

相对校正因子在中药多指标测定中的应用研究进展

罗祖良^{1,2}, 仇峰¹, 韦日伟^{1,2}, 覃禹^{1,2}, 张坤¹, 覃洁萍², 杨美华^{1*}

1. 北京协和医学院 药用植物研究所, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193

2. 广西中医学院, 广西 南宁 530001

摘要: 中药标准物质品种和质量的相对滞后, 已成为中药标准制定与提高的制约因素, 为解决这一问题, 不断涌现出新的测定方法。重点介绍与相对校正因子相关的一测多评法、替代对照品法、内标多控法及系统内标法等多指标定量方法; 阐述了相对校正因子计算方法相关内容和技术要求, 并对其在中药多指标质量控制中的应用情况进行论述。

关键词: 相对校正因子; 一测多评法; 替代对照品法; 多指标测定; 中药标准物质

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)07-1448-05

Application of relative correction factor in multi-index determination of Chinese materia medica

LUO Zu-liang^{1,2}, QIU Feng¹, WEI Ri-wei^{1,2}, QIN Yu^{1,2}, ZHANG Kun¹, QIN Jie-ping², YANG Mei-hua¹

1. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China

Key words: relative correction factor (RCF); quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS); substitute reference substance method; multi-index determination; standard substance of Chinese materia medica

在药品质量检验过程中, 对照品是进行定量测定的关键之一。而在实际工作中, 有些对照品本身价格昂贵, 或者性质不稳定, 甚至有时很难获得, 使得药品检验包括其重要指标定量无法进行, 影响到药品的质量控制^[1]。目前中药化学对照品的品种和数量远远不能满足药品的检验、质量标准的研究与提高, 以及新药研制等方面的要求。在很大程度上, 中药标准物质品种和质量的相对滞后, 已成为中药标准制定与提高的制约因素^[2]。而现行国家标准采用的是各个成分逐一检测来控制中药及其复方质量, 给生产检验带来诸多不便。

为解决这一问题, 研究者不断开发出新的测定方法, 如内标多控法、替代对照品法、加校正因子的主成分自身对照法、系统内标法、一测多评法等。以上方法不仅在一定程度上解决了对照品难以制得、价格昂贵和不稳定等问题, 而且在中药的多指

标质量控制方面起到重要的作用。虽然以上各方法的名称都不尽相同, 但其方法的原理却基本相同, 即根据中药中各成分间存在着的一定比例关系, 在多个指标成分中, 选定一个性质稳定且对照品较容易获得的指标成分作为内标成分(此成分不是外加内标, 而是待测指标之一, 故以上方法与内标法相似, 却又有差别)。取各指标成分的对照品与内标成分的对照品, 建立各成分对内标成分的相对校正因子, 相对校正因子建立后, 实现仅用一个对照品对多个成分进行同时测定。

目前, 相对校正因子算法不仅应用于药品的相关物质的测定, 而且还广泛应用于中药及其复方制剂中多指标成分的测定^[3-5]。应用此法不需要每种对照品即可完成多指标同步测定, 方法简单、快速。本文将对与相对校正因子相关的多指标定量方法及相对校正因子算法的主要内容和进行综述。

收稿日期: 2011-11-13

基金项目: 科技部重大新药创制专项(2009ZX09502-025); 国家中医药管理局 2008 年度中医药行业科研专项(200807042)

作者简介: 罗祖良(1986—), 男, 布依族, 云南马关人, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制。E-mail: luozuliang123@yahoo.com

*通讯作者 杨美华 Tel: (010)57833277 E-mail: yangmeihua15@hotmail.com

1 相对校正因子的相关方法

1.1 内标多控法

研究发现,在中药各成分间存在着一定的比例关系,只要各成分的量符合该比例关系,中药的多指标质量控制可以依此法解决。王跃生等^[6]提出了基于内标多控法的中药复方质量评价模式,即在中药复方中选则1~2个分离度好、性质稳定而且对照品较易获得的成分作为内标成分(此成分不是外加的内标物质,而是复方中本身含有的成分,因其作用与内标物质相类似,故此命名)。方法原理:在一定的范围(线性范围)内成分的量(质量或浓度)与检测器响应值成正比,即 $f=W/A$ (W 表示浓度, A 表示响应值),以易得对照品成分为内标成分,建立该内标成分与被测成分间的相对校正因子(f_{km}),然后通过内标成分对照品的浓度和相对校正因子计算被测组分的量,即 $f_{km}=f_k/f_m=(W_k \times A_m)/(W_m \times A_k)$; $W_m=(W_k \times A_m)/(f_{km} \times A_k)$; 式中 A_k 为内标成分对照品的峰面积, W_k 为内标成分对照品的浓度, A_m 为被测组分的峰面积, W_m 为被测组分的浓度。

