

· 药物制剂与药品质量控制 ·

一测多评法测定肾炎四味颗粒中 4 种黄酮类成分的含量

周伟,曹全胜

(湖北省食品药品监督检验研究院,武汉 430064)

摘要 **目的** 建立高效液相色谱一测多评法,同时测定肾炎四味颗粒中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的含量。**方法** 采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相为甲醇-0.4% 磷酸溶液,梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 278 nm。以黄芩苷为参照,建立汉黄芩苷与其他 3 种成分相对校正因子,计算其他 3 种成分的含量,实现一测多评,同时利用外标法测定这 4 种成分的含量,比较两者的差异,验证一测多评法的准确性和科学性。**结果** 一测多评法的计算结果与外标法的实测值之间差异无统计学意义。**结论** 一测多评的质量评价模式用于肾炎四味颗粒的质量控制可行,且准确。

关键词 肾炎四味颗粒;黄芩苷;汉黄芩苷;黄芩素;汉黄芩素;一测多评;校正因子;色谱法;高效液相

中图分类号 R286;R927.2

文献标识码 B

文章编号 1004-0781(2017)01-0065-05

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.01.016

Determination of Four Flavonoids in *Shenyan Siwei* Granules by Quantitative Analysis of Multi-components with Single Marker

ZHOU Wei, CAO Quansheng (Hubei Province Food and Drug Supervision and Inspection Institute, Wuhan 430064, China)

ABSTRACT **Objective** To establish an HPLC method to measure four flavonoids (baicalin, wogonoside, baicalein and wogonin) in *shenyan siwei* granules by quantitative analysis of multi-components with single marker (QAMS). **Methods** Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was composed with methanol and 0.4% phosphoric acid solution at 1.0 mL·min⁻¹ flow rate with gradient elution. The detection wavelength was 278 nm. Baicalin was used as the internal reference substance. The relative correction factors (RCF) between the baicalin and the other three flavonoids were established to detect the quantitation of baicalin and calculate the quantitation of the other three constituents. The external standard method was used for quantitating the four constituents, and the method was evaluated by comparing to the quantitative results between external standard method and QAMS method. **Results** The results of QAMS method had no significant difference with those of external standard method. **Conclusion** It is feasible and accurate to control the quality of *shenyan siwei* granules with QAMS.

KEY WORDS *Shenyan siwei* granules; Baicalin; Wogonoside; Baicalein; Wogonin; Quantitative analysis of multi-components with single marker; Relative correction factor; Chromatography, high performance liquid

肾炎四味颗粒处方由细梗胡枝子、黄芩、石韦、黄芪组成。主要有清热利尿、补气健脾之功效。用于湿热内蕴兼气虚所致的水肿,症见水肿、腰痛、乏力、小便不利,可治疗慢性肾炎。方中细梗胡枝子可消肿、利尿、消除尿蛋白,降低血清尿素氮(BUN),恢复肾功能,配以气薄味厚的黄芩,清泻肺中之郁热,通利膀胱

之水湿,黄芩有消炎、抗菌的药理作用,主要有黄酮类活性成分^[1-4]。肾炎四味颗粒仅有 1 个批准文号,为湖北科益药业股份有限公司独家品种,批准文号为国药准字 Z20040076。现行标准含量测定项目为测定黄芩苷单一成分的含量,按照药典委员会国家药品标准提高工作的要求,笔者对该品种的质量标准进行了修订。

当前中药质量控制模式已逐渐由单一成分控制转向多指标评价模式,但在实验过程中需要用足够的化学对照品。由于中药的化学对照品分离难度大、部分品种价格过高或稳定性差等因素,中药对照品的供应一直是困扰质量标准制定和执行的难题,一些进行多组分质量控制的标准甚至难以执行。因此,本项目旨在建立一测多评法对肾炎四味颗粒进行多指标质量控

收稿日期 2015-07-16 修回日期 2015-12-02

作者简介 周伟(1977-),男,湖北武汉人,主管药师,学士,主要从事中药检验与中成药标准制订工作。电话:027-87705226, E-mail: lacfh@163.com。

通信作者 曹全胜(1969-),男,湖北武汉人,副主任药师,硕士,主要从事药品监督与质量分析等工作。电话:027-87736913, E-mail: cqscyf@163.com。

