

一测多评法测定热毒宁注射液中9种成分

张亚非¹, 王雪^{2,3}, 毕宇安^{2,3}, 王振中^{2,3}, 萧伟^{2,3*}, 李萍¹

1. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210009

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 建立一测多评(QAMS)法测定热毒宁注射液中9种成分的分析方法,并与外标法进行比较,评价QAMS法用于热毒宁注射液质量控制的技术适应性和应用可行性。方法 以热毒宁注射液为研究对象,以绿原酸、异绿原酸A和槲皮苷为内参物,建立绿原酸与新绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸间的相对校正因子(f),异绿原酸A与异绿原酸B、异绿原酸C间的 f ,槲皮苷与断氧化马钱子苷间的 f ,比较该方法与外标法测定结果的差异,并对该方法进行再验证。结果 热毒宁注射液中各成分的 f 分别为 $f_{\text{绿原酸/新绿原酸}}=0.965$ 、 $f_{\text{绿原酸/隐绿原酸}}=0.991$ 、 $f_{\text{绿原酸/咖啡酸}}=0.555$ 、 $f_{\text{异绿原酸A/异绿原酸B}}=1.283$ 、 $f_{\text{异绿原酸A/异绿原酸C}}=1.129$ 、 $f_{\text{槲皮苷/断氧化马钱子苷}}=1.030$ 。QAMS法的计算结果与外标法的实测结果无显著性差异,再验证结果也无显著性差异,实验所得的 f 可信。结论 QAMS可以作为一种简便准确的质量评价模式用于热毒宁注射液多种成分的定量测定。

关键词: 一测多评; 相对校正因子; 热毒宁注射液; 高效液相色谱; 绿原酸; 咖啡酸; 槲皮苷; 断氧化马钱子苷

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)22-3162-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.22.013

Determination of nine components in Reduning Injection by quantitative analysis of multi-components with a single-marker

ZHANG Ya-fei¹, WANG Xue^{2,3}, BI Yu-an^{2,3}, WANG Zhen-zhong^{2,3}, XIAO Wei^{2,3}, LI Ping¹

1. School of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Company with Limited Liability, Lianyungang 222001, China

3. State Key Laboratory of Pharmaceutical Process New-tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To establish a quantitative analysis of multi-components with a single-marker (QAMS) method for the determination of the nine components in Reduning Injection (RI), comparing with the external standard method, and to evaluate the adaptation and application of QAMS method in the quality control of RI. **Methods** Chlorogenic acid, isochlorogenic acid A, and gardenoside were used as the internal reference substances. The relative correlation factors (f) of neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, and caffeic acid to chlorogenic acid, isochlorogenic acid B and isochlorogenic acid C to isochlorogenic acid A, and secoxyloganin to gardenoside were calculated and established. The results were compared with those obtained by the external standard method. **Results** Within the linear ranges, the f values of chlorogenic acid to neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, and caffeic acid were 0.965, 0.991, and 0.555, respectively; isochlorogenic acid A to isochlorogenic acid B and isochlorogenic acid C were 1.283 and 1.129, respectively; jasminoidin to secoxyloganin was 1.030. The two methods did not show the significant difference in assay results. **Conclusion** The QAMS method is feasible and credible, and could be used to determine the multiple components in RI.

Key words: quantitative analysis of multi-components with a single-marker; relative correlation factors; Reduning Injection; HPLC; chlorogenic acid; caffeic acid; jasminoidin; secoxyloganin

收稿日期: 2013-07-03

基金项目: 国家“重大新药创制”——现代中药创新集群与数字制药技术平台(2013ZX09402203); 国家“重大新药创制”——大品种药物IV期临床试验及新药临床试验审评研究技术平台——热毒宁注射液IV期临床试验研究(2011ZX09304)

作者简介: 张亚非(1989—),女,硕士研究生在读,研究方向为工业药学。Tel: 15861297031 E-mail: zhangyafei77@163.com

