

壮药毛冬青配方颗粒一测多评的定量研究

农新维, 梁冰丽, 李颖, 黄雄梅, 韦红言* (培力(南宁)药业有限公司, 南宁 530007)

摘要: 目的 建立一测多评法同时测定毛冬青配方颗粒中 6 种酚酸类成分的含量。方法 以绿原酸为内参物, 分别建立其与隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的相对校正因子, 并利用该相对校正因子计算含量; 同时利用外标法测定该 6 种酚酸的含量, 比较 2 种测定方法的差异, 验证一测多评法的准确性和可行性。结果 相对校正因子的重现性良好, 8 批毛冬青配方颗粒的计算值与实测值无显著性差异。结论 该方法可用于毛冬青配方颗粒中多指标成分质量评价。

关键词: 毛冬青; 配方颗粒; 绿原酸; 酚酸; 高效液相色谱法; 一测多评法; 相对校正因子

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)08-1118-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.08.010

引用本文: 农新维, 梁冰丽, 李颖, 等. 壮药毛冬青配方颗粒一测多评的定量研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(8): 1118-1121.

Quantitative Analysis of Zhuang Medicine *Ilex Pubescens* Formula Granules by QAMS

NONG Xinwei, LIANG Bingli, LI Ying, HUANG Xiongmei, WEI Hongyan* (Pura Pharm (Nanning) Pharmaceutical Company Limited, Nanning 530007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for simultaneous determination of six phenolic acids in *Ilex pubescens* formula granules by quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS). **METHODS** Chlorogenic acid was used as the internal reference substance. The relative correction factors (RCF) of chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C were established respectively, and their contents in samples were calculated by RCF. At the same time, the external standard method (ESM) was used to determine the above six phenolic acids. Compared with the content results determined by the ESM and QAMS, the accuracy and feasibility of QAMS method were verified. **RESULTS** The reproducibility of RCF was acceptable. There was no significant difference between the quantitative results of the above two methods in eight batches of *Ilex pubescens* formula granules. **CONCLUSION** The method can be used as quality evaluation method of multi-component in *Ilex pubescens* formula granules.

KEY WORDS: *Ilex pubescens*; formula granules; chlorogenic acid; phenolic acids; HPLC; quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS); relative correction factor

毛冬青为冬青科冬青属毛冬青(*Ilex pubescens* Hook. et Arn)的干燥根, 是广西壮族民间常用中草药, 具有活血通络、清热解毒、消肿止痛的功效^[1]。文献报道^[2-3], 其主要含三萜类、黄酮类和酚酸类等化合物。

毛冬青配方颗粒为毛冬青饮片经水提、浓缩、干燥、制粒而成的单味中药配方颗粒剂, 主要成分以水溶性成分为主。由于萜类成分水溶性不佳, 含量较低, 其作为含量测定的指标成分意义不大。通过摸索研究发现, 毛冬青配方颗粒中的酚酸类成分含量较高, 其中的绿原酸类及咖啡酸具有抗菌、消炎、抗氧化等多种药理作用^[4-5], 与毛冬青清热解毒、消肿止痛的功效相符合, 因此, 建立酚酸类成分的含量测定方法对毛冬青配方颗粒的

质量控制具有现实意义。

目前毛冬青相关文献主要对三萜皂苷类、总黄酮等进行定量研究^[6-7], 未见有毛冬青或其相关制剂中酚酸类成分一测多评方法的报道。一测多评法是一种以样品中某一成分为内参物, 建立该成分与其他成分间的相对校正因子, 通过相对校正因子计算其他成分量的质量控制方法^[8]。该方法已经在多种药材及中成药中得到验证与应用^[9-13]。本实验以毛冬青配方颗粒为研究对象, 采用一测多评法同时测定 6 个酚酸类成分的含量, 为毛冬青配方颗粒的多指标成分质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱系统(美国 Agilent

基金项目: 南宁市本级科学研究与技术开发计划项目(20153326); 南宁市人才小高地项目(2015023)

作者简介: 农新维, 男, 助理工程师 Tel: 18275721890 E-mail: xwnong@purapharm.com.cn *通信作者: 韦红言, 女, 硕士, 工程师 Tel: (0771)3218026 E-mail: hywei@purapharm.com.cn