制研究,即以黄芩苷对照品为参照物,通过建立其与汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的相对校正因子(relative correction factor,RCF)进行含量计算,以降低检测成本和时间,并对方法的准确度和重复性进行验证。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪;DIONEX ultima 3000 高效液相色谱仪;Waters e2695-2489 高效液相色谱仪;色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)、phenomenex Gemini C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、TechMate C₁₈-ST (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)、CAPCELL PAK C₁₈ MG (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、Welch Xtimate C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、Waters SunFireTM C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm);梅特勒-托利多 MS204S/Z 电子天平(感量 0.1 mg);梅特勒-托利多 MS105 电子天平(感量 0.01 mg);超声仪(济宁市中区鲁超仪器厂)。

1.2 试剂 黄芩苷(批号:110715-201318,含量:93.3%)、黄芩素(批号:111595-201306,含量:98.5%)、汉黄芩素对照品(批号:111514-201304,含量:97.6%)均由中国食品药品检定研究院提供;汉黄芩苷对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号:MUST-0031201,含量>98.0%),甲醇(色谱纯,美国Fisher公司,批号:20131215),磷酸(分析纯,北京化工厂,批号:20140126),乙醇(分析纯,北京化工厂,批号:20140315),色谱用水为Millipore制备超纯水;肾炎四味颗粒(规格:每袋5g)8批,湖北科益药业股份有限公司生产。

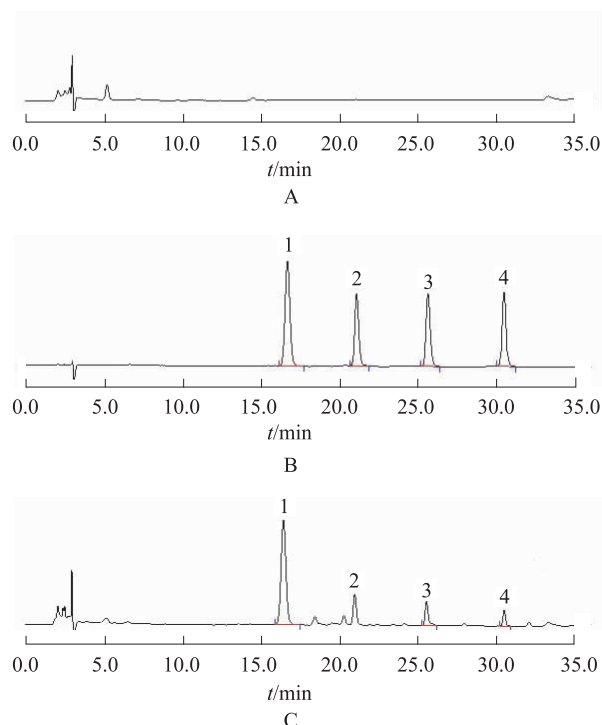
2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相:甲醇(A)-0.4%磷酸(B),梯度洗脱(0~10 min, 55% B; ~30 min, 55% → 20% B);流速 1.0 mL·min⁻¹;柱温 30℃;检测波长为 278 nm;进样量 10 μL。在上述色谱条件下,各组理论板数均不低于 4 000,样品中各待测组分与相邻峰分离度均>1.5,色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 取黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品适量加甲醇制成浓度分别为 30.17, 15.22, 12.96, 11.43 μg·mL⁻¹ 的混合溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取本品 30 g,混匀,取 0.5 g,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加 70% 乙醇约 80 mL,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 30 min,放冷,加 70% 乙醇至刻度,摇匀,滤过。精密量取续滤液 2 mL,置 10 mL 量瓶中,加 70% 乙醇稀释至刻度,摇

匀,即得。



A. 阴性样品;B. 对照品;C. 样品;1. 黄芩苷;2. 汉黄芩苷;3. 黄芩素;4. 汉黄芩素

图 1 3 种溶液的 HPLC 色谱图

A. negative sample; B. control; C. sample; 1. baicalin; 2. wogonoside; 3. baicalein; 4. wogonin

Fig. 1 HPLC chromatograms of three kinds of solutions

2.4 阴性样品溶液的制备 按处方的组成,取除黄芩外其他药味,按工艺制法制成阴性样品,按供试品溶液制备方法制备,即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 波长的选择及峰纯度检测 采用光电二极管阵列检测器,对供试品中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素进行峰纯度检测,结果峰纯度均符合要求;根据对照品二极管阵列检测器扫描图,黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素最大吸收波长分别为 277.6, 330.5, 275.5, 275.0 nm,综合考虑,选择检测波长为 278 nm。

