

基于一测多评的中药多成分定量研究进展

陆兔林¹, 石上梅², 蔡宝昌¹, 刘会珍¹, 池玉梅¹, 周 渊¹

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046

2. 国家药典委员会, 北京 100061

摘 要: 中药成分的复杂多样决定了中药质量控制模式必须采用多成分定量和多指标质量控制, 但中药化学对照品性质不稳定、货源严重紧缺和检测成本昂贵等, 严重阻碍了这一模式的发展, 成为中药现代化的瓶颈问题之一。“一测多评”分析方法通过测定一个对照品易得的成分实现中药多成分定量, 是适合中药特点的多指标质量控制和评价模式。系统阐述了“一测多评”法的基本原理及其在中药多成分定量中的研究进展, 总结了“一测多评”法在中药材、中药饮片及中药复方制剂中的应用, 探讨其优势及其在实际应用中存在的关键问题。提出“一测多评”法的研究思路在 20 多种中药材、中药饮片及中药复方制剂中得到了验证, 有望成为中药质量控制的未来发展趋势。

关键词: 一测多评; 中药; 质量控制; 质量评价; 质量标准

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)12-2525-05

Advances in studies on multi-component determination of Chinese materia medica by QAMS

LU Tu-lin¹, SHI Shang-mei², CAI Bao-chang¹, LIU Hui-zhen¹, CHI Yu-mei¹, ZHOU Yuan¹

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. Chinese Pharmacopoeia Commission, Beijing 100061, China

Key words: quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS); Chinese materia medica (CMM); quality control; quality evaluation; quality standard

中药是中华民族瑰宝, 中药的质量是否符合标准, 直接影响到中医临床辨证施治的效果。提高中药的质量标准, 是保证广大患者用药安全有效的前提。中药成分的多样性、复杂性和作用机制的模糊性, 使其质量控制仍然存在许多问题, 一定程度上阻碍了中药现代化、国际化的进程, 是中药现代化的瓶颈之一。中药的整体作用及多成分、多靶点的特点, 决定了任何一个单一成分作为指标都不能准确反映中药材、中药饮片和中药复方制剂的质量。建立中药的质量保证体系应立足于中药的特色, 建立多成分、多指标的质量控制模式, 对中药及其制剂的整体药效进行控制, 以《中国药典》2010 年版为代表的质量标准已经确立了“从单指标向多指标、从指标性成分向药效成分控制”的发展方向。针对目前中药多成分定量和多指标质量控制中存在的对

照品缺乏的问题, 提出了根据中药有效成分内在的函数关系和比例关系, 只测定一个成分(对照品易得、价廉、有效者)实现多个成分(对照品难以得到或难供应者)同步测定的一测多评(quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS)的分析方法^[1-2]。该方法提出后得到了业内学者们广泛的认可, 许多研究者进行了深入的研究, 并在部分中药材、中药饮片及中药复方制剂中得到了应用。本文就一测多评法的原理及其研究进展进行概述, 并就其存在的问题和发展前景进行讨论。

1 一测多评概述

1.1 一测多评的基本原理

在一定的线性范围内成分的量(质量或浓度)与检测器响应成正比。在多指标质量评价时, 以药材中某一典型成分(对照品易得、价廉、有效者)

收稿日期: 2012-08-21

基金项目: 国家科技部创新药物“中药质量标准平台建设研究”项目(2009ZX09308); 国家科技部行业专项“全国中药炮制技术规范研究”(201207004)

作者简介: 陆兔林, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药质量控制及炮制研究。Tel: 13951636763 E-mail: lutuling2005@126.com

为内参物,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(relative correction factor),无需提供鉴别和定位用的对照品,通过校正因子计算其他组分的量。这种测定一个成分,实现对多个成分定量的方法命名为“一测多评”法。

假设某样品中含有*i*个组分, $f_i = W_i/A_i$ ($i=1, 2, \dots, k, \dots, m$),式中 A_i 为组分峰面积, W_i 为组分浓度。选取其中一组分*k*为内参物,建立组分*k*与其他组分*m*之间的相对校正因子 $f_{km}=f_k/f_m=W_k/W_m \times (A_m/A_k)$;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 为内参物峰面积, W_k 为内参物浓度, A_m 为其他组分*m*峰面积; W_m 为其他组分*m*浓度^[1]。

一测多评法原理与校正因子法原理基本一致,在方法学建立时,选定内参物,求出内参物与各待测成分间的相对校正因子,并把其作为一个常数用于定量测定中。在定量时,内参物的浓度按常规方法(外标一点法、二点法)进行测定,根据保留时间差和/或相对保留时间值(分别考察相对保留值或保留时间差2种参数在不同品牌仪器和不同规格色谱柱中的重现性,选取RSD值较小的一种参数作为峰定位依据),结合化合物的紫外吸收特征、液质联用技术给出的质谱信息等确定目标峰的峰位,相对校正因子结合内参物实测浓度,计算待测成分的浓度。对于成分复杂的样品,通过相对保留值或保留时间差等参数不能准确定位时,可选用定性用的对照品或含有各待测组分的“中药对照提取物”对待测组分色谱峰进行定位。

