

一测多评法同步测定银黄片中 6 种咖啡酰奎宁酸

林永强¹, 徐丽华¹, 王淑华², 庄明蕊¹

1. 山东省食品药品检验所, 山东 济南 250101

2. 山东省生物药物研究院, 山东 济南 250101

摘要: 目的 建立银黄片中 6 种咖啡酰奎宁酸的一测多评定量测定方法。方法 以绿原酸 (5-*O*-咖啡酰奎宁酸) 为指标, 建立该成分与 3-*O*-咖啡酰奎宁酸、4-*O*-咖啡酰奎宁酸、4, 5-*O*-二咖啡酰奎宁酸、3, 5-*O*-二咖啡酰奎宁酸和 3, 4-*O*-二咖啡酰奎宁酸的相对校正因子, 采用相对校正因子计算各成分的量, 同时对 13 批银黄片一测多评的计算结果与外标法实测值进行比较, 并对不同品牌仪器和不同厂家色谱柱进行考察, 评价一测多评法在银黄片中应用的准确性和科学性。结果 建立了银黄片的定量控制方法; 方法准确性评价结果表明, 利用一测多评法在不同色谱柱的计算值与外标实测值之间没有显著性差异。结论 本法可只采用绿原酸对照品同时控制 6 种成分的量, 为中药的多指标成分质量评价模式提供参考。

关键词: 一测多评; 银黄片; 咖啡酰奎宁酸; 绿原酸; 高效液相色谱法

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)04-0706-05

Quantitative analysis on multi-components by single marker for simultaneous determination of six caffeoylquinic acids in Yinhuang Tablets

LIN Yong-qiang¹, XU Li-hua¹, WANG Shu-hua², ZHUANG Ming-rui¹

1. Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China

2. Shandong Institute of Biopharmaceuticals, Jinan 250101, China

Key words: quantitative analysis multi-components by single marker; Yinhuang Tablets; caffeoylquinic acids; chlorogenic acid; HPLC

银黄片由金银花提取物和黄芩提取物组成, 用于急慢性扁桃体炎、急慢性咽喉炎、上呼吸道感染。其中金银花具有清热解毒、抗菌消炎之功效, 咖啡酰奎宁酸是其主要抗菌有效成分, 主要以绿原酸 (5-*O*-咖啡酰奎宁酸, 5-*O*-CQA^[1]) 和 3, 5-*O*-二咖啡酰奎宁酸 (3, 5-*O*-diCQA) 形式存在, 在制备提取物和制剂过程中, 5-*O*-CQA 和 3, 5-*O*-diCQA 发生异构化, 部分转化为 3-*O*-CQA、4-*O*-CQA、4, 5-*O*-diCQA、3, 4-*O*-diCQA, 并且达到一定比例。近年已有大量文献报道, 研究建立了上述多种成分同时测定的定量方法^[2-4], 马双成等^[5]还首次同时测定了这 6 种咖啡酰奎宁酸的量, 为咖啡酰奎宁酸类成分进行质量控制提供了理论和数据支持。但由于这些成分主要是异构化产物, 对照品不易获得, 纯化难度大, 价格昂贵, 直接限制了用常规外标法来实现其多指标质量控制的设想, 导致这些文献所报道的方法无法在生产和检验中得到应用。

本研究利用一测多评法中药质量评价模式^[6], 建立 5-*O*-COA 与其余 5 种咖啡酰奎宁酸之间的相对校正因子, 以 5-*O*-COA 为对照, 外标法测出样品中 5-*O*-COA 的量, 通过相对校正因子计算其余 5 种咖啡酰奎宁酸的量, 实现银黄片的多指标质量评价。同时对 13 批银黄片一测多评的计算结果与外标法实测值进行比较, 并对不同品牌仪器和色谱柱进行考察, 评价一测多评法在银黄片中应用的准确性和科学性。

