

# 一测多评法测定昆仙胶囊中 10 种黄酮类成分

张 雪<sup>1</sup>, 彭富全<sup>2\*</sup>, 何风雷<sup>2</sup>

1. 中国药科大学, 江苏 南京 211198

2. 广州白云山陈李济药厂有限公司, 广东 广州 510288

**摘要:** **目的** 建立一测多评法同时测定昆仙胶囊中 10 种黄酮类成分的含量, 并验证此方法在昆仙胶囊中应用的可行性和适用性。 **方法** 采用 HPLC 法, 以金丝桃苷为内参物, 建立朝藿苣 A、朝藿苣 C、朝藿苣 B、淫羊藿苷、木犀草素、槲皮素、川陈皮素、山柰酚和宝藿苣 I 的相对校正因子 ( $f_{s/i}$ ), 并利用  $f_{s/i}$  计算昆仙胶囊样品中成分的含量, 同时用外标法计算各成分的含量, 比较两种方法的差异, 采用  $t$  检验法比较分析昆仙胶囊中 10 种黄酮类成分的含量。 **结果** 朝藿苣 B、朝藿苣 A、朝藿苣 C、淫羊藿苷、木犀草素、槲皮素、川陈皮素、山柰酚和宝藿苣 I 的  $f_{s/i}$  分别为 0.756 5、2.199 4、1.232 7、1.008 5、0.635 7、0.576 0、0.487 5、0.545 6、0.675 8。采用一测多评法与外标法得到的 10 批昆仙胶囊样品含量测定结果  $RSD < 2.0\%$ , 无显著差异。 **结论** 以金丝桃苷为内参物建立  $f_{s/i}$  准确、可行, 一测多评法可用于昆仙胶囊的质量评价。

**关键词:** 昆仙胶囊; 一测多评; 相对校正因子; 金丝桃苷; 朝藿苣 A; 朝藿苣 C; 朝藿苣 B; 淫羊藿苷; 木犀草素; 槲皮素; 川陈皮素; 山柰酚; 宝藿苣 I

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)24-5823-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.24.014

## Determination of ten flavones in Kunxian Capsules with quantitative analysis of multi-components by single marker

ZHANG Xue<sup>1</sup>, PENG Fu-quan<sup>2</sup>, HE Feng-lei<sup>2</sup>

1. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

2. Guangzhou Baiyunshan Chen Liji Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510288, China

**Abstract:** **Objective** To establish quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) method for simultaneous determining the content of ten flavonoids in Kunxian Capsules (KC), and evaluate the adaptation and application of QAMS method in the quality control of KC. **Methods** The relative factor ( $f_{s/i}$ ) of epimedin A, epimedin C, epimedin B, icariin, luteolin, quercetin, nobiletin, kaempferol and baohuoside I were established by HPLC method with hyperoside as internal standard, which were used to calculate the content of ten flavonoids in the samples of KC. Meanwhile, external standard method (ESM) was used to calculate the content of ten flavonoids. The difference between QAMS and ESM were analyzed to evaluate the accuracy of QAMS.  $T$ -test was used to compare the content of ten flavonoids in KC. **Results** The  $f_{s/i}$  of epimedin A, epimedin C, epimedin B, icariin, luteolin, quercetin, nobiletin, kaempferol, and baohuoside I were 0.756 5, 2.199 4, 1.232 7, 1.008 5, 0.635 7, 0.576 0, 0.487 5, 0.545 6, 0.675 8. The content determination results of ten batches of KC samples were calculated by the method of QAMS and ESM, with no significant difference in  $RSD < 2.0\%$ . **Conclusion** The  $f_{s/i}$  established in the QAMS method with hyperoside as the internal reference substance is accurate and feasible. The QAMS method can be used for the quality evaluation of KC.

**Key words:** Kunxian Capsules; quantitative analysis of multi-components by single marker; relative correction factor; hyperoside; epimedin A; epimedin C; epimedin B; icariin; luteolin; quercetin; nobiletin; kaempferol; baohuoside I

昆仙胶囊 (Kunxian Capsules, KC) 是广州白云山陈李济药厂与四川省中药研究所共同研制的治疗类风湿性关节炎 (风湿痹阻兼肾虚证) 的中药新

药 (第 6 类), 处方由昆明山海棠、淫羊藿、菟丝子、枸杞子 4 味中药组成, 具有补肾通络、祛风除湿的功效, 主治类风湿性关节炎属风湿痹阻兼肾虚证<sup>[1]</sup>。

收稿日期: 2018-08-20

基金项目: 广州市科技计划项目“昆仙胶囊顶层设计研究”(201604016062)

作者简介: 张 雪 (1992—), 硕士研究生。E-mail: 18798710454@163.com

\*通信作者 彭富全 (1974—), 高级工程师, 主要从事中药质量标准研究。Tel: 13570313688 E-mail: tsuanpeng@163.com

