

HPLC 一测多评法同时测定双青咽喉片中 10 种成分

何 兵¹, 刘 艳¹, 杨世艳^{2*}, 张 燕³

1. 泸州医学院 药物研究中心, 四川 泸州 646000
2. 泸州医学院附属中医医院, 四川 泸州 646000
3. 泸州医学院附属医院, 四川 泸州 646000

摘要: 目的 在 HPLC 法同时测定双青咽喉片中 10 种成分(柠檬酸、没食子酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、甘草酸单铵及蒿酮)的基础上, 建立一测多评法的方法学考察模式, 验证此方法在双青咽喉片中应用的可行性和技术适应性。方法 以双青咽喉片为研究对象, 其所含的 10 种成分为指标成分, 采用 3 种校正方法分别建立各成分与没食子酸的相对校正因子($f_{k/s}$), 计算各成分的量, 实现一测多评; 同时采用外标法和回归方程法测定该 10 种成分的量, 并比较 3 种 $f_{k/s}$ 所得计算值与实测值的差异, 以验证一测多评法的准确性和可行性。结果 3 批双青咽喉片中 10 种成分的计算值与实测值间无显著差异。结论 3 种校正方式的一测多评控制双青咽喉片的质量是可行的、准确的。

关键词: 一测多评; 相对校正因子; 双青咽喉片; HPLC; 柠檬酸; 没食子酸; 绿原酸; 甘草酸单铵; 蒿酮

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)08-0000-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.08.000

Simultaneous determination of 10 constituents in Shuangqing Yanhou Tablets by HPLC-QAMS

HE Bing¹, LIU Yan¹, YANG Shi-yan², ZHANG Yan³

1. Research Center for Drug, Luzhou Medical University, Luzhou 646000, China
2. Hospital TCM Affiliated to Luzhou Medical University, Luzhou 646000, China
3. Affiliated Hospital of Luzhou Medical University, Luzhou 646000, China

Abstract: Objective To establish a new method of quantitative analysis on multi-components by single marker (QAMS) and validate its feasibility and technical adaptability in analysis on Shuangqing Yanhou Tablets for the simultaneous determination of 10 main constituents (citric acid, gallic acid, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, ammonium glycyrrhizinate, and artemisia ketone). **Methods** Using Shuangqing Yanhou Tablets as object, the above 10 constituents as indexes, three correction methods were used to establish the relative correction factor ($f_{k/s}$) between each component and gallic acid, respectively then to calculate the amount of each component and finally to achieve QAMS. At the same time, the external reference method and regression equation method were used to determine the amounts of the above 10 constituents, to compare the difference between the calculated and real data of the three $f_{k/s}$, and to validate the correctness and adaptability of QAMS. **Results** No significant difference was found in the quantitative results of 10 active constituents in three batches of Shuangqing Yanhou Tablets determined by the calculated and real data. **Conclusion** The QAMS by three correction methods is feasible and accurate to evaluate the contents of the 10 constituents in Shuangqing Yanhou Tablets.

Key words: quantitative analysis on multi-components by single marker; relative correction factor; Shuangqing Yanhou Tablets; HPLC; citric acid; gallic acid; chlorogenic acid; ammonium glycyrrhizinate; artemisia ketone

双青咽喉片是由金银花提取物、青蒿油、青果提取物、乌梅提取物、甘草酸单铵和薄荷脑 6 味中药提取的有效部位及有效成分组成的复方制剂, 具

有芳香透邪、清热解毒、生津润燥、利咽止痛等功效^[1]。临床上主要用于治疗急慢性咽炎、喉炎、扁桃体炎、口腔黏膜溃疡; 亦可辅佐治疗细菌或病毒

收稿日期: 2012-08-31

基金项目: 泸州市 2010 年重点科技项目(泸市财企[2010]41 号); 泸州医学院 2010 年青年基金(泸医院[2010]108 号)

作者简介: 何 兵, 男, 副研究员, 研究方向为中药活性成分及质量分析研究。Tel: 13982770721 E-mail: lyhb2008@126.com

*通信作者 杨世艳 Tel: 18982785351 E-mail: lyysy2010@126.com

感染的其他呼吸道疾病。金银花提取物的活性成分主要为绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸及异绿原酸 A、B、C^[2]。青果提取物中的主要有效成分为没食子酸，柠檬酸为乌梅提取物中的主要有效成分，蒿酮为青蒿油主要成分。双青咽喉片原质量标准分别为分别单独测定绿原酸、没食子酸、柠檬酸、甘草酸单铵和蒿酮，后来采用梯度洗脱尝试了同时分离绿原酸、没食子酸和柠檬酸^[3]。进一步研究发现，上述成分在同一色谱条件下均能同时分离测定，该方法简单快速，重复性好，为全面控制双青咽喉片的质量及其质量标准提高研究提供科学依据。

