

一测多评法测定一清颗粒中5种蒽醌类成分的含量

孔卫东^{1*}, 李婷婷¹, 濮永杰^{2#} (1.成都市食品药品检测中心, 成都 610045; 2.四川省医疗卫生技术咨询所, 成都 610041)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)24-2292-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.24.29

摘要 目的:建立一清颗粒中5种主要活性成分的一测多评含量测定方法。方法:以大黄素为内标物,采用高效液相色谱法,建立其与其他4种成分芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、大黄酸的相对校正因子,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5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:采用一测多评法测定一清颗粒中5种蒽醌类成分的含量是可行的。

关键词 一测多评法;外标法;高效液相色谱法;校正因子;一清颗粒;含量测定

Content Determination of 5 Anthraquinones in Yiqing Granules by Multi-components Quantitation by One Marker

KONG Wei-dong¹, LI Ting-ting¹, PU Yong-jie² (1.Chengdu Center for Food and Drug Control, Chengdu 610045, China; 2.Sichuan Medical Technology Institute, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the multi-components quantitation by one mark for content determination of 5 anthraquinones in Yiqing granules. METHODS: Using emodin as internal substance, HPLC method was adopted to determination the content of emodin and obtain relative correction factor of it to other 4 components for calculation. The multi-components quantitation by one mark was conducted. The external standard method was adopted for the content determination of 5 components and compared with multi-components quantitation by one mark. RESULTS: The relative correction factor showed good reproducibility; there was slight difference between calculated value by correction factor and measured value of external standard method. CONCLUSIONS: The method is feasible for the content determination of 5 anthraquinones in Yiqing granules.

KEYWORDS Multi-components quantitation by one mark; External standard method; HPLC; Correction factor; Yiqing granules; Content determination

一测多评法是以药材中某一典型成分为参照物,根据中药有效成分间存在的内在函数关系和比例关系,建立该组分与其他组分之间的相对校正因子,通过测定一个成分,实现对多个成分的定量^[1-12]。一清颗粒由黄连、大黄和黄芩3味药材组成,具有清热泻火解毒、化瘀凉血止血之功效。大黄为其主要药味,其中的蒽醌类成分为清热泻火、凉血解毒的有效成分^[4]。本试验采用一测多评法,以大黄素为内标物,采用高效液相色谱(HPLC)法测定一清颗粒中该成分含量,建立该成分与芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚和大黄酸的相对校正因子,由此计算芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚和大黄酸的含量,并对一测多评法的计算值与外标法实测值进行比较。

1 材料

1200 HPLC仪,包括四元泵、在线脱气机、全自动进样器、紫外检测器、Chemstation工作站(美国Agilent公司);2695-2487 HPLC仪,包括四元泵、在线脱气机、全自动进样器、紫外检测器、Empower工作站(美国Waters公司);SK250H超声仪(上海科导超声仪器有限公司);AE240电子天平(瑞士Met-

tler-Toledo公司)。

大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、大黄酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110756-200110、110795-201007、110796-201118、110758-201013、110757-200206,质量分数:100%、98.0%、99.5%、99.8%、100%);一清颗粒(来源于市售6家生产企业共8个批次,批号:S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8);乙腈、甲醇(色谱纯,北京百灵威科技有限公司,批号:134752、116481);其他试剂为分析纯,试验用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件和系统适应性

色谱柱:Diamonsil C₁₈(200 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters Symmetryshield RP C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent ZORBAX C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸溶液(85:15, V/V);流速:1.0 ml/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μl;检测波长:254 nm。在该色谱条件下,各待测成分分离度大于1.5,理论板数均大于10 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量,加甲醇溶解,制成含芦荟大黄素176.5 μg/ml、大黄酸206.0 μg/ml、大黄素204.8 μg/ml、大黄酚220.0 μg/ml、大黄素甲醚129.9 μg/ml的

