

复方阿胶浆质量标准提升研究

许 啸^{1,2}, 张 淹³, 刘晓云¹, 王 宇¹, 刘 越¹, 董 英¹, 宋若兰¹, 于啊香¹, 马嘉慕¹, 折改梅^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

2. 中国热带农业科学院分析测试中心, 海南 海口 571101

3. 东阿阿胶股份有限公司国家胶类中药工程技术研究中心, 山东 聊城 252201

摘要: **目的** 提升复方阿胶浆质量标准。**方法** 基于中药复方制剂“整体鉴别”新模式, 对复方阿胶浆中植物来源中药采用一板多鉴法, 红参、党参使用同一供试品溶液、同一展开剂, 采用对照品和对照药材双对照(红参使用人参皂苷 Rg₁ 对照品和红参对照药材; 党参使用党参炔苷对照品和党参对照药材)进行鉴别; 熟地黄、山楂使用 2 种供试品溶液、同一展开剂, 采用对照品和对照药材双对照(熟地黄使用毛蕊花糖苷对照品和熟地黄对照药材; 山楂使用牡荆素鼠李糖苷对照品和山楂对照药材)进行鉴别。对复方阿胶浆中动物药阿胶建立 L-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸 4 种氨基酸含量测定。并采用一测多评法, 以 L-羟脯氨酸为内标, 确定甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸的相对校正因子并计算含量。**结果** 建立了复方阿胶浆中植物药鉴别的“4-3-2-2”模式, 即 4 味中药, 3 种供试品溶液制备方法、2 种展开剂, 2 种对照物的双对照方法, 斑点清晰且专属性强。建立了复方阿胶浆中动物药阿胶一测多评法含量测定, 15 批样品中 L-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸的质量浓度分别为 2.73~3.37、4.61~6.99、2.64~3.97、3.58~4.46 mg/mL。以 L-羟脯氨酸为内标建立的甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸的相对校正因子分别为 0.651、0.958、0.857。采用 *t* 检验、相对偏差法和 Pearson 相关系数法对 2 种方法的含量测定结果进行比较分析, 15 批复方阿胶浆一测多评法计算值与外标法实测含量值无显著差异。**结论** 建立了复方阿胶浆中植物药来源中药鉴别的“4-3-2-2”模式。对处方中动物来源中药阿胶建立了 4 种氨基酸的一测多评法含量测定。通过“一板、一测”, 达到“多鉴、多评”整体药味质量控制的目的, 科学合理地提升复方阿胶浆的质量标准。

关键词: 复方阿胶浆; 整体质量控制; 一板多鉴法; 一测多评法; 相对校正因子; 质量标准提升; 整体鉴别; 红参; 党参; 熟地黄; 山楂; 阿胶; 人参皂苷 Rg₁; 党参炔苷; 毛蕊花糖苷; 牡荆素鼠李糖苷; L-羟脯氨酸; 甘氨酸; 丙氨酸; 脯氨酸
中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)20-6226-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.20.012

Promotion on quality standard of Fufang E'jiao Jiang

XU Xiao^{1,2}, ZHANG Yan³, LIU Xiao-yun¹, WANG Yu¹, LIU Yue¹, DONG Ying¹, SONG Ruo-lan¹, YU A-xiang¹, MA Jia-mu¹, SHE Gai-mei¹

1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. Analysis and Test Center, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

3. National Engineering Research Center for Gelatin-based Traditional Chinese Medicine, Dong-E-E-Jiao Co., Ltd., Liaocheng 252201, China

Abstract: **Objective** To improve the quality standard of Fufang E'jiao Jiang (复方阿胶浆, FEJ). **Methods** Identification of FEJ was based on the novel model of “holistic identification”. Identification of multi-herbal medicines by a single-thin layer chromatography (IMMS) was used to identify the herbal medicines in FEJ. Hongshen (*Ginseng Radix et Rhizoma Rubra*, GRRR) and Dangshen (*Codonopsis Radix*, CR) used the same sample and developing solvent. Both reference substances and reference material were used to control GRRR (ginsenoside Rg₁ and GRRR reference material) and CR (lobetyolin and CR reference material). Shudihuang (*Rehmanniae Radix Preparata*, RRP) and Shanzha (*Crataegi Fructus*, CF) used different samples and the same developing

收稿日期: 2021-05-11

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1707300); 国家重点研发计划项目(2018YFC1706300)

作者简介: 许 啸(1995—), 女, 硕士, 研究实习生。Tel: 13521701679 E-mail: xux_26@163.com

*通信作者: 折改梅(1976—), 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中(民族)药药效成分和新药创制研究。