*通信作者 萧伟,男,研究员级高级工程师,博士。研究方向为中药新药的研究与开发。

Tel: (0518)85522009 Fax: (0518)85522017 E-mail: kanionlunwen@163.com

热毒宁注射液处方由青蒿、金银花、栀子3味中药组成,临床上用于治疗上呼吸道感染,中医辨证为外感风热证引起的高热不退、鼻塞、流涕、头身痛、咽喉肿痛等病症。据热毒宁注射液成分研究结果,现已明确的主要有机酚酸类及环烯醚萜苷类成分分别为新绿原酸、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、栀子苷和断氧化马钱子苷,且已经建立了上述多种成分同时测定的定量方法^[1]。但由于对照品不易获得,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目的,导致其方法无法在生产实践中得到应用。基于中药的化学成分多为一类或几类化合物,可采用一测多评(QAMS)法中药质量评价模式,已有文献报道该方法在黄连、连翘、关黄柏、大黄、预知子、丹参、秦皮、穿心莲等药材及成方制剂中开展了可行性研究^[2-12],成功应用该方法的黄连质量评价方法已被《中国药典》2010年版收载。但部分业内学者可能对该方法一些关键问题认识欠缺,陆兔林等^[13]在总结分析文献的基础上对该方法的可行性研究及方法建立过程中涉及的关键问题进行了深入探讨,以便该方法能更好地应用到生产实践中。本研究对QAMS法建立过程中涉及的关键问题进行研究,根据该方法的适用性,结合热毒宁注射液中已知化合物的结构,建立绿原酸与新绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸间的相对校正因子(f),异绿原酸A与异绿原酸B、异绿原酸C间的 f ,栀子苷与断氧化马钱子苷间的 f ,通过测定绿原酸、异绿原酸A和栀子苷的量来计算其余待测成分的量,用于热毒宁注射液多种成分的质量评价,并和常规的外标法进行比较,评价QAMS法的技术适应性和应用可行性,结果该方法简便快捷,大大减少检测成本,使热毒宁注射液多指标质量控制应用于实践成为可能。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪; Agilent 1200 高效液相色谱仪; Waters Alliance 2695 高效液相色谱仪; 岛津 UV-2401PC 紫外分光光度计。色谱柱: Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Phenomenex luna C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 岛津 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Waters C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Unique C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Venusil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。甲醇为色谱纯,磷酸为分析纯,水为超纯水。

绿原酸(批号 110753-200413, 质量分数为>98%)、栀子苷(批号 110749-200714, 质量分数为>98%)、咖啡酸(批号 110885-200102, 质量分数为>98%)、异绿原酸A(批号 111782-201203, 质量分数为>98%)、异绿原酸C(批号 111894-201102, 质量分数为>98%)对照品均由中国药品生物制品检定所提供,新绿原酸(批号 101212168, 质量分数为>98%)、隐绿原酸(批号 101245643, 质量分数为>98%)对照品均由 Sigma 公司提供,异绿原酸B(批号 MUST-11083102, 质量分数为92.1%)对照品由成都曼斯特生物科技有限公司提供,断氧化马钱子苷对照品为自制(质量分数为98.1%)。45批热毒宁注射液(批号分别为120704、120705、120707、120709、120710、120714、120715、120716、120721、120722、120724、120801、120802、120803、120807、120809、120810、120815、120816、120817、120818、120823、120824、120825、120827、120901、120902、120904、120905、120906、121102、121103、121108、121109、121111、121118、121119、121120、121121、121122、121124、121125、121126、121127、121128)均由江苏康缘药业股份有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),以甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相,梯度洗脱:0~10 min, 15%~25%甲醇;10~30 min, 25%~35%甲醇;30~60 min, 35%~50%甲醇;进样量为10 μL;体积流量为0.8 mL/min;柱温为30℃;栀子苷和断氧化马钱子苷的检测波长为237 nm,新绿原酸、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检测波长为324 nm,此条件下各组分分离度良好,色谱图见图1。