鉴于多指标的质量控制模式需要对照品的种类和数量均比较大，且部分对照品（如绿原酸异构体及异绿原酸类）价格较昂贵，王智明等提出了一测多评的多指标质控模式^[4]。即在多指标质量控制时，以样品中对照品廉价易得的典型成分为内标，建立该成分与其他成分间的相对校正因子 ($f_{k/s}$)，再通过 $f_{k/s}$ 计算出其他成分的量。在方法实施时，可在只有 1 种对照品而其余对照品不足的情况下，实现这些成分的同时定量测定，并成功应用于预知子、关黄柏、银黄片、人参、三七等中药的质量控制^[5-9]，其中黄连药材的一测多评法更被《中国药典》2010 年版采用^[10]。本实验以没食子酸为参照物，采用 3 种校正方法建立其与柠檬酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C、甘草酸单铵及蒿酮之间的 $f_{k/s}$ ，并计算各成分的量，同时采用外标法和回归方程法同步测定，验证一测多评法得到结果的准确性和可靠性。

1 仪器与材料

Dionex 高效液相色谱仪(包括 P680A 四元梯度泵, PDA—100 二极管阵列检测器, TCC—100 柱温箱和 Chromeleon 色谱工作站)。Agilent 1100 高效液相色谱仪(包括 G1311A 四元泵、G1313A 自动进样器、G1315B 二极管阵列检测器、G1316A 柱温箱和 Agilent ChemStation 工作站)。色谱柱: AkzoNobel Kromasil C₁₈、Lubex Kromasil C₁₈、Phenomenex Luna C₁₈ (2)、Dikma Platisil ODS, 规格均为 250 mm×4.6 mm, 5 μm。瑞士 Precisa 电子天平(XR 205SM-DR)。

对照品新绿原酸(批号 070915)、绿原酸(批号 080620)、隐绿原酸(批号 080923)、异绿原酸 B(批号 071129)、异绿原酸 A(批号 080530)、异绿原酸 C(批号 071115)均由成都普瑞法有限公司提

供, 对照品柠檬酸(批号 111679-200701)、没食子酸(批号 110831-200902)、甘草酸单铵(批号 110731-200812)均由中国药品生物制品检定所提供, 对照品蒿酮(批号 053989/1)由 Sigma-Aldrich 公司提供, 所有对照品经 HPLC 峰面积归一化法检测质量分数均在 98%以上。乙腈为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

双青咽喉片(规格: 0.5 g/片, 批号 110503、110518、110530)自制^[11]: 取 β-环糊精, 加适量水于水浴中搅拌溶解, 在 30 °C 恒温下, 加入青蒿油与薄荷脑的混溶物, 搅拌或超声 45 min, 冷藏 24 h, 滤取沉淀物, 于 40 °C 真空干燥, 得青蒿油、薄荷脑包合物。另取金银花提取物、甘草酸盐、青果、乌梅提取物及上述包合物, 粉碎成细粉, 按等量递加法与辅料 PVP、糊精、蔗糖粉混匀, 用 80%乙醇作润湿剂制粒, 50 °C 干燥, 整粒, 加入硬脂酸镁, 混匀, 压制成片, 包装即得成品。

2 方法与结果

2.1 分析方法验证

2.1.1 色谱条件 AkzoNobel Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 1%~5%乙腈; 10~35 min, 5%~30%乙腈; 35~55 min, 30%~90%乙腈; 55~56 min, 90%~1%乙腈; 56~60 min, 1%乙腈; 体积流量 0.8 mL/min; 分段变波长测定, 0~15 min 为 215 nm(柠檬酸、没食子酸), 15~40 min 为 326 nm(新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C), 40~50 min 为 252 nm(甘草酸单铵), 50~60 min 为 241 nm(蒿酮); 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。