Tel: (010)84738628 E-mail: shegaimci@126.com

solvent. Both reference substances and reference material were used to control RRP (acteoside and RRP reference material) and CF (vitexin rhamnoside and CF reference material). The method of multi-components by a single-marker (QAMS) was used to determining four amino acids in E'jiao (*Asini Corii Colla*, ACC). With *L*-hydroxyproline as the internal reference substance, the relative correction factors (RCF) of glycine, proline, and alanine were determined by HPLC to calculate corresponding contents. **Results** A “4-3-2-2” model was established for the identification of herbal medicines in FEJ, including four herbal medicines, three samples preparation methods, two developing solvents, and all of them were controlled by both reference substance and reference medicine. The identification spots were clear and exclusive. The method of QAMS for the determination of four amino acids in FEJ was established. The contents of *L*-hydroxyproline, glycine, alanine and proline in 15 batches of samples were 2.73—3.37, 4.61—6.99, 2.64—3.97, and 3.58—4.46 mg/mL, respectively. The RCF of glycine, alanine, and proline were 0.651, 0.958 and 0.857, respectively. Using *t*-test, relative deviation method and Pearson correlation coefficient method to compare the contents of four components. The results showed no significant difference in the 15 batches of FEJ by external standard method and QAMS. **Conclusion** The “4-3-2-2” model for the overall identification of FEJ was established. Through “one plate” and “one test”, the aim of “multi-identification” and “multi-evaluation” of the quality control of the whole medicine flavor was achieved, and the quality standard of FEJ was scientifically and reasonably improved.

Key words: Fufang E'jiao Jiang; whole quality control; identification of multi-herbal medicines by a single-thin layer chromatography (IMMS); quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS); relative correction factors (RCF); improvement on quality standard; holistic identification; *Ginseng Radix et Rhizoma Rubra*; *Codonopsis Radix*; *Rehmanniae Radix Preparata*; *Crataegi Fructus*; *Asini Corii Colla*; ginsenoside Rg₁; lobetyolin; acteoside; vitexin rhamnoside; *L*-hydroxyproline; glycine; alanine; proline

中药复方制剂药味复杂, 化学成分种类繁多, 其有效、专属的质量可控是其发展的关键因素。当前, 很多中药复方制剂质量控制方法存在着仅对部分药味鉴别和缺乏活性成分或者专属性成分的含量测定等不足。因此, 中药复方制剂采用全药味鉴别以及有效、特征和专属的成分含量测定等质控思路得到广大科学家的认可^[1-2]。

复方阿胶浆 (Fufang E'jiao Jiang, FEJ), 原方出自明代《景岳全书》中“两仪膏”, 由动物药阿胶和 4 味植物药红参、熟地黄、党参、山楂组成。《中国药典》2020 年版复方阿胶浆质量标准仅收录了阿胶、红参、党参、山楂的鉴别方法和总氮量含量测定方法^[3]。本研究鉴于国家重点研发计划 (2018YFC1707300) 全药味整体质控的思路, 将一板多鉴法 (identification of multi-herbal medicines by a single-thin layer chromatography, IMMS) 和一测多评法 (quantitative analysis of multi-components by single marker, QAMS) 用于复方阿胶浆质量标准提升研究。

IMMS 是复方制剂中不同药味使用不同或相同的供试品溶液, 在相同薄层色谱条件 (吸附剂、展开剂)、使用相同/不同显色方法进行鉴别, 可实现在一块薄层板上同时鉴别多个药味。《中国药典》2020 年版中, IMMS 在牛黄解毒片、清脑降压片等复方制剂中得到了应用^[3]。本研究采用 IMMS 法建立了复方阿胶浆中植物来源中药的薄层色谱鉴别,

即“4-3-2-2”模式, 4 味中药、3 种供试品溶液制备方法、2 种展开剂、2 种对照物的双对照方法, 以相对较少的薄层色谱试验次数, 进行有效鉴别。

《中国药典》2020 年版规定阿胶药材使用 *L*-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸 4 种氨基酸进行含量测定^[3]。以药材含量测定指标性成分为依据建立复方制剂含量测定方法, 是质量标准中含量测定较为认可的方法。本研究在建立复方阿胶浆 4 种氨基酸含量测定的基础上, 根据 *L*-羟脯氨酸与其他成分的相对校正因子, 通过测定 *L*-羟脯氨酸以计算甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸的含量, 达到一测多评的目的, 在一定程度上解决对照品紧缺和检测成本高的问题^[4]。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

华谱科仪 Acchorm S6000 高效液相色谱仪, 配备在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器, 华谱科仪 (北京) 科技有限公司; Waters e2695 高效液相色谱, 配备在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、UV-Vis 检测器, 沃特世科技 (上海) 有限公司; 岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱, 配备在线脱气机、二元泵、自动进样器、柱温箱、PDA 检测器, 岛津企业管理 (中国) 有限公司; Linomat-5 半自动点样台, Reportstar 薄层色谱摄像系统, 瑞士 CAMAG 公司; BT25S 十万分之一电子天平, 北京赛多利斯科学仪器有限公司; TD5A-WS

台式离心机, 常州市万合仪器制造有限公司; 8302 恒温水浴锅, 上海利浦自动化仪表厂; RE-52AA 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; KQ-250DE 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 101FXB-2 电热鼓风干燥箱, 上海树立仪器仪表有限公司。

Welch Ultimate AQ C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters T-nature C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent Zorbax XDB C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)。硅胶 G 薄层板 (批号 HX87113742), 购自德国 Merck 公司。

