 ml稀释液于25 ml量瓶中,用甲醇定容,再以0.45 μm的有机微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按照清热解暑口服液处方组成,除去黄芩、金银花、连翘、栀子4味药材,其余药材按照处方比例及制备工艺制备阴性样品,并按“2.2.2”项下方法进行处理,即得阴性对照溶液。

取上述3种溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱,详见图1。

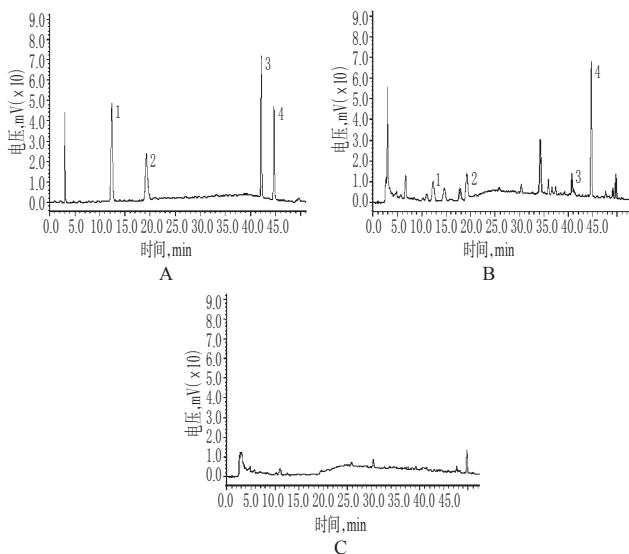


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.栀子苷;2.绿原酸;3.连翘苷;4.黄芩苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. test sample; C. negative control; 1. jasminoidin; 2. caffeotannic acid; 3. forsythin; 4. baicalin

2.3 线性关系考察

分别精密吸取“2.1.1”项下对照品溶液1.00 ml,置于10 ml量瓶中,用甲醇定容,再精密吸取该溶液1、3、7、10、12、14 μl注入HPLC仪中,按“2.1”项下色谱条件进样。以进样量(x, μg)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,其回归方程和线性范围见表1。

表1 4种成分的回归方程和线性范围

Tab 1 Regression equation and linear range of 4 kinds of active components

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
黄芩苷	$y=2.62 \times 10^4 x + 2.16 \times 10^4$	0.999 9	0.045 0~0.630 0
绿原酸	$y=7.52 \times 10^4 x - 2.86 \times 10^4$	0.999 5	0.059 8~0.837 2
连翘苷	$y=2.82 \times 10^4 x - 9.26 \times 10^4$	0.999 8	0.042 8~0.599 2
栀子苷	$y=1.62 \times 10^5 x - 3.14 \times 10^4$	0.999 9	0.046 0~0.644 0

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液适量,

按“2.1”项下色谱条件连续进样6次。结果,黄芩苷、绿原酸、连翘苷、栀子苷峰面积的RSD分别为0.59%、0.92%、0.14%、0.87%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(批号:S1)适量,按“2.1”项下色谱条件,分别于放置0、2、8、16、24、48、72 h时进样测定。结果,黄芩苷、绿原酸、连翘苷、栀子苷峰面积的RSD分别为1.34%、1.68%、0.98%、1.39%,表明72 h内供试品溶液的成分稳定。

2.4.3 重复性试验 精密吸取同一批次(批号:S1)的清热解暑口服液原液适量,共6份,按“2.2.2”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。结果,黄芩苷、绿原酸、连翘苷、栀子苷含量的RSD分别为1.08%、0.59%、0.88%、0.94%,表明该方法重复性良好。

2.4.4 加样回收率试验 精密吸取已知含量的清热解暑口服液1.00 ml,共9份,分别置于250 ml量瓶中,分别加入低、中、高浓度的对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进行测定,计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery tests(n=9)