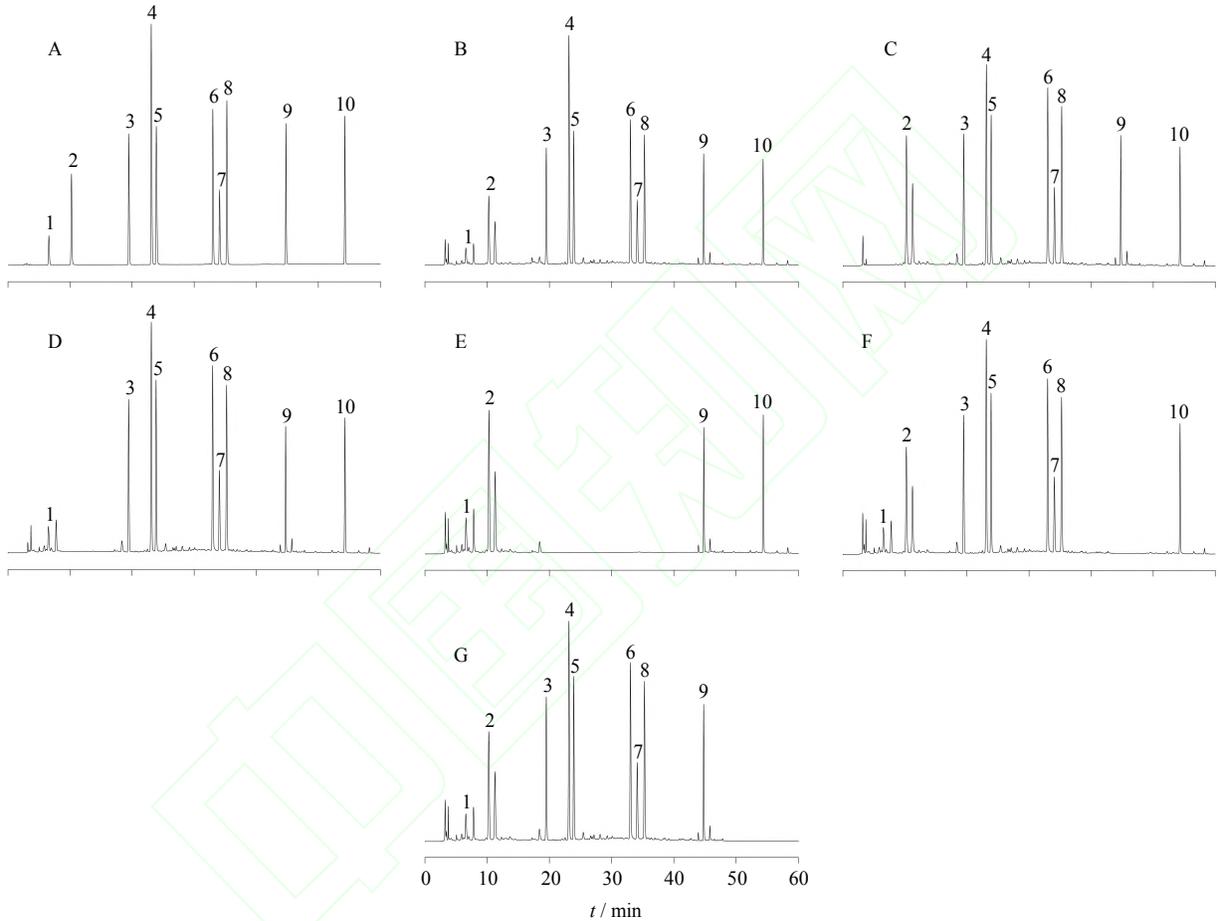
2.1.2 混合对照品溶液制备 分别精密称取柠檬酸、没食子酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C、甘草酸单铵及蒿酮对照品适量, 以 50%甲醇溶解并定容, 制成质量浓度分别为柠檬酸 8.691 mg/mL、没食子酸 0.406 mg/mL、新绿原酸 1.128 mg/mL、绿原酸 2.236 mg/mL、隐绿原酸 1.145 mg/mL、异绿原酸 B 1.132 mg/mL、异绿原酸 A 0.581 mg/mL、异绿原酸 C 1.223 mg/mL、甘草酸单铵 4.068 mg/mL 及蒿酮 0.751 mg/mL 的混合对照品储备液, 分别精密量取 0.5、1、2、3、4、5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 以 50%甲醇稀释至刻度, 制得系列混合对照品溶液, 避光保存。

2.1.3 供试品溶液制备 取重量差异项下的本品

20片,精密称定,研细,取约0.5g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇25mL,称定质量,超声处理30min,取出,放冷,再称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,即得。

2.1.4 阴性对照溶液制备 取按处方比例及制备工艺制得的不含乌梅提取物、青果提取物、金银花提取物、甘草酸单铵及青蒿油的阴性对照样品,按供试品溶液制备方法分别制成阴性对照溶液。

2.1.5 系统适应性及专属性试验 分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各10 μ L,进样分析,结果见图1。柠檬酸、没食子酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C、甘草酸单铵及蒿酮与其相邻色谱峰的分离度均大于1.5,拖尾因子在1.02~1.11,理论塔板数以各色谱峰计算均在5000以上。阴性对照在相应位置处未见色谱峰,方法专属性良好。



1-柠檬酸 2-没食子酸 3-新绿原酸 4-绿原酸 5-隐绿原酸 6-异绿原酸B 7-异绿原酸A 8-异绿原酸C 9-甘草酸单铵 10-蒿酮, 图2同
1-citric acid 2-gallic acid 3-neochlorogenic acid 4-chlorogenic acid 5-cryptochlorogenic acid 6-isochlorogenic acid B
7-isochlorogenic acid A 8-isochlorogenic acid C 9-ammonium glycyrrhizate 10-artemisia ketone, same as Fig.2

图1 混合对照品 (A)、双青咽喉片 (B)、缺乌梅提取物 (C)、缺青果提取物 (D)、缺金银花提取物 (E)、缺甘草酸单铵 (F)、缺青蒿油 (G) 阴性样品的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Shuangqing Yanhou Tablets (B), negative sample without *Mume Fructus* extract (C), without *Canarii Fructus* extract (D), without *Loniceræ Japonicæ Flos* extract (E), without ammonium glycyrrhizate (F), and without artemisia oil (G)

2.1.6 线性关系考察 分别精密吸取系列质量浓度的混合对照品溶液10 μ L,注入液相色谱仪,记录色谱图。以峰面积积分为纵坐标(Y),对照品质量为横坐标(X)进行线性回归。同系列混合对照品制备方法逐级稀释,分别以信噪比3和10考察检