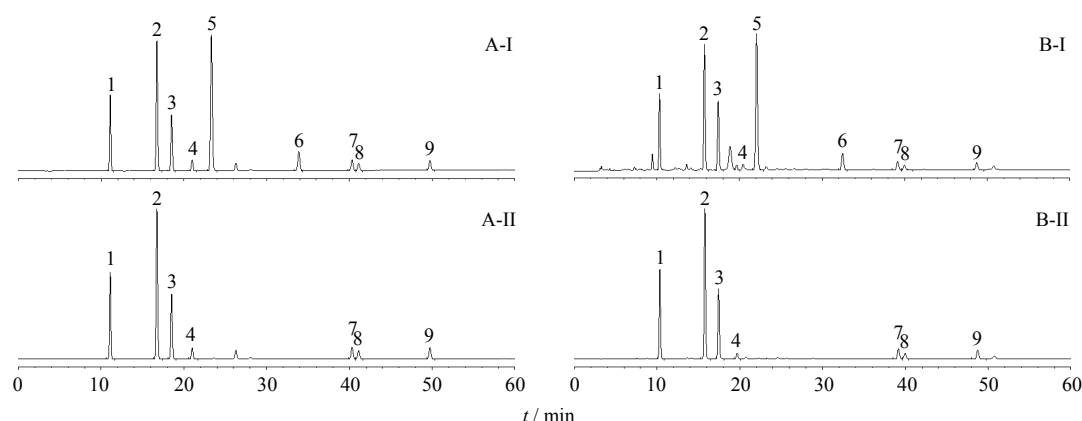
2.2 对照品溶液和供试品溶液的制备

精密称取新绿原酸、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、栀子苷和断氧化马钱子苷对照品适量,分别加入50%甲醇溶解并稀释制成含各成分分别为364.2、746.5、353.0、36.3、73.0、44.0、68.6、1 132.3、182.3 μg/mL的混合对照品溶液,摇匀,即得。

精密吸取热毒宁注射液1 mL,置20 mL量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

2.3 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液0.25、0.5、1.0、



1-新绿原酸 2-绿原酸 3-隐绿原酸 4-咖啡酸 5-栀子苷 6-断氧化马钱子苷 7-异绿原酸 B 8-异绿原酸 A 9-异绿原酸 C
 1-neochlorogenic acid 2-chlorogenic acid 3-cryptochlorogenic acid 4-caffeic acid 5-jasminoidin 6-secoxyloganin
 7-isochlorogenic acid B 8-isochlorogenic acid A 9-isochlorogenic acid C

图1 混合对照品 (A) 和供试品 (B) 分别在 237 nm (I) 和 324 nm (II) 处的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and sample (B) at 237 nm (I) and 324 nm (II)

2.0、4.0、10.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别精密吸取上述溶液各 10 μ L, 注入液相色谱仪, 以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得回归方程: 新绿原酸 $Y=37\ 477 X+30.064$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 9.1~364.2 μ g/mL; 绿原酸 $Y=35\ 128 X+154.73$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 18.7~746.5 μ g/mL; 隐绿原酸 $Y=35\ 000 X+15.731$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 8.8~353.0 μ g/mL; 咖啡酸 $Y=65\ 644 X+2.129\ 5$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 0.9~36.3 μ g/mL; 异绿原酸 B $Y=39\ 725 X+1.011\ 9$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 1.8~73.0 μ g/mL; 异绿原酸 A $Y=48\ 637 X-1.359\ 7$, $r=0.999\ 8$, 线性范围 1.1~44.0 μ g/mL; 异绿原酸 C $Y=42\ 248 X-1.916\ 8$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 1.7~68.6 μ g/mL; 栀子苷 $Y=17\ 250 X+57.022$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 28.3~1\ 132.3 μ g/mL; 断氧化马钱子苷 $Y=17\ 488 X+5.595\ 5$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 4.6~182.3 μ g/mL。