1.2 试药

对照药材红参 (批号 121045-201806)、党参 (批号 121057-201206)、熟地黄 (批号 121196-202007)、山楂 (批号 121626-201402) 及对照品人参皂苷 Rg₁ (批号 110703-201832, 质量分数为 95%)、党参炔苷 (批号 111732-201908)、毛蕊花糖苷 (批号 111530-201914, 质量分数为 95%)、牡荆素鼠李糖苷 (批号 111668-200602)、L-羟脯氨酸 (批号 111578-201602, 质量分数为 99.9%)、甘氨酸 (批号 140689-202006, 质量分数为 100%)、丙氨酸 (批号 140680-202005, 质量分数为 99.9%)、脯氨酸 (批号 140677-201808, 质量分数为 99.9%), 均购自中国食品药品检定研究院。乙腈, 批号 204197, 购自美国 Fisher Scientific 公司, 为色谱纯; 异硫氰酸苯酯 (PITC), 批号 C11507973, 购自上海麦克林生化科技有限公司; 其他试剂均为分析纯。超纯水由实验室 Millipore Synergy 超纯水系统自制。

1.3 样品

复方阿胶浆 (批号 1905075、1907011、1907012、1907014、1907015、1907017、1907020、1907021、1907022、1909004、1909007、1909010、1909011、1909013、1909015、1909016) 以及批号为 1905075 批次所对应的红参阴性样品、党参阴性样品、熟地黄阴性样品、山楂阴性样品均由东阿阿胶股份有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 IMMS 薄层色谱鉴别的建立

2.1.1 红参、党参 取本品 20 mL, 用水饱和正丁醇振摇萃取 3 次, 每次 20 mL, 合并正丁醇液。用氨试液 30 mL 洗涤, 弃去水液。再用正丁醇饱和水 30 mL 洗涤, 弃去水液。正丁醇液回收至干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取红参对照药材 1 g、党参对照药材 1 g, 分别加水 50 mL,

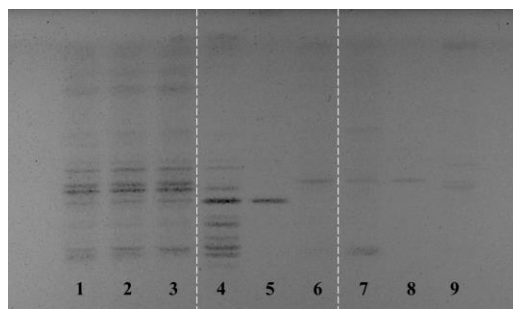
超声处理 45 min, 滤过, 水液浓缩至 20 mL, 自“用水饱和正丁醇振摇萃取 3 次”, 同法制成对照药材溶液; 再取人参皂苷 Rg₁、党参炔苷对照品适量, 分别加甲醇制成含 0.5 mg/mL 的对照品溶液。

取 3 批复方阿胶浆 (批号 1905075、1907011、1907012) 及对应批次的红参阴性样品、党参阴性样品各 20 mL, 自“用水饱和正丁醇振摇萃取 3 次”, 同法分别制成供试品溶液 1~3、红参阴性对照溶液、党参阴性对照溶液。

照薄层色谱法 (通则 0502) 试验, 吸取上述溶液 2~6 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-醋酸乙酯-甲醇-水 (15:40:22:10) 的下层溶液为展开剂, 连续展开 3 次, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 105 °C 加热至斑点显色清晰, 置日光下检视。结果显示, 供试品色谱中, 在与对照药材和对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。阴性对照色谱相应的位置上, 无斑点干扰, 表明该方法专属性、重复性良好。见图 1。

2.1.2 熟地黄、山楂

(1) 熟地黄供试品溶液的制备: 取本品 20 mL, 加甲醇 50 mL, 离心, 上清液蒸干, 残渣加水 20 mL 溶解, 用醋酸乙酯萃取 3 次, 每次 20 mL, 合并醋酸乙酯液, 回收至干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液; 另取熟地黄对照药材 1 g, 加水 50 mL, 超声处理 45 min, 滤过, 滤液浓缩至 20 mL, 自“加甲醇 50 mL”, 同法制成对照药材溶液; 再取毛蕊花糖苷适量, 分别加甲醇制成含 0.5 mg/mL 的溶液, 作对照品溶液。



1~3-FEJ 供试品 1~3 (批号 1905075、1907011、1907012) 4-红参对照药材 5-人参皂苷 Rg₁ 对照品 6-红参阴性对照 7-党参对照药材 8-党参炔苷对照品 9-党参阴性对照

1—3-FEJ 1—3 (batch No. 1905075, 1907011, 1907012) 4-GRRR reference material 5-ginsenoside Rg₁ reference substance 6-negative sample without GRRR 7-CR reference material 8-lobetyolin reference substance 9-negative sample without CR

图 1 复方阿胶浆中红参、党参薄层色谱图

Fig. 1 TLC of GRRR and CR in FEJ

(2) 山楂供试品溶液的制备: 取本品 50 mL, 加聚酰胺 (30~60 目) 6 g, 混匀, 静置 30 min, 用脱脂棉滤过, 聚酰胺用水洗脱至近无色, 加乙醇 50 mL, 超声处理 10 min, 滤过, 回收至干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液; 另取山楂对照药材 1 g, 加水 50 mL, 超声处理 45 min, 滤过, 自“加聚酰胺 (30~60 目) 6 g”, 同法制成对照药材溶液; 再取牡荆素鼠李糖苷适量, 分别加甲醇制成含 0.5 mg/mL 的溶液, 作对照品溶液。