该课题组应用HPLC内标多控法测定了四逆散中芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸和新橙皮苷,并对该评价模式进行方法学考察,比较了外标法与内标多控法的测定结果,表明内标多控法对中药复方多成分质量控制是可行的、实用的。随后,该课题组又用此法分别测定了杏香兔耳风中绿原酸和3,5-二咖啡酰基奎宁酸的量及芸香科植物枳实、枳壳、青皮和陈皮中黄酮类成分的量。结果表明内标多控法可实现只用绿原酸一种对照品同时测绿原酸和3,5-二咖啡酰基奎宁酸的量;该法可用于枳实、枳壳、青皮以及陈皮中黄酮类成分的定量分析和质量控制^[7-8]。

1.2 替代对照品法

谢元超等^[9]采用测定替代对照品相对于对照品的“相对校正因子”的方法,将测得的“相对校正因子”载入到各品种项下,用替代对照品结合“相对校正因子”的方法进行中药或中药复方的质量控制。相对校正因子(f)= $(A_i/C_i)/(A_r/C_r)$,式中 A_i 为替代对照品的峰面积; A_r 为对照品的峰面积; C_i 为替代对照品的浓度; C_r 为对照品的浓度。在一定的色谱条件下,配制一系列浓度对照品和替代对照品溶液,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,分别绘制对照品和替代对照品的标准曲线,将标准曲线的截距校正为0后,用两条标准曲线斜率(k)

的比值求得 f 。测定样品时,用对照品进行测定,被测样品浓度 $C_1=A_t/(A_r/C_r)$;用替代对照品进行测定,被测样品浓度 $C_2=(A_t/f)/(A_r/C_r)$,式中 A_t 为被测样品峰面积。

谢元超等^[1,9]先后用替代对照品法对丹参、复方丹参片及石杉碱甲片进行质量控制,具有实用价值,方法中使用的替代对照品并非药物的有效成分,而是引入的新成分。随后,马双成等^[2,10]用替代对照品法同时测定了莪术油及其注射液中的6种成分以及同时测定了中药和保健食品中的6种大豆异黄酮类成分的量。方法中使用的替代对照品均为药物所含有效成分,是多种待测成分中易得到而稳定的一种成分,利用其他待测成分与其相对校正因子来实现对待测成分的测定。

1.3 主成分自身对照法

目前我国药品质量标准检查有关物质最常用的方法是加校正因子的主成分自身对照法,该法用主成分作对照,杂质峰面积不经校正,由于不同物质检测的响应值不一样,杂质峰面积不经校正则难以定量测定,因此只能对杂质作限量检查。

吴益群等^[11]采用加校正因子的主成分自身对照法测定5-羟甲基糠醛对替硝唑的校正因子,并以该校正因子计算替硝唑葡萄糖注射液中5-羟甲基糠醛的量,结果较为满意。魏嘉陵等^[12]参考《中国药典》加校正因子的主成分自身对照法,探讨测定杂质氯苯酞胺相对于主成分苯扎贝特的相对保留时间以确定氯苯酞胺在色谱图中的位置,测定杂质氯苯酞胺相对于主成分苯扎贝特的校正因子以计算氯苯酞胺的量。结果表明用加校正因子的主成分自身对照法测定苯扎贝特中杂质氯苯酞胺的量,方法可行,该法测定结果与外标法基本相同。于莲欣等^[13]用加校正因子的主成分自身对照法测定盐酸土霉素中相关物质,结果表明,加校正因子的主成分自身对照法是一种比较准确、实用、快捷的分析方法。

1.4 系统内标法

系统内标法的原理^[14]:首先获得成分A对照品溶液质量浓度(C_A)与检测器的响应信号(峰面积或峰高, Y)之间的回归方程 $Y=K_A \times C_A$ 及其线性范围, K_A 即成分A的校正因子,同法获得成分B的校正因子 K_B 。计算成分A与B之间相对校正因子(f)= K_B/K_A 。利用外标法测定样品中成分A的质量浓度 C_a (成分A为内标);通过测定样品中成分A与成分B的峰面积(A_a 、 A_b),利用 f 计算样品中成分B