2.5.2 线性关系考察 取黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品浓度分别为 150.35, 77.80, 65.12, 62.10 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 12.0, 16.0, 20.0 mL,分别置 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,进样量均为 10 μL,记录色谱图,以测得峰面积(A)对进样量(m)进行线性回归,结果见表 1(n=7),各成分在一定进样量范围内呈良好的线性关系。

2.5.3 精密度实验 精密量取黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素浓度分别为 30.17, 15.22, 12.96,

11.43 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品混合溶液,连续进样 6 次,进样量均为 10 μL ,结果黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素峰面积的 RSD 分别为 0.93%、0.95%、1.24% 和 1.06%,表明仪器精密度良好。

表 1 4 种成分线性关系

Tab.1 Linearity of the methods for four constituents

成分	回归方程	线性范围/ μg	r
黄芩苷	$A = -8.00 \times 10^{-2} + 60.46m$	0.060 ~ 1.203	0.999 9
汉黄芩苷	$A = 6.22 \times 10^{-2} + 57.46m$	0.031 ~ 0.622	0.999 8
黄芩素	$A = -5.60 \times 10^{-2} + 63.97m$	0.026 ~ 0.521	0.999 9
汉黄芩素	$A = -8.18 \times 10^{-2} + 89.33m$	0.025 ~ 0.497	0.999 6

2.5.4 稳定性实验 取同一份供试品溶液,分别在配制后 0、2、4、8、24 h 进样,进样量均为 10 μL ,结果黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素峰面积的 RSD 分别为 1.12%、0.88%、1.13% 和 1.17%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定,能保证含量测定的时间要求。

2.5.5 重复性实验 取同一批号样品溶液 6 份,分别依法操作,测定 4 种成分含量。结果黄芩苷平均含量为 37.1 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD = 1.25%;汉黄芩苷平均含量为 12.2 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD = 1.19%;黄芩素平均含量为 13.4 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD = 1.28%;汉黄芩素平均含量为 10.6 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD = 1.11%。

2.5.6 加样回收率实验 取已知含量的样品 9 份,每份取样量约 0.25 g,分别加入混合对照品溶液(含黄芩苷 9.96 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,汉黄芩苷 3.06 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,黄芩素 3.34 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,汉黄芩素 2.71 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 0.8、1.0、1.2 mL,按“2.3”项供试品溶液的制备方法操作,测定含量,结果见表 2($n=9$),各成分回收率均符合要求。

2.6 待测成分 RCF 的计算 取“2.5.2”项数据,以黄芩苷为参照物,按式(1)计算各成分 RCF,结果见表 3,汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素平均 RCF 分别为 1.218 (RSD = 0.76%),1.657 (RSD = 0.89%),1.733 (RSD = 0.67%),表明不同浓度的 RCF 基本相同。

式(1): $f_{si} = \frac{f_s}{f_i} = \frac{A_s/C_s}{A_i/C_i}$

式中 f_s 为参照物校正因子, f_i 为某待测成分校正因子, A_s 为参照物峰面积, C_s 为参照物浓度, A_i 为某待测成分峰面积, C_i 为某待测成分浓度。

2.7 待测成分 RCF 耐用性考察 在 Agilent 1100、DIONEX ultima 3000、Waters e2695-2489 3 种高效液相色谱仪上,分别考察本色谱条件在 Agilent ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm × 150 mm,5 μm)、phenomenex Gemini C₁₈(4.6 mm × 250 mm,5 μm)、TechMate C₁₈-ST

(4.6 mm × 150 mm,5 μm)、CAPCELL PAK C₁₈ MG (4.6 mm × 250 mm,5 μm)、Welch Xtimate C₁₈ (4.6 mm × 250 mm,5 μm)、Waters SunFireTM C₁₈ (4.6 mm × 150 mm,5 μm) 6 种色谱柱上的 RCF 值,结果见表 4,汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的平均 RCF 分别为 1.222、1.671、1.723;RSD 分别为 0.85%、1.08%、1.09%,表明不同仪器及色谱柱对 RCF 基本无影响。

