

# 一测多评法测定蒙成药三子散中 4 种成分的含量

何春龙, 白玉琴, 雷露静, 王焕芸\*

内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110

**摘要:** 采用高效液相色谱法(HPLC), 以栀子苷为对照品, 外标法测定其在三子散中的量, 并分别测定栀子苷与没食子酸、绿原酸、诃黎勒酸的相对校正因子, 并通过相对校正因子计算后三种成分的含量, 实现一测多评; 同时, 采用外标法测定三子散中没食子酸、绿原酸、诃黎勒酸的含量, 并比较 2 种方法所得计算结果的差异, 10 批三子散中 4 种成分的外标法测定结果与相对校正因子法计算结果无显著性差异, 说明一测多评法可以应用于三子散的多指标质量评价。

**关键词:** 一测多评法; 三子散; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.5.015

## Determination of Four Components in Mongolian Medicine Sanzisan by Quantitative Analysis of Multi-components via Single Marker Method

HE Chun-long, BAI Yu-qin, LEI Lu-jing, WANG Huan-yun\*

*Department of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China*

**Abstract:** In this study, a new strategy for quantitative analysis of multi-components via single marker(QAMS) was developed and validated to analyze four components (geniposide, gallic acid, chlorogenic acid and chebulagic acid) in Sanzisan by HPLC. The QAMS method was based on the relative correction factor(RCF) between each analyte and single standard within certain concentration ranges. In the present study, geniposide was selected as the internal reference substance. The RCFs values between geniposide and the other three components were investigated using three different types of chromatographic columns. The content of other three components were calculated by RCFs, respectively. Meanwhile, the content of the four analytes was also determined by a conventional external standard method to compare with QAMS method. Finally, the relative error which were all under 3% revealed that there was no significant difference between the QAMS method and the external standard method. The QAMS method established in this study solved the problem of the availability and high cost of some standard substances, and would be useful for providing an efficient and feasible quality assessment method for Sanzisan.

**Key words:** quantitative analysis of multi-components via single marker method; Sanzisan; high performance liquid chromatography

三子散, 蒙药名为图喜木勒-3, 系由诃子、川楝子、栀子 3 味药材组成的复方制剂, 是常用的蒙古族验方, 最早收载于《四部医典》。该方具有清热、凉血、解毒功能, 主要用于温热, 眩晕, 头痛, 血热, 新久热等病症。中蒙药材及其复方制剂化学成分的多样性、复杂性及作用机制的模糊性决定了仅对其中某单一成分或指标进行控制, 是难以反映中蒙药多效性和整体性特点的, 因此, 通过多指标同步控制来反应中蒙药质量已成为趋势。而在实际应用过程中,

多指标含量测定的质量评价模式必须有足够多的对照品, 但由于中蒙药对照品的分离难度大, 单体不稳定, 或价格昂贵等因素, 使对照品获得困难<sup>[1]</sup>。一测多评法 (quantitative analysis of multi-components via single marker method, QAMS)<sup>[2,3]</sup> 是利用药物各有效成分内在的函数和比例关系, 通过测定其中一个经典易得的成分并计算相对校正因子来测定其他成分的含量。现代研究发现, 三子散方中的栀子含有 40 余种活性物质, 而国内外公认的栀子有效成分为环烯醚萜类成分, 其中含量最高的为栀子苷<sup>[4]</sup>, 其中的绿原酸成分也因其广泛的生物活性成为国内外学者的研究热点之一<sup>[5]</sup>, 而复方中另一位药材诃

子中的酚酸类成分则是诃子发挥药理活性的主要组分<sup>[6]</sup>。三子散现收载于《中国药典》(2015年版)<sup>[7]</sup>,含量测定项下仅以高效液相法测定了方中诃子苷的含量,本研究建立了只需诃子苷对照品,就可对方中没食子酸、绿原酸、诃黎勒酸的含量进行质量控制的一测多评方法,为三子散的质量控制提供了新思路。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Dionex UltiMate3000 高效液相色谱仪(Thermo-Fisher 公司,美国),二极管阵列检测器;AL204 型万分之一电子天平、AB135-S 型十万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);KQ-250DA 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司;100W,40KHz)。