公司); XPE205DR 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

绿原酸(批号: 110753-201314, 纯度: 96.6%)、咖啡酸(批号: 110885-200102, 供含量测定用)、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸(异绿原酸 A, 批号: 111782-201204, 纯度: 94.2%)均购于中国食品药品检定研究院; 隐绿原酸(批号: MUST-14041410, 纯度>98%)、异绿原酸 B(批号: MUST-09061602, 纯度>98%)、异绿原酸 C(批号: MUST-09041001, 纯度>98%)均购于成都曼思特生物科技有限公司; 毛冬青配方颗粒由培力(南宁)药业有限公司提供(批号: 1221-01、1221-02、1221-03、1221-04、1221-05、1221-06、1221-07、1221-08); 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ MGII(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸(B), 梯度洗脱(0~8 min, 8%A; 8~60 min, 8%A→30%A); 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 30 °C; 检测波长为 330 nm, 进样量为 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 取绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的对照品适量, 精密称定, 用 50%乙醇分别制成 69.09, 50.96, 30.72, 182.67, 80.18, 117.60 μg·mL⁻¹的混合对照品储备液。精密吸取上述储备液 2 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加 50%乙醇定容制成混合对照品溶液, 于 4 °C 避光保存。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品适量, 研细。称取细粉约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50%乙醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 50%乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 取按处方比例及制备工艺制得不含毛冬青的阴性对照样品, 按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 专属性试验

精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件测定, 色谱图见图 1。结果表明阴性对照溶液无干扰。

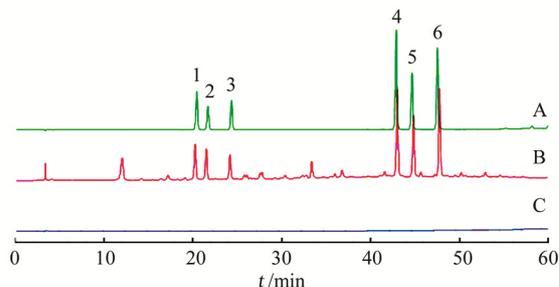


图 1 高效液相色谱图

A-混合对照品; B-供试品; C-阴性对照; 1-绿原酸; 2-隐绿原酸; 3-咖啡酸; 4-异绿原酸 B; 5-异绿原酸 A; 6-异绿原酸 C。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-mixed control; B-test sample; C-negative control; 1-chlorogenic acid; 2-cryptochlorogenic acid; 3-caffeic acid; 4-isochlorogenic acid B; 5-isochlorogenic acid A; 6-isochlorogenic acid C.

2.4 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.1”项下储备液 1, 1, 1, 2, 3 mL, 分别置 25, 10, 5, 5, 5 mL 量瓶中, 加 50%乙醇定容, 即得系列混合对照品溶液。吸取上述系列混合对照品溶液及对照储备液各 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件测定。以峰面积(Y)为纵坐标, 进样量(X)为横坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程, 见表 1。

表 1 线性关系

Tab. 1 Results of linear equations

成分	线性方程	r	线性范围/μg
绿原酸	$Y = 3\ 115X + 2.02$	0.999 9	0.028~0.691
隐绿原酸	$Y = 2\ 753X + 1.11$	0.999 9	0.020~0.510
咖啡酸	$Y = 5\ 277X + 1.49$	0.999 9	0.012~0.307
异绿原酸 B	$Y = 3\ 004X + 6.45$	0.999 9	0.073~1.827
异绿原酸 A	$Y = 4\ 017X + 1.00$	0.999 9	0.032~0.802
异绿原酸 C	$Y = 3\ 685X + 2.83$	0.999 9	0.047~1.176

2.5 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 峰面积的 RSD 分别为 0.07%, 0.42%, 0.12%, 0.17%, 0.25%, 0.32%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号: 1221-01), 分别于 0, 2, 7, 14, 24 h 进样, 记录绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 峰面积, 各成分峰面积的 RSD 分别为 1.31%, 1.62%, 0.65%, 0.89%, 0.81%, 0.60%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取同一批次(批号: 1221-01)的样品, 按“2.2.2”