2.4 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 结果新绿原酸、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、栀子苷和断氧化马钱子苷峰面积的 RSD 依次为 0.4%、0.4%、0.3%、0.5%、0.3%、0.4%、0.5%、1.1%、0.9%, 表明在此条件下进样精密度良好。

2.5 稳定性试验

取混合对照品溶液和供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、16、20 h 进样, 记录峰面积, 计

算 RSD。结果混合对照品溶液中新绿原酸、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、栀子苷和断氧化马钱子苷峰面积的 RSD 依次为 1.5%、1.6%、1.6%、1.6%、1.7%、1.5%、1.3%、1.3% 和 1.6%, 供试品中新绿原酸、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、栀子苷和断氧化马钱子苷峰面积的 RSD 依次为 0.8%、0.8%、0.7%、0.8%、0.8%、1.5%、0.8%、1.2% 和 1.3%, 表明混合对照品溶液及供试品溶液在 20 h 内稳定性均较好。

2.6 重复性试验

取供试品 (批号 120807) 溶液, 平行制备 6 份, 测定各成分的质量分数。结果供试品中新绿原酸、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、栀子苷和断氧化马钱子苷的平均质量分数依次为 2.91、5.71、2.87、0.14、0.53、0.24、0.44、9.12 和 1.31 mg/mL, RSD 依次为 1.3%、1.1%、1.3%、1.1%、1.1%、1.2%、1.4%、1.3% 和 1.9%, 表明该方法的重复性良好。

2.7 加样回收试验

精密吸取已测定的供试品 (批号 120807) 溶液 0.5 mL, 置 20 mL 量瓶中, 精密加入“2.2”项下混合对照品溶液 4.0 mL, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 平行制备 6 份, 测定各成分质量分数, 计算加样回收率, 结果新绿原酸、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、栀子苷和断氧化马钱子苷的平均加样回收率依次为 98.6%、99.9%、98.2%、97.6%、98.6%、98.5%、

99.9%、99.0%和 97.3%，RSD 依次为 0.9%、1.0%、1.1%、0.5%、0.9%、0.5%、0.5%、1.5%和 1.2%，表明该方法的准确度良好。

2.8 f 的确定

2.8.1 f 的测定 取“2.3”项下各混合对照品溶液，每个样品进样 2 次，测定各成分的峰面积。根据 f 计算公式^[11]，以绿原酸作为内参物计算新绿原酸、

隐绿原酸、咖啡酸的 f ，以异绿原酸 A 作为内参物计算异绿原酸 B、异绿原酸 C 的 f ，以槲子苷作为内参物计算断氧化马钱子苷的 f ，结果新绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 C 和断氧化马钱子苷的 f 依次为 0.965、0.991、0.555、1.283、1.129、1.030，RSD 分别为 1.0%、1.3%、1.7%、1.8%、1.8%、1.7%。结果见表 1。

表 1 各成分的 f 值
Table 1 f values of each component

序 号	$f_{\text{绿原酸/新绿原酸}}$	$f_{\text{绿原酸/隐绿原酸}}$	$f_{\text{绿原酸/咖啡酸}}$	$f_{\text{异绿原酸 A/异绿原酸 B}}$	$f_{\text{异绿原酸 A/异绿原酸 C}}$	$f_{\text{槲子苷/断氧化马钱子苷}}$
1	0.966	0.995	0.552	1.299	1.184	1.050
2	0.965	0.997	0.565	1.254	1.133	1.058
3	0.962	0.996	0.547	1.231	1.102	1.062
4	0.970	0.997	0.563	1.254	1.103	1.012
5	0.971	0.997	0.565	1.290	1.124	1.033
6	0.972	0.995	0.560	1.290	1.133	1.028
7	0.972	0.997	0.563	1.299	1.135	1.027
8	0.972	0.997	0.554	1.299	1.132	1.014
9	0.971	0.994	0.558	1.296	1.127	1.023
10	0.971	0.995	0.556	1.288	1.124	1.021
11	0.945	0.963	0.538	1.298	1.128	1.019
12	0.945	0.964	0.540	1.296	1.128	1.017
平均值	0.965	0.991	0.555	1.283	1.129	1.030
RSD / %	1.0	1.3	1.7	1.8	1.8	1.7

