

一测多评法同时测定蒙药扎冲十三味丸中 8 种成分

宝鲁尔¹, 王 徽¹, 吴杰斯², 白塔那², 陈红梅², 王秀兰^{1*}

1. 内蒙古民族大学蒙医药学院, 内蒙古 通辽 028000

2. 内蒙古民族大学附属医院, 内蒙古 通辽 028000

摘要: 目的 建立测定蒙药扎冲十三味丸中 8 种成分(没食子酸、绿原酸、沉香四醇、鞣花酸、丁香酚、 α -细辛脑、 β -细辛醚、甘草酸铵)含量的一测多评(QAMS)方法。方法 采用 HPLC 法, 以 Inertsil ODS-3 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长: 0~7 min, 271 nm; 7~20 min, 252 nm; 20~28 min, 254 nm; 28~33 min, 281 nm; 33~45 min, 257 nm; 45~55 min, 237 nm; 以丁香酚为内参物, 建立与其他 7 种待测成分的相对校正因子($f_{s/i}$), 并采用 2 台不同高效液相色谱仪和 3 根不同色谱柱对所建立的 $f_{s/i}$ 进行耐用性考察, 从而用 QAMS 法测定各待测成分的含量。同时采用外标法测定 3 个批次蒙药扎冲十三味丸中 8 种成分的含量, 比较 2 种方法测定的结果, 并验证所建立一测多评法的准确性。结果 蒙药扎冲十三味丸中没食子酸、绿原酸、沉香四醇、鞣花酸、 α -细辛脑、 β -细辛醚、甘草酸铵 7 种成分的 $f_{s/i}$ 重现性良好, 分别为 0.433 4、1.068 3、0.505 6、0.141 6、0.429 0、0.346 2、1.748 8。一测多评法与外标法测定结果无显著性差异。结论 以丁香酚为内参物, 所建立的一测多评法方便快捷, 结果准确可靠, 可用于蒙药扎冲十三味丸多指标成分质量控制, 为蒙药扎冲十三味丸的质量评价提供参考。

关键词: 蒙药扎冲十三味丸; 一测多评法; 相对校正因子; 没食子酸; 绿原酸; 沉香四醇; 鞣花酸; 丁香酚; α -细辛脑; β -细辛醚; 甘草酸铵

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)11-3249-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.11.012

Simultaneous determination of eight components in Zhachong Shisanwei Pills by QAMS

BAO Lu-er¹, WANG Hui¹, WU Jie-si², BAI Ta-na², CHEN Hong-mei², WANG Xiu-lan¹

1. School of Mongolia Medicine and Pharmacy, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China

2. Institute of Clinical Pharmacology of Traditional Mongolian Medicine, Tongliao 028000, China

Abstract: Objective Using eugenol as internal reference material to establish a method for the determination of eight components (gallic acid, chlorogenic acid, agarotetraol, ellagic acid, eugenol, β -asarone, α -asarone, and ammonium glycyrrhizinate) in Mongolian medicine Zhachong Shisanwei Pills (ZSP) by QAMS method. **Methods** An inertsil ODS-3 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m), methanol-0.1% phosphoric acid solution as mobile phase, gradient elution, column temperature of 30 $^{\circ}$ C, flow rate of 1.0 mL/min, detection wavelength: 0—7 min, 271 nm; 7—20 min, 252 nm; 20—28 min, 254 nm; 28—33 min, 281 nm; 33—45 min, 257 nm; 45—55 min, 237 nm. The relative correction factors ($f_{s/i}$) were established with the other 7 components to be measured using eugenol as the internal reference, and the durability of the established $f_{s/i}$ was investigated by using two different HPLC instruments and three different columns, so that the content of each component to be measured could be determined by QAMS method. At the same time, the external standard method was used to determine the contents of eight components in three batches of ZSP. The results of the two methods were compared, and the accuracy of the established one-test-multi-assessment method was verified. **Results** The relative correction factors of gallic acid, chlorogenic acid, agar tetraol, ellagic acid, β -asarone, α -asarone and ammonium glycyrrhizinate in

收稿日期: 2021-02-01

基金项目: 国家重点研发计划项目: 蒙医防治优势病种经典方药研发平台及质量体系建设和示范研究(2018YFC1708200); 内蒙古自治区科技重大专项(2019ZD004); 内蒙古自治区人民政府蒙医药标准化项目(2020-MB019)