* 副主任中药师。研究方向:药品分析。电话:028-85322592。E-mail:kowei-d@sohu.com

通信作者:副主任药师。研究方向:临床药学和药品分析。电话:028-86133722。E-mail:353885303@qq.com

混合对照品贮备溶液。分别精密吸取上述贮备溶液 2 ml, 置于 10 ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 作为混合对照品溶液 (含芦荟大黄素 35.30 μg/ml、大黄酸 41.20 μg/ml、大黄素 40.96 μg/ml、大黄酚 44.00 μg/ml、大黄素甲醚 25.98 μg/ml)。

2.2.2 供试品溶液的制备 取样品适量, 研细, 精密称取 0.3 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 ml, 称定质量, 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。精密量取续滤液 5 ml, 置于烧瓶中, 挥去溶剂, 加 8% 盐酸溶液 10 ml, 超声 (功率: 300 W; 频率: 50 kHz) 处理 2 min, 再加三氯甲烷 10 ml, 加热回流 1 h, 放冷, 置分液漏斗中, 用少量三氯甲烷洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 酸液再用三氯甲烷提取 3 次, 每次 10 ml, 合并三氯甲烷液, 减压回收溶剂至干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 10 ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按照一清颗粒处方组成及比例制备除去大黄药材的阴性样品, 并按“2.2.2”项下方法处理, 即得阴性对照溶液。

2.3 阴性干扰试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱, 详见图 1。由图 1 可见, 阴性对照不干扰 5 种成分的含量测定。

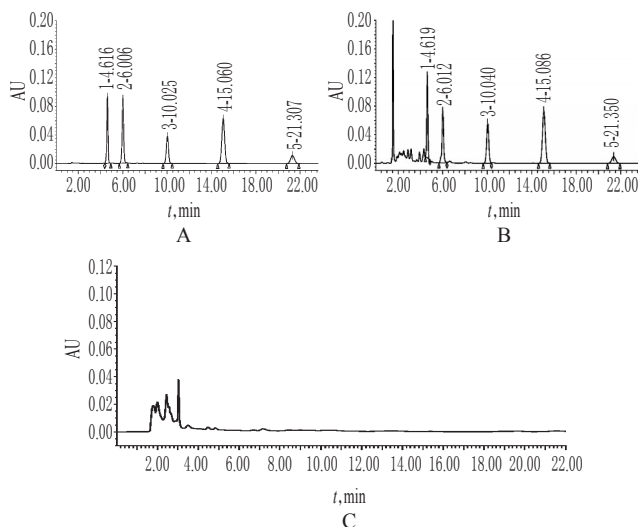


图 1 高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 芦荟大黄素; 2. 大黄酸; 3. 大黄素; 4. 大黄酚; 5. 大黄素甲醚

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. test sample; C. negative control; 1. aloeo-emodin; 2. rhein; 3. emodin; 4. chrysophanol; 5. physcione

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下的混合对照品贮备溶液 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、10.0 ml, 分别置于 10 ml 量瓶中, 加甲醇溶液并稀释至刻度, 再分别精密吸取上述稀释后的溶液各 10 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。

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下的混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 每次 10

μl, 进行测定。结果, 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.32%、0.45%、0.22%、0.37%、0.55%, 表明仪器的精密度良好。

表 1 5 种成分的回归方程和线性范围

Tab 1 Regression equation and linear range of 5 compounds

成分	回归方程	r	线性范围, μg
芦荟大黄素	y=33.25x-0.25	0.999 7	0.088 3~1.765
大黄酸	y=22.14x-0.14	0.999 7	0.103 0~2.060
大黄素	y=36.16x-0.22	0.999 5	0.102 4~2.048
大黄酚	y=27.89x-0.37	0.999 6	0.110 0~2.200
大黄素甲醚	y=55.36x-0.19	0.999 8	0.065 0~1.299