1.2 一测多评的特点及优势

1.2.1 实现了中药多成分定量,更加符合传统中医理论的整体观 中药及其制剂化学成分与有效成分的多样性、复杂性以及相互间的协同作用,决定了单一成分和指标难以准确、全面地表达中药的内在质量,传统中医的整体观要求对中药进行多药效成分的综合评价,而多指标的质量评价模式又要求有足够高质量分数的化学对照品作为保障,由于某些化学对照品分离难度大或单体不稳定难以供应、供应价格高等造成了中药多指标质量控制对照品匮乏的问题,限制了用常规的外标法或内标法来实现对多成分的定量和多指标的质量控制。一测多评法利用有效成分间内在的函数关系和比例关系,只测定一个成分,实现对多个成分的同步测控,很好地解

决了对照品缺乏的问题,实现了中药多指标质量评价,符合传统中医理论的整体观。

1.2.2 解决了中药化学对照品匮乏的瓶颈问题 中药多指标质量控制和评价模式需要有多种对照品建立标准曲线,但现有部分中药化学对照品分离难度大、单体不稳定、难以供应或供应价格高等,使其在品种和数量上不能满足中药质量监控和新药研发等方面的需求,而只能采用逐个检测单一有效成分来控制中药及其制剂的质量的方法,给药品检测带来诸多不便,降低了检测效率。一测多评法通过测定一个对照品易得成分(内参物)的量,计算出其他药效成分对应于这一内参物的相对校正因子,实现多个成分的同步测控,尤其是对照品匮乏成分的测定。该方法可实现在对照品短缺的情况下,进行多指标成分的测定,经实践验证,具有技术适应性和可行性。

1.2.3 弥补了中药指纹图谱技术模糊性的缺陷 在中药多指标质量评价过程中,多采用指纹图谱技术来体现中药的整体性,目前色谱指纹图谱分析方法已被国际公认为可用于植物药等复杂化学组成体系质量控制的有效手段,许多外国植物药生产厂家已将其用于药品质量控制中,但其模糊性的特点使其难以在实际生产中应用,并造成了“难以说清楚”的局面。而一测多评的研究思路侧重从量上阐明主要成分或药效成分间的相互关系,是对指纹图谱数据进一步定量挖掘分析,在指纹图谱整体控制基础上,进一步明确个别成分的量,为中药多指标质量评价提供了新的研究思路。

1.2.4 方便、快捷、廉价 一测多评法借鉴经典的内标法、校正因子法、主成分自身对照法和紫外百分吸收系数法的优势,在缺少对照品的情况下,利用成分间的相对校正因子实现多成分的测定,对中药的质量进行控制,该方法方便、快速、廉价,大幅度降低了检测成本和时间,提高了工作效率和方法的实用性,能够更有效、更全面、更准确地控制中药质量,将是中药多组分同步定量的发展方向。