作者简介: 宝鲁尔(1989—), 女, 蒙古族, 内蒙古通辽人, 硕士研究生, 研究方向为蒙药有效物质基础及药理研究。E-mail: baoluer220@163.com

***通信作者:** 王秀兰(1963—), 女, 蒙古族, 内蒙古通辽人, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事蒙药有效物质基础及药理研究工作。

E-mail: tlmwsl@163.com

ZSP were reproducible with good reproducibility, which were 0.433 4, 1.068 3, 0.505 6, 0.141 6, 0.429 0, 0.346 2, and 1.748 8, respectively. There was no significant difference between the results of multiple evaluation method and external standard method.

Conclusion With eugenol as the internal reference material, the established method is convenient, rapid, accurate and reliable, which can be used for the quality control of Mongolian medicine ZSP.

Key words: Zhachong Shisanwei Pills; quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS); relative correction factor; gallic acid; chlorogenic acid; agarotetro; ellagic acid; eugenol; β -asarone; α -asarone; ammonium glycyrrhizinate

扎冲十三味丸 (Zhachong Shisanwei Pills, ZSP)

又名嘎日迪十三味丸、十三味麝香丸、十三味大鵬金翅丸、扎冲朱素木,在蒙医临床上使用历史较长,此方由木香、诃子、甘草、麝香、肉豆蔻、制草乌、石菖蒲、丁香、沉香、珍珠(制)、磁石(煅)、禹粮土、珊瑚(制)共13味单药组成,具有除“协日乌素”、镇静安神、祛风通窍、舒筋活血功效,用于左痰右疾、手脚麻痺、腰腿不利、言语不清、口眼歪斜、神经麻痺、半身不遂、筋骨疼痛、关节疼痛、风湿^[1]。临床上用于治疗缺血性脑血管病(白脉病)、风湿性关节炎(协日乌素病)、面肌痉挛、周围性神经麻痺、坐骨神经痛、冠心病心绞痛等疾病^[2-4]。

蒙药是蒙古族历代蒙医经典医籍传承的宝贵财富,具有独特的功效。近几年研究蒙药复方的学者和研究人员逐渐增多,同时,为了顺应国际和国内的用药需求,对蒙药复方的质量控制也不再是单一成分的含量测定,而通过对多成分同时测定实现蒙药复方的多指标质量评价。一测多评法(quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS)是一种采用1个成分来实现对多个成分同步监控的有效方法,近年来在蒙药复方制剂多指标成分定量测定中得到广泛应用。本实验采用QAMS法同时测定ZSP中主要活性成分没食子酸、鞣花酸、绿原酸、丁香酚、 β -细辛醚、 α -细辛脑、甘草酸铵、沉香四醇的含量,为蒙药ZSP的多指标质量控制提供实验依据和参考方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 Infinity II 型高效液相,美国Agilent科技有限公司;Agilent Zorbax SB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); Inertsil ODS-3 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); BDS Hypersil™ C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);岛津 LC-20A (20A) 型高效液相,日本岛津科技有限公司;QUINTIX35-1CN 型十万分之一电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;KQ-300VDY 型医用超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

1.2 材料

ZSP, 9 个批次,批号 1908003、1908005、1908008、1909010、1909011、1909016、1911004、1911005、1911006,内蒙古奥特奇蒙药股份有限公司。对照品没食子酸(批号 110831-201605,质量分数 90.8%)、绿原酸(批号 110753-200413,质量分数 99.3%)、鞣花酸(批号 111959-201903,质量分数 88.8%)、沉香四醇(批号 111980-201904,质量分数 98.6%)、丁香酚(批号 110725-201917,质量分数 99.1%)、甘草酸铵(批号 110731-201619,质量分数 93.0%)、 α -细辛脑(批号 100298-201203,质量分数 100.0%)、 β -细辛醚(批号 112018-201802,质量分数 99.3%)均购于中国食品药品检定研究院。甲醇为色谱纯;水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