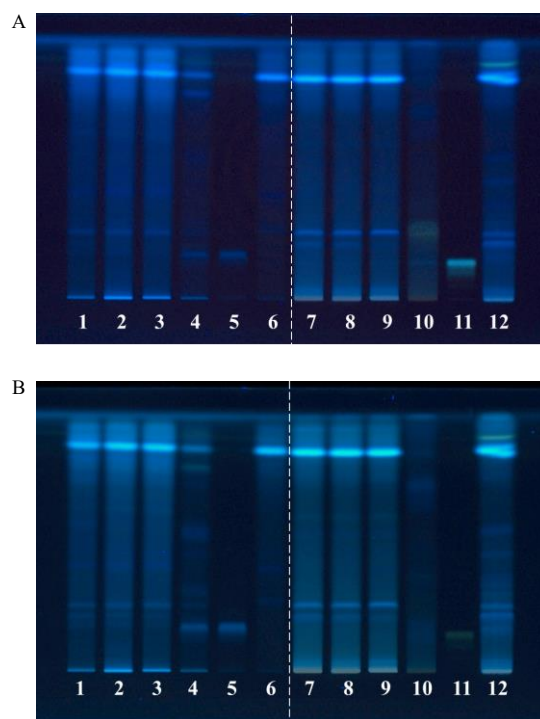
取 3 批复方阿胶浆 (批号 1905075、1907011、1907012) 及对应批次的熟地黄阴性样品, 自“加甲醇 50 mL”, 同法分别制成熟地黄供试品溶液 1~3、熟地黄阴性对照溶液。再取 3 批复方阿胶浆 (批号 1905075、1907011、1907012), 及对应批次的山楂阴性样品 50 mL, 自“加聚酰胺 (30~60 目) 6 g”, 分别同法制成山楂供试品溶液 1~3、山楂阴性对照溶液。

照薄层色谱法 (通则 0502) 试验, 吸取上述溶液 2~8 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-甲酸 (8:2:0.2) 为展开剂, 连续展开 3 次, 取出, 晾干, 置紫外灯光 (365 nm) 下检视。结果显示, 供试品色谱中, 在与熟地黄对照药材和毛蕊花糖苷对照品色谱对应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点; 熟地黄阴性对照色谱相应的位置上, 无斑点干扰, 表明该方法专属性、重复性良好。见图 2-A。

再喷以三氯化铝试液, 置紫外灯光 (365 nm) 下检视。结果显示, 供试品色谱中, 在与山楂对照药材和牡荆素鼠李糖苷对照品色谱对应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点; 山楂阴性对照色谱相应的位置上, 无斑点干扰, 表明该方法专属性、重复性良好。见图 2-B。

2.2 QAMS 阿胶含量测定的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Welch Ultimate AQ C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 以乙腈-0.1 mol/L 乙酸钠溶液 (用醋酸调节 pH 值至 6.5) (7:93) 为流动相 A, 以乙腈-水 (4:1) 为流动相 B 进行梯度洗脱, 梯度洗脱程序: 0~11.0 min, 100%~93% A; 11.0~13.9 min, 93%~88% A; 13.9~14.0 min, 88%~85% A; 14.0~29.0 min, 85%~66% A; 29.0~30.0 min, 66%~0% A; 体积流量 1 mL/min; 柱温 43 $^{\circ}$ C; 检测波长 254 nm; 进样量 5 μ L。理论板数按 L-羟脯氨酸峰计算不低于 4000, 色谱图见图 3。



1~3-FEJ 供试品 1~3 (批号 1905075、1907011、1907012) 4-熟地黄对照药材 5-毛蕊花糖苷对照品 6-熟地黄阴性对照 7~9-FEJ 供试品 1~3 (批号 1905075、1907011、1907012) 10-山楂对照药材 11-牡荆素鼠李糖苷对照品 12-山楂阴性对照 A-显色前 B-显色后

1~3 FEJ 1~3 (batch No. 1905075, 1907011, 1907012) 4-RRP reference material 5-acteoside reference substance 6-negative sample without RRP 7~9 FEJ 1~3 (batch No. 1905075, 1907011, 1907012) 10-CF reference material 11-vitexin rhamnoside reference substance 12-negative sample without CF A-before chromogenic reaction B-after chromogenic reaction

图 2 复方阿胶浆中熟地黄和山楂薄层色谱图
Fig. 2 TLC of RRP and CF in FEJ

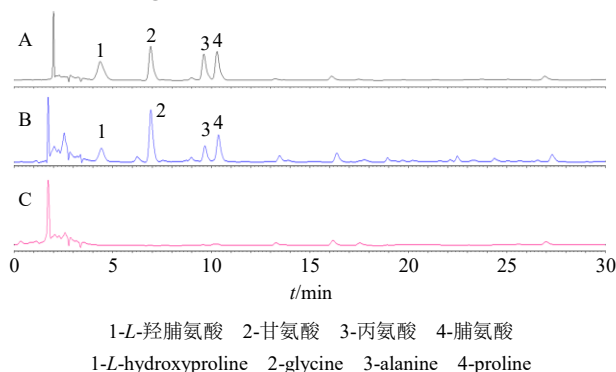


图 3 混合对照品 (A)、复方阿胶浆供试品 (B) 和阴性样品 (C) 的色谱图

Fig. 3 HPLC of mixed reference substances (A), FEJ sample (B), and blank sample (C)