2 一测多评法的应用

2.1 一测多评在单味中药中的应用

一测多评法提出之后,已经在丹参、黄连、金银花、赤芍、人参和三七等20多种药材的多成分定量和多指标质量控制中得到了探索和应用(表1)。

杨菲等^[7]以丹参为研究对象,建立了丹参中多种酚酸类成分的一测多评分析方法,以丹参素钠为

表 1 已开展一测多评研究的单味中药及制剂
Table 1 Study on single CMM and preparation by QAMS

单味药及成方制剂	化合物类型	测定成分	内参物	文献
淫羊藿	黄酮类	淫羊藿苷, 朝藿定 A、B、C	淫羊藿苷	3
黄芩	黄酮类	黄芩苷、迷迭香酸、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素	黄芩苷	4
黄芪	异黄酮	芒柄花素、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮	芒柄花素	5
金银花	有机酸	绿原酸、咖啡酸、新绿原酸、3, 4-二咖啡酸酰奎尼酸、3, 5-二咖啡酸酰奎尼酸、4, 5-二咖啡酸酰奎尼酸	绿原酸、咖啡酸	6
丹参	酚酸类	丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B	丹参素钠	7
关黄柏	生物碱	小檗碱、巴马汀、药根碱	小檗碱	8
黄连	生物碱	小檗碱、巴马汀、药根碱、黄连碱、表小檗碱、药根碱	小檗碱	9
吴茱萸	生物碱	吴茱萸次碱、吴茱萸内酯、吴茱萸碱	吴茱萸次碱	10
赤芍	倍半萜、酚酸类	芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、没食子酸、没食子酸甲酯、五没食子酰基葡萄糖	芍药苷	11
杜仲	酚酸、苷类	绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷、京尼平苷	绿原酸	12
柴胡	皂苷	柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d	柴胡皂苷 a	13
人参、三七	皂苷	人参皂苷 Rb ₁ 、人参皂苷 Rg ₁ 、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rf、人参皂苷 Rh ₁ 、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rb ₂ 、人参皂苷 Rb ₃ 、人参皂苷 Rd	人参皂苷 Rb ₁	14
连翘	黄酮、木脂素、苯乙醇苷	芦丁、连翘酯苷 A、连翘苷、连翘酯素	芦丁	15
莪术油及其注射液	倍半萜类	牻牛儿酮、莪术二酮、莪术醇、莪术烯、呋喃二烯、 β -榄香烯	牻牛儿酮	16
预知子	三萜皂苷	常春藤皂苷元 3-O- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖苷、常春藤皂苷元 3-O- β -D-吡喃木糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖苷、常春藤皂苷元 3-O- α -L-吡喃阿拉伯糖苷	常春藤皂苷元 3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖苷	17

内参物, 建立原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 与丹参素钠的相对校正因子, 并进行了方法学考察, 结果表明一测多评法的计算结果与外标法的实测值之间没有显著性差异, 实验所得校正因子可信。匡艳辉等^[9]以黄连药材为研究对象, 以药材中 5 个典型生物碱成分为指标, 建立小檗碱与巴马汀、黄连碱、表小檗碱、药根碱的相对校正因子, 并利用该校正因子计算其他成分的量(计算值), 实现一测多评。同时采用外标法测定药材中该 5 种生物碱的量(实测值), 并进行方法学考察, 比较发现计算值与实测值无显著性差异, 说明该方法可行、准确。李文龙等^[6]为解决金银花药材分析中部分对照品价格高、不易获得的问题, 建立了一测多评的分析方

法, 通过测定绿原酸、咖啡酸与其他有机酸的相对校正因子, 计算出其他几种有机酸的量。该方法在不同实验室、不同型号的高效液相色谱仪以及不同色谱柱上进行验证, 重复性满意; 与外标法相比, 所得结果均无显著性差异。王瑞等^[11]建立了赤芍中 2 种不同类型共 6 个化学成分的一测多评定量方法, 以芍药苷为内参物, 建立其与芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、没食子酸、没食子酸甲酯和五没食子酰基葡萄糖的相对校正因子。同时采用外标法测定 16 批赤芍中 6 个成分的量, 结果建立的相对校正因子重现性良好, 计算值与外标法实测值之间无显著差异。

2.2 一测多评在中药复方制剂中的应用

近年来也有文献报道将一测多评法应用于中药

复方制剂的多成分测定和多指标质量控制和评价中。邹桂欣等^[18]首次将一测多评法应用于中药复方制剂的质量控制中,以葛根素为指标,建立冠脉康胶囊中该成分与大豆苷元及丹酚酸B的相对校正因子,并用相对校正因子计算大豆苷元及丹酚酸B的量,同时对一测多评的计算值与外标法实测值进行比较,并对不同品牌填料及不同长度的色谱柱进行考察,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无显著性差异,符合中药的多指标质量评价模式的要求。林永强等^[19]以绿原酸为指标,建立了银黄片中6种咖啡先奎宁酸的一测多评定量测定方法,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,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。

3 一测多评在实际应用中存在的问题

3.1 相对校正因子的耐用性

在一测多评法建立的过程中,所有能引起检测器响应值变化的因素均有可能引起相对校正因子的波动。不同实验室、不同型号的高效液相色谱仪、不同色谱柱以及流动相的组成比例、pH值、柱温、流速、检测波长等微小改变均会引起相对校正因子的改变,在实测值与计算值之间引入误差。因此,在一测多评研究阶段,应充分考察不同因素对相对校正因子值的影响,对影响较大的因素进行限定,以保证其具有良好的重现性。

3.1.1 不同实验室之间相对校正因子的耐用性 一测多评法建立之后,各成分与内参物之间的相对校正因子作为常数,应用于多成分测定中。但是不同实验室、不同操作人员即使在同一色谱系统和检测条件下,所测得的相对校正因子值也会有微小差异,故方法学建立时需考察不同实验室、不同操作人员所引入的误差是否在允许的范围。