2.8.2 不同体积流量对 f 的影响 考察了不同体积流量（0.7、0.8、0.9 mL/min）对各 f 的影响，结果 RSD 依次为 0.2%、0.2%、0.1%、0.3%、0.6%、0.7%，表明微调体积流量对各成分的 f 无显著影响。

2.8.3 不同柱温对 f 的影响 考察了不同柱温（25、28、30、32、35 °C）对各 f 的影响，结果 RSD 依次为 0.1%、0.2%、0.1%、0.3%、0.5%、0.7%，表明柱温对各成分的 f 无显著影响。

2.8.4 不同色谱柱对 f 的影响 考察了 6 种不同品牌色谱柱（Kromasil C₁₈ 1[#]、Kromasil C₁₈ 2[#]、Phenomenex luna C₁₈、岛津 C₁₈、Waters C₁₈、Unique C₁₈、Venusil C₁₈）对各 f 的影响，结果使用岛津 C₁₈、Waters C₁₈、Unique C₁₈、Venusil C₁₈ 色谱柱时隐绿原酸与其他杂质峰不能实现完全分离，使用 Waters C₁₈ 色谱柱时异绿原酸 B 和异绿原酸 A 色谱峰重叠，使用 Venusil C₁₈ 色谱柱时咖啡酸和槲子苷色谱峰重叠，使用 Kromasil C₁₈ 和 Phenomenex luna C₁₈ 时样品中各成分实现良好分离，此 3 根色谱柱

的各成分 f 的 RSD 依次为 0.8%、1.3%、1.9%、2.0%、1.7%、2.1%，表明此 3 根色谱柱对各成分的 f 无显著影响。

2.8.5 不同仪器对 f 的影响 考察了 5 台高效液相色谱仪（3 种型号）对各 f 的影响，结果 RSD 依次为 1.0%、2.2%、1.0%、3.5%、2.1%、2.4%，表明此不同仪器对各成分的 f 无显著影响。

2.8.6 不同实验人员对 f 的影响 考察了 3 名实验人员对各 f 的影响，结果 RSD 依次为 0.6%、1.4%、1.5%、2.3%、0.8%、2.6%，表明不同操作人员所得各成分的 f 无显著差异。

2.8.7 f 耐用性影响因素综合 综合以上各种因素，新绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 C 和断氧化马钱子苷 f 的 RSD 依次为 0.7%、1.4%、1.5%、2.2%、1.4%、1.7%。结果见表 2。

