

一测多评法同时测定山茱萸配方颗粒中5种成分

田宇柔^{1,2,3}, 麻景梅^{1,2,3}, 王鑫国^{1,2,3}, 李军山^{2,3,4}, 牛丽颖^{1,2,3*}
(1. 河北中医学院, 河北 石家庄 050091; 2. 河北省中药配方颗粒工程技术研究中心, 河北 石家庄 050091; 3. 河北省高校中药配方颗粒应用技术研发中心, 河北 石家庄 050091; 4. 神威药业集团有限公司, 河北 石家庄 050091)

摘要: **目的** 建立一测多评法同时测定山茱萸配方颗粒(山茱萸)中5种成分的含有量。**方法** 该药物80%甲醇提取液的分析采用Wondasil C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.3%磷酸,梯度洗脱;体积流量1.0 mL/min;检测波长240 nm;柱温30℃。以莫诺苷为内标,计算没食子酸、5-羟甲基糠醛、马钱苷、山茱萸新苷的相对校正因子,再测定其含有量。**结果** 没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、山茱萸新苷分别在0.012 0~0.120、0.026 8~0.268、0.074 4~0.744、0.058 6~0.586、0.008 6~0.086 μg范围内线性关系良好($r\geq 0.999\ 9$),平均加样回收率(RSD)分别为103.43% (1.45%)、103.36% (1.50%)、104.47% (0.30%)、102.08% (1.74%)、104.01% (0.62%)。一测多评法所得结果接近于外标法。**结论** 该方法稳定可靠,可用于山茱萸配方颗粒的质量评价。

关键词: 山茱萸配方颗粒;没食子酸;5-羟甲基糠醛;莫诺苷;马钱苷;山茱萸新苷;一测多评

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)09-1845-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.09.017

Simultaneous determination of five constituents in Shanzhuyu Formulated Granules by QAMS

TIAN Yu-rou^{1,2,3}, MA Jing-mei^{1,2,3}, WANG Xin-guo^{1,2,3}, LI Jun-shan^{2,3,4}, NIU Li-ying^{1,2,3*}
(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China; 2. Hebei Provincial Engineering & Technology Research Center for TCM Formulated Granules, Shijiazhuang 050091, China; 3. Hebei Universities Application Technology Research Center for TCM Formulated Granules, Shijiazhuang 050091, China; 4. Shineway Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050091, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish a quantitative analysis of multi-components by single mark (QAMS) method for the simultaneous content determination of five constituents in Shanzhuyu Formulated Granules (*Corni Fructus*). **METHODS** The analysis of 80% methanol extract of this drug was performed on a 30℃ thermostatic Wondasil C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.3% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 335 nm. With morroniside as an internal standard, the relative correction factors of gallic acid, 5-hydroxymethylfurfural, loganin and cornuside were established, followed by the determination of their contents. **RESULTS** Gallic acid, 5-hydroxymethylfurfural, morroniside, loganin and cornuside showed good linear relationships within the ranges of 0.012 0-0.120, 0.026 8-0.268, 0.074 4-0.744, 0.058 6-0.586 and 0.008 6-0.086 μg ($r\geq 0.999\ 9$), whose average recoveries (RSDs) were 103.43% (1.45%), 103.36% (1.50%), 104.47% (0.30%), 102.08% (1.74%) and 104.01% (0.62%), respectively. The results obtained by QAMS approximated those obtained by external standard method. **CONCLUSION** This stable and reliable method can be used for the quality control of

收稿日期: 2016-12-26
基金项目: 河北省高等学校科学技术研究项目(ZD2015001);河北省中医药管理局科研计划项目(2017014)
作者简介: 田宇柔(1990—),女,硕士,助理实验师,研究方向为中药质量控制。E-mail: yuroutian@163.com
*通信作者: 牛丽颖(1968—),女,教授,硕士生导师,研究方向为中药质量及药效物质基础。Tel: (0311) 89926548, E-mail: niuliyinggy@163.com

Shanzhuyu Formulated Granules.