现代药理学和临床研究表明, KC 具有抗炎、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、免疫抑制等作用, 用于免疫性疾病, 如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、慢性肾炎等<sup>[2-9]</sup>。KC 单味药材中化学成分有黄酮类、生物碱、萜类、糖苷类等多种有效成分<sup>[10-13]</sup>, 但对 KC 中多指标成分同时测定的文献还未见报道。一测多评 (quantitative analysis of multi-components by single marker, QAMS) 是由中国中医科学院王智民等最先提出的多指标质量评价方法<sup>[14]</sup>, 是利用中药中有效成分内在函数关系和比例关系, 只测定 1 个有效成分 (性质稳定且易得到的对照品) 来实现多个成分 (性质不稳定且难得到的对照品) 的同时测定<sup>[15]</sup>。通过建立样品中某一有效、价廉、易得的典型成分与样品其余成分间的相对校正因子 ( $f_{s/i}$ ) 来计算样品中其他成分的量, 其检测成本低, 分析效率高<sup>[16]</sup>。KC 中含有大量的黄酮类成分, 本实验采用 QAMS 法, 以金丝桃苷为内参物, 对 KC 中黄酮类成分进行含量测定, 在其原有质量标准基础上进行优化和提升, 按照中药新药质量标准研究的技术要求, 建立 KC 的综合质量评价方法。从整体上有效控制产品质量, 为更好地保证临床疗效奠定基础。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪, Agilent 1200 DAD 检测器, 美国 Agilent 公司; Waters Acquity Arc 型高效液相色谱仪, Waters 2489 检测器, 美国 Waters 公司; BS 110S 型电子天平、CP 225D 型电子天平, 德国赛多利斯有限公司; SB-5200DT 型超声波清洗机, 宁波新芝生物股份有限公司; TGL-15B 型飞鸽高速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; Millipore SIMS5000 型超纯水仪, 德国默克密理博有限公司。

### 1.2 试剂

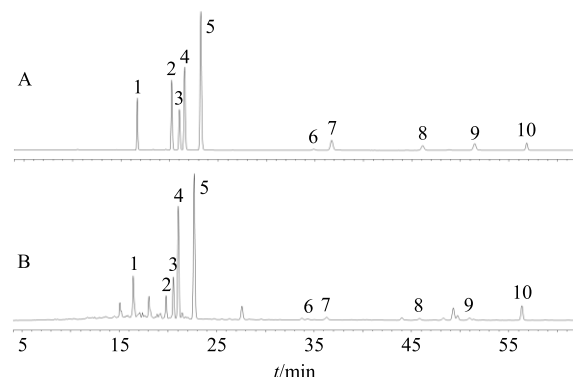
对照品金丝桃苷 (批号 11521-200303)、淫羊藿苷 (批号 110737-200415)、木犀草素 (批号 11520-200201)、槲皮素 (批号 0081-9304)、山柰酚 (批号 110861-200405)、宝藜苷 I (批号 201603) 均购于中国食品药品检定研究院, 质量分数均为 99.9%; 对照品朝藜定 A (质量分数 98.13%, 批号 18031106)、朝藜定 C (质量分数 98%, 批号 BP0547)、朝藜定 B (质量分数 98%, 批号 BP0546) 均购于成都莱宝科技有限公司; 对照品川陈皮素 (质量分数 99.46%, 批号 14100814) 购于北京恒元启

天化工技术研究院; 乙腈为色谱纯, 磷酸、乙醇为分析纯, 水为超纯水; 10 批 KC 为陈李济药厂有限公司生产, 批号分别为 H31001、H31002、H31003、H31004、H31005、F31007、F31008、J31001、J31002、J31006。

## 2 方法与结果

### 2.1 QAMS 方法学考察

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱为 Waters Symmetry Shield™ RP<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液, 洗脱梯度: 0~14 min, 10%~28%乙腈; 14~45 min, 28%~38%乙腈; 45~65 min, 38%~55%乙腈; 65~67 min, 55%~80%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 检测波长 270 nm (朝藜定 A、朝藜定 B、朝藜定 C、淫羊藿苷、宝藜苷 I)、325 nm (川陈皮素)、360 nm (金丝桃苷、槲皮素、木犀草素、山柰酚), 柱温 30 ℃。各色谱图见图 1。



1-金丝桃苷 2-朝藜定 B 3-朝藜定 A 4-朝藜定 C 5-淫羊藿苷 6-木犀草素 7-槲皮素 8-川陈皮素 9-山柰酚 10-宝藜苷 I  
1-hyperoside 2-epimedin B 3-epimedin A 4-epimedin C 5-icariin  
6-luteolin 7-quercetin 8-nobiletin 9-kaempferol 10-baohuoside I

图 1 混合对照品 (A) 和 KC 样品 (B) 的 HPLC 色谱图  
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed references (A) and KC sample (B)

**2.1.2 混合对照品溶液的制备** 精密称定金丝桃苷、朝藜定 B、朝藜定 A、朝藜定 C、淫羊藿苷、木犀草素、槲皮素、川陈皮素、山柰酚、宝藜苷 I 适量, 80%甲醇溶解定容、摇匀, 制成含有 96.8 μg/mL 金丝桃苷、119.04 μg/mL 朝藜定 B、213.2 μg/mL 朝藜定 A、257.32 μg/mL 朝藜定 C、390 μg/mL 淫羊藿苷、4.136 μg/mL 木犀草素、42.24 μg/mL 槲皮素、16.69 μg/mL 川陈皮素、24.416 μg/mL 山柰酚、17.984 μg/mL 宝藜苷 I 的混合对照品溶液, 放于 4 ℃ 冰箱保存, 备用。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 称取 KC 粉末 0.30 g, 精密称量, 置于 100 mL 具塞锥形瓶, 精密加入 80% 乙醇 20 mL, 称定质量, 超声 30 min, 冷却, 用 80% 乙醇补足减轻的质量, 摇匀, 取适量 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

