

基于一测多评法桂芍镇痫片中 8 种成分定量质量控制研究

高 森¹, 白 雪^{2*}, 文柳静³, 李正翔¹, 房志仲⁴

1. 天津医科大学总医院 药剂科, 天津 300052

2. 天士力控股集团研究院 中药开发中心, 创新中药关键技术国家重点实验室, 天津 300402

3. 天津医科大学肿瘤医院 药学部, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津 300060

4. 天津医科大学药学院, 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070

摘要: 目的 建立同时测定桂芍镇痫片中 8 种成分氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的一测多评方法。方法 采用 HPLC 法, Thermo ODS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1.1 mL/min, 柱温 25 ℃。建立氧化芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 与内标芍药苷的相对校正因子, 通过相对校正因子计算桂芍镇痫片中 8 种成分的含量, 与外标法测定的结果进行对比分析, 以验证一测多评法的合理性、可行性和重复性。结果 氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的线性范围分别为 2.63~65.75 μg/mL ($r=0.9997$)、9.67~241.75 μg/mL ($r=0.9998$)、13.59~339.75 μg/mL ($r=0.9995$)、1.79~44.75 μg/mL ($r=0.9994$)、2.45~61.25 μg/mL ($r=0.9991$)、7.98~199.50 μg/mL ($r=0.9997$)、2.79~69.75 μg/mL ($r=0.9993$)、2.51~62.75 μg/mL ($r=0.9995$); 平均加样回收率分别为 98.64%、99.33%、100.02%、97.42%、96.95%、98.75%、98.21%、97.81%, RSD 分别为 0.89%、1.19%、1.00%、1.33%、1.51%、0.99%、1.43%、0.80%; 氧化芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 与内标物芍药苷的相对校正因子分别为 0.5209、1.0869、0.4768、0.6261、0.8021、0.7138、0.3670; 一测多评法的计算结果与外标法的实测值无显著性差异。结论 建立的一测多评法可作为一种简便准确的质量评价模式用于桂芍镇痫片中氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的质量控制。

关键词: 一测多评法; 相对校正因子; 桂芍镇痫片; 质量控制; 氧化芍药苷; 芍药内酯苷; 芍药苷; 苯甲酰芍药苷; 肉桂酸; 桂皮醛; 柴胡皂苷 a; 柴胡皂苷 d

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)12-2883-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.12.022

Quality control for eight components in Guishao Zhenxian Tablets based on quantitative analysis of multi-components with a single-marker

GAO Sen¹, BAI Xue^{2*}, WEN Liu-jing³, LI Zheng-xiang¹, FANG Zhi-zhong⁴

1. Department of Pharmacy, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

2. State Key Laboratory of Chinese medicine key technology innovation, Traditional Chinese Medicine Development Center, Tasly Holding Group Academy, Tianjin 300402, China

3. Tianjin Key Lab of Cancer Prevention and Treatment, State Cancer Clinical Medical Research Center, Tianjin Medical University Cancer Hospital, Tianjin 300060, China

4. Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics, School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To establish a quantitative analysis of multi-components with a single-marker (QAMS) method for the simultaneous determination of oxypaeoniflorin, albiflorin, paeoniflorin, benzoylpaeoniflorin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, saikosaponin a, and saikosaponin d in Guishao Zhenxian Tablets (GZT). **Methods** The separation was performed on a Thermo ODS C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase consisting of acetonitrile-0.1% phosphate acid solution for gradient