KEY WORDS: Shanzhuyu Formulated Granules; gallic acid; 5-hydroxymethylfurfural; morroniside; loganin; cornuside; QAMS

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc 的干燥成熟果肉，其味酸、涩，微温，归肝、肾经，具有补益肝肾，收涩固脱的功效，用于眩晕耳鸣、腰膝酸痛、阳痿遗精、遗尿尿频、崩漏带下、大汗虚脱、内热消渴^[1]。山茱萸配方颗粒是以山茱萸饮片为原料，经水煎煮提取、浓缩、喷雾干燥而制成的颗粒，克服了传统中药饮片煎煮候药时间较长、携带不方便等不足，临床应用不断扩大，疗效也不断得到验证，但关于该制剂的质量控制方法目前尚无统一标准，相关文献也较少^[2-3]。

莫诺苷与马钱苷作为山茱萸的定量指标，被收载于 2015 年版《中国药典》中，用于评价山茱萸药材和制剂质量，但中药具有多成分、多靶点的作用特点，仅靠以上 2 种成分难以真正体现和保证其内在质量。2015 年版《中国药典》已收录了一测多评法测定黄连、丹参、生姜等药材成分的含有量，很好地解决了中药化学对照品分离难度大、单体性质不稳定、供应价格高等问题，实现了中药多指标的质量评价^[4-5]。因此，本实验采用该方法同时测定山茱萸配方颗粒中没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、山茱萸新苷的含有量，探讨了该方法的可行性与适用性。

1 仪器与材料

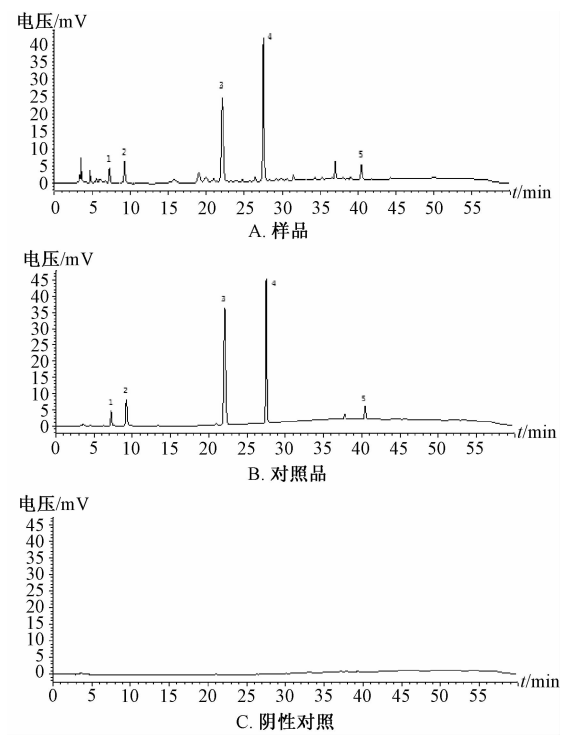
岛津高效液相色谱仪，配置 LC-15C 泵、SPD-15C 紫外检测器、SIL-10AF 自动进样器、CTO-15C 柱温箱、岛津 LC 色谱工作站；Ultimate 3000 高效液相色谱仪，配置低压三元梯度泵、自动进样器、DAD 检测器、变色龙色谱工作站（美国赛默飞公司）；TB-215D 电子天平（十万分之一，德国赛多利斯公司）；KQ-250E 超声波清洗器（250 W、40 kHz，昆山市超声仪器有限公司）。

莫诺苷（批号 151215，含有量≥98%）、马钱苷（批号 15110202，含有量≥98%）、山茱萸新苷（批号 151120，含有量≥98%）、5-羟甲基糠醛（批号 160126，含有量≥98%）、没食子酸（批号 151009，含有量≥98%）对照品均购自成都普菲德生物技术有限公司。山茱萸配方颗粒共 12 批，分别来自广东一方药业（批号 501491T、5111141、311004T）、江阴天江药业有限公司（批号 1510116、1511128）、北京康仁堂药业有限公司