2.2.2 供试品溶液的制备 取复方阿胶浆 (批号 1905075) 1 支, 摇匀, 精密量取本品 2 mL, 置 10

mL 量瓶中, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度, 摇匀。精密量取 2 mL, 置于顶空瓶中, 加盐酸 2 mL, 加盖密封, 于 150 °C 水解 1 h, 放冷, 移至蒸发皿中, 用水 10 mL 分次洗涤顶空瓶, 洗液并入蒸发皿中, 蒸干, 残渣加 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解, 转移至 25 mL 量瓶中, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液至刻度, 摇匀, 过滤, 即得。

精密量取上述供试品溶液 5 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 各加 0.1 mol/L PITC 的乙腈溶液 2.5 mL, 1 mol/L 三乙胺的乙腈溶液 2.5 mL, 摇匀, 室温放置 1 h 后, 加 50% 乙腈至刻度, 摇匀。取 10 mL, 加正己烷 10 mL, 振摇, 放置 10 min, 取下层溶液, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 混合对照品溶液的制备 取 *L*-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸对照品适量, 精密称定, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液制成分别含 *L*-羟脯氨酸 40 μg/mL、甘氨酸 80 μg/mL、丙氨酸 40 μg/mL、脯氨酸 60 μg/mL 的混合对照品溶液, 即得。

精密量取上述混合对照品溶液 5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加 0.1 mol/L PITC 的乙腈溶液 2.5 mL, 1 mol/L 三乙胺的乙腈溶液 2.5 mL, 摇匀, 室温放置 1 h 后, 加 50% 乙腈至刻度, 摇匀。取 10 mL, 加正己烷 10 mL, 振摇, 放置 10 min, 取下层溶液, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 线性关系考察 取按“2.2.3”项方法制成的含 *L*-羟脯氨酸 0.438 mg/mL、甘氨酸 0.774 mg/mL、丙氨酸 0.401 mg/mL、脯氨酸 0.572 mg/mL 的混合对照品溶液。取该混合对照品溶液, 用 0.1 mol/L 盐酸溶液分别稀释 0、5、10、25、50 倍, 自“2.2.3”项中“精密量取上述溶液 5 mL”进行操作, 即得系列质量浓度溶液。分别进样 5 μL, 测定 *L*-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸 4 个氨基酸成分的峰面积, 以质量浓度 (X) 对色谱峰面积 (Y) 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得 4 种成分回归方程分别为 *L*-羟脯氨酸 $Y=3 \times 10^7 X+2\ 596.6$, $r=1.000\ 0$, 线性范围 1.75~87.60 μg/mL; 甘氨酸 $Y=4 \times 10^7 X-4\ 790.7$, $r=1.000\ 0$, 线性范围 3.10~155.00 μg/mL; 丙氨酸 $Y=3 \times 10^7 X+13\ 876$, $r=0.999\ 8$, 线性范围 1.60~80.20 μg/mL; 脯氨酸 $Y=3 \times 10^7 X+6\ 372.65$, $r=1.000\ 0$, 线性范围 2.29~114.00 μg/mL; 结果表明, 各氨基酸在各自的线性范围内线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 取供试品溶液(批号 1905075), 连续进样 6 次, 测定 *L*-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、

脯氨酸 4 个氨基酸成分, 结果各成分峰面积的 RSD 分别为 1.02%、1.27%、1.22%、1.15%, 表明仪器精密密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取供试品溶液(批号 1905075), 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 测定 *L*-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸 4 个氨基酸成分, 结果各成分峰面积的 RSD 分别为 1.24%、1.25%、1.37%、1.33%, 表明 24 h 内, 供试品溶液稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取复方阿胶浆(批号 1905075) 6 份, 分别制备供试品溶液, 测定 *L*-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸 4 个氨基酸成分, 结果各成分质量浓度的 RSD 分别为 1.55%、1.96%、2.30%、1.51%, 表明方法重复性良好。

2.2.8 加样回收试验 取已测定的复方阿胶浆(批号 1905075) 6 份, 精密加入与样品中待测成分含量相当的氨基酸混合对照品溶液, 依法提取测定, 计算各成分的回收率。结果表明, *L*-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸的平均回收率分别为 97.30%、94.10%、93.98%、97.91%, RSD 分别为 2.35%、1.59%、2.14%、1.83%, 表明方法的准确度良好。

2.2.9 QAMS 的建立

(1) 相对校正因子(relative correction factor, RCF)的测定: 阿胶中的主要成分是胶原蛋白, *L*-羟脯氨酸是胶原蛋白中特有的氨基酸, 其含量在胶原蛋白中比例基本固定^[11], 因此, 选用 *L*-羟脯氨酸作为内参物, 根据 *L*-羟脯氨酸与其他成分的 RCF 来计算其他成分的含量。