**2.1.4 线性关系的考察** 将上述混合对照品按照“2.1.1”项下条件依次进样, 进样量分别为 2、5、8、10、15、18、20、25  $\mu$ L。以峰面积为纵坐标 ( $Y$ ), 进样量为横坐标 ( $X$ ) 绘制标准曲线, 得金丝桃苷、金丝桃苷、朝藿定 B、朝藿定 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、木犀草素、槲皮素、川陈皮素、山柰酚和宝藿苣 I 的回归方程及线性范围, 见表 1。

表 1 10 种黄酮类成分的线性回归方程

Table 1 Linear regression equations of ten flavones

| 指标成分  | 回归方程               | 线性范围/ $\mu$ g | $r$    |
|-------|--------------------|---------------|--------|
| 金丝桃苷  | $Y=3.4559X+0.1726$ | 0.1936~2.4200 | 0.9999 |
| 朝藿定 B | $Y=5.5866X+0.5220$ | 0.2380~2.9760 | 0.9999 |
| 朝藿定 A | $Y=3.4646X+0.2840$ | 0.4264~5.3300 | 1.0000 |
| 朝藿定 C | $Y=7.4684X+0.5105$ | 0.5145~6.4330 | 0.9999 |
| 淫羊藿苷  | $Y=13.824X+1.2028$ | 0.7800~9.7500 | 0.9999 |
| 木犀草素  | $Y=0.2426X-0.0210$ | 0.0082~0.1034 | 0.9997 |
| 槲皮素   | $Y=2.6432X-0.1182$ | 0.0844~1.0560 | 0.9998 |
| 川陈皮素  | $Y=1.2142X+0.1337$ | 0.0333~0.4173 | 0.9999 |
| 山柰酚   | $Y=1.6159X-0.1391$ | 0.0487~0.6104 | 0.9997 |
| 宝藿苣 I | $Y=0.9585X+0.0024$ | 0.0358~0.4496 | 0.9999 |

**2.1.5 精密度试验** 精密吸取混合对照品溶液 10  $\mu$ L, 按照“2.1.1”项下条件重复进样 6 次, 测定 10 种黄酮的峰面积, 结果金丝桃苷、朝藿定 B、朝藿定 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、木犀草素、槲皮素、川陈皮素、山柰酚、宝藿苣 I 峰面积的 RSD 值分别为 1.31%、0.48%、0.25%、0.63%、0.44%、1.81%、1.43%、1.11%、0.41%、0.57%, 表明该条件下仪器精密度良好。

**2.1.6 稳定性试验** 取 KC 粉末 0.30 g, 精密称定, 按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 室温放置, 分别于 0、4、8、12、16、20、24 h 按照“2.1.1”项下色谱条件进样, 记录峰面积, 金丝桃苷、朝藿定 B、朝藿定 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、木犀草素、槲皮素、川陈皮素、山柰酚、宝藿苣 I 峰面积的 RSD 值分别为 0.15%、0.58%、0.32%、1.11%、0.98%、1.58%、0.55%、0.68%、1.03%、0.25%, 表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

取同一混合对照品溶液, 分别于 0、4、8、12、16、20、24 h 按照“2.1.1”项下色谱条件进样, 记录峰面积, 记录峰面积, 金丝桃苷、朝藿定 B、朝藿定 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、木犀草素、槲皮素、川陈皮素、山柰酚、宝藿苣 I 峰面积的 RSD 值分别为 0.53%、0.11%、0.52%、0.46%、0.34%、0.89%、0.48%、0.34%、0.25%、0.20%, 表明混合对照品溶液在室温下 24 h 内稳定。

**2.1.7 重复性试验** 取同一批 KC 粉末 (批号 F31008), 按照“2.1.3”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 金丝桃苷、朝藿定 B、朝藿定 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、木犀草素、槲皮素、川陈皮素、山柰酚、宝藿苣 I 的平均质量分数分别为 6.22、4.12、35.07、32.62、47.32、0.213、0.402、0.380、0.336、2.86 mg/g, RSD 分别为 1.90%、0.78%、1.04%、0.70%、0.68%、2.61%、1.92%、1.45%、2.92%、0.84%, 表明该方法重复性较好。

**2.1.8 加样回收率试验** 取同一批 KC 粉末 (批号 F31008) 共 9 份, 每份 0.30 g, 分成 3 组, 分别精密加入上述混合对照品溶液 2.0、3.0、4.0 mL, 按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算加样回收率, 结果金丝桃苷、朝藿定 B、朝藿定 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、木犀草素、槲皮素、川陈皮素、山柰酚、宝藿苣 I 的加样回收率分别为 97.35%、98.89%、99.12%、100.33%、98.96%、100.68%、96.23%、95.51%、96.58%、95.92%, RSD 值分别为 1.92%、0.76%、0.98%、1.48%、1.19%、1.68%、2.11%、1.82%、2.51%、1.02%, 表明该方法准确性较好。

## 2.2 $f_{s/i}$ 的确定及耐用性考察

**2.2.1  $f_{s/i}$  的测定** 取“2.1.2”项下混合对照品溶液, 进样分析, 记录各成分的峰面积, 以金丝桃苷为内参物, 按照下式分别计算朝藿定 B、朝藿定 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、木犀草素、槲皮素、川陈皮素、山柰酚、宝藿苣 I 的  $f_{s/i}$ , 结果见表 2。按照外标法测定内参物峰面积  $A_s$ , 利用各成分的  $f_{s/i}$  和内参物的实测值, 即可计算待测成分的含量。

$$f_{s/i} = f_s / f_i = A_s C_i / A_i C_s$$

$A_s$  为内参物对照品 s 的峰面积,  $C_s$  为内参物对照品 s 的质量浓度,  $A_i$  为某待测成分对照品 i 的峰面积,  $C_i$  为某待测成分对照品 i 的质量浓度