项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定。按外标法计算, 绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 含量的 RSD 分别为 1.16%, 1.83%, 0.30%, 0.74%, 1.00%, 0.60%, 表明方法重复性较好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号: 1221-01)6 份, 每份 0.5 g, 精密称定, 分别精密加入一定量的对照品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 测定回收率。按外标法计算, 绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的平均回收率为 98.5%, 98.0%, 98.5%, 97.6%, 96.4%, 99.6%, RSD 分别为 1.45%, 2.32%, 1.71%, 1.07%, 0.78%, 0.72%。

2.9 相对校正因子的计算

根据公式 $f_{s/i} = f_s / f_i = (A_s \times C_i) / (A_i \times C_s)$ (A_s 、 C_s 分别为内参物对照品的峰面积和浓度, A_i 、 C_i 分别为待测成分对照品的峰面积和浓度)^[8], 结合“2.4”项下测定的峰面积数据, 以绿原酸为内参物, 分别计算各成分与绿原酸的相对校正因子。结果隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的相对校正因子分别为 1.13, 0.59, 1.04, 0.78, 0.85, RSD 分别为 0.21%, 0.15%, 0.37%, 0.22%, 0.16%。

2.10 不同色谱柱考察

考察 7 种不同品牌色谱柱的相对校正因子, 结果见表 2。结果显示, 相对校正因子的 RSD<3%, 相对校正因子在不同色谱柱具有良好的重现性。

2.11 待测组分色谱峰的定位

利用相对保留时间对待测组分进行定位, 并

考察不同品牌色谱柱的相对保留时间。结果表明, 各组分在 7 种不同品牌的色谱柱中出峰顺序一致, 隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的相对保留时间平均值分别为 1.06, 1.18, 2.06, 2.14, 2.28, RSD 分别为 1.72%, 1.88%, 3.68%, 3.48%, 3.84%, 表明相对保留时间可以用于色谱峰的定位。

2.12 一测多评法与外标法测定结果比较

按“2.2.2”项下方法制备 8 批毛冬青配方颗粒供试品溶液, 精密吸取各供试品溶液各 10 μ L, 按“2.1”项下色谱条件测定。采用外标法和一测多评法分别计算 6 个成分的含量, 结果见表 3。为确认一测多评法的准确性, 2 种方法所得的含量结果分别经 Pearson 相关系数分析, 结果 2 种方法结果之间的相关系数均>0.999 9, 说明 2 种方法得到的结果相似性较高; 且 2 组结果的相对标准偏差均<3%, 表明一测多评法与外标法测定结果无显著差异。

3 讨论

对混合对照品进行 190~400 nm 全波长扫描, 6 种成分均在 330 nm 附近有最大吸收波长, 最终选择 330 nm 为检测波长。

实验分别采用了水、30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、乙醇 5 种提取溶剂同法超声提取样品, 测定结果(按 6 种成分总量计算)分别为 2.43, 2.52, 2.56, 2.30, 0.30 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。50%乙醇的提取效率较高, 样品杂质较少, 易滤过和宜长时间保存, 最终选用 50%乙醇作为提取溶剂。

6 种成分中绿原酸为主要指标成分, 且该成分价廉易得, 故作为内参物, 建立与其他 5 种成分的相对校正因子。

表 2 不同色谱柱的相对校正因子($n=2$)

Tab. 2 Relative correction factors of different columns ($n=2$)

色谱柱	$f_{\text{绿原酸/隐绿原酸}}$	$f_{\text{绿原酸/咖啡酸}}$	$f_{\text{绿原酸/异绿原酸 B}}$	$f_{\text{绿原酸/异绿原酸 A}}$	$f_{\text{绿原酸/异绿原酸 C}}$
Ultimate AQ-C ₁₈	1.14	0.60	1.03	0.78	0.85
YMC Triart C ₁₈	1.14	0.60	1.03	0.78	0.85
DIKMA Diamosil C ₁₈	1.12	0.59	1.03	0.78	0.85
Phenomenex Luna C ₁₈	1.14	0.59	1.03	0.78	0.86
Agilent TC-C18	1.15	0.60	1.03	0.78	0.86
Merck STAR LP RP-18	1.14	0.60	1.04	0.78	0.85
SHISEIDO CAPCELL PAK C ₁₈ MGII	1.13	0.59	1.04	0.78	0.85
平均值	1.14	0.59	1.03	0.78	0.85
RSD%	0.66	0.32	0.39	0.42	0.70