（批号 15025902）、深圳三九现代中药有限公司（批号 1510001W、1511001S）、四川新绿色药业科技发展股份有限公司（批号 1412046、1506097）、神威药业集团有限公司（批号 15031121、15031021）。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 Wondasil C₁₈ 色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0.3% 磷酸（B），梯度洗脱（0 ~ 11 min，7% A；11 ~ 15 min，7% ~ 11% A；15 ~ 30 min，11% ~ 22% A；30 ~ 45 min，22% ~ 25% A；45 ~ 60 min，25% A）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 240 nm。色谱图见图 1。



1. 没食子酸 2. 5-羟甲基糠醛 3. 莫诺苷 4. 马钱苷
5. 山茱萸新苷
1. gallic acid 2. 5-hydroxymethylfurfural 3. morroniside
4. loganin 5. cornuside

图 1 各成分 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.2 供试品溶液制备 精密称取样品约 0.1 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入 80% 甲醇 25 mL，称定质量，超声（250 W、40 kHz）20 min，取出，放

至室温，80% 甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.3 对照品溶液制备 精密称取没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、山茱萸新苷对照品适量，80% 甲醇制成 0.006、0.013 4、0.037 2、0.029 3、0.004 3 mg/mL 的对照品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 2、4、6、10、12、16、20 μL，注入液相色谱仪，以进样量为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，结果见表 1，表明各成分在各自范围内均呈良好的线性关系。

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents				
成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/μg	
没食子酸	$Y = 9.07 \times 10^5 X - 2.97 \times 10^2$	0.999 9	0.012 0 ~ 0.120	
5-羟甲基糠醛	$Y = 8.06 \times 10^5 X - 3.94 \times 10^2$	1.000 0	0.026 8 ~ 0.268	
莫诺苷	$Y = 1.72 \times 10^6 X + 2.21 \times 10^3$	0.999 9	0.074 4 ~ 0.744	
马钱苷	$Y = 1.51 \times 10^6 X + 1.19 \times 10^3$	0.999 9	0.058 6 ~ 0.586	
山茱萸新苷	$Y = 1.31 \times 10^6 X - 1.21 \times 10^2$	0.999 9	0.008 6 ~ 0.086	

2.4.2 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液（批号 15031121），同 1 d 内连续进样 6 次，测得没

食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、山茱萸新苷精密度 RSD 分别为 0.71%、0.46%、0.46%、0.49%、0.53%，表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液（批号 15031121），于 0、2、4、6、10、14、18、24 h 进样，每次 10 μL，测得没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、山茱萸新苷峰面积 RSD 分别为 0.54%、0.51%、0.57%、0.48%、0.82%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 取同一样品（批号 15031121），按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，测得没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、山茱萸新苷含有量 RSD 分别为 0.66%、0.62%、0.63%、0.62%、1.67%，表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取含有量已知的同一批号（批号 15031121）样品各约 0.05 g，共 6 份，按样品含有量-对照品约 1：0.8、1：1、1：1.2 的比例精密添加一定量对照品溶液，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，计算回收率，结果见表 2。