1 仪器与材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); DIONEX 高效液相色谱仪 (美国戴安公司); 岛津 UV-2550 紫外分光光度计 (日本岛津); Sartorius CP225D 电子天平 (德国 Sartorius 公司)。

5-*O*-CQA (批号 110753-200413, 中国药品生物制品检定所), 3-*O*-CQA、4-*O*-CQA、4, 5-*O*-diCQA、3, 5-*O*-diCQA、3, 4-*O*-diCQA 购于成都普思生物科

收稿日期: 2011-09-01

作者简介: 林永强 (1975—), 男, 主管药师, 硕士, 研究方向为药物分析。Tel: (0531)81216522 E-mail: franklin810@163.com

技有限公司, 质量分数 > 98%, 批号分别为 ps010603-05、ps010512-05、ps08103101、ps08103102、ps08110401。13 批银黄片样品批号及来源见表 1。甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

表 1 样品批号及来源

Table 1 Batch No. and source of samples

批号	厂家
20101109s	山东鲁泰环中制药
090901h	海南海力制药
100101h	海南海力制药
101001h	海南海力制药
20100901h	湖南爱生制药
100101g	广西广明药业
100501y	云南云河药业
100701y	云南云河药业
100301g	广东一片天医药
100701g	广东一片天医药
20100601t	通化金马药业
101001t	通化正和药业
101001s	上海和黄药业

2 方法与结果

2.1 方法原理^[6]

在一定线性范围内, 某一组分的量与检测器响应值成正比, 即 $f=A/C$ (A 表示峰面积, C 表示浓度)。在多指标质量建立时, 配制一定浓度的含有各待测组分的混合对照, 以其中一种典型组分为内标物, 建立该组分与其他组分之间的相对校正因子 ($f_{k/s}$)。

$$f_{k/s} = f_k / f_s = A_k C_s / (A_s C_k) \quad (1)$$

A_s 为内标物峰面积, C_s 为内标物浓度, A_k 为某待测组分 k 的峰面积, C_k 为某待测组分 k 的浓度

测得的 $f_{k/s}$ 可作为某一色谱条件下某一组分的通用参数, 通过使用一种对照品和 $f_{k/s}$ 即可按下式计算样品中其他组分的量。

$$C_k = A_k C_s' / (f_{k/s} A_s') \quad (2)$$

A_k 为样品中待测组分 k 的峰面积, C_s' 为用外标法测得的样品中内标物浓度, A_s' 为样品中内标物的峰面积

因此, 一测多评法可同时测定样品中 n 个组分, 其中一个组分 (内标物) 用外标法测定, 其余组分分别按公式 (2) 计算, 即得。

2.2 一测多评方法学考察

2.2.1 色谱条件

色谱柱为大连依利特柱 (BDS) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A)-0.4% 磷酸溶液 (B), 梯度洗脱: 0~15 min, 5%~20% A; 15~30 min, 20%~30% A; 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 327 nm, 进样量 10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取 3-*O*-CQA、5-*O*-CQA、4-*O*-CQA、4, 5-*O*-diCQA、3, 5-*O*-diCQA、3, 4-*O*-diCQA 对照品各适量, 加 50% 甲醇制得各对照品的储备溶液。分别精密吸取各对照品储备溶液适量, 置量瓶中, 50% 甲醇稀释至刻度, 制得各对照品的单一溶液 (3-*O*-CQA 38.32 μg/mL、5-*O*-CQA 37.32 μg/mL、4-*O*-CQA 37.68 μg/mL、4, 5-*O*-diCQA 18.28 μg/mL、3, 5-*O*-diCQA 8.2 μg/mL、3, 4-*O*-diCQA 39.12 μg/mL)。再分别精密吸取各对照品储备溶液适量, 置同一量瓶中, 50% 甲醇稀释至刻度, 制得混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取样品 10 片, 研细。称取细粉约 0.2 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇适量, 超声处理 30 min, 放冷, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取上述混合对照品溶液 1、3、6、9、12、15、18 μL 进样分析, 以进样量对峰面积积分值进行回归处理, 得 3-*O*-CQA、5-*O*-CQA、4-*O*-CQA、4, 5-*O*-diCQA、3, 5-*O*-diCQA、3, 4-*O*-diCQA 回归方程分别为 $Y=3\ 021.7 X+1.479\ 3$, $Y=2\ 987.5 X+1.907\ 5$, $Y=3\ 048.6 X+1.338\ 1$, $Y=3\ 148.2 X+0.702\ 4$, $Y=3\ 545.9 X+0.447\ 7$, $Y=3\ 661.8 X+1.130\ 2$, r 分别为 0.999 6、0.999 1、0.999 9、0.998 2、0.995 7、0.997 6, 表明 6 种咖啡酰奎宁酸分别在 0.04~0.69、0.04~0.67、0.04~0.68、0.02~0.33、0.01~0.15、0.04~0.70 μg 线性关系良好。