的质量浓度 (C_b) = $(A_b \times C_a) / (A_a \times f)$ 。

柏冬等^[15]以桂枝汤中芍药苷为内标,测定芍药苷与甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和甘草酸之间的相对校正因子,利用该相对校正因子计算甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和甘草酸的量,并与外标一点法测定结果进行比较,以验证方法的准确性和可行性。结果表明,系统内标法既能同时测定中药中多个成分的量,又能简化实验操作,有望成为适合中药特点的多指标质量评价新模式。此外,该课题组还以七参颗粒中人参皂苷 R_{g1} 与三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_e 和人参皂苷 R_{b1} 之间的相对校正因子,利用该相对校正因子计算三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_e 和人参皂苷 R_{b1} 的量,建立了同时测定七参颗粒中多个有效成分的系统内标含量测定方法^[14]。

1.5 一测多评法

王智民等^[16]提出了一测多评法,利用中药有效成分内在的比例关系,只测定一个成分(对照品可得到者),即可实现多个成分的同步测定。其原理:在一定的范围内(线性范围内)成分的量(质量或浓度)与检测器响应值成正比。在多指标质量评价时,以药材中某一典型组分(有对照品者)为内标,建立该组分与其他组分之间的相对校正因子(f_{km}),通过相对校正因子计算其他组分的量。这种测定一个成分以实现多个成分定量的方法为一测多评法。计算 f_{km} 值的公式: $f_{km} = f_k / f_m = (W_k \times A_m) / (W_m \times A_k)$; 由此可导出定量计算公式: $W_m = (W_k \times A_m) / (f_{km} \times A_k)$, 式中 A_k 为内标物峰面积; W_k 为内标物浓度; A_m 为待测组分峰面积; W_m 为待测组分浓度。

近年来,有关这方面的研究报道逐渐增多,且在《中国药典》2010年版一部中,已经收录该法测定黄连中小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱4个成分的量;吴呈祥等^[17]以槲皮素为对照,应用一测多评法测定中药篇蓄中主要黄酮类成分杨梅苷、篇蓄苷和槲皮素的量,建立了中药篇蓄的质量标准。到目前为止,一测多评法已在木通、黄连、黄芩、黄芪、人参、三七、柴胡、连翘、大黄等药材多指标定量测定中得到应用^[18-23]。也有研究将一测多评法应用于复方中药的质量控制^[24]。

2 相对校正因子计算方法主要内容

2.1 检测指标的选择

原则上指标性成分应选择药材中药理作用比较明确的有效成分或与药材临床功效具有相关性

的成分;选择的“内标”成分应是对照品相对易得者;其他检测指标应是不易得到或制备难度大或成本高或不稳定者。待测指标选取后,应进行预试验,确定多成分同时测定的色谱条件。另外,待测成分应有相对较高的量。

2.2 对照品溶液制备

实验中所用对照品应该标明质量分数,如果为自制的对照品,则需经严格的质量分数检查,质量分数应大于98%,必要时注明量,供校正用。配制混合对照品溶液是分别取各待测成分对照品一定量,精密称定,采用适宜的溶剂,制成含适宜浓度的混合对照品溶液,用于实验方法学的考察及相对校正因子的计算。

2.3 方法学考察

参照《中国药典》附录中高效液相色谱法的要求,完成色谱条件的优化;参照《中国药典》附录中药质量标准分析方法验证指导原则的要求完成准确度、精密度、专属性、定量限、检测限、线性范围、耐用性等各项内容的考察,应符合要求。

2.4 待测成分相对校正因子的计算

待测成分的相对校正因子在以上不同方法中计算方法也不相同,常用的计算方法主要分为两种:一种是分别测定待测成分的标准曲线,应用标准曲线斜率的比值求得相对校正因子;另一种是以不同进样量测得的校正因子的平均值作为相对校正因子。

2.4.1 标准曲线法 在一定的色谱条件下,配制一系列浓度的混合对照品溶液,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,分别测定各对照品的标准曲线,将标准曲线的截距校正为0后,用两条标准曲线斜率 K 的比值求得校正因子。利用对照品溶液获得质量浓度与检测器的响应信号(峰面积或峰高)之间的回归方程 $Y = K \times C$ 及其线性范围($r > 0.9995$), K 即校正因子;同法获得其他成分的校正因子。计算成分A与B之间相对校正因子 $f = K_B / K_A$ 。