表 2 各成分加样回收率试验结果（*n* = 6）

Tab. 2 Results of recovery tests for various constituents (<i>n</i> = 6)						
成分	称样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/% (RSD/%)
没食子酸	0.050 6	0.066 2	0.057 5	0.126 5	104.87	103.43 (1.45)
	0.050 7	0.066 3	0.057 5	0.126 5	104.70	
	0.050 6	0.066 2	0.072 0	0.139 0	101.11	
	0.049 9	0.065 2	0.072 0	0.138 8	102.22	
	0.050 3	0.065 8	0.086 0	0.155 5	104.30	
	0.050 5	0.066 1	0.086 0	0.155 0	103.37	
5-羟甲基糠醛	0.050 6	0.144 6	0.126 0	0.276 4	104.59	103.36 (1.50)
	0.050 7	0.144 9	0.126 0	0.276 2	104.23	
	0.050 6	0.144 6	0.155 4	0.301 0	100.65	
	0.049 9	0.142 6	0.155 4	0.301 7	102.37	
	0.050 3	0.143 7	0.191 1	0.342 5	104.01	
	0.050 5	0.144 3	0.191 1	0.343 7	104.32	
莫诺苷	0.050 6	0.303 2	0.266 3	0.581 3	104.42	104.47 (0.30)
	0.050 7	0.303 8	0.266 3	0.581 7	104.34	
	0.050 6	0.303 3	0.328 3	0.647 0	104.70	
	0.049 9	0.299 0	0.328 3	0.640 3	103.93	
	0.050 3	0.301 5	0.395 5	0.715 3	104.64	
	0.050 5	0.302 7	0.395 5	0.717 1	104.78	
马钱苷	0.050 6	0.362 6	0.322 7	0.690 9	101.74	102.08 (1.74)
	0.050 7	0.363 3	0.322 7	0.682 9	99.04	
	0.050 6	0.362 6	0.393 6	0.762 7	101.65	
	0.049 9	0.357 6	0.393 6	0.766 4	103.88	
	0.050 3	0.360 4	0.471 9	0.850 2	103.78	
	0.050 5	0.361 9	0.471 9	0.845 2	102.43	
山茱萸新苷	0.050 6	0.051 0	0.044 9	0.097 9	104.41	104.01 (0.62)
	0.050 7	0.051 1	0.044 9	0.097 3	102.93	
	0.050 6	0.051 0	0.055 6	0.108 8	103.97	
	0.049 9	0.050 3	0.055 6	0.108 0	103.67	
	0.050 3	0.050 7	0.066 9	0.120 8	104.68	
	0.050 5	0.050 9	0.066 9	0.120 8	104.41	

2.5 相对校正因子测定

2.5.1 计算方法 取对照品溶液进样 2、6、10、16、20 μL，按公式 $f_{k/m} = f_k/f_m = W_k \times A_m / (W_m \times A_k)$ 计算相对校正因子，其中 A_k 为内标物峰面积， W_k 为内标物质量， A_m 为组分 m 峰面积， W_m 为组分 m 质量。以莫诺苷为内标，计算没食子酸、5-羟甲基糠醛、马钱苷和山茱萸新苷相对校正因子，结果见表 3。

2.5.2 重复性考察 在 2 种高效液相色谱系统和

表 3 各成分相对校正因子

Tab. 3 Relative correction factors of various constituents

进样量/μL	$f_{\text{莫诺苷/没食子酸}}$	$f_{\text{莫诺苷/5-羟甲基糠醛}}$	$f_{\text{莫诺苷/马钱苷}}$	$f_{\text{莫诺苷/山茱萸新苷}}$
2	0.510	0.459	0.879	0.737
6	0.520	0.460	0.877	0.763
10	0.523	0.464	0.878	0.763
16	0.526	0.465	0.879	0.763
20	0.526	0.467	0.879	0.763
平均值	0.521	0.463	0.878	0.758
RSD/%	1.27	0.73	0.10	1.53

3 种色谱柱上测定，计算平均值，结果见表 4。

表 4 不同仪器和色谱柱上相对校正因子

Tab. 4 Relative correction factors on different instruments and columns

仪器	色谱柱	$f_{\text{莫诺苷/没食子酸}}$	$f_{\text{莫诺苷/5-羟甲基糠醛}}$	$f_{\text{莫诺苷/马钱苷}}$	$f_{\text{莫诺苷/山茱萸新苷}}$
岛津	Wondasil C ₁₈	0.521	0.463	0.878	0.758
	依利特 C ₁₈	0.539	0.466	0.882	0.766
	Agilent C ₁₈	0.525	0.468	0.880	0.759
双三元	Wondasil C ₁₈	0.552	0.481	0.889	0.763
	依利特 C ₁₈	0.578	0.491	0.892	0.766
	Agilent C ₁₈	0.565	0.483	0.888	0.764
平均值	—	0.547	0.475	0.885	0.763
RSD/%	—	4.12	2.36	0.63	0.45