2.6 稳定性试验

取样品 (批号: S1) 适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于放置 0、4、8、12、16、20、24 h 时进样 10 μl, 进行测定。结果, 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.2%、2.5%、1.2%、0.8%、1.1%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取样品 (批号: S1) 适量, 共 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以外标法计算含量。结果, 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量的 RSD 分别为 0.74%、0.62%、1.22%、1.37%、1.02%, 表明该方法的重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品 0.15 g, 共 6 份, 按各成分在药材中的不同含量分别加入相应量的对照品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算回收率, 结果见表 2。

2.9 不同仪器和色谱柱对相对校正因子的影响

取“2.2.1”项下的混合对照品溶液, 进样 10 μl, 以大黄素为内标物, 按公式计算大黄素对芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚的相对校正因子, 结果见表 3 (相对校正因子: $f_{k,s} = f_k / f_s = (W_s \cdot A_k) / (W_k \cdot A_s)$)。式中: f_k 是待测组分 k 的校正因子; f_s 是内标物的校正因子; W_s 为内标物的质量浓度; W_k 为待测组分 k 的质量浓度; A_k 为待测组分 k 的峰面积; A_s 为内标物的峰面积。表中 a、b、c、d 分别为芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚的相对校正因子)。

2.10 待测组分色谱峰的定位

采用不同仪器和色谱柱, 分别测定并计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚色谱峰相对于大黄素色谱峰的保留时间, 结果见表 4 (表中 RA/S、RB/S、RC/S、RD/S 分别为芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚相对于大黄素的保留时间)。

2.11 一测多评法与外标法测定结果的比较

取 8 批一清颗粒样品各适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 分别采用一测多评法和外标法计算样品中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量, 结果见表 5。由表 5 可知, 两种方法所得结果无明显差异。

3 讨论

在多指标评价中, 通常采用指纹图谱技术来体现药物的

表2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery tests (n=6)

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, %
芦荟大黄素	0.361 4	0.360 1	0.699 7	96.98	97.14	0.29
	0.352 5	0.360 1	0.693 6	97.33		
	0.357 3	0.360 1	0.700 3	97.62		
	0.355 5	0.360 1	0.694 3	97.03		
	0.370 1	0.360 1	0.708 4	97.01		
大黄酸	0.362 4	0.360 1	0.699 7	96.85	97.23	0.51
	0.258 1	0.234 5	0.479 1	97.25		
	0.243 1	0.234 5	0.464 8	97.33		
	0.250 0	0.234 5	0.469 5	96.90		
	0.257 8	0.234 5	0.475 4	96.56		
大黄素	0.233 6	0.234 5	0.459 0	98.05	96.90	0.46
	0.237 9	0.234 5	0.459 7	97.32		
	0.458 7	0.439 8	0.871 8	97.03		
	0.442 1	0.439 8	0.851 8	96.59		
	0.470 5	0.439 8	0.882 9	96.99		
大黄酚	0.471 2	0.439 8	0.876 5	96.21	97.32	0.82
	0.456 9	0.439 8	0.870 3	97.06		
	0.421 3	0.439 8	0.839 7	97.51		
	0.495 6	0.451 6	0.919 3	97.05		
	0.455 6	0.451 6	0.892 3	98.36		
大黄素甲醚	0.416 9	0.451 6	0.842 4	97.00	96.92	0.69
	0.421 5	0.451 6	0.845 9	96.89		
	0.431 2	0.451 6	0.867 4	98.25		
	0.411 9	0.451 6	0.832 3	96.39		
	0.175 6	0.190 0	0.355 8	97.32		
	0.172 5	0.190 0	0.347 9	95.96	97.83	
	0.170 3	0.190 0	0.347 2	96.36		
	0.169 8	0.190 0	0.352 0	97.83		
	0.173 3	0.190 0	0.352 4	96.99		
	0.166 9	0.190 0	0.346 4	97.05		