**2.2.2 不同柱温对  $f_{s/i}$  的影响** 考察了不同柱温

表 2 各成分的  $f_{s/i}$ Table 2  $f_{s/i}$  values of each component

| 进样体积/ $\mu\text{L}$ | $f_{\text{金丝桃苷/朝藿定 B}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/朝藿定 A}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/朝藿定 C}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/淫羊藿苷}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/木犀草素}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/槲皮素}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/川陈皮素}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/山柰酚}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/宝藿苷 I}}$ |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 2                   | 0.760                   | 2.195                   | 1.238                   | 1.009                  | 0.651                  | 0.573                 | 0.496                  | 0.542                 | 0.681                   |
| 5                   | 0.758                   | 2.202                   | 1.238                   | 1.008                  | 0.631                  | 0.599                 | 0.498                  | 0.566                 | 0.686                   |
| 8                   | 0.757                   | 2.182                   | 1.226                   | 0.996                  | 0.608                  | 0.577                 | 0.496                  | 0.547                 | 0.668                   |
| 10                  | 0.753                   | 2.170                   | 1.217                   | 0.999                  | 0.618                  | 0.567                 | 0.491                  | 0.537                 | 0.675                   |
| 15                  | 0.755                   | 2.180                   | 1.220                   | 0.998                  | 0.607                  | 0.571                 | 0.494                  | 0.547                 | 0.665                   |
| 18                  | 0.758                   | 2.198                   | 1.233                   | 1.008                  | 0.621                  | 0.574                 | 0.493                  | 0.549                 | 0.676                   |
| 20                  | 0.762                   | 2.209                   | 1.235                   | 1.009                  | 0.623                  | 0.585                 | 0.498                  | 0.547                 | 0.675                   |
| 25                  | 0.760                   | 2.189                   | 1.228                   | 1.005                  | 0.605                  | 0.567                 | 0.504                  | 0.536                 | 0.669                   |
| 平均值                 | 0.758                   | 2.191                   | 1.229                   | 1.004                  | 0.621                  | 0.577                 | 0.496                  | 0.546                 | 0.674                   |
| RSD/%               | 0.380                   | 0.586                   | 0.663                   | 0.548                  | 2.445                  | 1.855                 | 0.835                  | 1.699                 | 1.034                   |

(25、28、30、32、35  $^{\circ}\text{C}$ ) 对各  $f_{s/i}$  的影响, 结果 (表 3) 朝藿定 B、朝藿定 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、木犀草素、槲皮素、川陈皮素、山柰酚、宝藿苷 I  $f_{s/i}$  的 RSD 依次为 0.57%、1.18%、0.98%、1.08%、2.08%、1.90%、0.76%、2.45% 和 2.81%, 表明柱温的波动对各成分  $f_{s/i}$  无显著影响。

**2.2.3 不同体积流量对  $f_{s/i}$  的影响** 考察了不同体积流量 (0.6、0.8、1.0、1.2  $\text{mL/min}$ ) 对各  $f_{s/i}$  的影响, 结果 (表 4) 朝藿定 B、朝藿定 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、木犀草素、槲皮素、川陈皮素、山柰酚、宝藿苷 I  $f_{s/i}$  的 RSD 依次为 0.86%、0.73%、0.72%、0.35%、3.68%、0.88%、1.38%、2.87% 和 1.14%, 表明体积流量的波动对各成分  $f_{s/i}$  无显著影响。

**2.2.4 不同色谱柱对  $f_{s/i}$  的影响** 考察了 Waters

Symmetry Shield<sup>TM</sup> RP<sub>18</sub> (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 1)、Agilent Eclipse plus C<sub>18</sub> (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 2)、Agilent Eclipse XDB C<sub>18</sub> (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 3)、Agilent Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 4) 共 4 根色谱柱对各成分  $f_{s/i}$  的影响, 结果 (表 5) 使用以上色谱柱各成分均能达到较好的分离效果, 结果各成分  $f_{s/i}$  的 RSD 依次为 1.71%、1.04%、1.48%、0.30%、0.67%、1.49%、2.19%、1.65% 和 1.24%, 表明 4 根色谱柱对各成分  $f_{s/i}$  无显著影响。

**2.2.5 不同仪器对  $f_{s/i}$  的影响** 考察了 Agilent 1200 (A1<sup>#</sup>)、Agilent 1200 (A2<sup>#</sup>) 和 Waters 型 3 种高效液相色谱系统对各成分  $f_{s/i}$  的影响, 结果 (表 6) 各成分  $f_{s/i}$  的 RSD 依次为 0.62%、1.52%、0.61%、2.47%、