2.5.3 色谱峰定位 采用不同色谱仪器及色谱柱时，待测组分的保留时间会有所波动，文献在色谱峰定位中一般采用相对保留时间或保留时间差法^[6-12]。取“2.1.3”项下对照品溶液，分别采用 2 种高效液相色谱系统和 3 种色谱柱计算莫诺苷对没食子酸、5-羟甲基糠醛、马钱苷和山茱萸新苷的相对保留时间和保留时间差，发现没食子酸、5-羟甲基糠醛相对保留时间 RSD 分别为 11.48%、7.13%，马钱苷保留时间差 RSD 为 9.99%，表明

以上 2 种方法均不适合待测成分定位。
采用文献 [13] 方法，无论是等度分离还是梯度分离，在相同分析条件下即使采用不同高效液相色谱系统和色谱柱，组分保留时间仍存在线性关系，即分别以不同色谱柱测得的待测成分保留时间为横坐标与纵坐标，建立保留时间校对方程，将其在参照色谱柱的实测保留时间代入回归方程，计算理论保留时间，即计算值。将计算值与实测值进行比较，并以相对误差评价定位效果，结果见表 5。

表 5 不同仪器和色谱柱上保留时间

Tab. 5 Retention time on different instruments and columns

仪器	色谱柱	t_R	没食子酸	5-羟甲基糠醛	莫诺苷	马钱苷	山茱萸新苷	斜率	截距
岛津	Agilent C ₁₈	x	5.680	7.368	20.203	26.305	38.068	1.014 5	0.190 9
	依利特 C ₁₈	y	5.801	7.976	20.624	26.583	39.011	—	—
	实测值	—	7.264	9.270	22.158	27.553	40.476	—	—
	计算值	—	7.560	9.595	22.670	28.143	41.258	—	—
	相对误差	—	4.08	3.51	2.31	2.14	1.92	—	—
双三元	Agilent C ₁₈	x	5.827	7.743	19.983	25.053	36.747	1.018 3	0.207 3
	依利特 C ₁₈	y	6.103	8.383	20.323	25.427	37.887	—	—
	实测值	—	7.700	9.663	21.693	26.290	39.097	—	—
	计算值	—	8.048	10.047	22.297	26.978	40.019	—	—
	相对误差	—	4.52	3.97	2.78	2.61	2.36	—	—

2.5.4 样品含有量测定 分别采用外标法和一测多评法进行测定，平行 2 次，结果见表 6，可知 2 种方法所得结果无明显差异（RSD < 5%），表明所建立的方法具有较好的可信度。

3 讨论
3.1 检测波长选择 本实验采用 DAD 检测器对供试品溶液进行全波长扫描，发现莫诺苷、马钱苷、5-羟甲基糠醛、山茱萸新苷、没食子酸的最大吸收

表 6 各成分含有量测定结果 (mg/g, n = 2)

Tab. 6 Results of content determination of various constituents (mg/g, n = 2)