表3 不同仪器和色谱柱对相对校正因子的影响

Tab 3 Effects of different instruments and columns on relative correction factor

仪器	色谱柱	a	b	c	d
Agilent	Diamonsil C ₁₈	1.569	1.675	2.026	0.854
	Water Symmetryshield RP C ₁₈	1.533	1.658	2.007	0.857
	Agilent ZORBAX C ₁₈	1.562	1.671	2.035	0.847
Waters	Diamonsil C ₁₈	1.545	1.644	2.104	0.822
	Water Symmetryshield RP C ₁₈	1.587	1.651	2.041	0.861
	Agilent ZORBAX C ₁₈	1.532	1.622	2.019	0.819
平均值		1.555	1.654	2.039	0.843
RSD, %		1.40	1.20	1.70	2.20

表4 不同仪器和色谱柱对相对保留时间的影响

Tab 4 Effects of different instruments and columns on relative retention time

仪器	色谱柱	RA/S	RB/S	RC/S	RD/S
Agilent	Diamonsil C ₁₈	0.460	0.598	1.506	2.131
	Water Symmetryshield RP C ₁₈	0.451	0.587	1.507	2.021
	Agilent ZORBAX C ₁₈	0.442	0.574	1.424	2.098
Waters	Diamonsil C ₁₈	0.464	0.563	1.515	2.125
	Water Symmetryshield RP C ₁₈	0.454	0.588	1.524	2.174
	Agilent ZORBAX C ₁₈	0.437	0.577	1.498	2.117
平均值		0.451	0.581	1.496	2.111
RSD, %		2.29	2.13	2.42	2.40

整体质量,而一测多评法是对指纹图谱法的进一步定量挖掘分析。

本试验以一清颗粒为研究对象,以大黄素为内标物,建立了芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚4种成分的相对校正因子。选用大黄素作为内标物是因为大黄素为大黄中主要成分,且价廉易得,保留时间适中。利用大黄素峰的保留时间、其余各成分峰与内标物峰之间的相对保留时间及光谱变化趋势,即能正确判断各成分峰的位置,实现对各成分色谱峰

表5 两种方法含量测定结果比较

Tab 5 Comparison of content determination of 2 methods

样品批号	芦荟大黄素,mg/g		大黄酸,mg/g		大黄素,mg/g	大黄酚,mg/g		大黄素甲醚,mg/g	
	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法
S1	2.293	2.294	1.676	1.674	3.135	2.687	2.684	1.159	1.158
S2	2.241	2.243	1.305	1.306	2.751	2.119	2.120	1.365	1.367
S3	1.028	1.028	0.779	0.780	2.114	1.825	1.826	0.889	0.890
S4	3.005	3.007	2.425	2.426	1.995	1.039	1.035	0.769	0.767
S5	1.434	1.435	1.201	1.202	1.009	0.475	0.477	0.669	0.670
S6	2.125	2.123	1.339	1.339	2.997	2.703	2.701	1.005	1.002
S7	0.994	0.993	0.425	0.423	1.373	1.115	1.117	0.796	0.795
S8	1.369	1.368	0.723	0.722	2.559	1.398	1.398	0.479	0.474

的定位和定量。

通过比较发现,不同色谱柱、色谱仪对相对校正因子的影响不大;同时采用一测多评法和外标法对不同来源的样品进行测定,所得含量结果之间无明显差异。由此表明,在保证目标成分有较好分离度的前提下,一测多评法所得相对校正因子具有广泛的适用性。

综上所述,本方法准确、快速、经济,符合中药多指标评价模式的要求,适用于一清颗粒中5种蒽醌类成分的含量测定。

参考文献

[1] 王智民,高惠敏,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.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 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,2010:22-23.

[5] 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].药学学报,2008,43

毛细管气相色谱法测定阿仑膦酸钠原料药中甲烷磺酸乙酯的残留量

邱妍川^{1*}, 李跃芬², 钟玲², 伍彬^{1#} (1.重庆医药高等专科学校, 重庆 400016; 2.重庆药友制药有限责任公司, 重庆 400060)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)24-2295-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.24.30