2.9 待测组分色谱峰的定位

本研究采用相对保留时间进行待测成分色谱峰的定位，新绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸

表2 各种因素对 f 的影响
Table 2 Effects of various factors on f values

影响因素		f 绿原酸/新绿原酸	f 绿原酸/隐绿原酸	f 绿原酸/咖啡酸	f 异绿原酸 A/异绿原酸 B	f 异绿原酸 A/异绿原酸 C	f 梲子苷/断氧化马钱子苷
不同体积流量	0.7 mL/min	0.969	1.003	0.568	1.270	1.128	1.037
	0.8 mL/min	0.966	1.000	0.567	1.266	1.119	1.029
	0.9 mL/min	0.969	1.002	0.568	1.262	1.115	1.023
不同柱温	25 °C	0.968	1.005	0.567	1.266	1.131	1.040
	28 °C	0.967	1.000	0.567	1.263	1.122	1.025
	30 °C	0.966	1.000	0.567	1.266	1.119	1.029
	32 °C	0.969	1.000	0.568	1.271	1.122	1.023
	35 °C	0.969	1.001	0.568	1.271	1.115	1.034
不同仪器	Aglient11001#	0.952	1.025	0.554	1.210	1.152	1.000
	Aglient11002#	0.982	0.985	0.549	1.308	1.132	1.031
	Aglient12001#	0.966	1.000	0.567	1.266	1.119	1.029
	Aglient12002#	0.968	0.976	0.554	1.308	1.131	1.044
	WatersAlliance	0.971	0.974	0.547	1.317	1.171	1.065
不同色谱柱	luna	0.970	0.975	0.546	1.297	1.158	1.000
	Kromasil1#	0.966	1.000	0.567	1.266	1.119	1.029
	Kromasil2#	0.981	0.982	0.557	1.317	1.136	1.043
不同实验人员	实验员 1	0.966	1.000	0.567	1.266	1.119	1.029
	实验员 2	0.974	0.974	0.557	1.326	1.137	1.069
	实验员 3	0.963	0.978	0.550	1.291	1.126	1.019
平均值		0.968	0.992	0.562	1.282	1.129	1.033
RSD / %		0.7	1.4	1.5	2.2	1.4	1.7

B、异绿原酸 C 和断氧化马钱子苷的相对保留时间依次为 0.66、1.11、1.25、0.98、1.21、1.45，RSD 依次为 0.8%、0.8%、0.7%、0.1%、0.6%、0.8%。

2.10 QAMS 法与外标法测定结果的比较

取 29 批热毒宁注射液，采用外标法对热毒宁注射液进行多种成分同步定量测定，再用建立的 QAMS 法进行定量计算，以验证 QAMS 法用于热毒宁注射液多指标质量评价的准确性。结果见表 3~4。2 种方法测得的各种成分的量没有显著性差异，相对偏差 $[RD = (QAMS \text{ 法计算值} - \text{外标法实测值}) / \text{外标法实测值}] < 5.0\%$ ，表明建立的方法具有较好的可信度。

2.11 QAMS 法的再验证

另取热毒宁注射液 15 批，按照建立的 QAMS 法进行各待测成分色谱峰的定位，并对其量进行实际测算，得到质量分数的计算值，再以外标法进行反证，进一步验证 QAMS 法的合理性。结果见表 5~6。2 种方法得到的各成分的量无显著性差异，RD<

5.0%，表明建立的 QAMS 法在热毒宁注射液各成分检测中适用性良好。

3 讨论

本实验对各单一对照品进行了全波长扫描，各有机酸类成分在 324 nm 附近有最大吸收，环烯醚萜苷类成分在 237 nm 附近有最大吸收，因此选择 237 nm 作为梲子苷和断氧化马钱子苷的检测波长，324 nm 作为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 的检测波长。

待测成分色谱峰的准确定位是一测多评方法成功应用的关键，一般可以采用保留时间差或相对保留时间来定位待测成分色谱峰^[14]。相对保留时间指各待测成分 i 与内参物 s 间保留时间的比值，计算公式： $r_{is} = t_{Ri} / t_{Rs}$ ；保留时间差指各待测成分 i 与内参物 s 间保留时间的差值，计算公式： $\Delta t_{Ris} = t_{Ri} - t_{Rs}$ 。本实验考察了相对保留时间和保留时间差在不同品牌色谱柱和不同仪器上的重现性，结果保留时间差的波动较为明显，不太适合作为待测成分色谱峰定

表5 新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸成分测定的再验证

Table 5 Validation on determination of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, and caffeic acid