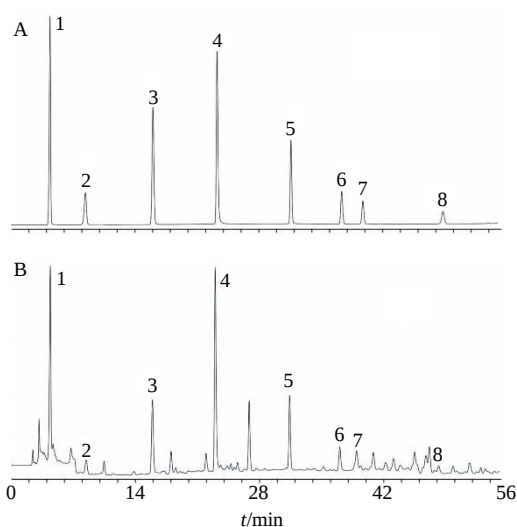
2 方法与结果

2.1 HPLC 定量方法

2.1.1 色谱条件 Inertsil ODS-3 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m),流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液,梯度洗脱:0~7 min, 30%甲醇;7~20 min, 30%~51%甲醇;20~28 min, 51%~59%甲醇;28~55 min, 59%~75%甲醇;检测波长为0~7 min, 271 nm(没食子酸);7~20 min, 252 nm(绿原酸、沉香四醇);20~28 min, 254 nm(鞣花酸);28~33 min, 281 nm(丁香酚);33~45 min, 257 nm(β -细辛醚、 α -细辛脑);45~55 min, 237 nm(甘草酸铵);体积流量 1.0 mL/min;柱温 30 $^{\circ}$ C;进样量 7 μ L。该色谱条件下对照品及样品色谱图见图 1。

2.1.2 混合对照品溶液制备 分别精密量取没食子酸、绿原酸、沉香四醇、鞣花酸、丁香酚、 β -细辛醚、 α -细辛脑、甘草酸铵对照品储备液适量,混合均匀,加甲醇进行稀释,制成含没食子酸 0.184 mg/mL、绿原酸 0.116 mg/mL、沉香四醇 0.167 mg/mL、鞣花酸 0.063 mg/mL、丁香酚 0.207 mg/mL、 β -细辛醚 0.042 mg/mL、 α -细辛脑 0.025 mg/mL、甘草酸铵 0.094 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液制备 精密称取样品 2.0 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称定



1-没食子酸 2-绿原酸 3-沉香四醇 4-鞣花酸 5-丁香酚 6-β-细辛醚 7-α-细辛脑 8-甘草酸铵
1-gallic acid 2-chlorogenic acid 3-agarotetrol 4-ellagic acid 5-eugenol 6-β-asarone 7-α-asarone 8-ammonium glycyrrhizinate

图 1 混合对照品 (A) 和 ZSP 样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and ZSP sample (B)

质量, 超声 35 min, 放冷至室温, 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.1.4 线性关系考察 将“2.1.2”项下混合对照品溶液按照“2.1.1”项下色谱条件分别进样 0.5、2.0、3.5、5.0、6.5、8.0 μL, 记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y), 对照品质量为横坐标 (X) 进行线性回归, 各组分的回归方程及相关系数见表 1。可见该方法在试验范围内线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液, 以“2.1.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 记录峰面积, 没食子酸、绿原酸、沉香四醇、鞣花酸、丁香酚、β-细辛醚、α-细辛脑、甘草酸铵峰面

表 1 线性关系测定结果

Table 1 Results of determination of linearity relation

成分	回归方程	r	线性范围/μg
没食子酸	$Y=3\,273.9X+8.040\,6$	0.999 9	0.092~1.472
绿原酸	$Y=1\,362.3X+3.201\,7$	0.999 9	0.058~0.928
沉香四醇	$Y=2\,797.4X+3.057\,1$	0.999 9	0.084~1.336
鞣花酸	$Y=10\,011X+3.146\,4$	0.999 9	0.032~0.504
丁香酚	$Y=1\,418.1X+3.966\,2$	0.999 9	0.104~1.656
β-细辛醚	$Y=3\,296.6X+0.255\,8$	0.999 9	0.021~0.336
α-细辛脑	$Y=4\,213.7X+7.301\,3$	0.999 5	0.013~0.200
甘草酸铵	$Y=759.15X-30.404$	0.999 2	0.047~0.752