2.2.5 校正因子计算 同“2.2.4”项进样操作, 记录色谱峰。以 5-*O*-CQA 为内标, 按公式 (1) 分别计算 3-*O*-CQA、4-*O*-CQA、4, 5-*O*-diCQA、3, 5-*O*-diCQA、3, 4-*O*-diCQA 的 $f_{k/s}$, 结果 $f_{3-O-CQA/5-O-CQA}$ 、 $f_{4-O-CQA/5-O-CQA}$ 、 $f_{4,5-O-diCQA/5-O-CQA}$ 、 $f_{3,5-O-diCQA/5-O-CQA}$ 、 $f_{3,4-O-diCQA/5-O-CQA}$ 分别为 1.011 2 ± 0.001 6、1.019 8 ± 0.000 5、1.053 4 ± 0.002 2、1.188 6 ± 0.006 4、1.224 1 ± 0.001 1 ($n=7$)。

2.2.6 精密度试验 精密吸取上述混合对照品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 3-*O*-CQA、5-*O*-CQA、4-*O*-CQA、4, 5-*O*-diCQA、3, 5-*O*-diCQA、3, 4-*O*-diCQA 峰面积的 RSD 分别为 0.09%、0.10%、

0.11%、0.11%、0.13%、0.12%。

2.2.7 定量限的测定 分别配制低质量浓度的对照品溶液，注入液相色谱仪，观察其峰高与基线噪音的比值（即信噪比 S/N ），当 S/N 等于 10 时的质量浓度为定量限（LOQ）。结果 3-*O*-CQA、5-*O*-CQA、4-*O*-CQA、4, 5-*O*-diCQA、3, 5-*O*-diCQA、3, 4-*O*-diCQA 6 种成分的定量限分别为 0.229、0.081、0.123、0.129、0.135、0.160 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液（批号 20101109），每隔 4 h 进样 1 次，记录峰面积，共考察 24 h，计算峰面积的 RSD，6 种成分的 RSD 分别为 0.48%、0.82%、1.14%、0.39%、1.91%、0.35%，表明处理后的样品溶液室温放置 24 h 稳定。

2.2.9 重复性试验 取银黄片（批号 20101109），按照供试品溶液的制备方法，平行制备 6 份供试品，按上述方法和条件进行测定，计算各成分的量。结果 6 种成分质量分数的 RSD 分别为 1.40%、1.28%、1.34%、2.13%、3.15%、2.24%。

2.2.10 加样回收率试验 精密称取批号 20101109 样品细粉 6 份，每份约 0.1 g，分别加入一定量的混合对照品，按供试品溶液处理方法制备供试品溶液并测定，计算加样回收率，6 种成分的平均回收率分别为 101.23%、104.27%、102.21%、99.87%、99.40%、98.74%，RSD 分别为 1.07%、1.30%、1.17%、1.88%、2.09%、1.94%。

2.2.11 空白试验 取处方中除去金银花提取物的其他药味，按处方比例制成缺金银花提取物的阴性对照样品。取阴性对照样品约 0.2 g，同供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。分别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 ，注入液相色谱仪中，测定，色谱图见图 1。试验结果表明，阴性对照溶液无干扰。