### 1.2 试剂

三子散(内蒙古中蒙医院,批号:150506、150516、150605;呼和浩特中蒙医院,批号:150518、150530、150616;实验室自制,批号:20150610、20150615、20150620、20150625);三子散自制所需诃子、川楝子、诃子3味药材均经内蒙古医科大学药学院生药学教研室渠弼教授鉴定为正品;没食子酸(中国食品药品检定研究院,批号110831-200302,纯度98%);绿原酸(阿拉丁试剂公司,批号L1425027,纯度98%);诃子苷(中国食品药品检定研究院,批号110749-200512,纯度98%);诃黎勒酸(上海源叶生物科技有限公司,批号Z06D5B2,纯度98%),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

SHIMADZU C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A相)、0.1% 磷酸溶液(B相),梯度洗脱:0~70 min,4%~18% A;流速1 mL/min;检测波长为0~20 min:270 nm,21~40 min:330 nm,41~60 min:240 nm,61~70 min:270 nm;柱温为30℃;分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各20 μL,注入液相色谱仪,测定,如图1所示。

### 2.2 溶液的制备

#### 2.2.1 混合对照品溶液的制备

取没食子酸、绿原酸、诃子苷、诃黎勒酸对照品

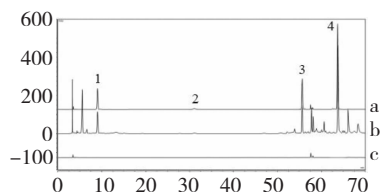


图1 混合对照品(a)、三子散样品(b)和空白样品(c)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed standards(a), sample(b) and blank(c)

1 没食子酸;2 绿原酸;3 诃子苷;4 诃黎勒酸

1 Gallic acid;2 Chlorogenic acid;3 Gardenoside;4 Chebulagic acid

适量于5 mL 容量瓶中,精密称定,加50%乙腈溶解并定容至刻度,制成浓度分别为176.0、26.23、636.0、1300 μg/mL的混合对照品溶液。

#### 2.2.2 供试品溶液的制备

取三子散约0.7 g,精密称定,置100 mL具塞锥形瓶中,精密加50%乙腈25 mL,称定重量,超声处理30 min(100 W,40 KHz)后,放冷,再称定重量,用50%乙腈补足减失的重量,摇匀,滤过。精密量取续滤液3 mL,置10 mL容量瓶中,加50%乙腈至刻度,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

### 2.3 方法学考察

#### 2.3.1 线性关系考察

分别精密吸取2.2.1项下混合对照品溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL于5 mL容量瓶中,各加50%乙腈至刻度,摇匀。按2.1项下色谱方法分别进样,记录各指标成分峰面积,以各成分浓度C(μg/mL)为横坐标,峰面积A为纵坐标绘制标准曲线,各成分回归方程及线性范围见表2。

#### 2.3.2 精密度实验

取三子散供试品溶液(批号:150506),按2.1项下色谱条件连续进样6次,记录各成分色谱峰峰面积,计算RSD值,结果没食子酸RSD=0.47%、绿原酸RSD=0.69%、诃子苷RSD=0.37%、诃黎勒酸RSD=0.29%,4个成分峰面积RSD均小于2%,表明仪器精密度良好。

#### 2.3.3 稳定性实验

取三子散供试品溶液(批号:150506),按2.1项下色谱方法分别于0、3、6、9、12、24 h进样,记录各成分色谱峰峰面积,计算RSD值,结果没食子酸RSD=1.28%、绿原酸RSD=1.42%、诃子苷RSD=0.15%、诃黎勒酸RSD=0.25%,各成分峰面积RSD值均小于2%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