取“2.2.4”项下的系列浓度的混合对照品溶液, 即得对照品母液(I)、稀释 5 倍对照品溶液(II)、稀释 10 倍对照品溶液(III)、稀释 25 倍对照品溶液(IV)、稀释 50 倍对照品溶液(V), 分别进样。以公式 $f_{s/i}=f_s/f_i=A_s C_i/A_i C_s$ (式中 A_s 为内参物对照品峰面积, C_s 为内参物对照品质量浓度, A_i 为待测成分对照品峰面积, C_i 为某待测成分对照品质量浓度), 分别计算 *L*-羟脯氨酸与甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸的 RCF 分别为 0.643、0.939、0.870, RSD 分别为 2.19%、2.96%、1.89%。

(2) 不同进样量对 RCF 的影响: 考察了在不同进样量 2、4、5、8、10 μL 对 RCF 的影响。结果(表 1)表明, 不同进样量下, *L*-羟脯氨酸与甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸的 RCF 分别为 0.647、0.980、0.853, RSD 分别为 1.20%、1.12%、1.23%, 无显著性影响(RSD<3%)。

(3) 不同仪器对 RCF 的影响: 考察了不同高效液相色谱仪 Acchorm S6000、Waters e2695、岛津 Nexera LC-40 对 RCF 的影响。结果(表 1)表明, 不同高效液相色谱仪中, *L*-羟脯氨酸与甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸的 RCF 分别为 0.661、0.958、0.848, RSD 分别为 0.87%、1.43%、1.99%, 无显著性影响(RSD<3%)。

(4) 不同色谱柱对 RCF 的影响: 考察了不同色谱柱 Waters T-nature C₁₈、Agilent Zorbax XDB C₁₈、Welch ultimate AQ C₁₈ 对 RCF 的影响。结果(表 1)表明, 不同色谱柱中, 对 *L*-羟脯氨酸与甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸的 RCF 分别为 0.654、0.954、0.857, RSD 分别为 1.29%、0.06%、0.70%, 无显著性影响(RSD<3%)。

(5) RCF 的确定: 综合以上对 RCF 影响因素的考察, 对所得数据取平均值, 最终确定 *L*-羟脯氨酸与甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸间的 RCF 分别为 0.651、0.958、0.857, RSD 分别为 1.20%、1.78%、1.09%。结果见表 1。

表 1 各成分的 RCF

Table 1 RCF of each component

考察因素	$f_{L\text{-羟脯氨酸}}/f_{\text{甘氨酸}}$	$f_{L\text{-羟脯氨酸}}/f_{\text{丙氨酸}}$	$f_{L\text{-羟脯氨酸}}/f_{\text{脯氨酸}}$
质量浓度	0.643	0.939	0.870
进样量	0.647	0.980	0.853
仪器	0.654	0.954	0.857
色谱柱	0.661	0.958	0.848
均值	0.651	0.958	0.857
RSD/%	1.20	1.78	1.09

(6) 待测组分数峰的定位: 当仅使用 *L*-羟脯氨酸作为对照品时, 为了能够准确确认甘氨酸、丙氨酸和脯氨酸色谱峰的位置, 利用相对保留值定位, 即确认内参物的保留时间, 加上相对保留值, 再根据峰形判断, 辨别目标峰的准确峰位置。

考察了采用不同仪器 Acchorm S6000、Waters e2695、岛津 Nexera LC-40 和不同色谱柱 Waters T-nature C₁₈、Agilent Zorbax XDB C₁₈、Welch ultimate AQ C₁₈ 时, *L*-羟脯氨酸色谱峰与甘氨酸、丙氨酸和脯氨酸色谱峰的相对保留值($t_{is}=t_{Ri}/t_{Rs}$, 公式中 t_{is} 为相对保留时间, t_{Ri} 为待测成分对照品保留时间, t_{Rs} 为内参物保留时间)。对不同仪器与不同色谱柱所得数据取平均值, 结果显示, *L*-羟脯氨酸色谱峰与甘氨酸、丙氨酸和脯氨酸色谱峰的 t_{is} 为 1.417、

1.941、2.084, RSD 分别为 2.32%、3.26%、3.37%, 均小于 5%。表明采用相对保留值法对待测成分定位是合理的。

2.2.10 样品测定及验证结果 为了进一步验证所建立的 QAMS 法的准确性, 本研究采用外标法(ESM)和 QAMS 法 15 批复方阿胶浆中 *L*-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸的含量进行测定。取 15 个批次(批号 1907011、1907012、1907014、1907015、1907017、1907020、1907021、1907022、1909004、1909007、1909010、1909011、1909013、1909015、1909016, 编号依次对应为 S1~S15)的复方阿胶浆, 每个批次平行制备 3 份供试品溶液, 依次进样测定, 结果见表 2。

表 2 EMS 法与 QAMS 法测定 4 种氨基酸的含量 ($n=3$)Table 2 Contents of four amino acids by QAMS and EMS ($n=3$)