收稿日期: 2017-12-07

作者简介: 高 森 (1980—), 男, 硕士, 副主任药师, 主要从事医院药学、药物质量控制和药物评价。

Tel: 13920249696 E-mail: yjkgaosen@163.com

*通信作者 白 雪 (1981—), 女, 高级工程师, 主要从事新药研发和药物质量控制研究。E-mail: gaosenyjk@163.com

elution. The column temperature was 25 °C, and flow rate was 1.1 mL/min. Using paeoniflorin as internal reference substance, the relative correlation factors of oxypaeoniflorin, albiflorin, benzoylpaeoniflorin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, saikosaponin a, and saikosaponin d were calculated and established by HPLC. The results were compared with those obtained by the external standard method to verify the rationality, feasibility, and repeatability of QAMS method. **Results** Oxypaeoniflorin, albiflorin, paeoniflorin, benzoylpaeoniflorin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, saikosaponin a, and saikosaponin d had good relations within the ranges of 2.63—65.75 µg/mL ($r = 0.999\ 7$), 9.67—241.75 µg/mL ($r = 0.999\ 8$), 13.59—339.75 µg/mL ($r = 0.999\ 5$), 1.79—44.75 µg/mL ($r = 0.999\ 4$), 2.45—61.25 µg/mL ($r = 0.999\ 1$), 7.98—199.50 µg/mL ($r = 0.999\ 7$), 2.79—69.75 µg/mL ($r = 0.999\ 3$), and 2.51—62.75 µg/mL ($r = 0.999\ 5$), respectively. The recovery rates were 98.64%, 99.33%, 100.02%, 97.42%, 96.95%, 98.75%, 98.21%, and 97.81%, RSDs were 0.89%, 1.19%, 1.00%, 1.33%, 1.51%, 0.99%, 1.43%, and 0.80%, respectively. The relative correlation factors values of oxypaeoniflorin, albiflorin, benzoylpaeoniflorin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, saikosaponin a, and saikosaponin d to paeoniflorin were 0.520 9, 1.086 9, 0.476 8, 0.626 1, 0.802 1, 0.713 8, and 0.367 0, respectively. There were no significant difference in assay results between QAMS and the external standard method. **Conclusion** The QAMS method is feasible and credible, and could be used to determine oxypaeoniflorin, albiflorin, paeoniflorin, benzoylpaeoniflorin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, saikosaponin a, and saikosaponin d in Guishao Zhenxian Tablets for the quality control.

Key words: quantitative analysis of multi-components with a single-marker; relative correlation factors; Guishao Zhenxian Tablets; quality control; oxypaeoniflorin; albiflorin; paeoniflorin; benzoylpaeoniflorin; cinnamic acid; cinnamaldehyde; saikosaponin a; saikosaponin d

桂芍镇痫片由白芍、桂枝、柴胡、党参、半夏(制)等 9 味药材加工而成, 处方源于卫生部药品标准中药成方制剂第十三册, 现收载于《中国药典》2015 年版一部, 具有调和营卫、清肝胆的功效, 临床上主要用于治疗各种发作类型的癫痫病症^[1-2]。桂芍镇痫片对顽固性癫痫、难治性癫痫效果显著^[3], 现行质量标准和文献报道仅对方中所含的芍药苷进行了定量测定研究^[4-5], 未检索到对桂芍镇痫片中多成分进行定量控制的文献报道, 中成药复方制剂组方复杂, 其疗效往往为多成分共同作用的结果, 单一成分难以有效控制桂芍镇痫片质量的稳定性和临床疗效的一致性。

为全面评价桂芍镇痫片的质量, 本实验建立 HPLC 法, 对桂芍镇痫片主要药味白芍所含氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷, 桂枝所含肉桂酸、桂皮醛和柴胡所含柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 进行同时测定, 同时为降低检验成本, 以芍药苷为内标物, 建立其与氧化芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的相对校正因子($f_{k/s}$), 利用 $f_{k/s}$ 计算桂芍镇痫片中各成分的含量, 并与外标法所得结果进行比较, 以验证一测多评法^[6-9](QAMS)的可行性和准确性。实验结果表明, 本实验建立的 QAMS 可作为一种简便准确的质量评价模式用于桂芍镇痫片中氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的质量控制, 为桂芍镇痫片的全面质量控制提供新的方法

和思路。

1 材料与仪器

Sartorius CP225D 电子分析天平, 德国 Sartorius 公司; Waters E2695 高效液相色谱仪, Waters 2414 型可变波长检测器, 美国 Waters 公司; KQ-250DE 数控型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

桂芍镇痫片 Guishao Zhenxian Tablets (GZT), 规格: 每片质量 0.32 g, 批号 20160601、20160803、20170301, 购自长春海外制药集团有限公司; 对照品芍药苷(批号 110736-201741, 质量分数为 95.7%)、肉桂酸(批号 110786-201604, 质量分数为 98.8%)、桂皮醛(批号 110710-201720, 质量分数为 98.7%)、柴胡皂苷 a(批号 110777-201711, 质量分数为 91.1%)和柴胡皂苷 d(批号 110778-201711, 质量分数为 95.8%)购自中国食品药品检定研究院; 对照品芍药内酯苷(批号 39011-90-0, 质量分数为 97.0%)、苯甲酰芍药苷(批号 38642-49-8, 质量分数为 98.0%)购自上海纯优生物科技有限公司; 对照品氧化芍药苷(批号 39011-91-1, 质量分数为 98.0%)购自宝鸡市辰光生物有限公司; 乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 HPLC 测定桂芍镇痫片中 8 种成分方法的建立