批 号	质量浓度 / (mg·mL ⁻¹)							批 号	质量浓度 / (mg·mL ⁻¹)								
	绿原酸	新绿原酸		隐绿原酸		咖啡酸			绿原酸	新绿原酸		隐绿原酸		咖啡酸			
		a	b	a	b	a	b			a	b	a	b	a	b	a	b
121102	6.62	3.01	3.03	2.95	2.98	0.16	0.16	121121	6.77	3.13	3.15	3.09	3.07	0.10	0.10		
121103	6.58	2.97	2.99	2.89	2.93	0.15	0.15	121122	6.79	2.76	2.77	2.75	2.74	0.15	0.15		
121108	6.49	3.08	3.10	3.03	3.06	0.16	0.16	121124	6.73	2.95	2.96	2.96	2.94	0.16	0.16		
121109	6.56	2.95	2.97	2.92	2.95	0.13	0.13	121125	6.28	2.58	2.58	2.59	2.58	0.12	0.12		
121111	6.48	3.01	3.03	2.94	2.98	0.13	0.13	121126	6.66	2.80	2.82	2.78	2.77	0.13	0.13		
121118	6.39	2.89	2.91	2.83	2.86	0.16	0.16	121127	6.39	2.85	2.87	2.86	2.84	0.15	0.15		
121119	6.80	2.89	2.92	2.82	2.85	0.14	0.14	121128	6.52	2.81	2.82	2.82	2.80	0.13	0.13		
121120	6.78	2.92	2.94	2.91	2.90	0.11	0.11										

表6 异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、栀子苷、断氧化马钱子苷成分测定的再验证

Table 6 Validation on determination of isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, jasminoidin, and secoxyloganin

批 号	质量浓度 / (mg·mL ⁻¹)								批 号	质量浓度 / (mg·mL ⁻¹)							
	异绿原 酸 A	异绿原酸		异绿原酸		栀子苷	断氧化马 钱子苷			异绿原 酸 A	异绿原酸		异绿原酸		栀子苷	断氧化马 钱子苷	
		B		C							B		C				
		a	b	a	b						a	b	a	b			
121102	0.27	0.55	0.54	0.37	0.38	10.07	1.26	1.28	121121	0.23	0.48	0.46	0.32	0.32	10.35	1.30	1.30
121103	0.25	0.52	0.51	0.37	0.37	10.10	1.22	1.24	121122	0.20	0.41	0.40	0.36	0.37	10.29	1.04	1.04
121108	0.25	0.51	0.50	0.35	0.36	10.26	1.53	1.55	121124	0.21	0.43	0.42	0.33	0.33	10.27	1.12	1.12
121109	0.23	0.46	0.45	0.33	0.34	10.51	1.48	1.49	121125	0.18	0.39	0.38	0.38	0.39	9.69	1.10	1.09
121111	0.23	0.46	0.45	0.32	0.33	10.33	1.49	1.51	121126	0.20	0.42	0.41	0.35	0.36	10.00	1.20	1.21
121118	0.23	0.46	0.45	0.33	0.34	10.19	1.48	1.49	121127	0.21	0.44	0.43	0.33	0.34	10.01	1.19	1.20
121119	0.21	0.43	0.42	0.31	0.32	10.20	1.21	1.22	121128	0.26	0.53	0.51	0.36	0.37	10.10	1.20	1.20
121120	0.22	0.46	0.44	0.34	0.35	10.33	1.35	1.35									

位的依据,相对保留时间的波动相对较小,因此采用相对保留时间法进行热毒宁注射液中各待测成分色谱峰的定位较为可靠。

由于热毒宁注射液中待测成分较多,部分品牌或型号色谱柱无法实现各成分的良好分离,尤其样品中隐绿原酸与杂质峰难以实现完全分离,故对色谱柱品牌和型号有一定的限制。研究中发现,使用 Kromasil C₁₈ 和 Phenomenex luna C₁₈ 时,热毒宁注射液中各成分实现良好分离。