2.2.12 样品测定 分别精密吸取供试品、混合对照品及 5-*O*-CQA 对照品溶液各 10 μL ，注入液相色谱仪，测定，分别采用外标法和一测多评法计算 6 种成分的量，结果见表 2。结果表明一测多评法与外标法测定结果无显著差异。

2.3 一测多评法耐用性和系统适用性评价

2.3.1 色谱柱及高效液相色谱仪考察 试验考察了两种高效液相色谱系统：Agilent 1200 液相色谱仪和 DIONEX 高效液相色谱仪；6 种色谱柱：大连依利特柱（BDS）、Kromasil 柱、Phenomenex Luna 柱、Agilent-extend 柱、Thermo 柱、资生堂 MG2 柱（250 mm \times 4.6 mm，5 μm ），所测的 $f_{k/s}$ 结果见表 3。

2.3.2 待测组分数谱峰的定位和系统适用性评价 由于一测多评法只使用 1 个对照品，在这种情况下，需要对待测组分数谱峰进行定位。本实验利用相对保留时间（ $t_{k/s}$ ）进行定位。由内标物的保留时间（ t_s ）和待测组分的 $t_{k/s}$ ，就能对待测组分进行定位。

$$t_{k/s} = t_k / t_s \quad (3)$$

t_k 为待测组分 k 的保留时间

精密吸取混合对照品溶液 10 μL ，注入液相色谱仪，记录各待测组分的理论板数、分离度、对称因子和保留时间，按保留时间和公式（3）计算出各组分与绿原酸的 $t_{k/s}$ ，对待测组分进行定位。同时试验了 7 种不同厂家的色谱柱，考察了方法的耐用性，结果见表 4。

各组分在 7 种不同厂家的色谱柱中出峰顺序一致，理论板数在 22 116~203 475、分离度（指与后一个色谱峰之间的分离度）在 2.21~48.3、对称因子在 0.87~1.29，均能较好地满足系统适用性要求，表明所采用的色谱条件耐用性良好。各组分相对保留值的 RSD $\leq 5\%$ ，表明 $t_{k/s}$ 在大部分色谱条件下是一个相对稳定的参数，可以用于色谱峰的定位。

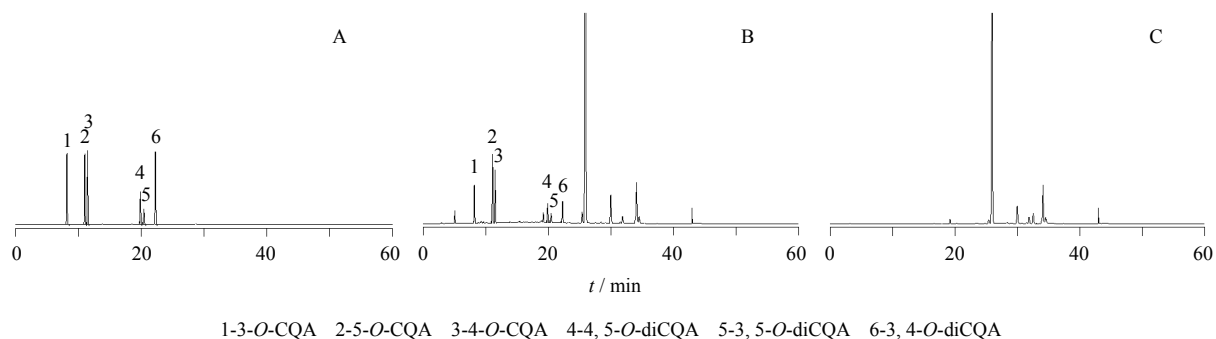


图 1 混合对照品 (A)、银黄片样品 (B) 和阴性样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Yinhuang Tablets sample (B), and negative sample (C)

表 2 13 批银黄片中 6 种咖啡酰奎宁酸的测定结果 (n=2)