2.1.1 色谱条件 采用 Thermo ODS C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) 色谱柱; 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~12 min, 15%乙腈; 12~24 min, 15%~36%乙腈; 24~33 min, 36%~51%乙

腈; 33~39 min, 51%~60%乙腈; 39~45 min, 60%~15%乙腈; 0~24 min 在 230 nm^[10-12]波长下检测氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷, 24~33 min 在 275 nm^[13-14]波长下检测肉桂酸和桂皮醛, 33~45 min 在 210 nm^[1]波长下检测柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d; 体积流量 1.1 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量为 10 µL。

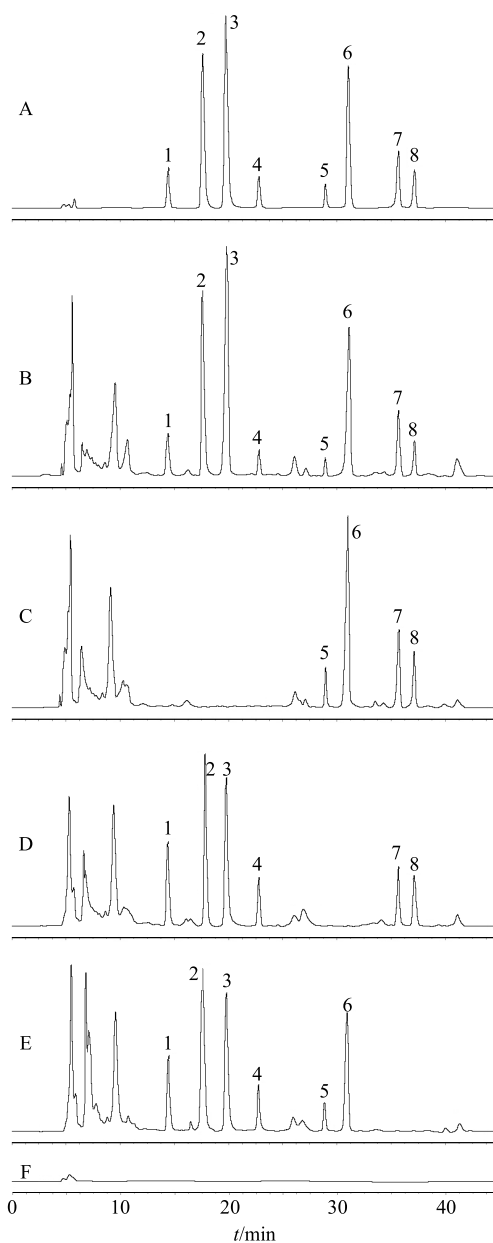
2.1.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 对照品各适量, 用甲醇溶解制成质量浓度分别为 0.526、1.934、2.718、0.358、0.490、1.596、0.558、0.502 mg/mL 的单一成分对照品储备液; 再依次精密吸取对照品储备液 2.5、2.5、2.5、2.5、1.0、2.5、2.5、2.5 mL, 置于同一量瓶中, 用甲醇稀释制成质量浓度分别为 26.3、96.7、135.9、17.9、9.8、79.8、27.9、25.1 µg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 线性关系考察混合对照品溶液的制备 依次精密吸取“2.1.2”项下制备的氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 对照品贮备液各 2.5 mL, 置于同一 20 mL 量瓶中, 摇匀, 作为线性关系考察混合对照品溶液 F, 精密吸取线性关系考察对照品溶液 F 各适量, 用甲醇分别稀释 5、10、15、20、25 倍, 依次制成线性关系考察混合对照品溶液 E、D、C、B、A。

2.1.4 供试品溶液的制备 取桂芍镇痫片适量, 除去薄膜衣后, 研细, 取约 0.5 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加入甲醇 40 mL, 超声提取 30 min, 放冷至室温, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 续滤液即为桂芍镇痫片供试品溶液。