批号	<i>L</i> -羟脯氨酸/ (mg·mL ⁻¹)	甘氨酸/ (mg·mL ⁻¹)		丙氨酸/ (mg·mL ⁻¹)		脯氨酸/ (mg·mL ⁻¹)	
		EMS	QAMS	EMS	QAMS	EMS	QAMS
S1	2.89	5.42	5.57	2.68	2.79	3.72	3.76
S2	3.01	5.54	5.69	2.75	2.86	3.84	3.88
S3	2.77	5.17	5.31	2.64	2.75	3.58	3.61
S4	2.91	5.45	5.60	2.80	2.92	3.73	3.77
S5	3.04	5.93	6.09	3.18	3.32	4.02	4.06
S6	3.20	6.58	6.75	3.67	3.82	4.19	4.23
S7	3.37	6.99	7.17	3.97	4.15	4.46	4.50
S8	3.02	6.07	6.24	3.49	3.64	3.98	4.03
S9	3.14	6.60	6.78	3.70	3.85	4.17	4.21
S10	2.82	5.81	5.97	3.34	3.48	3.76	3.80
S11	2.76	5.26	5.41	3.00	3.13	3.66	3.70
S12	2.73	4.65	4.70	3.22	3.36	3.72	3.76
S13	2.96	6.07	6.24	3.42	3.56	3.94	3.98
S14	2.98	5.46	5.61	3.27	3.41	3.96	4.00
S15	2.78	5.41	5.56	2.98	3.11	3.61	3.65

同时采用 t 检验、相对偏差法和 Pearson 相关系数法对两种方法的含量测定结果进行比较分析。经 t 检验比较, 结果显示常规的外标法实测含量值与 QAMS 计算的含量无显著性差异($P<0.001$); 相对偏差法计算结果显示, 外标法实测含量值与 QAMS 计算的各成分含量相对偏差分别为 1.88%、2.97%、0.74%; Pearson 相关系数结果均为 1, 说明 2 种方法得到含量相似性极高。以上结果表明 ESM 法和

QAMS 法测定结果无显著性差异。

3 讨论

3.1 IMMS 薄层色谱鉴别

3.1.1 对照物的选择 复方阿胶浆的制备工艺是红参、党参、熟地黄、山楂水煎煮的提取方法。前期实验采用 HPLC-Q-TOF-MSⁿ 技术研究表明复方阿胶浆化学成分组成复杂,包括人参皂苷类、苯乙醇苷类、环烯醚萜类、有机酸类等多种结构类型,且多为大极性化合物。

复方阿胶浆质量标准(2020 版)红参仅采用对照品(人参三醇)对照的鉴别方法。但是人参三醇为皂苷元,化合物极性较小。人参皂苷 Rg₁ 具有良好的调控血管新生的作用^[5-6],且该化合物为红参饮片薄层鉴别的对照品之一。因此,本研究中红参的薄层色谱鉴别采用人参皂苷 Rg₁ 和红参对照药材的双对照方法。

《中国药典》2020 年版中,复方阿胶浆山楂的鉴别方法是采用山楂对照药材进行对照。《中国药典》收录的山楂药材及含有山楂的复方制剂鉴别方法多用熊果酸作为对照品。复方阿胶浆化学成分组成研究中未发现熊果酸,这可能与其极性较小有关。牡荆素鼠李糖苷属于黄酮二糖苷类化合物,主要分布于山楂叶和山楂中,具有调节血管内皮细胞产生的血管活性物质、改善心肌供血量等作用^[7-8]。本研究采用山楂对照药材和牡荆素鼠李糖苷对照品的双对照方法。

3.1.2 供试品制备方法的优化 《中国药典》2020 年版复方阿胶浆质量标准中未收录熟地黄的薄层鉴别方法。含有熟地黄的口服液体制剂,多以熟地黄对照药材为对照物,其供试品溶液制备方法多采用醋酸乙酯溶剂萃取富集。毛蕊花糖苷易溶于醋酸乙酯^[9]。因此,本研究中熟地黄薄层色谱鉴别的供试品溶液制备采用甲醇沉淀蛋白后,醋酸乙酯萃取富集的方法。拟将山楂薄层色谱鉴别采用熟地黄相同供试品制备方法,但经过多次尝试,均不能满足鉴别的专属性要求。山楂的供试品溶液的制备方法采用复方阿胶浆质量标准(2020 版)鉴别项下山楂的薄层色谱鉴别的供试品制备方法。

《中国药典》2020 年版中收录含有红参的复方制剂在薄层色谱鉴别中供试品溶液的制备多采用水饱和正丁醇萃取皂苷类成分。结合参芪口服液、归脾合剂等复方制剂质量标准,党参的薄层色谱鉴别的供试品溶液制备也使用水饱和正丁醇溶液萃取的

方法^[3]。再者,现有的供试品制备方法中,对皂苷类成分如人参皂苷、黄芪甲苷等多采用 1%~2%氢氧化钠溶液(pH 13.40)或浓氨试液(pH 11.12)多次洗涤正丁醇萃取液。文献报道党参炔苷在碱性溶液 pH 值大于 12 时,对其稳定性影响较为显著^[10],因此,以党参炔苷为对照品时,供试品溶液的制备不宜用强碱性的氢氧化钠溶液或浓氨试液(pH>12)进行处理。本研究对不同浓度的氢氧化钠试液及氨试液进行考察,最终确定使用水饱和正丁醇用量(20 mL)的 1.5 倍体积比的弱碱性氨试液(30 mL)洗涤 1 次。