积的 RSD 值分别为 0.40%、0.73%、0.35%、0.51%、0.93%、0.79%、1.81%、1.69%, 表明在该条件下仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取 ZSP 粉末 2.0 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、2、4、6、8、10、12、24 h 按照“2.1.1”项下色谱条件进样, 记录峰面积, 没食子酸、绿原酸、沉香四醇、鞣花酸、丁香酚、β-细辛醚、α-细辛脑、甘草酸铵峰面积的 RSD 值分别为 0.14%、1.08%、0.22%、0.08%、0.72%、0.47%、1.84%、1.71%, 表明该供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一批次 ZSP 粉末 (批号 1908003) 2.0 g, 精密称定, 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, 计算没食子酸、绿原酸、沉香四醇、鞣花酸、丁香酚、β-细辛醚、α-细辛脑、甘草酸铵峰面积的 RSD 值分别为 0.06%、1.03%、0.19%、0.12%、0.29%、0.57%、1.86%、1.54%, 表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取同一批次 ZSP 粉末 (批号 1908003) 共 6 份, 每份 1.0 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密量取质量浓度为 1.66 mg/mL 没食子酸、0.52 mg/mL 绿原酸、0.97 mg/mL 沉香四醇、0.67 mg/mL 鞣花酸、1.74 mg/mL 丁香酚、0.29 mg/mL β-细辛醚、0.26 mg/mL α-细辛脑、0.56 mg/mL 甘草酸铵的混合对照品溶液 1 mL, 再按照“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, 记录峰面积, 计算 8 种成分的加样回收率以及 RSD 值, 结果显示, 没食子酸、绿原酸、沉香四醇、鞣花酸、丁香酚、β-细辛醚、α-细辛脑、甘草酸铵的平均加样回收率分别为 94.49%、100.43%、91.90%、94.66%、99.82%、95.85%、99.66%、97.34%, RSD 值分别为 0.45%、0.42%、0.26%、0.64%、0.60%、1.37%、0.78%、1.95%, 表明该方法具有良好的回收率。

2.2 相对校正因子 ($f_{s/i}$) 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, 以丁香酚为内参物, 取多个质量点计算所得的 $f_{s/i}$, 取平均值作为定量用 $f_{s/i}$ [$f_{s/i}=f_s/f_i=A_sC_i/A_iC_s$, 其中 A_s 为丁香酚对照品的峰面积, C_s 为丁香酚对照品的质量浓度, A_i 为待测成分的峰面积, C_i 为待测成分的质量浓度]^[5-7]。计算待测组分没食子酸、绿原酸、沉香四醇、鞣花酸、β-细辛醚、α-细辛脑、甘草酸铵的 $f_{s/i}$, 结果见

表 2。结果显示, 没食子酸、绿原酸、沉香四醇、鞣花酸、 β -细辛醚、 α -细辛脑、甘草酸铵与内参物丁香酚之间的 $f_{s/i}$ 分别为 0.433 4、1.068 3、0.505 6、0.141 6、0.429 0、0.346 2、1.748 8, RSD 值分别为 0.77%、0.40%、0.90%、0.82%、0.61%、1.42%、1.69%。

2.2.2 不同色谱仪器和色谱柱对 $f_{s/i}$ 的影响 本实验考察了 Agilent 1260 高效液相色谱仪器(美国)和 LC-20A (20A) 高效液相色谱仪(日本岛津)对 $f_{s/i}$ 的影响, Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6

mm, 5 μ m)、Inertsil ODS-3 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)、BDS HypersilTM C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)对 $f_{s/i}$ 的影响, 结果见表 3。结果显示, 2 台色谱仪器和 3 根色谱柱测得各待测成分 $f_{s/i}$ 的 RSD 均小于 2.0%, 表明 $f_{s/i}$ 在不同色谱仪器和色谱柱下具有良好的耐用性。

2.2.3 不同柱温对 $f_{s/i}$ 的影响 本实验考察了不同柱温(25、30、35、40 $^{\circ}$ C)对 $f_{s/i}$ 的影响, 结果见表 4。结果显示, 在不同柱温测得各待测成分 $f_{s/i}$ 的