测限和定量限,结果见表1。

2.1.7 精密度试验 取同一混合对照品溶液,连续进样6次,记录各组分色谱峰峰面积。结果柠檬酸、没食子酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C、甘草酸单铵及蒿

表 1 10 种成分的线性关系考察

Table 1 Results of linear relationships of 10 constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围 / μg	检测限 / ng	定量限 / ng
柠檬酸	$Y=2.3619X-0.0201$	0.9996	1.738~17.382	4.10	13.66
没食子酸	$Y=160.6183X-0.5680$	0.9998	0.081~0.812	0.06	0.20
新绿原酸	$Y=66.8127X-0.3575$	0.9998	0.226~2.256	0.28	0.92
绿原酸	$Y=66.9067X-0.2596$	0.9999	0.447~4.472	0.28	0.95
隐绿原酸	$Y=66.7782X-0.2685$	0.9999	0.229~2.290	0.26	0.85
异绿原酸 B	$Y=82.8187X-0.5764$	0.9998	0.226~2.264	0.29	0.96
异绿原酸 A	$Y=82.9849X-0.3235$	0.9997	0.116~1.162	0.25	0.83
异绿原酸 C	$Y=82.3792X-0.5531$	0.9998	0.245~2.446	0.24	0.79
甘草酸单铵	$Y=15.3054X-0.0403$	0.9998	0.814~8.136	0.44	1.48
蒿酮	$Y=103.0186X-0.7093$	0.9999	0.150~1.502	0.04	0.12

酮峰面积的 RSD 分别为 0.34%、0.29%、0.26%、0.18%、0.29%、0.35%、0.46%、0.39%、0.37%、0.43%，表明仪器精密度良好。

2.1.8 稳定性试验 取批号为 110503 同一供试品溶液，分别于制备后 0、4、8、12、24、36 h 注入液相色谱仪，记录各组分色谱峰峰面积。结果柠檬酸、没食子酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、甘草酸单铵及蒿酮峰面积的 RSD 分别为 0.86%、0.94%、0.91%、0.80%、0.86%、1.26%、1.33%、1.19%、0.98%、1.47%，表明供试品溶液在 36 h 内稳定。

2.1.9 重复性试验 取批号为 110503 的样品，按照“2.1.3”项下方法制备 6 份供试品溶液，进样分析，计算得柠檬酸、没食子酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、甘草酸单铵及蒿酮平均质量分数分别为 22.157、1.216、4.082、8.188、4.308、4.248、1.964、4.074、14.281、2.122 mg/g，其 RSD 分别为 0.87%、0.75%、0.72%、0.68%、0.74%、0.88%、1.13%、0.93%、0.81%、0.90%，表明本法重复性良好。

2.1.10 回收率试验 精密称取批号为 110503 的双青咽喉片 9 份，每份 0.25 g，分成 3 组，每组 3 份，分别精密添加含柠檬酸 2.229 mg/mL，没食子酸 0.121 mg/mL，新绿原酸 0.416 mg/mL，绿原酸 0.823 mg/mL，隐绿原酸 0.432 mg/mL，异绿原酸 B 0.417 mg/mL，异绿原酸 A 0.196 mg/mL，异绿原酸 C 0.401 mg/mL，甘草酸单铵 1.436 mg/mL 及蒿酮 0.216 mg/mL 的混合对照品溶液 2.0、2.5、3.0 mL，按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1.1”项下色谱条件测定，并分别计算回收率。结果柠檬酸、

没食子酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、甘草酸单铵及蒿酮的平均回收率分别为 98.20%、98.38%、98.47%、98.55%、98.34%、98.16%、97.99%、98.03%、98.41%、98.28%，RSD 分别为 1.22%、1.11%、1.01%、1.17%、1.30%、1.22%、1.39%、1.25%、1.46%、1.40%。结果表明本法具有良好的回收率。

2.1.11 耐用性试验 分别考察流动相各梯度点比例变化±5%、水相 pH 值变化±0.2、柱温变化±5℃、各变波长点检测波长变化±5 nm、体积流量变化±20%，以及采用 4 根不同色谱柱 AkzoNobel Kromasil C₁₈、Lubex Kromasil C₁₈、Phenomenex Luna C₁₈ (2)、Dikma Platisil ODS (规格均为 250 mm×4.6 mm, 5 μm) 进行测定时，仪器色谱行为的变化。检测同一批双青咽喉片中 10 种成分的量及其 RSD，并考察其分离度、拖尾因子、理论塔板数。结果各条件下所测各成分质量分数的 RSD 均<2.67%，分离效果理想。因此，双青咽喉片中的 10 种成分定量测定条件较宽，具有较好的耐用性。