表 3 不同柱温对  $f_{s/i}$  的影响Table 3 Effects of different column temperatures on  $f_{s/i}$ 

| 柱温/ $^{\circ}\text{C}$ | $f_{\text{金丝桃苷/朝藿定 B}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/朝藿定 A}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/朝藿定 C}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/淫羊藿苷}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/木犀草素}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/槲皮素}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/川陈皮素}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/山柰酚}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/宝藿苷 I}}$ |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 25                     | 0.768                   | 2.223                   | 1.245                   | 1.018                  | 0.620                  | 0.595                 | 0.506                  | 0.565                 | 0.700                   |
| 28                     | 0.756                   | 2.209                   | 1.225                   | 1.002                  | 0.632                  | 0.582                 | 0.499                  | 0.549                 | 0.680                   |
| 30                     | 0.757                   | 2.191                   | 1.236                   | 1.004                  | 0.639                  | 0.577                 | 0.502                  | 0.527                 | 0.676                   |
| 32                     | 0.761                   | 2.211                   | 1.227                   | 1.001                  | 0.660                  | 0.582                 | 0.498                  | 0.556                 | 0.682                   |
| 35                     | 0.759                   | 2.171                   | 1.222                   | 0.999                  | 0.641                  | 0.585                 | 0.500                  | 0.538                 | 0.677                   |

表 4 体积流量对  $f_{s/i}$  的影响Table 4 Effects of volume flow rate on  $f_{s/i}$ 

| 体积流量/<br>( $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) | $f_{\text{金丝桃苷/朝藿定 B}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/朝藿定 A}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/朝藿定 C}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/淫羊藿苷}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/木犀草素}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/槲皮素}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/川陈皮素}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/山柰酚}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/宝藿苷 I}}$ |
|----------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 0.6                                          | 0.748                   | 2.206                   | 1.223                   | 1.003                  | 0.671                  | 0.586                 | 0.490                  | 0.555                 | 0.693                   |
| 0.8                                          | 0.753                   | 2.169                   | 1.216                   | 0.996                  | 0.646                  | 0.576                 | 0.496                  | 0.544                 | 0.680                   |
| 1.0                                          | 0.757                   | 2.191                   | 1.236                   | 1.004                  | 0.639                  | 0.577                 | 0.502                  | 0.527                 | 0.676                   |
| 1.2                                          | 0.763                   | 2.198                   | 1.232                   | 1.000                  | 0.692                  | 0.576                 | 0.506                  | 0.563                 | 0.687                   |

2.20%、0.88%、2.11%、3.24%和 1.37%，表明不同仪器对各成分  $f_{s/i}$  无显著影响。

**2.2.6 不同实验人员对  $f_{s/i}$  的影响** 考察了 3 名实验人员对各成分  $f_{s/i}$  的影响，结果（表 7）各成分  $f_{s/i}$  的 RSD 值为 1.18%、2.63%、0.48%、3.04%、1.14%、0.58%、2.37%、1.27%、1.41%，表明不同实验人员

所得各目标成分的  $f_{s/i}$  无显著影响。

综上所述，朝藿定 B、朝藿定 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、木犀草素、槲皮素、川陈皮素、山柰酚、宝藿苷 I  $f_{s/i}$  的 RSD 依次为 0.30%、0.81%、1.11%、0.79%、2.24%、0.80%、2.96%、0.57%和 1.35%，表明该方法各成分  $f_{s/i}$  耐用性较好。

表 5 不同色谱柱对  $f_{s/i}$  的影响

Table 5 Effects of different columns on  $f_{s/i}$

| 不同色谱柱 | $f_{\text{金丝桃苷/朝藿定 B}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/朝藿定 A}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/朝藿定 C}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/淫羊藿苷}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/木犀草素}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/槲皮素}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/川陈皮素}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/山柰酚}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/宝藿苷 I}}$ |
|-------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 柱 1   | 0.774                   | 2.201                   | 1.216                   | 0.998                  | 0.631                  | 0.571                 | 0.487                  | 0.533                 | 0.660                   |
| 柱 2   | 0.747                   | 2.192                   | 1.205                   | 1.001                  | 0.629                  | 0.556                 | 0.484                  | 0.543                 | 0.677                   |
| 柱 3   | 0.741                   | 2.180                   | 1.187                   | 1.002                  | 0.632                  | 0.569                 | 0.483                  | 0.547                 | 0.682                   |
| 柱 4   | 0.757                   | 2.191                   | 1.236                   | 1.004                  | 0.639                  | 0.577                 | 0.482                  | 0.527                 | 0.676                   |

表 6 不同仪器对  $f_{s/i}$  的影响

Table 6 Effects of different instruments on  $f_{s/i}$

| 不同仪器            | $f_{\text{金丝桃苷/朝藿定 B}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/朝藿定 A}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/朝藿定 C}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/淫羊藿苷}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/木犀草素}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/槲皮素}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/川陈皮素}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/山柰酚}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/宝藿苷 I}}$ |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|
| A1 <sup>#</sup> | 0.757                   | 2.259                   | 1.256                   | 1.001                  | 0.649                  | 0.579                 | 0.471                  | 0.537                 | 0.690                   |
| A2 <sup>#</sup> | 0.759                   | 2.200                   | 1.260                   | 1.046                  | 0.636                  | 0.576                 | 0.486                  | 0.569                 | 0.673                   |
| Waters          | 0.750                   | 2.201                   | 1.245                   | 1.004                  | 0.621                  | 0.569                 | 0.490                  | 0.540                 | 0.673                   |