2.1.5 阴性样品溶液的制备 按照桂芍镇痫片质量标准项下的处方和制剂生产工艺, 分别制备缺白芍阴性样品、缺桂枝阴性样品和缺柴胡阴性样品, 再按照“2.1.4”项下方法分别制成白芍阴性样品溶液、桂枝阴性样品溶液和柴胡阴性样品溶液。

2.1.6 专属性试验 精密量取混合对照品溶液、桂芍镇痫片供试品溶液、白芍阴性样品溶液、桂枝阴性样品溶液和柴胡阴性样品溶液各适量, 依法进行检测, 结果见图 1, 阴性样品溶液对桂芍镇痫片中氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 测定无干扰, 理论塔板数按所测各色谱峰计均不低于



1-氧化芍药苷 2-芍药内酯苷 3-芍药苷 4-苯甲酰芍药苷 5-肉桂酸 6-桂皮醛 7-柴胡皂苷 a 8-柴胡皂苷 d
1-oxypaeoniflorin 2-albiflorin 3-paeoniflorin 4-benzoylpaeoniflorin 5-cinnamic acid 6-cinnamaldehyde 7-saikosaponin a 8-saikosaponin d

图 1 混合对照品 (A)、桂芍镇痫片 (B)、白芍阴性样品 (C)、桂枝阴性样品 (D)、柴胡阴性样品 (E) 和空白溶剂 (F) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatogram of mixed reference substances (A), GZT (B), negative sample of *Paeoniae Radix Alba* (C), negative sample of *Cinnamomi Ramulus* (D), negative sample of *Bupleuri Radix* (E), and blank solvents (F)

3 500, 桂芍镇痫片中氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 与其相邻峰均能达到有效分离, 分

离度大于 1.5, 所测各成分色谱峰纯度检测合格, 符合含量测定要求。

2.1.7 线性关系考察 分别精密吸取“2.1.3”项下制备的线性关系考察混合对照品溶液 A~F, 依法进样测定氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂

苷 d 的峰面积, 以质量浓度为横坐标 (X), 各成分峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的回归方程、线性范围、相关系数 (r) 及定量限 (LOQ, $S/N=10$) 见表 1。

表 1 线性关系及定量限实验结果

Table 1 Results of linear relationship test and LOQ

指标成分	回归方程	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	r	LOQ/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
氧化芍药苷	$Y=7.8077\times 10^5 X+764.2$	2.63~65.75	0.9997	0.159
芍药内酯苷	$Y=1.6332\times 10^6 X-942.0$	9.67~241.75	0.9998	0.118
芍药苷	$Y=1.5024\times 10^6 X+406.0$	13.59~339.75	0.9995	0.294
苯甲酰芍药苷	$Y=7.1349\times 10^5 X+862.6$	1.79~44.75	0.9994	0.097
肉桂酸	$Y=9.3676\times 10^5 X-342.8$	2.45~61.25	0.9991	0.131
桂皮醛	$Y=1.2019\times 10^6 X+266.2$	7.98~199.50	0.9997	0.306
柴胡皂苷 a	$Y=1.0715\times 10^6 X-829.4$	2.79~69.75	0.9993	0.172
柴胡皂苷 d	$Y=5.4890\times 10^5 X+419.5$	2.51~62.75	0.9995	0.145

2.1.8 精密度试验 精密吸取“2.1.2”项下的混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的峰面积, 计算峰面积的 RSD 值, 结果氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的峰面积的 RSD 分别为 1.08%、0.66%、0.57%、1.15%、1.39%、0.74%、0.96%、1.02%。

2.1.9 重复性试验 取批号为 20160601 的桂芍镇痫片适量, 按照“2.1.4”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 依法进样测定, 记录氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的峰面积, 计算所测各成分含量, 结果氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的平均质量分数分别为 2.617、10.984、11.305、1.633、0.842、9.289、2.871、2.297 mg/g, RSD 分别为 1.42%、1.03%、0.91%、1.28%、1.39%、1.11%、0.75%、1.27%。

2.1.10 稳定性试验 取批号 20160601 的桂芍镇痫片同一份供试品溶液, 分别于室温下 0、3、6、9、12、15 h 进样检测氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的峰面积, 结果桂芍镇痫片供试品溶液室温下 15 h 内稳定, 所测各成分峰面积的 RSD 分别为 1.10%、0.72%、0.69%、1.13%、1.41%、0.80%、