2.2 $f_{k/s}$ 的计算

2.2.1 多点校正法 参照文献^[5-7]以多个质量浓度点计算所得的 $f_{k/s}$ 的平均值作为 $f_{k/s}$ 。校正因子计算公式： $f_{k/s}=(C_s \times A_k)/(C_k \times A_s)$ ；待测成分质量浓度计算公式： $C_k'=(C_s \times A_k)/(f_{k/s} \times A_s)$ 。两式中 C_s 为参照物质质量浓度， A_s 为参照物质色谱峰峰面积， C_k 为其他对照组分质量浓度， A_k 为其他对照组分色谱峰峰面积， C_k' 为待测组分质量浓度， A_k' 为待测组分色谱峰峰面积。应用此法需先获得一个参照物的质量浓度 C_s 和色谱峰峰面积值 A_s 。结果见表 2。

2.2.2 斜率校正法 在标准曲线 $Y=aX+b$ 中， $X=$

表 2 以没食子酸为参照的 $f_{k/s}$ (多点校正法)Table 2 $f_{k/s}$ with gallic acid as reference (multi-point correction)

进样体积 / μL	其他成分相对于没食子酸的 $f_{k/s}$								
	柠檬酸	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C	甘草酸单铵	蒿酮
0.5	0.015	0.418	0.416	0.418	0.516	0.517	0.521	0.098	0.642
1.0	0.015	0.420	0.421	0.419	0.520	0.520	0.517	0.097	0.638
2.0	0.015	0.419	0.421	0.418	0.514	0.519	0.512	0.096	0.638
3.0	0.015	0.418	0.422	0.417	0.517	0.518	0.516	0.096	0.643
4.0	0.015	0.419	0.418	0.426	0.524	0.516	0.516	0.097	0.645
5.0	0.015	0.415	0.424	0.412	0.512	0.518	0.512	0.095	0.639
平均值	0.015	0.418	0.420	0.418	0.517	0.518	0.516	0.096	0.641
RSD/%	0.99	0.38	0.63	1.10	0.83	0.30	0.69	1.28	0.50

$(Y-b)/a=Y/a-b/a$, 由于 b 值通常为误差引起, 在 a/b 值大于 100 时, b/a 值可以忽略不计, 此时可以直接计算。故 $f_{k/s}$ 可以二者的斜率 a 之比直接计算, $f_{k/s}$ 计算公式: $f_{k/s}=a_k/a_s$, 即可以参照物快速推算其余待测成分的量, 计算公式: $C_k'=A_k'/(a_s f_{k/s})$ 。式中 a_s 为参照物斜率, a_k 为其他对照组斜率。应用此法需先建立参照物的标准曲线获得其斜率 a_s 。结果柠檬酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、甘草酸单铵、蒿酮相对于没食子酸的 $f_{k/s}$ 分别为 0.015、0.416、0.417、0.416、0.516、0.517、0.513、0.095、0.641。

2.2.3 定量因子 在公式 $C_k'=A_k'/(a_s \times f_{k/s})$ 中, 当在同一实验室、同一仪器、同一色谱条件时, 特别是在药厂或药检所大量样品短期内复检时, 由于 a_s 基本一致, $f_{k/s}$ 也是固定值, 故可先以公式 $a_k=a_s f_{k/s}$ 推算出定量因子 a_k , 直接以待测样品峰面积 A_k' 即可快速推测其量。计算公式: $C_k'=A_k'/a_k$ 。可见标准曲线中各成分的斜率值实际上就是其定量因子。应用此法需首先获得 a_s 值, 并保证 a_s 值恒定。定量因子 a_k 仅对同一仪器在相同色谱条件下短期内保持恒定, 不同仪器应分别建立。另外定量因子计算所用 $f_{k/s}$ 为斜率校正法所得, 故其计算结果与斜率校正法一致。结果柠檬酸、没食子酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、甘草酸单铵、蒿酮的定量因子分别为 2.361、160.618、66.817、66.914、66.785、82.815、82.991、82.381、15.307、103.021。

2.3 $f_{k/s}$ 重现性考察

本试验考察了不同实验室的两套色谱系统 (Dionex P680 和 Agilent 1100) 及不同的色谱柱 (Kromasil C₁₈、Luna C₁₈、Platisil, 规格均为 250 mm

$\times 4.6$ mm, 5 μm) 对 $f_{k/s}$ 的影响, 结果其 RSD < 2.35%。表明 $f_{k/s}$ 在不同实验室、不同色谱系统和不同色谱柱下具有良好的重现性。

2.4 待测组份色谱峰的定位

在色谱峰的定位中, 文献报道普遍采用相对保留时间 (R_{tR}) 定位的方法。本试验发现, 在相同色谱条件下, 不同类型色谱柱, 其 R_{tR} 除柠檬酸差异较小外, 其余相对偏差 (RD) 均超过 5%, 见表 3。在这种情况下, 利用 R_{tR} 很难准确定位, 可见该法仅用于相同填料或色谱行为极为相似的色谱柱。