表 7 不同实验人员对  $f_{s/i}$  的影响

Table 7 Effects of different experimenters on  $f_{s/i}$

| 不同实验人员         | $f_{\text{金丝桃苷/朝藿定 B}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/朝藿定 A}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/朝藿定 C}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/淫羊藿苷}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/木犀草素}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/槲皮素}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/川陈皮素}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/山柰酚}}$ | $f_{\text{金丝桃苷/宝藿苷 I}}$ |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 1 <sup>#</sup> | 0.759                   | 2.297                   | 1.249                   | 1.003                  | 0.643                  | 0.576                 | 0.459                  | 0.543                 | 0.652                   |
| 2 <sup>#</sup> | 0.746                   | 2.201                   | 1.220                   | 1.058                  | 0.635                  | 0.577                 | 0.472                  | 0.553                 | 0.670                   |
| 3 <sup>#</sup> | 0.763                   | 2.190                   | 1.239                   | 1.006                  | 0.650                  | 0.582                 | 0.450                  | 0.540                 | 0.662                   |

### 2.3 待测成分色谱峰的定位

采用相对保留时间值（待测成分与内参物保留时间之比）对 KC 中各待测成分色谱峰进行定位，以金丝桃苷的保留时间计算朝藿定 B、朝藿定 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、木犀草素、槲皮素、川陈皮素、山柰酚、宝藿苷 I 的相对保留时间，各成分的相对保留时间分别为 1.212 0、1.259 3、1.291 3、1.392 5、2.093 6、2.195 6、2.769 9、3.091 3、3.417 7；各成分的 RSD 值分别为 0.27%、0.31%、0.34%、0.37%、0.30%、1.03%、0.32%、0.28%、0.29%，相对保留时间规定值 RSD 在 5%范围之内，表明相对稳定，可用于色谱峰的定位。

### 2.4 QAMS 法与外标法（ESM）测定结果比较

取 KC 粉末适量，精密称定，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件测定峰面积，采用 QAMS 法建立内参物金丝桃苷与朝藿定 B、朝藿定 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、木犀草

素、槲皮素、川陈皮素、山柰酚、宝藿苷 I 的  $f_{s/i}$ ，对 10 批 KC 样品中各成分含量进行计算，同时采用外标法对朝藿定 B、朝藿定 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、木犀草素、槲皮素、川陈皮素、山柰酚、宝藿苷 I 成分进行含量测定，结果见表 8。比较 QAMS 法与 ESM 计算的含量的相对误差（RD），并利用 SPSS 22.0 统计软件进行  $t$  检验，结果显示各成分两种计算方法的相关系数均大于 0.999 9。表明 2 种方法计算结果无显著差异。由表 8 可知，KC 中黄酮类成分淫羊藿苷含量最高，为 825.888  $\mu\text{g/mL}$ ，木犀草素（3.697  $\mu\text{g/mL}$ ）与川陈皮素（4.916  $\mu\text{g/mL}$ ）含量较低，不同批次 KC 样品中各成分含量不同。

### 3 讨论

本实验考察了料液比（1:67、1:33），结果显示料液比在 1:67 时提取效率最佳，目标成分可完全溶出。考察超声提取时间（20、30、40 min）和提取溶剂（甲醇、乙醇、80%甲醇、80%乙醇），实

表 8 QAMS 法与外标法测得 10 批 KC 中 10 种黄酮的含量 ( $n=3$ )Table 8 Content of ten flavones in ten batches of KC by QAMS and ESM ( $n=3$ )

| 样品批号   | 金丝桃苷/<br>( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) | 朝藿定 B/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) |        |       | 朝藿定 A/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) |         |       | 朝藿定 C/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) |         |       |
|--------|----------------------------------------------|-------------------------------------------|--------|-------|-------------------------------------------|---------|-------|-------------------------------------------|---------|-------|
|        |                                              | QAMS                                      | ESM    | RD/%  | QAMS                                      | ESM     | RD/%  | QAMS                                      | ESM     | RD/%  |
| H31001 | 120.013                                      | 89.981                                    | 89.734 | 0.194 | 545.852                                   | 545.686 | 0.022 | 868.828                                   | 868.790 | 0.003 |
| H31002 | 106.875                                      | 85.623                                    | 85.377 | 0.203 | 697.857                                   | 698.478 | 0.063 | 713.792                                   | 713.800 | 0.001 |
| H31003 | 122.429                                      | 93.344                                    | 92.926 | 0.317 | 580.648                                   | 580.538 | 0.013 | 888.418                                   | 888.350 | 0.005 |
| H31004 | 78.791                                       | 73.056                                    | 72.801 | 0.247 | 778.062                                   | 780.207 | 0.195 | 463.490                                   | 463.624 | 0.020 |
| H31005 | 98.763                                       | 80.736                                    | 80.470 | 0.233 | 712.137                                   | 713.071 | 0.093 | 504.755                                   | 504.434 | 0.045 |
| F31007 | 58.724                                       | 55.858                                    | 55.519 | 0.430 | 495.540                                   | 497.318 | 0.253 | 407.956                                   | 408.715 | 0.132 |
| F31008 | 71.300                                       | 63.403                                    | 63.076 | 0.366 | 535.843                                   | 537.123 | 0.168 | 502.151                                   | 502.768 | 0.087 |
| J31001 | 105.849                                      | 91.247                                    | 91.061 | 0.144 | 576.923                                   | 577.158 | 0.029 | 672.346                                   | 672.281 | 0.006 |
| J31002 | 87.308                                       | 89.812                                    | 89.670 | 0.112 | 552.387                                   | 553.073 | 0.088 | 712.608                                   | 713.334 | 0.071 |
| J31006 | 75.039                                       | 82.701                                    | 82.585 | 0.099 | 529.164                                   | 530.228 | 0.142 | 733.607                                   | 735.071 | 0.141 |