本研究首次以不同类型化合物成分分别作为内参物来确定同类成分之间的 f ,因同类成分之间的紫外吸收接近, f 接近于 1,在实际应用中误差较小,一测多评方法的应用可行性更强^[10],故热毒宁注射液中采用不同的化合物分别作为内参物,建立同类

似结构成分之间的 f ,从而计算待测成分的量。热毒宁注射液中现已知的成分可分为有机酚酸类和环烯醚萜苷类(栀子苷、断氧化马钱子苷)2 大类,其中有机酚酸类成分除咖啡酸以外,又分为单咖啡酰奎宁酸(绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸)和二咖啡酰奎宁酸(异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C),故选择绿原酸、异绿原酸 A 和栀子苷分别作为单咖啡酰奎宁酸、二咖啡酰奎宁酸和环烯醚萜苷类的内参物,来计算其余同类成分的 f 。所得的 f 中 $f_{\text{绿原酸/新绿原酸}}=0.97$, $f_{\text{绿原酸/隐绿原酸}}=0.99$, $f_{\text{栀子苷/断氧化马钱子苷}}=1.03$, f 接近于 1,且 QAMS 法与外标法的量结果差异较小,准确度高。而 $f_{\text{绿原酸/咖啡酸}}=0.56$, $f_{\text{异绿原酸 A/异绿原酸 B}}=1.28$, f 偏离 1 较大,其中咖啡酸是因为比绿原酸少了 1 个奎宁酸结构,紫外吸收有差异。异绿原酸 B

的 f 偏离1的原因有可能是其质量分数偏低(面积归一化法质量分数为92.1%),以后需做进一步的研究验证,同时提示QAMS法在实际应用过程中,对对照品纯度问题应该引起研究者的关注。

本研究首次将QAMS法应用到热毒宁注射液的多指标质量评价模式中,通过大量数据建立了以多个内参物计算同类成分的 f ,并确定了各待测成分的色谱定位方法,对QAMS法应用于热毒宁注射液中多种成分同步测定进行了可行性研究。实验的研究结果,进一步确证了在对照品获得困难和多指标高昂检测成本的情况下,QAMS法显示了突出的优势和在热毒宁注射液多成分同步测定过程中良好的应用前景,使中药的多指标质量控制和评价模式应用于生产实践成为可能。

参考文献

- [1] 毕宇安,王振中,宋爱华,等.热毒宁注射液高效液相色谱指纹图谱研究及多成分定量分析[J].世界科学技术:中医药现代化,2010,12(2):298-303.
- [2] 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.
- [3] 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,2010,35(17):1301-1304.
- [4] 尹萌,孟月兰,闻珣毓.关黄柏中生物碱类成分的“一测多评”[J].中草药,2011,42(6):1093-1096.
- [5] 谭玉柱,童婷婷,赵高琼,等.基于一测多评法对大黃地上部位提取物的质量控制研究[J].中草药,2013,44(9):1190-1194.
- [6] 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.
- [7] 蓝天凤,王 晓,王岱杰,等.一测多评法测定丹参中4种丹参酮类成分[J].中草药,2012,43(12):2420-2423.
- [8] 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.
- [9] 杨 菲,冯伟红,王智民,等.一测多评法测定银黄制剂中4种黄酮类成分含量[J].中国药学杂志,2012,47(12):984-988.
- [10] 何 兵,刘 艳,杨世艳,等.HPLC一测多评法同时测定双青咽喉片中10种成分[J].中草药,2013,44(8):974-981.
- [11] 林 青,匡艳辉,黄 琳,等.一测多评法测定穿心莲及其制剂中内酯类成分[J].中草药,2012,43(12):2406-2411.
- [12] 陆兔林,石上梅,蔡宝昌,等.基于一测多评的中药多成分定量研究进展[J].中草药,2012,43(12):2525-2529.
- [13] 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.
- [14] 程丽丽,许妍妍,Nyirimigabo E,等.一测多评法测定乌头类药材中生物碱[J].现代药物与临床,2013,28(4):528-534.