王龙星等通过色谱热力学分析发现在相同的分析条件下, 即使采用不同的液相色谱系统或不同的色谱柱, 组分的保留时间存在简单的线性关系^[12]。其采用已有的 5 种对照品做内标, 并计算其标准曲线, 但在一测多评试验中, 这点并不适合, 失去了一测多评的意义。参考其原理, 假设 5 个点均落在标准曲线上, 那么用 2 个点其结果与 5 个点基本一致, 而在一测多评试验中, 用 2 个点已足够。采用没食子酸和最后一个容易辨认的色谱峰 (蒿酮) 两点校正, 推导其校正方程, 利用该校正方程可以快速推测各成分理论出峰时间, 快速定位色谱峰。结果见表 4。

通过该法预测出峰时间后, 若该色谱峰临近还有其它色谱峰, 再根据紫外吸收光谱 (见图 2)、整体峰形或峰面积百分比, 即能够在一定程度上准确定位色谱峰。

2.5 一测多评法与常规法测定结果的比较

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液 10 μL , 进样测定, 记录柠檬酸、没食子酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、甘草酸单铵及蒿酮的峰面积, 分别用回

表 3 不同色谱柱的保留时间及以没食子酸为参照的相对保留时间

Table 3 Retention time (t_R) and relative retention time (Rt_R) with gallic acid as reference determined on different columns

色谱柱	t_R / min									
	柠檬酸	没食子酸	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C	甘草酸单铵	蒿酮
AkzoNobel Kromasil	6.58	10.26	19.50	23.14	23.92	33.03	34.12	35.28	44.79	54.34
Lubex Kromasil	7.83	12.23	21.03	24.53	25.24	34.27	35.48	36.44	45.00	55.40
Phenomenex Luna	8.13	12.78	21.63	25.25	25.91	34.93	36.03	37.08	45.65	54.88
Dikma Platisil	11.12	17.47	24.45	28.09	28.35	37.31	38.72	39.61	46.41	55.90

色谱柱	Rt_R									
	柠檬酸	没食子酸	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C	甘草酸单铵	蒿酮
AkzoNobel Kromasil (A)	0.64	1.00	1.90	2.26	2.33	3.22	3.33	3.44	4.37	5.30
Lubex Kromasil (L)	0.64	1.00	1.72	2.01	2.06	2.80	2.90	2.98	3.68	4.53
Phenomenex Luna (P)	0.64	1.00	1.69	1.98	2.03	2.73	2.82	2.90	3.57	4.30
Dikma Platisil (D)	0.64	1.00	1.40	1.61	1.62	2.14	2.22	2.27	2.66	3.20
L 与 A Rt_R RD / %	0	0	-9.47	-11.06	-11.59	-13.04	-12.91	-13.37	-15.79	-14.53
P 与 A Rt_R RD / %	0	0	-11.05	-12.39	-12.88	-15.22	-15.32	-15.70	-18.31	-18.87
D 与 A Rt_R RD / %	0	0	-26.32	-28.76	-30.47	-33.54	-33.33	-34.01	-39.13	-39.62

A-不带保护柱, L、P、D-带 Dikma EasyGuard II C₁₈ 保护柱

A-without protection column, L, P, D-with Dikma EasyGuard II C₁₈ protection column

表 4 不同仪器和不同色谱柱下保留时间考察结果

Table 4 Retention time on different instruments and columns

仪器	色谱柱	t_R	柠檬酸	没食子酸	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C	甘草酸单铵	蒿酮
Dionex	AkzoNobel Kromasil	$t_R(X)$	6.58	10.26	19.50	23.14	23.92	33.03	34.12	35.28	44.79	54.34
	Lubex Kromasil	实测 t_R	7.83	12.23	21.03	24.53	25.24	34.27	35.48	36.44	45.00	55.40
		预测 $t_R(Y)$ 校正方程	8.62	12.23	21.28	24.84	25.60	34.53	35.59	36.73	46.05	55.40
		$Y=0.979X+2.178$										
Phenomenex	Luna	实测 t_R	8.13	12.78	21.63	25.25	25.91	34.93	36.03	37.08	45.65	54.88
		预测 $t_R(Y)$ 校正方程	9.26	12.78	21.60	25.08	25.82	34.53	35.56	36.67	45.75	54.88
		$Y=0.955X+2.978$										
		RD / %	10.09	0	1.19	1.26	1.43	0.76	0.31	0.80	2.33	0
Dikma	Platisil	实测 t_R	11.12	17.47	24.45	28.09	28.35	37.31	38.72	39.61	46.41	55.90
		预测 $t_R(Y)$ 校正方程	14.26	17.47	25.52	28.70	29.37	37.32	38.27	39.28	47.57	55.90
		$Y=0.872X+8.523$										
		RD / %	28.24	0	4.38	2.17	3.60	0.03	-1.16	-0.83	2.50	0
Agilent	AkzoNobel Kromasil	实测 t_R	6.67	10.35	19.65	23.28	24.06	33.11	34.30	35.37	44.91	54.51
		预测 $t_R(Y)$ 校正方程	6.66	10.35	19.61	23.26	24.03	33.17	34.25	35.42	44.95	54.51
		$Y=1.002X+0.073$										
		RD / %	-0.15	0	-0.20	-0.09	-0.12	0.18	-0.15	0.14	0.09	0
Phenomenex	Luna	实测 t_R	8.25	12.89	21.74	25.36	26.02	35.04	36.15	37.20	45.76	54.99
		预测 $t_R(Y)$ 校正方程	9.37	12.89	21.72	25.19	25.93	34.64	35.67	36.79	45.87	54.99
		$Y=0.955X+3.093$										
		RD / %	13.58	0	-0.09	-0.67	-0.35	-1.14	-1.33	-1.10	0.24	0