编号	莫诺昔	没食子酸		5-羟甲基糠醛		马钱苷		山茱萸新苷	
		外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法
1	13.55	1.38	1.37	1.14	1.18	8.45	8.49	1.28	1.25
2	13.38	1.33	1.32	1.21	1.25	8.30	8.33	1.27	1.24
3	12.92	1.59	1.55	1.29	1.32	8.01	8.09	1.40	1.35
4	9.95	2.39	2.41	8.40	8.43	8.21	8.25	0.91	0.88
5	9.93	2.02	2.07	8.21	8.28	8.19	8.23	0.88	0.85
6	2.43	1.02	0.98	2.42	2.49	2.37	2.40	0.21	0.20
7	8.30	2.55	2.49	5.37	5.42	12.62	12.68	1.75	1.71
8	8.33	2.62	2.68	5.56	5.62	12.65	12.73	1.73	1.68
9	2.33	0.42	0.40	2.05	2.07	3.32	3.35	0.42	0.41
10	2.42	0.43	0.41	2.09	2.12	3.45	3.49	0.44	0.46
11	6.67	1.45	1.40	3.16	3.21	7.96	8.01	1.12	1.10
12	7.12	1.55	1.53	3.21	3.26	8.12	8.16	1.24	1.21

波长分别为 240、238、284、219、273 nm。考虑谱图基线、色谱峰数目以及各待测成分色谱峰峰高、分离度，最终选择 240 nm 作为检测波长。

3.2 供试品溶液方法选择 本实验对提取溶剂（50%、70%、80%、100% 甲醇）和超声时间（10、20、30 min）进行比较，发现以 80% 甲醇超声提取 20 min 时，各成分提取率相对较高。

3.3 内标物选择 莫诺昔、马钱苷、5-羟甲基糠醛、山茱萸新苷、没食子酸在山茱萸配方颗粒中含有量较高，而且生物活性较好，故将其作为反映山茱萸配方颗粒质量的指标。其中，莫诺昔化学性质稳定，而且对照品廉价易得，故选择其作为内标物，以降低检测成本。

4 结论

本实验以山茱萸配方颗粒为研究对象，通过方法学验证、相对校正因子确认、重复性考察、色谱峰定位、准确性评价，对一测多评技术的可行性与适用性进行探讨，发现该方法所得结果与外标法无明显差异，具有较高的重复性、稳定性及可信度，可为山茱萸配方颗粒的质量评价提供参考依据。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 27-28.

[2] 郑峙云, 张茂婷, 蒋晓静, 等. 山茱萸配方颗粒的质量研究[J]. 安徽中医药大学学报, 2016, 35(2): 88-90.

[3] 赵 蓉. HPLC 法测定山茱萸配方颗粒中马钱苷的含量[J]. 黑龙江医药, 2007, 20(6): 554-555.

[4] 王智民, 钱忠直, 张启伟, 等. 一测多评法建立的技术指南[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 657-658.

[5] 孙立磊, 包永睿, 孟宪省, 等. 一测多评法同时测定川芎中 5 种成分[J]. 中成药, 2016, 38(11): 2503-2505.

[6] 梅国荣, 刘 飞, 王 福, 等. 一测多评法测定决明子中橙黄决明素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚[J]. 中草药, 2016, 47(8): 1392-1396.

[7] 赵 倩, 冯伟红, 张启伟, 等. “一测多评”法用于栀子金花丸多成分含量测定的可行性研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(10): 1826-1833.

[8] 黄群莲, 罗 颖, 李 芹, 等. “一测多评”含量测定法对黄柏配方颗粒与黄柏饮片适用性研究[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(16): 1470-1474.

[9] 陈 静, 王淑美, 孟 江, 等. 一测多评法测定苦参中 5 种生物碱的含量[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(9): 1406-1410.

[10] 吴明侠, 侯珊珊, 张东霞, 等. 一测多评法同时测定野菊花中 5 种有机酸[J]. 中成药, 2016, 38(11): 2423-2427.

[11] 胡 攀, 夏厚林, 文冰杰, 等. HPLC-DAD 法和一测多评法同时测定安息香中 4 种成分[J]. 中成药, 2016, 38(6): 1274-1278.

[12] 刘 圆, 魏惠珍, 龚建平, 等. 一测多评法测定健脾丸中 4 种黄酮类成分[J]. 中成药, 2015, 37(5): 995-999.

[13] 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.