2.4.2 平均值算法 在一定的范围内(线性范围内)成分的量(W)与检测器响应值(A)成正比,即 $W = fA$, 选取待测成分中一组分 k 为内标,建立组分 k 与其他组分 m 之间的相对校正因子,即 $f_{km} = f_k / f_m = (W_k \times A_m) / (W_m \times A_k)$ 。配置一定浓度的混合对照品溶液,精密吸取不同体积的同一混合对照品进样分析,分别计算不同进样体积下的 f_{km} , 然后计算平均值,并以其作为相对校正因子进行样品

的定量测定。

2.5 相对校正因子耐用性考察

待测成分相对校正因子耐用性系指在测定条件有小的变动时,其对影响的承受程度。为使所建立的各待测成分的相对校正因子能用于常规检验,应对待测成分相对校正因子耐用性进行全面的考察,如果测试条件要求苛刻,则应加以限定。考察内容包括相对校正因子在各种条件(流动相的组成比例、pH 值、柱温、体积流量及检测波长等的微小改变时和使用不同仪器、不同品牌或不同批号的同类型色谱柱、不同实验室、不同操作人员等)下的耐用性。对于相对校正因子值影响大的因素应具体分析后加以限定,以确保方法有效。

2.6 计算值与实测值的比较

按照供试品溶液制备方法制备不同批次的样品(样品应尽可能多),分别进样分析。对实测值(外标法测定)和计算值两组数据采用 t 检验或夹角余弦值或用 Pearson 相关系数进行分析比较,以验证相对校正因子计算法用于多指标质量评价的准确性和可行性。

2.7 待测成分的色谱峰定位

色谱峰的准确定位是保证相对校正因子计算法应用的前提,一般可以采用保留时间差或相对保留值等参数结合色谱图整体特征,以及每个峰的紫外吸收特征来定位其余待测成分色谱峰。相对保留值(r_{as})指各待测成分与内参物(s)间保留时间的比值,即 $r_{as}=t_{Ra}/t_{Rs}$;保留时间差指各待测成分与s 间保留时间的差值,即 $t_{Ras}=t_{Ra}-t_{Rs}$ 。

在 HPLC-MS 分析中,可以根据各种被测成分相应的保留时间、分子离子质荷比、紫外光谱数据对样品中被测成分进行确认,结果更准确。魏锋等^[10]采用 HPLC-DAD-MS 联用技术,通过定性和定量手段分别求得各被测成分相对于特定对照品的相对校正因子,从而实现以染料木素为对照,同时测定样品中大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素和染料木素 6 种成分的量。

3 结语

相对校正因子的计算多通过不同质量浓度或不同进样量对照品溶液所测得的峰面积与质量浓度比值的算术平均值作为成分的校正因子,并以各成分与对照成分校正因子的比值作为相对校正因子,可以看出不同进样量、不同浓度计算所得的校正因子有一定误差;而通过一系列浓度的混合对照

品溶液测定,分别测定各对照品的标准曲线,将标准曲线的截距校正为 0 后,用两条标准曲线斜率的比值求得成分相对校正因子,此法计算得到的校正因子更准确、方法更合理,且可以限定相对校正因子的使用范围。另外,在色谱峰的定位中,当应用 HPLC 色谱法分析时,可以根据保留时间差、相对保留值和各成分的紫外光谱数据来定位;如果有条件使用 HPLC-MS 进行分析,可以根据各种被测成分相应的保留时间、分子离子质荷比、紫外光谱数据对样品中被测成分进行确认,则色谱峰的确认将更加简单、准确。

中药现代研究已经逐渐认识到中药有效成分的多样性,单一成分将很难全面反映其质量,因此,中药成分定量测定发展的趋势是多指标定量测定。对于多指标定量测定一般需要为每种待测成分建立测定方法或在同一条件下采用多个指标对照进行测定。这些多指标测定方法存在着对照品消耗量大的缺陷,而且操作复杂、繁琐、易导致误差。相对校正因子计算法既能反映中药有效成分多样化,实现中药多指标同步测定,可以降低对照品的使用数量,减少误差,提高测定结果的准确性,且操作相对简单、快速。相对校正因子计算法尤其适合于生产企业或一些专门的实验室对某类长期生产和重复测定的样品进行例行检测,可以达到分析检测的准确、快速、高效,并可大大地降低分析检测的成本。同时,对中药和天然药物复杂体系的分析和测定,该法具有独特的优势。目前,相对校正因子计算法在多指标成分的定量中,虽已有多种方法被提出并得到越来越多的应用,但各方法之间还没有统一的标准,不够成熟,方法还需进一步完善,使其能应用于中药的质量控制。