成分	所含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
黄芩苷	0.669 0	0.400 4	1.050 7	95.33	96.49	1.88
	0.684 1	0.400 4	1.074 5	97.50		
	0.682 7	0.400 4	1.064 2	95.28		
	0.685 1	0.600 6	1.276 3	98.43		
	0.675 0	0.600 6	1.246 0	95.07		
	0.684 1	0.600 6	1.286 0	100.22		
	0.665 2	0.800 8	1.430 8	95.60		
	0.678 4	0.800 8	1.440 9	95.22		
	0.680 2	0.800 8	1.447 2	95.78		
	0.435 1	0.389 4	0.812 0	96.79		
绿原酸	0.441 7	0.389 4	0.812 7	95.27	96.09	0.76
	0.426 0	0.389 4	0.800 9	96.28		
	0.440 8	0.519 2	0.936 0	95.38		
	0.431 7	0.519 2	0.937 1	97.34		
	0.429 0	0.519 2	0.930 6	96.61		
	0.439 2	0.649 0	1.060 4	95.72		
	0.440 5	0.649 0	1.059 2	95.33		
	0.430 2	0.649 0	1.053 9	96.10		
	0.081 0	0.102 8	0.179 5	95.82		
	0.084 0	0.102 8	0.182 2	95.53		
连翘苷	0.082 0	0.102 8	0.180 9	96.21	95.64	1.27
	0.085 0	0.205 6	0.280 3	94.99		
	0.088 0	0.205 6	0.283 4	95.04		
	0.083 0	0.205 6	0.278 5	95.09		
	0.079 0	0.308 4	0.380 1	97.63		
	0.080 0	0.308 4	0.373 2	95.07		
	0.078 0	0.308 4	0.372 2	95.40		
	0.474 1	0.289 2	0.758 2	98.24		
	0.470 1	0.289 2	0.750 1	96.82		
	0.468 7	0.289 2	0.748 6	96.78		
栀子苷	0.478 2	0.433 8	0.907 2	98.89	97.82	2.32
	0.468 0	0.433 8	0.903 7	100.44		
	0.468 1	0.433 8	0.910 1	101.89		
	0.457 1	0.578 4	1.016 7	96.75		
	0.469 8	0.578 4	1.020 1	95.14		
	0.459 2	0.578 4	1.010 9	95.38		

2.5 相对校正因子^[3]的确定及待测组色谱峰的定位^[4]

以黄芩苷为内标物,按公式计算绿原酸、连翘苷、栀子苷对黄芩苷的相对校正因子和相对保留值,结果见表3表中,相对校正因子: $f_{ks} = f_k / f_s = (W_k \cdot A_s) / (W_s \cdot A_k)$ 。式中: f_k 为待测组分 k 的校正因子, f_s 为内标物的校正因子, W_k 为待测组分 k 的峰面积, A_k 为待测组分 k 的质量浓度, A_s 为内标物的质量浓度, W_s 为内标物的峰面积。相对保留值: $r_{ks} = t_{rk} / t_{rs}$ 。式中: t_{rk} 为待测组分 k 的保留值, t_{rs} 为内标物的保留值; a : $f_{\text{黄芩苷/绿原酸}}$; b : $f_{\text{黄芩苷/连翘苷}}$; c : $f_{\text{黄芩苷/栀子苷}}$ 。

表3 不同色谱柱对相对校正因子和相对保留值的影响

Table 3 Effects of different chromatogram columns on relative correction factor and relative retention value

色谱柱	相对校正因子			相对保留值		
	a	b	c	a	b	c
Kromasil C ₁₈	0.924	0.946	0.882	0.82	0.80	0.85
Spherigel ODS C ₁₈	0.911	0.916	0.901	0.80	0.82	0.84
Shim-Pack VP-ODS C ₁₈	0.895	0.922	0.919	0.83	0.86	0.88

由表3可以看出,不同色谱柱的相对校正因子有一定差别,但其差异无统计学意义($P > 0.05$);3种不同型号的色谱柱的色谱峰相对保留值较接近,说明本法所得相对校正因子可以作为定量的校正系数。

2.6 QAMS与外标法测定结果的比较

取10批次清热解毒口服液各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定。分别采用外标法与QAMS计算样品中黄芩苷、绿原酸、连翘苷、栀子苷的含量,结果见表4。由表4可知,两种方法所得结果差异不大。

表4 两种方法含量测定结果比较

Table 4 Comparison of content determination of samples by external standard method and QAMS