表 2 ZSP 中 7 种成分的 $f_{s/i}$ Table 2 $f_{s/i}$ of seven components for ZSP

进样体积/ μ L	$f_{\text{丁香酚/没食子酸}}$	$f_{\text{丁香酚/绿原酸}}$	$f_{\text{丁香酚/沉香四醇}}$	$f_{\text{丁香酚/鞣花酸}}$	$f_{\text{丁香酚/}\beta\text{-细辛醚}}$	$f_{\text{丁香酚/}\alpha\text{-细辛脑}}$	$f_{\text{丁香酚/甘草酸铵}}$
1.5	0.430 5	1.061 3	0.500 3	0.140 1	0.427 7	0.349 1	1.749 1
3.0	0.430 5	1.068 4	0.501 9	0.141 6	0.426 9	0.350 2	1.696 0
4.5	0.431 1	1.070 1	0.502 7	0.140 2	0.425 9	0.348 7	1.737 8
6.0	0.437 5	1.072 3	0.510 6	0.142 9	0.433 0	0.349 1	1.773 6
7.5	0.437 5	1.072 0	0.510 5	0.142 1	0.430 7	0.339 0	1.760 4
9.0	0.433 5	1.065 7	0.507 8	0.142 4	0.429 5	0.340 7	1.775 8
平均值	0.433 4	1.068 3	0.505 6	0.141 6	0.429 0	0.346 2	1.748 8
RSD/%	0.77	0.40	0.90	0.82	0.61	1.42	1.69

表 3 不同色谱仪器和色谱柱对 $f_{s/i}$ 的影响Table 3 Effects of different instruments and columns on $f_{s/i}$

色谱仪器	色谱柱	$f_{\text{丁香酚/没食子酸}}$	$f_{\text{丁香酚/绿原酸}}$	$f_{\text{丁香酚/沉香四醇}}$	$f_{\text{丁香酚/鞣花酸}}$	$f_{\text{丁香酚/}\beta\text{-细辛醚}}$	$f_{\text{丁香酚/}\alpha\text{-细辛脑}}$	$f_{\text{丁香酚/甘草酸铵}}$
Agilent1260	Inertsil ODS-3	0.433 0	0.958 1	0.507 2	0.141 5	0.428 3	0.340 6	1.728 5
	Agilent Zorbax SB-C ₁₈	0.433 3	0.958 1	0.499 4	0.143 8	0.427 0	0.341 8	1.760 7
	BDS Hypersil TM C ₁₈	0.424 9	0.967 6	0.497 0	0.140 6	0.430 3	0.334 3	1.751 6
平均值		0.430 4	0.961 3	0.501 2	0.142 0	0.428 5	0.338 9	1.746 9
RSD/%		1.11	0.57	1.07	1.17	0.38	1.19	0.95
LC-2 (20A)	Inertsil ODS-3	0.434 7	0.673 1	0.507 9	0.137 5	0.427 2	0.354 2	1.755 4
	Agilent Zorbax SB-C ₁₈	0.439 9	0.677 9	0.509 9	0.138 5	0.428 1	0.362 6	1.750 8
	BDS Hypersil TM C ₁₈	0.430 7	0.691 5	0.502 1	0.136 2	0.419 9	0.350 9	1.714 7
平均值		0.435 1	0.680 8	0.506 6	0.137 4	0.425 1	0.355 9	1.740 3
RSD/%		1.06	1.40	0.80	0.82	1.06	1.69	1.28

表 4 不同柱温对 $f_{s/i}$ 的影响Table 4 Effects of different column temperatures on $f_{s/i}$

柱温/ $^{\circ}$ C	$f_{\text{丁香酚/没食子酸}}$	$f_{\text{丁香酚/绿原酸}}$	$f_{\text{丁香酚/沉香四醇}}$	$f_{\text{丁香酚/鞣花酸}}$	$f_{\text{丁香酚/}\beta\text{-细辛醚}}$	$f_{\text{丁香酚/}\alpha\text{-细辛脑}}$	$f_{\text{丁香酚/甘草酸铵}}$
25	0.433 8	0.992 2	0.507 1	0.140 7	0.428 3	0.349 1	1.796 7
30	0.431 3	0.951 3	0.504 5	0.140 7	0.426 8	0.350 4	1.789 0
35	0.430 9	0.952 2	0.504 3	0.141 7	0.428 2	0.342 3	1.846 4
40	0.427 5	0.965 8	0.500 2	0.140 7	0.426 1	0.338 0	1.842 1
平均值	0.430 9	0.965 4	0.504 0	0.141 0	0.427 4	0.345 0	1.818 6
RSD/%	0.60	1.98	0.57	0.37	0.25	1.69	1.64