1.05%、1.37%。

2.1.11 加样回收率试验 取已知含量的桂芍镇痫片 (批号 20160601) 20 片, 除去薄膜衣后, 研细, 分成 6 份, 每份取约 0.25 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 分别精密加入 0.649 mg/mL 氧化芍药苷对照品溶液 1.0 mL、1.383 mg/mL 芍药内酯苷对照品溶液 2.0 mL、1.917 mg/mL 芍药苷对照品溶液 2.0 mL、0.411 mg/mL 苯甲酰芍药苷对照品溶液 1.0 mL、0.213 mg/mL 肉桂酸对照品溶液 1.0 mL、2.324 mg/mL 桂皮醛对照品溶液 1.0 mL、0.717 mg/mL 柴胡皂苷 a 对照品溶液 1.0 mL、0.573 mg/mL 柴胡皂苷 d 对照品溶液 1.0 mL, 再按照“2.1.4”项下方法制备加样供试品溶液, 依次进样测定, 结果所测成分氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的平均加样回收率分别为 98.64%、99.33%、100.02%、97.42%、96.95%、98.75%、98.21%、97.81%, RSD 分别为 0.89%、1.19%、1.00%、1.33%、1.51%、0.99%、1.43%、0.80%。

2.2 QAMS 方法的建立

2.2.1 $f_{k/s}$ 的计算 精密吸取“2.1.3”项下制备的线性关系考察混合对照品溶液 A~F, 依法进样测定, 记录氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 峰面积, 以芍药苷为内标物, 根据公式 ($f_{k/s}=f_k/f_s=W_kA_s/W_sA_k$, 其中 W_k 为内标物芍药苷的质量浓度,

A_k 为内标物芍药苷的峰面积, W_s 为氧化芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的质量浓度, A_s 为氧化芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的峰面积) 分别计算芍药苷与氧化芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的 $f_{k/s}$ 值, 结果见表 2。

2.2.2 不同高效液相色谱仪、色谱柱对 $f_{k/s}$ 的影响 为考察不同品牌高效液相色谱仪和色谱柱对 $f_{k/s}$ 的影响, 本实验分别选取 Waters E2695 高效液相色谱仪和 Dionex UitiMate 3000 高效液相色谱仪, Thermo

ODS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent TC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 Waters Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱进行实验, 结果表明不同品牌高效液相色谱仪和色谱柱对氧化芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的 $f_{k/s}$ 无显著影响, 结果见表 3。

2.2.3 不同柱温对 $f_{k/s}$ 的影响 为考察不同柱温对 $f_{k/s}$ 的影响, 本实验柱温分别选取 20、25、30 °C 进行实验, 实验结果表明不同柱温对氧化芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的 $f_{k/s}$ 无显著影响, 结果见表 4。

表 2 各成分的 $f_{k/s}$ 值
Table 2 $f_{k/s}$ of each component

混合对照品溶液	$f_{\text{芍药苷/氧化芍药苷}}$	$f_{\text{芍药苷/芍药内酯苷}}$	$f_{\text{芍药苷/苯甲酰芍药苷}}$	$f_{\text{芍药苷/肉桂酸}}$	$f_{\text{芍药苷/桂皮醛}}$	$f_{\text{芍药苷/柴胡皂苷 a}}$	$f_{\text{芍药苷/柴胡皂苷 d}}$
A	0.530 1	1.100 3	0.484 0	0.638 4	0.821 5	0.716 9	0.375 7
B	0.513 3	1.064 3	0.478 3	0.625 0	0.791 8	0.713 1	0.366 1
C	0.520 4	1.081 6	0.475 3	0.629 3	0.785 6	0.718 1	0.365 0
D	0.523 6	1.102 6	0.473 2	0.615 8	0.811 2	0.710 2	0.364 6
E	0.518 3	1.092 6	0.473 4	0.620 7	0.809 1	0.707 5	0.364 6
F	0.519 6	1.079 9	0.476 6	0.627 2	0.793 2	0.716 7	0.366 2
平均值	0.520 9	1.086 9	0.476 8	0.626 1	0.802 1	0.713 8	0.367 0
RSD/%	1.08	1.33	0.84	1.24	1.73	0.59	1.17

表 3 不同仪器、色谱柱对 $f_{k/s}$ 的影响
Table 3 Effects of different instruments and columns on $f_{k/s}$ values