摘要 目的:建立测定阿仑膦酸钠原料药中甲烷磺酸乙酯残留量的方法。方法:采用毛细管气相色谱法。色谱柱为HP-5毛细管色谱柱,载气为氮气,柱温为100℃保持8 min,流速为1.0 ml/min,进样量为1.0 μl,分流比为10:1,进样口温度为220℃,检测器为氢火焰离子化检测器,检测器温度为300℃。结果:甲烷磺酸乙酯检测质量浓度在3.92~27.44 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.9997$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD≤2.30%;平均回收率为97.94%,RSD=1.48%($n=9$)。3批样品中均未检出甲烷磺酸乙酯。结论:该方法简便、灵敏、可靠,可用于阿仑膦酸钠原料药中甲烷磺酸乙酯残留量的测定。

关键词 阿仑膦酸钠原料药;毛细管气相色谱法;甲烷磺酸乙酯;残留量

Determination of Residual Ethyl Methyl Sulfonate in Alendronate Sodium by GC

QIU Yan-chuan¹, LI Yue-fen², ZHONG Ling², WU Bin¹ (1.Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 400016, China; 2.Chongqing Yaoyou Pharmaceutical Co. Ltd., Chongqing 400060, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the determination of residual ethyl methyl sulfonate in alendronate sodium raw material. METHODS: Capillary GC method was adopted. The determination was performed on HP-5 capillary column with nitrogen as carrier gas at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 100 °C for 8 min, and sample size was 1.0 μl. The split ratio was 10:1, and temperature of injector was 220 °C. The flame ionization detector was used with the temperature of 300 °C. RESULTS: The linear range of ethyl methyl sulfonate were 3.92-27.44 μg/ml ($r=0.9997$) with average recovery of 97.94% (RSD=1.48%, $n=9$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.30%. Ethyl methyl sulfonate was not detected in 3 batches of samples. CONCLUSIONS: The established method is simple, sensitive and reliable, and it can be used for the content determination of ethyl methyl sulfonate in alendronate sodium.

KEYWORDS Alendronate sodium; Capillary GC; Ethyl methyl sulfonate; Residual

阿仑膦酸钠为氨基二膦酸盐骨吸收抑制剂,与骨内羟磷灰石有强亲和力,对破骨细胞有双重抑制作用。由于其强力抑制骨吸收,能有效改善骨质疏松患者在骨吸收与形成间的失衡状态,使骨生成作用加强,从而达到治疗目的^[1-5]。在阿仑

膦酸钠的合成中,要用到甲烷磺酸和乙醇两种试剂,可能产生潜在的基因毒性副产物——甲烷磺酸乙酯^[6-8]。甲烷磺酸乙酯具有致畸作用,人用药品注册技术规定国际协调会议(ICH)要求其在药品中的残留限量为38 μg/g^[9-10]。而为了严格控制药

(12):1 211.

- [6] 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.
- [7] 何欢,马双成,张启明,等.HPLC替代对照品法同时测定莪术油及其注射液中6种成分的含量[J].药物分析杂志,2009,29(11):1 892.
- [8] 魏峰,李启艳,马玲云,等.对照品替代法同时测定中药和保健品中6种大豆异黄酮类成分的含量[J].药物分析杂

- 志,2009,29(5):725.
- [9] 谢元超,金少鸿,张启明.替代对照品法用于丹参和复方丹参片含量测定的研究[J].药物分析杂志,2007,27(4):497.
- [10] 高运玲,潘正,张涛,等.HPLC测定独一味不同制剂中4种环烯醚萜苷的含量[J].中成药,2010,32(1):71.
- [11] 高晓燕,卢建秋.HPLC-DAD法同时测定大黄中7个蒽醌类化合物的含量[J].药物分析杂志,2010,30(9):1 636.
- [12] 汪航,冯芳,王学全,等.栀子大黄汤化学成分的HPLC-PDA-ESI-MS/MS分析[J].中国药科大学学报,2009,40(3):232.

* 讲师,硕士。研究方向:药物制剂。E-mail:christiana42@163.com

通信作者:副教授,硕士。研究方向:药物分析。E-mail:532859882@qq.com

(收稿日期:2014-01-28 修回日期:2014-05-06)