2.8 待测成分色谱峰的定位 色谱峰准确定位是保证一测多评法应用的前提,一般采用的是保留时间差(Δt_{Ras})或相对保留值(Ras)等参数,因常规色谱柱长度有 150 与 250 mm 两种规格,保留时间差(Δt_{Ras})差别较大,因此本研究拟采用相对保留值(Ras)进行定位。分别考察了不同仪器、不同色谱柱上 Ras 的重复性,结果见表 4,以黄芩苷为参照,汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素平均相对保留值分别为 1.23、1.46、1.66;RSD 分别为 0.86%、5.58%、4.86%,黄芩素、汉黄芩素 Ras 变化略大,但相对保留值均在平均值的 + 8% 以内,表明 Ras 可以作为本方法的定位参数。

2.9 外标法与一测多评法测定结果比较 取样品 8 批,按“2.3”项方法制备供试品溶液,分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液进样测定,采用外标法和一测多评法计算黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素含量,结果见表 5。用 SPSS17.0 版软件配对样品 T 检验分析两种方法测定结果,从配对样本 T 检验结果可以得到两种方法测定结果之差均值的标准差:汉黄芩苷为 0.250 7、黄芩素为 0.164 2、汉黄芩素为 0.192 7;均值标准误:汉黄芩苷为 0.088 6、黄芩素为 0.058 1、汉黄芩素为 0.068 1,直观上看,两种方法结果差别较小,设置置信区间为 95%,汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的 T 检验概率分别为 0.590、0.836、0.064,均大于 0.05 的显著水平,可以认为两种方法的测定结果差异无统计学意义,表明一测多评法可用于此 3 种成分的测定。

3 讨论

肾炎四味颗粒及其系列制剂标准对黄芩的质量控制均体现为“黄芩苷”的含量。鉴于制定中药质量标准应以中医临床用药中注重整体的观念为基础,黄芩的抗炎作用是多种成分的综合作用,因此仅用某一种成分作为衡量该药味质量的指标,就不能体现其内在本质,所以建立多种有效成分或专属性成分的含量测定方法、探讨多成分综合评价体系是非常必要的。一测多评法的建立为其系列制剂质量标准的提高提供了思路和方法。

表 2 4 种成分加样回收率实验结果

Tab. 2 Results of recovery test on four constituents

成分	取样量/g	原有量	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
		mg		%			
黄芩苷	0.253 3	9.40	7.97	17.46	101.13	99.79	2.11
	0.254 7	9.45	7.97	17.21	97.37		
	0.250 6	9.30	7.97	17.34	100.88		
	0.259 8	9.64	9.96	19.65	100.50	99.26	1.45
	0.253 7	9.41	9.96	19.14	97.69		
	0.250 7	9.30	9.96	19.22	99.60		
	0.253 3	9.40	11.95	21.28	99.41	99.86	1.80
	0.255 7	9.49	11.95	21.66	101.84		
	0.258 1	9.58	11.95	21.33	98.33		
汉黄芩苷	0.253 3	3.09	2.45	5.57	101.22	102.31	1.01
	0.254 7	3.11	2.45	5.62	102.45		
	0.250 6	3.06	2.45	5.59	103.27		
	0.259 8	3.17	3.06	6.25	100.65	100.76	0.19
	0.253 7	3.10	3.06	6.19	100.98		
	0.250 7	3.06	3.06	6.14	100.65		
	0.253 3	3.09	3.67	6.83	101.91	100.09	1.57
	0.255 7	3.12	3.67	6.76	99.18		
	0.258 1	3.15	3.67	6.79	99.18		
黄芩素	0.253 3	3.39	2.67	6.07	100.37	100.50	0.57
	0.254 7	3.41	2.67	6.11	101.12		
	0.250 6	3.36	2.67	6.03	100.00		
	0.259 8	3.48	3.34	6.72	97.01	99.80	2.59
	0.253 7	3.40	3.34	6.75	100.30		
	0.250 7	3.36	3.34	6.77	102.10		
	0.253 3	3.39	4.01	7.27	96.76	96.26	0.90
	0.255 7	3.43	4.01	7.25	95.26		
	0.258 1	3.46	4.01	7.34	96.76		
汉黄芩素	0.253 3	2.68	2.17	4.83	99.08	98.77	1.42
	0.254 7	2.70	2.17	4.81	97.24		
	0.250 6	2.66	2.17	4.83	100.00		
	0.259 8	2.75	2.71	5.45	99.63	99.63	0.37
	0.253 7	2.69	2.71	5.40	100.00		
	0.250 7	2.66	2.71	5.35	99.26		
	0.253 3	2.68	3.25	5.96	100.92	99.28	2.11
	0.255 7	2.71	3.25	5.86	96.92		
	0.258 1	2.74	3.25	5.99	100.00		