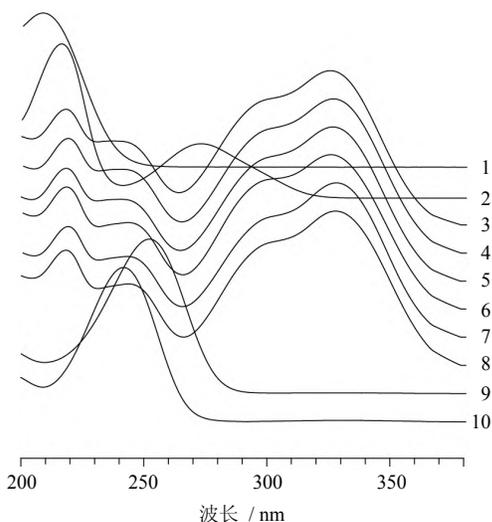


图2 对照品紫外吸收光谱图

Fig. 2 UV absorption spectra of reference substances

表5 双青咽喉片中10种成分不同方法定量测定结果 ($n=3$, $RSD < 2\%$)

Table 5 Determination of 10 constituents in Shuangqing Yanhou Tablets by different methods ($n=3$, $RSD < 2\%$)

批号	定量方法	成分量 / ($\text{mg} \cdot \text{片}^{-1}$)									
		柠檬酸	没食子酸	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C	甘草酸单铵	蒿酮
110503	外标法	11.134	0.611	2.051	4.114	2.165	2.135	0.987	2.047	7.176	1.066
	回归方程法	11.163	0.615	2.064	4.136	2.168	2.129	0.995	2.044	7.184	1.070
	一测多评多点校正	11.088	0.611	2.055	4.119	2.161	2.122	0.990	2.031	7.142	1.062
	一测多评斜率校正	11.145	0.606	2.050	4.126	2.157	2.112	0.985	2.027	7.177	1.052
	一测多评定量因子	11.145	0.606	2.050	4.126	2.157	2.112	0.985	2.027	7.177	1.052
110518	外标法	11.851	0.688	2.115	4.083	2.275	2.223	1.150	2.224	7.368	1.194
	回归方程法	11.881	0.691	2.128	4.104	2.278	2.217	1.157	2.219	7.376	1.196
	一测多评多点校正	11.802	0.688	2.119	4.088	2.272	2.210	1.153	2.207	7.333	1.189
	一测多评斜率校正	11.863	0.683	2.114	4.094	2.268	2.200	1.147	2.202	7.369	1.178
	一测多评定量因子	11.863	0.683	2.114	4.094	2.268	2.200	1.147	2.202	7.369	1.178
110530	外标法	12.002	0.602	2.030	4.312	2.388	2.103	1.064	2.173	7.322	1.155
	回归方程法	12.032	0.607	2.043	4.334	2.390	2.098	1.071	2.168	7.329	1.157
	一测多评多点校正	11.952	0.602	2.034	4.317	2.384	2.090	1.067	2.156	7.287	1.150
	一测多评斜率校正	12.014	0.598	2.029	4.324	2.380	2.081	1.062	2.151	7.322	1.140
	一测多评定量因子	12.014	0.598	2.029	4.324	2.380	2.081	1.062	2.151	7.322	1.140

2. 为使测定各成分均在其最大吸收波长下进行测定, 提高分析方法的灵敏度和各色谱峰的丰度, 采用分段变波长检测法对此 10 种化学成分进行测定, 根据各成分保留时间差异, 在 0~15 min 设定检测波长 215 nm, 以测定柠檬酸和没食子酸, 15~40 min 设定检测波长 326 nm 以测定绿原酸类, 40~50 min 设定检测波长 252 nm 以测定甘草酸单铵, 50~60 min 设定检测波长 241 nm 以测定蒿酮。

归方程法、外标法和 3 种一测多评法计算其量, 结果见表 5。

为确认一测多评法的准确性, 将 5 种方法定量结果分别经 Pearson 相关系数分析, 结果 5 种方法之间以及 5 种方法与其平均值之间的相关系数均大于 0.999 9, 说明 5 种方法得到的结果相似性极高。再从 5 种方法定量结果之间的 RSD 来看, 均在 1% 以内。同时经方差分析, P 值远大于 0.05, 说明 5 种方法计算结果并无显著性差异。可见一测多评法在双青咽喉片的多指标成分质量评价中应用是可行的。