仪器	色谱柱	$f_{\text{芍药苷/氧化芍药苷}}$	$f_{\text{芍药苷/芍药内酯苷}}$	$f_{\text{芍药苷/苯甲酰芍药苷}}$	$f_{\text{芍药苷/肉桂酸}}$	$f_{\text{芍药苷/桂皮醛}}$	$f_{\text{芍药苷/柴胡皂苷 a}}$	$f_{\text{芍药苷/柴胡皂苷 d}}$
Waters E2695	Thermo ODS C ₁₈	0.521 1	1.086 5	0.477 2	0.625 7	0.802 8	0.714 5	0.367 3
	Agilent TC-C ₁₈	0.520 7	1.057 6	0.478 5	0.617 9	0.823 4	0.709 1	0.361 8
	Waters Symmetry C ₁₈	0.521 9	1.108 1	0.471 6	0.621 3	0.791 6	0.718 3	0.372 6
Dionex UitiMate 3000	Thermo ODS C ₁₈	0.523 7	1.096 7	0.473 4	0.631 5	0.803 7	0.708 5	0.369 5
	Agilent TC-C ₁₈	0.519 4	1.083 4	0.485 9	0.627 3	0.799 1	0.721 6	0.371 4
	Waters Symmetry C ₁₈	0.532 9	1.090 5	0.471 3	0.630 2	0.806 8	0.718 9	0.372 5
平均值		0.523 3	1.087 1	0.476 3	0.625 6	0.804 6	0.715 1	0.369 2
RSD/%		0.94	1.56	1.16	0.84	1.32	0.76	1.12

表 4 不同柱温对 $f_{k/s}$ 的影响
Table 4 Effects of different column temperature on $f_{k/s}$ values

柱温/°C	$f_{\text{芍药苷/氧化芍药苷}}$	$f_{\text{芍药苷/芍药内酯苷}}$	$f_{\text{芍药苷/苯甲酰芍药苷}}$	$f_{\text{芍药苷/肉桂酸}}$	$f_{\text{芍药苷/桂皮醛}}$	$f_{\text{芍药苷/柴胡皂苷 a}}$	$f_{\text{芍药苷/柴胡皂苷 d}}$
20	0.519 7	1.069 5	0.483 4	0.624 3	0.795 6	0.721 3	0.364 5
25	0.520 3	1.084 6	0.476 1	0.625 7	0.801 4	0.712 9	0.367 8
30	0.524 4	1.091 1	0.471 5	0.615 4	0.819 4	0.703 7	0.370 6
平均值	0.521 5	1.081 7	0.477 0	0.621 8	0.805 5	0.712 6	0.367 6
RSD/%	0.49	1.02	1.26	0.90	1.54	1.24	0.83

2.2.4 不同体积流量对 $f_{k/s}$ 的影响 为考察不同体积流量对 $f_{k/s}$ 的影响, 本实验体积流量分别选取 1.0、1.1、1.2 mL/min 进行实验, 实验结果表明不同体积流量对氧化芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的 $f_{k/s}$ 无显著影响, 结果见表 5。

2.2.5 待测成分色谱峰定位 本实验采用相对保留时间进行所测成分色谱峰的定位, 以芍药苷为内标物, 计算在不同品牌高效液相色谱仪和色谱柱条件下所测成分氧化芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 与

内标物的相对保留值 ($t_{s/k}$), 对所测定成分色谱峰进行定位, 实验结果表明不同品牌高效液相色谱仪和色谱柱条件下所测各成分间的相对保留值变化无明显差异, 结果见表 6。

2.3 QAMS 法与外标法测定结果的比较

取 3 批次桂芍镇痫片 (批号 20160601、20160803、20170301), 分别采用外标法和 QAMS 测定氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的含量, 结果见表 7, QAMS 与外标法所测得的各成分含量无显著差异。

表 5 不同体积流量对 $f_{k/s}$ 的影响

Table 5 Effects of different flow rates on $f_{k/s}$ values

体积流量/(mL·min ⁻¹)	$f_{\text{芍药苷/氧化芍药苷}}$	$f_{\text{芍药苷/芍药内酯苷}}$	$f_{\text{芍药苷/苯甲酰芍药苷}}$	$f_{\text{芍药苷/肉桂酸}}$	$f_{\text{芍药苷/桂皮醛}}$	$f_{\text{芍药苷/柴胡皂苷 a}}$	$f_{\text{芍药苷/柴胡皂苷 d}}$
1.0	0.526 7	1.068 4	0.478 5	0.619 8	0.798 1	0.721 1	0.364 3
1.1	0.521 4	1.083 7	0.477 2	0.625 6	0.801 4	0.714 5	0.366 1
1.2	0.518 3	1.095 2	0.473 7	0.623 1	0.815 9	0.708 3	0.369 5
平均值	0.522 1	1.082 4	0.476 5	0.622 8	0.805 1	0.714 6	0.366 6
RSD/%	0.81	1.24	0.52	0.47	1.18	0.90	0.72