| 样品批号   | 金丝桃苷/<br>( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) | 淫羊藿苷/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) |           |       | 木犀草素/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) |       |       | 槲皮素/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) |        |       |
|--------|----------------------------------------------|------------------------------------------|-----------|-------|------------------------------------------|-------|-------|-----------------------------------------|--------|-------|
|        |                                              | QAMS                                     | ESM       | RD/%  | QAMS                                     | ESM   | RD/%  | QAMS                                    | ESM    | RD/%  |
| H31001 | 120.013                                      | 1 024.076                                | 1 023.312 | 0.053 | 3.502                                    | 3.402 | 2.048 | 9.258                                   | 9.395  | 1.039 |
| H31002 | 106.875                                      | 956.293                                  | 955.603   | 0.051 | 4.114                                    | 3.992 | 2.129 | 11.925                                  | 12.053 | 0.755 |
| H31003 | 122.429                                      | 1 035.533                                | 1 035.004 | 0.036 | 2.414                                    | 2.356 | 1.720 | 12.737                                  | 12.853 | 0.641 |
| H31004 | 78.791                                       | 746.703                                  | 746.052   | 0.062 | 3.018                                    | 2.942 | 1.803 | 28.000                                  | 28.090 | 0.227 |
| H31005 | 98.763                                       | 788.937                                  | 788.798   | 0.013 | 3.986                                    | 3.870 | 2.088 | 14.736                                  | 14.855 | 0.569 |
| F31007 | 58.724                                       | 646.880                                  | 646.625   | 0.027 | 3.082                                    | 3.010 | 1.671 | 6.548                                   | 6.728  | 1.917 |
| F31008 | 71.300                                       | 730.131                                  | 731.235   | 0.107 | 3.558                                    | 3.465 | 1.873 | 6.314                                   | 6.484  | 1.879 |
| J31001 | 105.849                                      | 765.367                                  | 765.291   | 0.007 | 5.167                                    | 5.005 | 2.252 | 15.463                                  | 15.574 | 0.506 |
| J31002 | 87.308                                       | 782.611                                  | 782.014   | 0.054 | 4.500                                    | 4.368 | 2.105 | 21.117                                  | 21.219 | 0.341 |
| J31006 | 75.039                                       | 782.724                                  | 782.828   | 0.227 | 3.633                                    | 3.536 | 1.914 | 21.389                                  | 21.509 | 0.396 |

| 样品批号   | 金丝桃苷/<br>( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) | 川陈皮素/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) |       |       | 山柰酚/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) |        |       | 宝藿苷 I/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) |        |       |
|--------|----------------------------------------------|------------------------------------------|-------|-------|-----------------------------------------|--------|-------|-------------------------------------------|--------|-------|
|        |                                              | QAMS                                     | ESM   | RD/%  | QAMS                                    | ESM    | RD/%  | QAMS                                      | ESM    | RD/%  |
| H31001 | 120.013                                      | 4.888                                    | 4.834 | 0.786 | 6.039                                   | 6.205  | 1.917 | 96.801                                    | 96.323 | 0.350 |
| H31002 | 106.875                                      | 4.918                                    | 4.898 | 0.288 | 7.415                                   | 7.574  | 1.500 | 92.440                                    | 92.023 | 0.320 |
| H31003 | 122.429                                      | 4.203                                    | 4.130 | 1.239 | 6.921                                   | 7.081  | 1.616 | 85.586                                    | 85.156 | 0.356 |
| H31004 | 78.791                                       | 5.200                                    | 5.167 | 0.450 | 13.048                                  | 13.190 | 0.765 | 77.484                                    | 77.262 | 0.203 |
| H31005 | 98.763                                       | 4.891                                    | 4.842 | 0.712 | 9.208                                   | 9.359  | 1.150 | 76.181                                    | 75.869 | 0.290 |
| F31007 | 58.724                                       | 5.679                                    | 5.672 | 0.087 | 7.149                                   | 7.336  | 1.826 | 71.764                                    | 71.708 | 0.055 |
| F31008 | 71.300                                       | 5.848                                    | 5.837 | 0.133 | 5.363                                   | 5.549  | 2.411 | 86.025                                    | 85.834 | 0.157 |
| J31001 | 105.849                                      | 4.777                                    | 4.723 | 0.804 | 9.560                                   | 9.706  | 1.072 | 75.548                                    | 75.214 | 0.313 |
| J31002 | 87.308                                       | 4.538                                    | 4.481 | 0.894 | 14.066                                  | 14.194 | 0.641 | 73.478                                    | 73.223 | 0.246 |
| J31006 | 75.039                                       | 4.217                                    | 4.156 | 1.030 | 11.232                                  | 11.387 | 0.970 | 71.065                                    | 70.883 | 0.181 |

验结果显示超声时间 30 min, 提取溶剂选用 80%乙醇对目标成分提取效果最佳。Agilent 1200 DAD 检测器选择多波长 (270、325、360 nm) 同时检测的方式。Waters 2489 采用分段变波长测定, 0~18 min (360 nm)、18~30 min (270 nm)、30~40 min (360 nm)、40~47 (325 nm)、47~55 min (360 nm)、