3 讨论

采用二极管阵列检测器在 190~380 nm 分别扫描混合对照品溶液中各成分的紫外吸收, 结果见图

对于 $f_{k/s}$ 的计算, 文献普遍采用多点校正, 再求平均值的方法, 但该方法有个弊端, 就是如果有一两个点有较大偏差 (特别是第 1 个和最后 1 个点), 其会拖累整个平均值, 从而导致计算值出现较大误差。而采用标准曲线斜率之比计算 $f_{k/s}$, 即使有几个点有较大偏差, 其对整个标准曲线斜率影响不大, 相对于多点校正更科学合理。另外斜率校正无需逐个浓度计算 $f_{k/s}$ 求其平均值, 直接以标准曲线斜率计算,

相对更快捷。而从表 5 可见, 2 种方法所计算的结果并无显著差异。定量因子计算所用 $f_{k/s}$ 为斜率校正法所得, 故其计算结果与斜率校正法一致。由于相同浓度参照物于不同仪器其峰面积有一定差异, 特别是不同仪器峰面积计算方式不一致, 从而导致定量因子出现一定差异, 故定量因子每台仪器需单独建立。但在同一仪器、同一色谱条件, 特别是在药厂或药检所大量样品短期内复检时, 由于参照物斜率 a_s 基本恒定, 定量因子计算含量非常快捷有效。

HPLC 定量方法中一般以回归方程法计算结果最为准确, 当标准曲线的 a/b 值大于 100 时, 可采用外标一点法计算, 外标法也是应用最为普遍的定量方法。当外标法所选的浓度点越接近标准曲线, 则二者计算结果越接近。而一测多评法(斜率校正)方法中只要 a/b 值越大, 其结果同回归方程法越接近。一测多评法(多点校正)则要求每个浓度点均尽量落在标准曲线附近, 特别是最低和最高浓度点, 且每组 $f_{k/s}$ 不宜相差太大, 不然会导致平均值出现较大偏差, 从而影响计算结果。一测多评法(定量因子)同斜率校正法一样均是舍弃标准曲线中截距的计算结果, 只要 a/b 值越大, 二者计算结果越接近。

一测多评法中色谱峰的定位, 文献均采用 R_{t_R} 或保留时间差定位的方法, 但在实验中发现, 随着各色谱峰保留时间远离参照峰没食子酸, 其 R_{t_R} 的 RD 逐渐增大, 甚至超过 10%, 而保留时间差波动更大。在这种情况下, 利用 R_{t_R} 很难准确定位。可见该法仅用于相同填料或色谱行为极为相似的色谱柱。试验采用两点校正法, 以参照峰没食子酸和最后一个易辨认色谱高峰蒿酮的 t_R 推导校正方程, 采用该法可快速准确定位色谱峰, 经校正后, 推测出峰时间和实测 t_R 无明显差异, 其 RD 除柠檬酸稍大外, 其余均低于 3%, 得到明显改善(见表 3、4)。对于柠檬酸, 由于其出峰时间短, 反而不适合该法。未校正前, 其 R_{t_R} 均为 0.64, 故柠檬酸可单独采用 R_{t_R} 校正。在选择两点法的 2 个点时, 为保证计算结果的准确性, 取点不宜太近, 也不宜偏向一方, 应在前后各选一点。若相邻色谱峰过多或部分色谱峰理论 t_R 和实测 t_R 差异较大, 可将已定位色谱峰加

入标准曲线。增加选点数, 会提高推测的准确性。另外, 对于同一仪器同一色谱柱, 在加减保护柱和不同时间检测遇到的 t_R 的整体漂移, 采用两点校正也远比采用 R_{t_R} 校正, 其 RD 要低得多。另外, 由于色谱图均以 t_R 标示色谱峰, 若采用 R_{t_R} 校正, 需逐个色谱峰计算 R_{t_R} , 再在色谱图上寻找相应 R_{t_R} 的 t_R , 或将色谱峰重新以 R_{t_R} 标记, 操作繁琐。而两点法校正得到的结果为 t_R , 可在色谱图上直接辨认, 直观明了。

参考文献

- [1] 熊 瑛, 李国平, 欧小毅, 等. 双青咽喉片治疗咽喉疾病的疗效观察 [J]. 泸州医学院学报, 1999, 22(5): 404-405.
- [2] 陈 俊. 金银花提取物的物质基础和制备工艺研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [3] 何 兵, 田 吉, 李春红, 等. HPLC 同时测定双青咽喉片中 3 种活性成分的含量 [J]. 中国药学杂志, 2008, 43(19): 1507-1510.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 尹 萌, 孟月兰, 闻俐毓. 关黄柏中生物碱类成分的“一测多评” [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1093-1096.
- [7] 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.
- [8] 罗祖良, 仇 峰, 韦日伟, 等. 相对校正因子在中药多指标测定中的应用研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1448-1452.
- [9] 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.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [11] 泸州医学院. 一种治疗咽喉口腔疾病的药物组合物与其制备工艺: 中国, CN200510021920.2 [P]. 2006-05-17.
- [12] 王龙星, 肖红斌, 梁鑫淼. 一种提高色谱指纹谱保留时间重现性的新方法 [J]. 分析化学, 2003, 31(10): 1232-1236.