3.1.2 不同的色谱仪器系统之间相对校正因子的耐用性 计算值与实测值之间的误差除了检测过程中的人为误差和系统误差外,还应考虑分析仪器硬件所引起的误差。一测多评法建立时多使用不同的色谱仪器系统检测,计算平均相对校正因子值,目前主要有Waters和Agilent公司生产的不同型号的高效液相色谱仪,少量有奥泰公司生产的色谱仪等。一测多评研究中,多使用紫外检测器和二极管阵列检测器,少数使用紫外-可见光检测器、紫外-电喷

雾检测器检测器和通用型质谱检测器。对于紫外检测器,根据待测成分的结构特性选择合适的检测波长非常重要。为了兼顾多个成分的强吸收,并不能选择各成分的最大吸收波长,因此测定误差增大,且不同类型成分间的误差比同类成分间的误差大,不同仪器上表现也更明显。

3.1.3 不同的色谱检测条件之间相对校正因子的耐用性 色谱检测条件包括不同的检测器类型、固定相种类、流动相组成,是分析误差来源需要考虑的主要因素。色谱柱主要是来自不同生产厂家的C₁₈键合硅胶柱,不同色谱柱固定相粒度不同,色谱柱的长短、内径不一,势必会造成相对校正因子值的波动。流动相的组成、比例会影响色谱峰的分离度和峰参数,从而引起误差,但可以通过改善色谱系统,优化色谱条件将此偏差降至最低。另外,柱温、体积流量的改变也会引起相对校正因子的微小波动。

3.2 目标峰的定位

一测多评在实际应用于定量测定时,由于只有内参物用到了对照品,其他待测成分无对照品,无法准确确定待测组分峰(即目标峰)的位置,因此,如何对这些成分的色谱峰进行定位是一测多评法需解决的关键问题之一。文献研究中对目标峰的定位方法主要有2种:一是采用待测组分与内参物的保留时间差值定位;二是根据待测组分与内参物的相对保留时间比值定位,并结合色谱峰的形状、化合物的紫外吸收特征、液质联用技术给出的质谱信息等辅助确认。也有对这两种方法进行考察,根据考察结果确定最合适的目标峰定位方法,如果仍不能准确定位可以使用含有上述待测成分中药对照提取物进行定位。

4 前景与展望

目前中药化学对照品的种类和数量还不能满足质量检测和新药研发的需求,中药及其制剂的质量通常采用逐个检测有效成分的方法来控制,检测效率低。一测多评法实现了在对照品缺乏的情况下,进行中药多成分定量和多指标质量控制,显著降低了检测成本,提高了工作效率。另外,有文献报道用“替代对照品”法对中药有效成分进行测定,其原理与一测多评法基本一致,用一种易得、价廉的对照品来代替制备困难、难以供应、价格昂贵或者性质不稳定的对照品,这一方法和思路也在一定程度上解决了中药对照品缺失的问题。

虽然一测多评法在中药质量控制中的应用才刚

刚开始,仍然存在许多不足之处,需要进一步改善,但其利用成分间的相对校正因子同时定量中药多个药效成分的方法,具有快速、廉价的优势,适合中药药效成分复杂多样的特点,有利于中药质量标准的制定,会越来越广泛地应用于中药科研和生产实践中,成为中药质量控制和评价模式新的发展趋势,对于中药药效物质基础和作用机制的阐明、中药新药研究和开发具有重要意义。

参考文献

- [1] Zhu J J, Wang Z M, Ma X Y, *et al.* A quantitative method for simultaneous determination of four anthraquinones with one marker in *Rhei Radix et Rhizoma* [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(2): 157-163.
- [2] 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.
- [3] 于霄, 宋静, 熊志立, 等. 一测多评法测定淫羊藿中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 及淫羊藿苷的含量 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(24): 3310-3311.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 李文龙, 张文明, 薛东升, 等. 测定金银花中 6 种有机酸类化合物含量的一种新方法 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2012, 41(1): 13-18.
- [7] 杨菲, 王智民, 张启伟, 等. “一测多评”法测定丹参酚酸类成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(17): 2372-2378.
- [8] 尹萌, 孟月兰, 闻珺毓. 关黄柏中生物碱类成分的“一测多评” [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1093-1096.
- [9] 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): 390-394.
- [10] 宋亚芳, 王智民, 朱晶晶, 等. 一测多评法测定吴茱萸中吴茱萸内酯、吴茱萸碱及吴茱萸次碱的含量 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(24): 2781-2785.
- [11] 王瑞, 黄山君, 王峥涛, 等. 一测多评法测定赤芍中不同类型成分的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(8): 594-598.
- [12] 林芳, 王云红, 万丽, 等. 一测多评法结合指纹图谱对杜仲质量控制的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 79-83.
- [13] 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.
- [14] 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(12): 1211-1216.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 宋永贵, 张武岗, 刘岩庭, 等. 一测多评法同时测定预知子中 4 种三萜皂苷 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1418-1421.
- [18] 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.
- [19] 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): 706-710.