表 3 3 种成分不同浓度的校正因子

Tab. 3 RCF of different concentration of three constituents

汉黄芩苷		黄芩素		汉黄芩素	
浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RCF	浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RCF	浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RCF
3.11	1.217	2.60	1.669	2.48	1.739
6.22	1.214	5.21	1.668	4.97	1.748
12.45	1.220	10.4	1.647	9.94	1.717
24.90	1.209	20.8	1.656	19.87	1.729
37.34	1.216	31.26	1.638	29.81	1.736
49.79	1.215	41.68	1.642	39.74	1.742
62.24	1.238	52.10	1.676	49.68	1.719

表 4 不同仪器与色谱柱测得各成分校正因子与相对保留值
Tab.4 RCF and Ras of each constituent using different instruments and columns

仪器	色谱柱	汉黄芩苷		黄芩素		汉黄芩素	
		RCF	Ras	RCF	Ras	RCF	Ras
Agilent 1100	Agilent ZORBAX SB-C ₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)	1.216	1.232	1.678	1.507	1.720	1.724
	phenomenex Gemini C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	1.221	1.248	1.669	1.508	1.725	1.737
DIONEX ultima 3000	TechMate C18-ST (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)	1.234	1.219	1.683	1.521	1.741	1.726
	CAPCELL PAK C ₁₈ MG (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	1.209	1.228	1.676	1.523	1.733	1.537
Waters e2695-2489	Welch Xtimate C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	1.217	1.227	1.635	1.363	1.726	1.608
	Waters SunFire™ C18 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)	1.235	1.220	1.682	1.352	1.687	1.639
平均值		1.222	1.229	1.671	1.462	1.723	1.662
RSD/(%)		0.85	0.86	1.08	5.58	1.09	4.86

表 5 外标法与一测多评法测定结果
Tab.5 Results of external standard method and QAMS method

批号	黄芩苷	汉黄芩苷		黄芩素		汉黄芩素	
		外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法
120301	30.5	14.9	14.8	12.4	12.2	8.7	8.8
120401	32.8	10.6	10.4	13.6	13.7	9.5	9.7
130101	40.6	11.7	11.5	14.3	14.5	14.1	14.5
130501	38.1	16.4	16.7	15.7	15.5	11.3	11.7
140502	37.1	12.2	12.5	13.4	13.4	10.6	10.5
140601	39.4	11.9	12.0	12.6	12.7	12.5	12.7
141001	36.0	14.6	14.3	14.7	14.6	9.8	9.9
141201	34.5	13.8	13.5	13.2	13.4	13.4	13.3

本方法采用 Ras 对色谱峰进行定位,因仪器设备及色谱柱的限制,仅考察 3 种高效液相色谱系统和 6 种不同品牌色谱柱。实验中如相对保留时间略超出规定范围时,可以结合色谱图整体特征及每个峰的紫外光谱特征来定位,或选用各对照品对色谱峰进行定位,确定目标峰位置^[5]。

参考文献

[1] 刘金欣,孟繁蕴,张胜海. UPLC 同时测定黄芩中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A[J]. 中草药,2014,45(10):1477-1480.

[2] 徐丹洋,陈佩东,张丽. 黄芩的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):78-80.
[3] 符洪,肖新月,张南平. 药用黄芩中主要化学成分分析[J]. 药物分析杂志,2003,23(1):42-47.
[4] 颜明,李洪志,刘洁婷,等. 黄芩苷对 SH-SY5Y 细胞损伤的 Bcl-2 和 Bcl-xL mRNA 基因表达的影响[J]. 医药导报,2012,31(7):843-845.
[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):657-658.