表1 回归方程和线性范围  
Table 2 Regression equation and linearity

成分名称 Components	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient( <i>r</i> )	线性范围 Linearity(μg/mL)
没食子酸 Gallic acid	$A = 0.6425C + 0.3174$	0.9995	7.040 ~ 42.24
绿原酸 Chlorogenic acid	$A = 0.6200C - 0.0490$	0.9995	1.049 ~ 6.296
栀子苷 Gardenoside	$A = 0.3277C + 0.9133$	0.9995	25.44 ~ 152.6
诃黎勒酸 Chebulagic acid	$A = 0.4103C - 0.5936$	0.9997	52.00 ~ 312.0

### 2.3.4 重复性实验

取供试品(批号:150506)6份,每份约0.7 g,精密称定,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件分别测定,记录各指标成分的峰面积,计算含量并计算RSD值,结果没食子酸平均含量为4.9019 mg/g, RSD = 1.70%;绿原酸,0.3125 mg/g, RSD = 1.82%;栀子苷 13.9958 mg/g, RSD = 1.96%;诃黎勒酸 31.0525 mg/g, RSD = 1.53%;各成分含量RSD值均小于2%,表明该方法重复性良好。

### 2.3.5 加样回收率实验

取已知含量的供试品(批号:150506)6份,每份0.35 g,精密称定,分别加入一定量的没食子酸、绿原酸、栀子苷、诃黎勒酸对照品,按2.2.2项下方法分别制备供试品溶液,并按2.1项下方法测定,记录各色谱峰峰面积,计算回收率及RSD值,结果没食子酸、绿原酸、栀子苷、诃黎勒酸的回收率均值分别为102.8%、101.8%、100.8%、99.60%,RSD分别为1.68%、1.75%、1.73%、0.32%,表明该方法准确性良好,结果见表3。

表3 回收率试验结果  
Table 3 The results of recovery test

成分名称 Components	称样量 Weight(g)	样品含量 Sample content(mg)	加入量 Added amount(mg)	测得量 Measured amount(mg)	回收率 Recovery(%)	平均回率 Average recovery(%)	RSD(%)
没食子 Gallic acid	0.3503	1.7171	1.72	3.4769	102.31	102.8	1.68
	0.3501	1.7161	1.72	3.5119	104.41		
	0.3502	1.7166	1.71	3.4244	99.87		
	0.3503	1.7171	1.71	3.4823	103.23		
	0.3503	1.7171	1.72	3.4787	102.42		
	0.3501	1.7161	1.71	3.5042	104.57		
绿原酸 Chlorogenic acid	0.3503	0.1098	0.11	0.2191	99.36	101.8	1.75
	0.3501	0.1097	0.11	0.2244	104.27		
	0.3502	0.1098	0.11	0.2214	101.45		
	0.3503	0.1098	0.11	0.2204	100.54		
	0.3503	0.1098	0.11	0.2232	103.09		
	0.3501	0.1097	0.11	0.2225	102.54		
栀子苷 Gardenoside	0.3503	4.9027	4.95	9.8370	99.68	100.8	1.73
	0.3501	4.8999	4.91	9.9692	103.24		
	0.3502	4.9013	4.90	9.8668	101.34		
	0.3503	4.9027	4.91	9.8198	100.14		
	0.3503	4.9027	4.89	9.7208	98.53		
	0.3501	4.8999	4.88	9.8917	102.29		
诃黎勒酸 Chebulagic acid	0.3503	10.8777	10.84	21.6383	99.27	99.60	0.32

成分名称 Components	称样量 Weight (g)	样品含量 Sample content (mg)	加入量 Added amount (mg)	测得量 Measured amount (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回率 Average recovery (%)	RSD (%)
	0.3501	10.8715	10.80	21.6296	99.61		
	0.3502	10.8746	10.76	21.6775	100.12		
	0.3503	10.8777	10.76	21.5716	99.38		
	0.3503	10.8777	10.81	21.6665	99.80		
	0.3501	10.8715	10.79	21.5985	99.42		

## 2.4 相对校正因子的建立

### 2.4.1 相对校正因子的计算

计算公式为:

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

式中  $f_i$  为待测组分校正因子,  $f_s$  为内参物校正因子,  $A_i$  为待测组分峰面积,  $C_i$  为待测组分浓度,  $A_s$

为内参物峰面积,  $C_s$  为内参物浓度, 按上述公式计算相对校正因子。

取 2.3.1 项下混合对照品溶液 1~6 号, 按 2.1 项下色谱条件分析, 记录各成分峰面积, 以梔子苷为内标, 分别计算没食子酸、绿原酸、诃黎勒酸相对于梔子苷的相对校正因子, 结果见表 4。

表 4 相对校正因子结果

Table 4 The results of relative correction factor

编号 No.	相对校正因子 Relative correction factor		
	$f_{\text{没食子酸/梔子苷}}$	$f_{\text{绿原酸/梔子苷}}$	$f_{\text{诃黎勒酸/梔子苷}}$
1	1.9056	1.6609	1.1148
2	1.9152	1.7321	1.1456
3	1.9321	1.7399	1.2134
4	1.9381	1.7745	1.2028
5	1.9556	1.8443	1.2197
6	1.9439	1.8423	1.2244
平均值 Average	1.9317	1.7657	1.1868
RSD (%)	0.96	4.00	3.83

### 2.4.2 不同色谱柱对相对校正因子的影响

本研究采用 Dionex UltiMate3000 高效液相色谱仪, 分别考察 SHIMADZU  $C_{18}$  色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m)、安捷伦不同键合工艺的 Agilent Extend- $C_{18}$  色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m)、Agilent Eclipse Plus- $C_{18}$  色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m) 对各成分相对校正因子的影响, 结果: 不同色谱柱各成分相对校正因子 RSD 均小于 3%, 表明用不同色谱柱得出的相对校正因子无显著性差异。

### 2.4.3 待测成分色谱峰的定位

实现多成分一测多评的前提是待测成分色谱峰准确定位, 通常所用方法为相对保留时间定位或利用保留时间差值定位。相对保留时间即计算待测成分  $i$  与内参物  $s$  保留时间的比值, 计算公式为  $t_{r,i} = t_i/t_s$ ; 保留时间差即计算待测成分  $i$  与内参物  $s$  保

留时间的差值, 计算公式?  $t_{r,i} = t_i - t_s$ 。本研究在对比后选择相对保留时间色谱峰定位方式: 在 Dionex UltiMate3000 及 SHIMADZU LC20 两台色谱仪上分别用三种不同色谱柱考察了各待测峰相对保留时间重现性, 结果各成分相对保留时间 RSD 均小于 3%, 表明相对保留时间法波动较小, 较稳定, 故选择用相对保留时间法进行峰定位。

## 2.5 一测多评法 (QAMS) 与外标法测定结果比较

取 10 批不同批次三子散, 按 2.1 项下色谱条件进样, 记录各待测成分保留时间及峰面积, 用外标法测定各成分含量, 再与 QAMS 法计算得到的含量比较, 用相对误差评价两种方法含量测定结果的差异, 结果两种方法含量测定结果相对误差均小于 3%, 表明两者无显著性差异, 建立的三子散中 4 种指标成分的一测多评法准确性良好, 见表 5。

表5 外标法与 QAMS 法测定三子散中四种成分结果比较

Table 5 Comparison of external standard method and QAMS method for the determination of 4 components in Sanzisan