表 3 不同批次样品含量测定(n=2)

Tab. 3 Results of content determination of samples(n=2)

样品编号	绿原酸	mg·g ⁻¹									
		隐绿原酸		咖啡酸		异绿原酸 B		异绿原酸 A		异绿原酸 C	
		外标	一测多评	外标	一测多评	外标	一测多评	外标	一测多评	外标	一测多评
1221-01	0.35	0.33	0.33	0.14	0.14	0.83	0.83	0.45	0.45	0.65	0.65
1221-02	0.40	0.44	0.44	0.15	0.15	0.98	0.98	0.54	0.54	0.74	0.73
1221-03	0.74	0.83	0.82	0.22	0.22	1.92	1.92	0.78	0.78	1.59	1.58
1221-04	0.30	0.28	0.28	0.16	0.16	0.71	0.71	0.30	0.30	0.63	0.62
1221-05	0.21	0.23	0.23	0.16	0.16	0.44	0.44	0.21	0.21	0.32	0.32
1221-06	0.54	0.59	0.59	0.11	0.11	0.96	0.96	0.57	0.57	0.69	0.68
1221-07	0.62	0.60	0.60	0.15	0.15	1.33	1.33	0.70	0.70	1.09	1.08
1221-08	1.27	1.05	1.05	0.42	0.42	2.67	2.67	1.38	1.38	2.41	2.38

实验考察了不同品牌色谱柱, 结果表明相对校正因子和相对保留值均相对稳定, 说明本方法用不同色谱柱同样可获得较好的重现性。一测多评法计算结果与外标法所得结果无显著差异, 说明一测多评法可用于毛冬青配方颗粒中酚酸类成分的含量测定, 可为其他中药配方颗粒的多指标成分定量提供参考。

REFERENCES

- [1] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准第二卷[S]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2011: 52.
- [2] 熊友香, 李昶, 罗宪堂. 毛冬青的化学成分药理作用研究进展[J]. 中药材, 2002, 25(5): 371-374.
- [3] ZHOU Z L. Studies on chemical constituents of *Ilex pubescens* Hook. et Arn [D]. Guilin: Guangxi Normal University, 2007.
- [4] CHEN S H, WANG Y Q, LUO L X. Advances in study on natural product of chlorogenic acid [J]. Food Sci Technol(食品科技), 2008, 33(2): 195-199.
- [5] 杨九凌, 祝晓玲, 李成文, 等. 咖啡酸及其衍生物咖啡酸苯乙酯药理作用研究进展[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(8): 577-582.
- [6] 李英, 吕晔, 林丽萍. HPLC-ELSD 法同时测定毛冬青中 3 种五环三萜的含量[J]. 中药材, 2014, 37(3): 451-453.
- [7] XU Y H, MIAO M S, XU P, et al. Determination on content of total flavonoids in the effective fraction of *Ilex pubescens* Hook [J]. China J Chin Med(中医学报), 2011, 26(7): 826-827.
- [8] 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): 657-658.
- [9] HE B, LIU Y, YANG S Y, et al. Determination of 10 active constituents in *Farfarae Flos* by quantitative analysis of multi-components by single marker [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析), 2013, 33(9): 1518-1524.
- [10] ZHANG S R, WU T, WEI S, et al. Study of QAMS with forsythin as the internal reference substance for quality evaluation in *Shanxi Forsythiae Fructus* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(3): 304-308.
- [11] LU T L, SHI S M, CAI B C. Advances in studies on multi-component determination of Chinese materia medica by QAMS [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2012, 43(12): 2525-2529.
- [12] FENG W H, LI C, ZHANG K B, et al. Integrative research of QAMS model used in assay of flavonoids in *Epimedium Folium*, its processed products and finished Chinese medicines [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2016, 41(15): 2843-2854.
- [13] GAO H M, SONG Z H, WANG Z M, et al. Overview on quantitative analysis of multi-components by single-marker [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2012, 37(4): 405-416.

收稿日期: 2017-02-15
(本文责编: 蔡珊珊)