3.1.3 展开方法 薄层同向多次展开技术是薄层展开一定展距后,取出晾干,再进行展开。多次展开等于延长展开距离,从而提高了分离效果^[11]。本研究党参阴性样品和党参炔苷对照品在同一比移值(Rf)均存在斑点,无法满足党参鉴别的专属性要求。将展开后的薄层板晾干后继续在同一展开剂中展开,连续展开 3 次,有效区别了干扰斑点与鉴别斑点。该方法为其他中成药的质量控制的鉴别提供了借鉴。

3.2 QAMS 含量测定

3.2.1 指标成分的选择 阿胶是复方阿胶浆中的君药,占据重要的地位。复方阿胶浆现行质量标准中含量测定项仅有总氮量一项,该质控方法专属性较差^[12]。阿胶的化学成分主要为驴皮所含原胶原的降解物,包括明胶、蛋白质及多种氨基酸。其中氨基酸作为蛋白质的基本结构单位,也是生物代谢过程中的重要物质^[13]。L-羟脯氨酸是胶原蛋白中特有的氨基酸,其含量在胶原蛋白中比例基本固定^[14]。甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸在阿胶中含量较高^[15]。《中国药典》2020 年版阿胶药材含量测定的指标成分也是 L-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸。因此,选用这 4 个成分作为指标成分的复方阿胶浆含量测定方法,其专属性和有效性更好。再者可以有效地控制从单味药(阿胶)到成方制剂(复方阿胶浆)的转移和传递过程。

此外,将 QAMS 应用于 4 种氨基酸的含量测定,可以改善检测多种指标成分检测而造成的操作繁琐、成本高、耗时长等现状。建立一种测定单个有效成分实现同时测定多个有效成分的快速测定方法,可以很大程度上克服对多指标成分质量控制的限制^[16]。

3.2.2 测定方法的优化 以《中国药典》2020 年版

中阿胶药材的测定方法为基础,本研究对复方阿胶浆样品的稀释倍数、盐酸的用量、水解时间和水解温度进行了考察,以确定复方阿胶浆样品酸水解的实验条件。同时也考察了 PITC 的用量对衍生化的影响。研究发现 0.5 倍和 1 倍量 PITC 反应后,氨基酸含量无明显差异。考虑到 PITC 对色谱柱损害较大,因此,使用 0.5 倍量 PITC 试剂,并使用等体积的正己烷萃取除去衍生化试剂,避免色谱柱柱效降低^[17]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 马双成,王翀,朱炯,等. 中成药的整体质量状况及有关问题分析 [J]. 中国药理学杂志, 2019, 54(17): 1369-1373.
- [2] 周跃华,路金才,周娟,等. 关于中药新药复方制剂“整体鉴别”新模式的思考 [J]. 中草药, 2021, 52(8): 2199-2204.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 197, 694, 817, 1215, 1322, 1688.
- [4] 李静,李耀磊,于健东,等. 一测多评法结合特征图谱的新疆紫草质量控制研究 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(7): 1209-1216.
- [5] 杨婷,张莉君,黄睿,等. 中药活性成分调控血管新生的研究进展 [J]. 药学学报, 2020, 55(9): 1995-2007.
- [6] Hu A, Shuai Z, Liu J, et al. Ginsenoside Rg₁ prevents vascular intimal hyperplasia involved by SDF-1 α /CXCR4, SCF/c-kit and FKN/CX3CR1 axes in a rat balloon injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 260: 113046.
- [7] 董嘉琪,陈金鹏,龚苏晓,等. 山楂的化学成分、药理作用及质量标志物(Q-Marker)预测 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2801-2818.
- [8] 朱晓新,李连达,刘建勋,等. 牡荆素鼠李糖苷对内皮细胞血管舒缩因子表达影响的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(7): 566-569.
- [9] 丘琴,卢诗剑,潘翠柳,等. HPLC 同时测定赇桐根 3 种不同极性部位咖啡酸、毛蕊花糖苷及山柰酚的含量 [J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(12): 140-144.
- [10] 廖江敏,李林玉,瞿云安,等. 党参药材活性成分党参炔苷的化学稳定性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(3): 385-388.
- [11] 孙建彬,王欣,覃瑶,等. 黄连及其炮制品和黄连须的薄层鉴别 [J]. 华西药学杂志, 2014, 29(6): 675-677.
- [12] 刘军. 食品中蛋白质凯氏定氮法测定比较 [J]. 食品安全导刊, 2021(12): 147.
- [13] 陈萍红,王书芳,田守生,等. 柱前衍生 RP-HPLC 法测定阿胶中 13 种氨基酸 [J]. 中草药, 2013, 44(14): 1995-1999.
- [14] 李敏,郭威,于姗姗,等. 一测多评法测定阿胶中 4 种主要氨基酸的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(4): 79-82.
- [15] 程显隆,肖新月,邹秦文,等. 柱前衍生化 HPLC 法同时测定阿胶中 4 种主要氨基酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(12): 1997-2000.
- [16] 陈晓璐,郭振旺,邓家刚,等. 基于肉桂质量标志物(Q-Marker)预测的质量控制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2707-2718.
- [17] 郭晓晗,程显隆,柳温曦,等. 柱前衍生化-HPLC 法同时测定不同商品规格鹿茸片中 15 种氨基酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(10): 1780-1789.

[责任编辑 郑礼胜]