Table 2 Determination of six caffeoylquinic acids in 13 batches of Yinhuang Tablets (n=2)

批号	5-O-CQA / (mg·片 ⁻¹)		3-O-CQA / (mg·片 ⁻¹)		4-O-CQA / (mg·片 ⁻¹)		4, 5-O-diCQA / (mg·片 ⁻¹)		3, 5-O-diCQA / (mg·片 ⁻¹)		3, 4-O-diCQA / (mg·片 ⁻¹)	
	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	外标	一测多评
20101109s	1.45	0.77	0.79	1.10	1.08	0.44	0.42	0.23	0.21	0.48	0.47	
090901h	5.63	1.03	1.05	1.31	1.29	0.69	0.65	1.16	1.05	1.66	1.61	
100101h	5.52	1.04	1.06	1.28	1.26	0.67	0.63	1.18	1.07	1.61	1.56	
101001h	5.38	1.41	1.45	1.70	1.67	0.75	0.70	1.20	1.08	1.69	1.63	
20100901h	1.49	0.25	0.26	0.27	0.26	0.13	0.12	0.28	0.26	0.32	0.31	
100101g	0.67	0.07	0.07	0.03	0.03	0.02	0.02	0.43	0.39	0.13	0.12	
100501y	0.35	0.05	0.05	0.08	0.08	0.07	0.07	0.06	0.05	0.10	0.09	
100701y	0.16	0.02	0.02	0.04	0.04	0.06	0.06	0.03	0.02	0.05	0.05	
100301g	0.49	0.07	0.08	0.08	0.08	0.05	0.04	0.10	0.09	0.12	0.12	
100701g	0.44	0.07	0.07	0.08	0.08	0.04	0.04	0.09	0.08	0.11	0.10	
20100601t	1.78	0.24	0.25	0.29	0.29	0.14	0.13	0.20	0.18	0.26	0.25	
101001t	5.32	1.77	1.82	2.27	2.23	0.76	0.71	0.52	0.47	1.32	1.28	
101001s	6.41	2.43	2.50	3.55	3.50	1.31	1.23	0.85	0.77	1.65	1.60	

表 3 不同仪器和色谱柱测得的 $f_{k/s}$

Table 3 $f_{k/s}$ obtained by different instruments and columns

仪器	色谱柱	$f_{3-O-CQA/5-O-CQA}$	$f_{4-O-CQA/5-O-CQA}$	$f_{4,5-O-diCQA/5-O-CQA}$	$f_{3,5-O-diCQA/5-O-CQA}$	$f_{3,4-O-diCQA/5-O-CQA}$
Agilent	大连依利特 (BDS)	1.011 2	1.019 8	1.053 4	1.188 6	1.224 1
	Kromasil	1.010 8	1.020 8	1.050 4	1.189 2	1.217 9
	Phenomenex Luna	1.011 9	1.023 3	1.052 8	1.194 8	1.221 9
DIONEX	Agilent-extend	1.011 3	1.023 6	1.059 4	1.194 5	1.233 1
	Thermo 柱	1.013 1	1.020 2	1.053 9	1.183 5	1.222 6
	资生堂 MG2	1.012 8	1.024 6	1.058 4	1.192 5	1.231 7

表 4 6 种咖啡酰奎宁酸色谱柱考察和待测组分色谱峰的定位结果

Table 4 $t_{k/s}$ of six caffeoylquinic acids observed in different columns and peak positioned of will-be tested components