表 6 相对保留值

Table 6 Relative retention values

仪器	色谱柱	$t_{\text{氧化芍药苷/芍药苷}}$	$t_{\text{芍药内酯苷/芍药苷}}$	$t_{\text{苯甲酰芍药苷/芍药苷}}$	$t_{\text{肉桂酸/芍药苷}}$	$t_{\text{桂皮醛/芍药苷}}$	$t_{\text{柴胡皂苷 a/芍药苷}}$	$t_{\text{柴胡皂苷 d/芍药苷}}$
Waters E2695	Thermo ODS C ₁₈	0.710 8	0.890 7	1.152 6	1.463 3	1.569 8	1.802 9	1.879 2
	Agilent TC-C ₁₈	0.711 2	0.890 9	1.167 1	1.479 7	1.578 5	1.813 3	1.887 4
	Waters Symmetry C ₁₈	0.710 5	0.890 1	1.149 5	1.461 9	1.567 3	1.801 7	1.875 7
Dionex UitiMate 3000	Thermo ODS C ₁₈	0.713 1	0.899 4	1.153 4	1.466 4	1.571 2	1.803 4	1.880 6
	Agilent TC-C ₁₈	0.707 8	0.890 2	1.136 7	1.447 5	1.548 7	1.759 2	1.870 1
	Waters Symmetry C ₁₈	0.710 4	0.885 8	1.151 9	1.460 1	1.568 4	1.804 8	1.876 8
平均值		0.710 6	0.891 2	1.151 9	1.463 2	1.567 3	1.797 6	1.878 3
RSD/%		0.24	0.50	0.84	0.71	0.63	1.07	0.31

表 7 QAMS 与外标法 8 种成分的测定结果 ($n=3$)

Table 7 Determination results of eight components by QAMS and external standard methods ($n=3$)

批号	芍药苷/(mg·g ⁻¹)			氧化芍药苷/(mg·g ⁻¹)			芍药内酯苷/(mg·g ⁻¹)			苯甲酰芍药苷/(mg·g ⁻¹)		
	外标法	QAMS	RSD/%	外标法	QAMS	RSD/%	外标法	QAMS	RSD/%	外标法	QAMS	RSD/%
20160601	11.356			2.595	2.588	0.14	11.052	10.894	0.72	1.649	1.665	0.48
20160803	10.796			2.350	2.336	0.30	10.957	10.916	0.19	1.490	1.456	1.15
20170301	11.893			2.804	2.842	0.67	12.139	12.003	0.56	1.708	1.714	0.18
批号	肉桂酸/(mg·g ⁻¹)			桂皮醛/(mg·g ⁻¹)			柴胡皂苷 a/(mg·g ⁻¹)			柴胡皂苷 d/(mg·g ⁻¹)		
	外标法	QAMS	RAD/%	外标法	QAMS	RAD/%	外标法	QAMS	RAD/%	外标法	QAMS	RAD/%
20160601	0.841	0.859	0.11	9.357	9.381	0.13	2.867	2.825	0.74	2.312	2.254	1.27
20160803	0.952	0.906	0.25	10.639	10.257	1.83	3.008	3.084	1.25	2.646	2.601	0.86
20170301	0.726	0.792	0.43	8.000	8.086	0.53	2.622	2.706	1.58	2.119	2.165	0.11

3 讨论

3.1 流动相的选择

实验中参考《中国药典》2015年版和文献资料,以色谱峰基线平稳、检测时间和所测各成分氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷a和柴胡皂苷d的峰形、分离度等为考察指标,采用等度洗脱分别考察了不同流动相(乙腈-水^[1,15-16]、乙腈-0.1%磷酸水溶液^[11-14]、乙腈-0.1%甲酸水溶液^[17])对考察指标的综合影响,结果乙腈-0.1%磷酸水溶液流动相体系优于乙腈-水和乙腈-0.1%甲酸水溶液流动相体系,但存在柴胡皂苷a和柴胡皂苷d色谱峰分离效果欠佳,检测时间长的缺点;在此基础上,笔者以乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相采用梯度洗脱法,通过对流动相的比例进行摸索,最终确定“2.1.1”项下的流动相体系对桂芍镇痫片中氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷a和柴胡皂苷d进行同时测定。