批号 Batch No.	栀子苷 Gardenoside		没食子酸 Gallic acid		绿原酸 Chlorogenic acid			河黎勒酸 Chebulagic acid		
	a	a	b	c	a	b	c	a	b	c
1	12.6467	4.6063	4.6151	0.19	0.3042	0.3003	-1.28	31.5249	32.3464	2.61
2	12.8100	4.7884	4.7952	0.14	0.3133	0.3095	-1.21	32.3727	33.2211	2.62
3	12.5747	4.7638	4.7709	0.15	0.3081	0.3043	-1.23	32.1979	33.0408	2.62
4	12.6091	4.7681	4.7751	0.15	0.3035	0.2996	-1.28	31.2166	32.0284	2.60
5	13.1596	4.9057	4.9112	0.11	0.3247	0.3211	-1.11	32.4829	33.3347	2.62
6	12.9028	4.8411	4.8473	0.13	0.3207	0.3171	-1.12	31.9869	32.8231	2.61
7	12.5476	4.8866	4.8923	0.12	0.3257	0.3222	-1.07	32.3212	33.1680	2.62
8	12.7739	4.6859	4.6938	0.17	0.3024	0.2985	-1.29	30.9636	31.7673	2.60
9	12.7633	4.6820	4.6899	0.17	0.2953	0.2912	-1.39	32.6429	33.4999	2.63
10	12.8790	4.7939	4.8007	0.14	0.3048	0.3009	-1.28	32.8224	33.6851	2.63

注:a:外标法(mg/g);b:QAMS(mg/g);c:相对误差=(b-a)/a×100%。

Note:a:external standard method(mg/g);b:quantitative analysis of multi-components via single marker method(mg/g);c:relative error=(b-a)/a×100%.

### 3 讨论与结论

研究初始,根据文献报道<sup>[8]</sup>,我们选择以甲醇为溶剂分别溶解4种对照品,发现河黎勒酸对照品的色谱图显示有杂峰,且峰面积微小;尝试以蒸馏水为溶剂,出现同样的问题。后选用50%乙腈为溶剂,色谱图显示河黎勒酸成分峰面积较大,且杂峰微小,同时其他三种成分的峰面积与在甲醇中溶解时无明显差异,故选用50%乙腈做为溶剂溶解混合对照品。

本研究考察了以乙腈-0.1%磷酸水、乙腈-0.2%磷酸水为流动相;不同柱温(25、30、35℃),不同进样量(10、20 μL),在保证各色谱峰分离度的前提下,尽量缩短分析时间,确定最终条件为乙腈-0.1%磷酸水溶液梯度洗脱,柱温30℃,进样量20 μL。

在检测波长的选择上,分别兼顾各待测成分的最大吸收波长,没食子酸的最大吸收波长为270 nm,绿原酸的最大吸收波长为330 nm,栀子苷的最大吸收波长为240 nm,河黎勒酸的最大吸收波长为270 nm,故波长采用时间梯度。“一测多评”选择内参物的标准是廉价易得,色谱峰峰面积及出峰时间稳定,栀子苷均符合以上条件,故选择栀子苷为内参物。

#### 参考文献

1 Dou ZH(窦志华), An LP(安莉萍), Shi K(施凯), et al. Quality evaluation of *Schisandra chinensis* based on combina-

tion of fingerprint and QAMS. *China J Pharm* (中国医药工业杂志), 2014, 45:1170-1173.

2 Wang ZM(王智民), Gao HM(高慧敏), Fu XT(付雪涛), et al. Multi-components quantitation by one marker new method for quality evaluation of Chinese herbal medicine. *J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2006, 31:1925-1928.

3 Xie J(谢静), Xiong J(熊静), Song L(宋丽), et al. Determination of 6 catechins in tea polyphenols extract by quantitative analysis of multi-components via single marker method. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28:1568-1571.

4 Kitano A. Genipin suppression of fibrogenic behaviors of the alpha-TN4 lens epithelial cell line. *J Cataract Refract Surg*, 2006, 32:1727-1735.

5 Xi LS(席利莎), Mu TH(木泰华), Sun HN(孙红男). Progresses in the research of chlorogenic acids. *J Nucle Agric Sci* (核农学报), 2014, 28:292-301.

6 Liu F(刘芳), Qin HF(秦红飞), Liu SQ(刘松青). Progresses in the research of chemical composition and pharmacological activity of *Terminalia chebula*. *China Pharm* (中国药房), 2012, 23:670-672.

7 Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 489-490.

8 Zhang ZW(张正伟). The study on preparation technology and quality control standard of *Terminalia chebula* extraction. *Henan Coll Tradit Chin Med* (河南中医学院), 2009:43.