色谱柱	3-O-CQA		5-O-CQA		4-O-CQA		4, 5-O-diCQA		3, 5-O-diCQA		3, 4-diCQA	
	t/ min	$t_{k/s}$	t/ min	$t_{k/s}$	t/ min	$t_{k/s}$	t/ min	$t_{k/s}$	t/ min	$t_{k/s}$	t/ min	$t_{k/s}$
钻石二代	9.018	0.76	11.806	1.00	12.460	1.06	20.907	1.77	21.891	1.85	23.335	1.98
资生堂 G120	8.477	0.75	11.245	1.00	11.694	1.04	20.084	1.79	20.847	1.85	22.430	1.99
Thermo 柱	7.735	0.75	10.355	1.00	10.862	1.05	19.021	1.84	19.552	1.89	21.211	2.05
kromasil 柱	8.980	0.77	11.625	1.00	12.252	1.05	20.563	1.77	21.475	1.85	22.961	1.98
Agilent-extend	7.119	0.75	9.544	1.00	10.173	1.07	18.466	1.93	19.209	2.01	20.592	2.16
Phenomenex Luna	10.649	0.78	13.723	1.00	14.103	1.03	23.293	1.70	24.499	1.79	26.043	1.90
大连依利特 (BDS)	8.313	0.75	11.157	1.00	11.627	1.04	20.015	1.79	20.585	1.85	22.418	2.01

3 讨论

本实验还对不同提取方式(回流和超声),不同提取溶剂(甲醇、50%甲醇和水),提取时间(20、30、40 min)和取样量(0.1、0.2、0.3 g)等供试品

溶液的制备方法进行考察,最终确定为“2.2.3”项下制备方法。

有文献报道银黄制剂在制备过程中煮沸后绿原酸的量降低了 54.05%,而 UV 法测定结果显示煮沸

前后基本保持不变^[7]。说明绿原酸在生产和储存过程中容易转化为异构体,不利于仅以绿原酸为指标成分进行质量控制;并且绿原酸是一种多植物共有的指标成分,甚至在废弃烟叶中也能提取分离得到绿原酸,提取率达到 1.71%^[8]。为了更好地控制产品质量,防止不法企业为经济利益仅以绿原酸或高绿原酸质量分数的提取物投料,因此有必要对金银花提取物及其制剂中其他的咖啡酰奎宁酸类成分进行质量控制。

本实验以银黄片为例,通过方法学验证、一测多评准确性的评价和方法的耐用性、系统适用性考察,对一测多评法的技术适用性和可行性进行了探讨研究。结果表明,一测多评法计算的结果与外标法所得结果没有显著差异,提示本方法可实现以绿原酸为对照品,通过确定的相对校正因子计算其余 5 种咖啡酰奎宁酸的量,实现银黄片的多指标质量评价。

通过对不同品牌仪器和色谱柱的考察,各组分出峰顺序一致,理论板数、分离度、对称因子均能较好的满足系统适用性要求,表明所采用的色谱条件耐用性良好,能推广到金银花提取物及其相关制剂的多指标质量控制中。

参考文献

- [1] Takenaka M, Nanayama K, Isobe S, *et al.* Changes in caffeic acid derivatives in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) during cooking and processing. [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(1): 172-177.
- [2] 张宇平, 黄可龙. 高效液相色谱法同时测定金银花中 5 种有机酸 [J]. *分析试验室*, 2007, 26(7): 67-70.
- [3] 张 惠, 李 祥, 周红燕, 等. 反相高效液相色谱法同时测定脉络宁注射液中 6 种酚酸类成分的含量 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2009, 16(2): 54-56.
- [4] Qian Z M, Li H J, Li P, *et al.* Simultaneous qualification and quantification of thirteen bioactive compounds in *Flos Lonicerae* by high-performance liquid chromatography with diode array detector and mass spectrometry [J]. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55(7): 1073-1076.
- [5] 马双成, 毕培曦, 黄荣春, 等. 金银花药材中抗呼吸道感染病毒感染的咖啡酰奎宁酸类成分的定量研究 [J]. *药物分析杂志*, 2005, 25(7): 751-755.
- [6] 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.
- [7] 高咏莉. HPLC 法测定银黄制剂中绿原酸的含量 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2004, 8(11): 705-707.
- [8] 古君平, 魏万之. 废次烟叶中绿原酸的提取与分离 [J]. *烟草科技*, 2010(2): 43-47.