参考文献

- [1] 谢元超,张启明,金少鸿.替代对照品法用于石杉碱甲片含量测定的研究[J].中国药理学杂志,2008,43(3):217-221.
- [2] 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的 6 种成分的含量[J].药物分析杂志,2009,29(11):1892-1899.
- [3] 尹萌,孟月兰,闻琰毓.关黄柏中生物碱类成分的“一测多评”[J].中草药,2011,42(6):1093-1096.
- [4] Sun P, Wang X D, Alquier L, et al. Determination of relative response factors of impurities in paclitaxel with high performance liquid chromatography equipped with

- ultraviolet and charged aerosol detectors [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1177: 87-91.
- [5] Wang H F, Provan G J, Helliwell K. HPLC determination of catechins in tea leaves and tea extracts using relative response factors [J]. *Food Chem*, 2003, 81: 307-312.
- [6] 王跃生, 饶毅, 魏惠珍, 等. HPLC-“内标”多控法测定四逆散中芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸和新橙皮苷 [J]. 中草药, 2008, 39(9): 1316-1319.
- [7] 魏惠珍, 杜艳龙, 饶毅, 等. 单一内标多控法同步测定杏香兔耳风中绿原酸和 3, 5-二咖啡酰基奎宁酸的含量 [J]. 江西医学院学报, 2009, 49(11): 14-17.
- [8] 魏惠珍, 谢菲, 饶毅, 等. 内标多控法测定枳实、枳壳、青皮和陈皮中黄酮类成分含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14): 74-77.
- [9] 谢元超, 金少鸿. 替代对照品法用于丹参和复方丹参片含量测定研究 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(4): 497-502.
- [10] 魏锋, 李启艳, 马玲云, 等. 对照品替代法同时测定中药和保健食品中 6 种大豆异黄酮类成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(5): 725-730.
- [11] 吴益群, 史咏梅. 校正因子法测定替硝唑葡萄糖注射液 5-羟甲基糠醛的含量 [J]. 江苏药学与临床研究, 2004, 12(6): 6-8.
- [12] 魏嘉陵, 林畅伟. 用加校正因子的主成分自身对照法测定苯扎贝特中杂质氯苯酰胺的含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 26(12): 1848-1850.
- [13] 于莲欣, 蔡乐. 加校正因子的主成分自身对照法测定盐酸土霉素中相关物质 [J]. 江西化工, 2010(2): 89-90.
- [14] 柏冬, 范斌, 牛晓红, 等. HPLC-系统内标法测定桂枝汤中芍药苷、甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和甘草酸 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 387-390.
- [15] 柏东, 彭娟, 范斌. 系统内标法测定七参颗粒中多指标成分 [J]. 吉林中医药, 2010, 30(6): 528-530.
- [16] 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.
- [17] 吴呈祥, 陈君, 张蕾, 等. 中药篇蓄的质量标准研究 [J]. 药学与临床研究, 2009, 17(5): 365-369.
- [18] 朱晶晶, 王智民, 张启伟, 等. 一测多评法同时测定黄芩药材中 4 种黄酮类成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(24): 3229-3234.
- [19] 蔡海霞, 陈君, 李萍. 一测多评法测定黄芪中 4 种异黄酮的含量 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(20): 2712-2717.
- [20] 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]. 药学报, 2008, 43(12): 1211-1216.
- [21] 黄帅, 马淼, 黄倩倩, 等. 一测多评法同步测定柴胡药材中 3 种皂苷的含量 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(4): 838-840.
- [22] 孔晶晶, 朱晶晶, 王智民, 等. 一测多评法测定连翘中多种不同类型成分的含量 [J]. 中国药学杂志, 2010, 45(17): 1301-1304.
- [23] Zhu J J, Wang Z M, Ma X Y, et al. A quantitative method for simultaneous determination of four anthraquinones with one marker in *Rehi Radix et Rhizoma* [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(2): 157-163.
- [24] 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): 1828-1831.