55~60 min (270 nm)。

QAMS 法以中药的一种成分为内参物, 实现多指标成分同时测定, QAMS 用于中药材及中药饮片等复杂体系的同类成分的质量评价<sup>[17]</sup>, QAMS 法已经用于多种中药材、中药饮片及中药制剂中黄酮类成分含量的测定, 如银杏叶、南方菟丝子、淫羊藿

总黄酮胶囊、淫羊藿<sup>[18-23]</sup>等。《中国药典》2010年版<sup>[24]</sup>首次收录 QAMS 法,确立“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。但仅用于黄连药材及饮片中生物碱类成分的含量测定。《中国药典》2015年版一部<sup>[25]</sup>新增 8 个使用 QAMS 法的药材,范围也扩展至中药材提取物、制剂。收载了银杏叶提取物、银杏叶滴丸、银杏叶胶囊、银杏叶片采用 QAMS 法测定其黄酮类成分<sup>[26]</sup>。运用 QAMS 法对 KC 进行黄酮类成分含量测定,对其质量标准进行了提高,显著降低了检验成本,提高了检测效率,增加了现行标准的可控性和用药安全,对中药质量标准的完善具有较大的促进作用,并有利于更经济、更科学地构建中药质量评价标准。

本研究建立 QAMS 法同时测定 KC 中 10 种黄酮类成分含量,对 QAMS 法的可行性进行了探讨分析,采用 QAMS 法与外标法分别测定了 10 批 KC 样品中各目标成分含量,结果表明该方法计算结果与外标法结果无显著差异,能高效准确地得到 KC 中多种黄酮类成分的含量,降低生产测试成本,有望能广泛应用于 KC 的质量评价中。

#### 参考文献

- [1] Harris E D Jr, Budd R C, Firestein G S, et al. 凯利风湿病学 [M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [2] 林昌松, 杨岫岩, 戴 冽. 昆仙胶囊治疗类风湿关节炎多中心临床研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(6): 769-774.
- [3] 鲁 莹. 昆仙胶囊对 MRL/lpr 小鼠狼疮性肾炎代谢组学影响的研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2011.
- [4] 徐 强, 魏振权, 谢 晗, 等. 昆仙胶囊不同服药方法对类风湿关节炎患者胃肠道安全性的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35(3): 411-414.
- [5] 田 艺. 昆仙胶囊治疗活动性类风湿关节炎的临床研究 [D]. 大连: 大连医科大学, 2014.
- [6] 高建华, 张剑勇, 黄 华, 等. 昆仙胶囊联合他克莫司治疗狼疮性肾炎的临床观察 [A] // 全国第十届中西医结合风湿病学会论文汇编 [C]. 成都: 中国中西医结合学会风湿类疾病专业委员会, 2012.
- [7] 全 瑛, 王 菊. 昆仙胶囊联合硫酸羟氯喹治疗类风湿关节炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(10): 2638-2641.
- [8] Qiu L, Li L, Li B, et al. Kunxian capsules in the treatment of patients with ankylosing spondylitis: A randomized placebo-controlled clinical trial [J]. *Trials*, 2016, 337(17): 1-7.
- [9] Lin Q, Li L, He D. Efficacy and safety of KunXian capsule for treatment of spondyl oarth. Ropathy (SPA) and ankylosing spondylitis (AS): Results of a multi-center randomized placebo-controlled trial [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2014, 32(5): 790-790.
- [10] 张航行, 耿会玲, 杨维霞. 昆明山海棠的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 动物医学进展, 2002, 23(6): 42-44.
- [11] 王焕珍, 柴艺汇, 陈云志, 等. 淫羊藿化学成分与药理作用研究进展 [J]. 亚太传统医学, 2016, 12(7): 63-65.
- [12] 周麟林. 菟丝子属植物化学成分和药理活性 [J]. 国外医药: 植物药分册, 2003, 18(6): 239-243.
- [13] 滕 俊, 袁 佳, 叶莎莎. 枸杞子化学成分及药理作用相关性概述 [J]. 海峡药学, 2010, 26(6): 36-37.
- [14] 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.
- [15] 吴文杰, 邓 阳, 谭桂林, 等. 一测多评法测定葛根药材中 5 种异黄酮类成分 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 777-781.
- [16] 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.
- [17] 秦昆明, 杨 冰, 胡 静, 等. 一测多评法在中药多组分质量控制中的应用现状与思考 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 725-731.
- [18] 于雪娥, 秦建平, 李家春, 等. 一测多评法同时测定淫羊藿总黄酮胶囊中 7 种黄酮类成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(7): 79-85.
- [19] 高 森, 白 雪, 文柳静, 等. 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 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2883-2889.
- [20] 于 宵, 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): 3310-3313.
- [21] 徐文芬, 杨 雯, 何顺志, 等. 一测多评法测定淫羊藿中淫羊藿苷和朝藿定 A、B、C [J]. 中草药, 2016, 47(1): 130-137.
- [22] 高慧敏, 宋宗华, 王智民, 等. 适合中药特点的质量评价模式——QAMS 研究概述 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(4): 405-416.
- [23] 张 玲, 周 慧. 一测多评法在血府逐瘀丸质量评价中的应用 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1588-1593.
- [24] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [25] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [26] 杨 洋, 黄良永, 朱美玲, 等. 一测多评法在中国药典 2015 版中的应用 [J]. 中国南药, 2017, 15(12): 1738-1741.