批号	黄芩苷,%		绿原酸,%		连翘苷,%		栀子苷,%	
	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS
S1	3.42	2.19	1.98	0.14	0.15	2.03	1.98	
S2	3.29	2.34	2.01	0.19	0.22	1.86	1.86	
S3	1.76	1.15	1.19			1.06	1.07	
S4	1.90	1.20	1.22			1.17	1.18	
S5	2.51	1.16	1.17	0.12	0.12	1.01	1.01	
S6	2.17	1.09	1.12	0.11	0.10	0.97	0.96	
S7	1.85	1.39	1.39			1.16	1.18	
S8	1.92	1.44	1.42			1.28	1.28	
S9	1.80	1.14	1.17			1.20	1.21	
S10	1.66	1.07	1.12			1.01	1.00	

3 讨论

试验过程中由于4种活性成分的最大吸收波长不同(通过紫外-可见分光光度计进行全波段扫描),如连翘苷和栀子苷在300~700 nm范围没有紫外吸收,从对4种成分同时定量分析的角度来看,选择227 nm作为制剂含量测定的检测波长较为合适,此波长下各个成分都有吸收,并且色谱参数较好,适宜对其进行定量分析^[5]。

本试验以清热解毒口服液为研究对象,建立了黄芩苷与绿原酸、连翘苷、栀子苷3种成分的相对校正因子。通过比较发现,不同色谱柱对相对校正因子的影响不大,由此表明,在保证目标成分有较好的分离度的前提下,所得相对校正因子具有广泛的适用性,可同时适用于不同剂型的中成药或者药材的多成分定量评价。因此,本试验结果进一步拓宽了现行《中国药典》黄连QAMS评价方法的应用范围。

市售的10个批次的清热解毒口服液制剂中,除了连翘苷含量偏低外,有些生产厂家的制剂中相同条件下甚至检测不到连翘苷的存在,说明部分生产厂家的制剂在生产过程中由于各种原因导致了活性成分的丢失,这是在实际生产过程中需要注意的问题,这有可能造成制剂的有效性下降。另外,黄芩苷、绿原酸、栀子苷3种主要活性成分不同生产厂家的含量相差较大,反映出市售清热解毒口服液制剂质量良莠不齐,可能是在制剂生产过程中所添加的辅料比例不同,导致在进行定量时偏差较大。由此可见,现行《中国药典》中仅以黄芩苷的含量作为评价指标对清热解毒口服液进行质量控制难以真正保证药品的质量,采用QAMS同步测定多成分含量,可以更快速、全面地反映制剂的整体质量^[6]。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:1126-1127.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:285-286.
- [3] 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.
- [4] 匡艳辉,朱晶晶,王智民,等.一测多评法测定黄连中小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱、药根碱含量[J].中国药学杂志,2009,44(5):390.
- [5] 彭晓霞,张振巍.二次正交旋转组合设计法优化赤芍醇提工艺[J].中药材,2010,33(6):991.
- [6] 石磊,张振巍.二次回归正交设计法优选黄芩苷醇提工艺[J].中药材,2011,34(12):1946.

(收稿日期:2012-11-27 修回日期:2013-04-18)

国家卫生和计划生育委员会主任李斌会见中国医药卫生事业发展基金会王彦峰理事长一行

本刊讯 2013年6月14日,国家卫生和计划生育委员会主任李斌在机构所在地会见中国医药卫生事业发展基金会王彦峰理事长一行。

李斌主任对基金会长期以来对卫生计生事业发展给予的大力支持和无私奉献表示感谢。李斌主任指出,多年来,基金会与国家及地方卫生计生行政部门以及疾病预防控制中心等单位密切合作,在普及健康教育、建立健康档案、参与卫生扶贫、支持医疗技术创新、加强基层人员培训、参与应急救援等

方面做了大量工作,起到了很好的示范和带头作用。李斌主任表示,望今后与基金会在卫生计生扶贫开发、对口支援、人员培训、健康教育等方面有更加深入的交流与合作,充分发挥基金会在工作机制、社会资源和宣传网络等方面的优势。会见中,王彦峰理事长介绍了中国医药卫生事业发展基金会有关情况。会见活动最后,李斌主任代表国家卫生和计划生育委员会向王彦峰理事长颁发了荣誉证书和感谢状。