3.2 桂芍镇痫片供试品溶液制备方法的优化

在实验中对桂芍镇痫片供试品溶液制备所用溶剂(甲醇^[11,13,15-16]、50%甲醇^[17]、乙醇、60%乙醇^[10])和提取方式(超声波超声提取^[11,13,16-17]和加热回流提取^[12,14])进行了对比考察,以桂芍镇痫片中所测定成分氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷a和柴胡皂苷d的提取率为考察指标,最终确定采用甲醇超声提取30 min作为桂芍镇痫片供试品溶液的制备方法。

中药复方制剂所含成分较多,多成分同时测定已成为中成药复方制剂质量评价的发展趋势,QAMS运用所测各组分间存在的内在函数关系,以其中一个易得且性质稳定的成分为内标物,通过建立内标物与其他所测组分间的 $f_{k/s}$,实现多组分的同时测定,大大地降低了检验成本,已广泛得以应用。本实验采用QAMS,以芍药苷为内标物,建立了内标物芍药苷与其他所测组分氧化芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、桂皮醛、柴胡皂苷a和柴胡皂苷d的 $f_{k/s}$,采用相对保留值对待测组分数谱峰进行定位,QAMS和外标法实验结果无显著性差异,检测方法简便、准确,为桂芍镇痫片的全面质量控制提供新的方法和思路。

参考文献

- [1] WS3-B-2887-98. 卫生部颁药品标准(中药成方制剂第十三册)[S]. 1998.
- [2] 中国药典[S]. 一部. 2015.
- [3] 陈俊宁,戴志仙,乐卫东,等. 桂芍镇痫片治疗癫痫的临床观察[J]. 中成药研究, 1982, 5(12): 20-21.
- [4] 刘献洋,蒋道英,侯佳伟,等. HPLC测定桂芍镇痫片中芍药苷的含量[J]. 中成药, 2008, 30(4): 6-8.
- [5] 管清香,岳峻威,刘昕,等. 桂芍镇痫片质量标准研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(1): 56-57.
- [6] 董迎,夏彦铭,狄留庆,等. 一测多评法同时测定补肾清利颗粒中8种成分[J]. 中草药, 2017, 48(24): 5158-5167.
- [7] 梁文仪,袁永兵,陈文静,等. 一测多评法测定不同丹参制剂中4个酚酸成分[J]. 药物评价研究, 2018, 41(5): 828-835.
- [8] 申琳,许桂玲,郝福,等. 一测多评法测定丹酚酸A原料药中迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B和丹酚酸C[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(1): 32-36.
- [9] 刘娟,钟瑞娜,刘肖,等. 一测多评法在肝能滴丸质量控制中的应用研究[J]. 中草药, 2018, 49(5): 1075-1080.
- [10] 李伟铭,赵月然,杨燕云,等. HPLC波长切换法同时测定白芍饮片中9个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(12): 2208-2212.
- [11] 何秀菊,张振秋,王婧宁,等. HPLC波长切换法同时测定桂枝、白芍药对提取物中8个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(11): 1899-1903.
- [12] 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.
- [13] 刘威,李红娟,张帅. HPLC测定不同商品规格桂枝中香豆素、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 134-138.
- [14] 刘威,李家春,胡军华,等. 桂枝水提液全时段双波长融合高效液相色谱指纹图谱研究及6个成分定量分析[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(6): 1043-1048.
- [15] 李媛媛,秦雪梅,王玉庆,等. 柱前衍生化法评价不同品种和产地柴胡药材和饮片的质量[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(3): 237-240.
- [16] 何晓梅. HPLC-ELSD法测定大柴胡颗粒中柴胡皂苷a及柴胡皂苷d的含量[J]. 健康必读(下旬刊), 2012, 26(12): 433.
- [17] 刘杰,许文,李煌,等. UPLC-MS/MS法同时测定白芍饮片中10种成分[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(4): 635-643.