RSD 均小于 2%，表明 $f_{s/i}$ 在柱温有波动时具有良好的耐用性。

2.2.4 不同体积流量对 $f_{s/i}$ 的影响 本试验考察了不同体积流量 (0.8、1.0、1.2、1.4 mL/min) 对 $f_{s/i}$ 的影响, 结果见表 5。结果显示, 在不同体积流量测得各待测成分 $f_{s/i}$ 的 RSD 均小于 2%, 表明 $f_{s/i}$ 在体积流量有变化时具有良好的耐用性。

2.3 待测组份色谱峰定位

文献对色谱峰的定位普遍采用相对保留时间和保留时间差来定位峰^[8-11]。取混合对照品溶液, 选取 2 台色谱仪器和 3 根不同型号色谱柱, 按“2.2.1”

项下色谱条件进行测定, 以丁香酚为参照峰, 计算其他 7 种成分的相对保留时间 ($t_{i/s}$) 和保留时间差 ($\Delta t_{i/s}$)。结果见表 6、7。

$$t_{i/s} = t_i/t_s$$

$$\Delta t_{i/s} = t_i - t_s$$

s 为内参物, i 为待测组分, t 为保留时间

表 6 的结果显示, 在相同色谱条件下, 当色谱柱发生变化时, 没食子酸、绿原酸、沉香四醇、鞣花酸相对保留时间的 RSD 值均大于 5%, 表明不能用相对保留时间定位色谱峰。

表 7 的结果显示, 在相同色谱条件下, 没食子

表 5 体积流量对 $f_{s/i}$ 的影响

Table 5 Effects of volume flow rate on $f_{s/i}$

体积流量/(mL·min ⁻¹)	$f_{\text{丁香酚/没食子酸}}$	$f_{\text{丁香酚/绿原酸}}$	$f_{\text{丁香酚/沉香四醇}}$	$f_{\text{丁香酚/鞣花酸}}$	$f_{\text{丁香酚/β-细辛醚}}$	$f_{\text{丁香酚/α-细辛脑}}$	$f_{\text{丁香酚/甘草酸铵}}$
0.8	0.434 3	0.966 7	0.507 6	0.141 7	0.427 9	0.340 3	1.817 2
1.0	0.429 0	0.955 2	0.503 5	0.140 2	0.428 6	0.352 4	1.754 7
1.2	0.426 5	0.962 6	0.499 4	0.140 3	0.425 8	0.347 7	1.762 5
1.4	0.424 0	0.971 1	0.495 2	0.140 5	0.425 5	0.347 2	1.804 8
平均值	0.428 5	0.963 9	0.501 4	0.140 7	0.426 9	0.346 9	1.784 8
RSD/%	1.03	0.70	1.07	0.48	0.36	1.43	1.73

表 6 不同色谱柱测得的 $t_{i/s}$

Table 6 $t_{i/s}$ of different columns

色谱柱	$t_{\text{没食子酸/丁香酚}}$	$t_{\text{绿原酸/丁香酚}}$	$t_{\text{沉香四醇/丁香酚}}$	$t_{\text{鞣花酸/丁香酚}}$	$t_{\text{丁香酚/丁香酚}}$	$t_{\text{β-细辛醚/丁香酚}}$	$t_{\text{α-细辛脑/丁香酚}}$	$t_{\text{甘草酸铵/丁香酚}}$
Zorbax SB-C ₁₈	0.119 4	0.218 8	0.444 2	0.643 1	1.000 0	1.175 6	1.247 3	1.568 1
Inertsil ODS-3	0.137 6	0.260 2	0.505 8	0.732 7	1.000 0	1.179 0	1.253 8	1.527 7
BDS Hypersil TM C ₁₈	0.130 2	0.173 0	0.431 2	0.586 0	1.000 0	1.143 5	1.214 9	1.509 4
RSD/%	7.08	20.08	8.65	11.315	0	1.68	1.68	1.96

表 7 不同色谱柱测得的 $\Delta t_{i/s}$

Table 7 Difference of retention time measured by different chromatographic columns

色谱柱	$\Delta t_{\text{没食子酸/丁香酚}}$	$\Delta t_{\text{绿原酸/丁香酚}}$	$\Delta t_{\text{沉香四醇/丁香酚}}$	$\Delta t_{\text{鞣花酸/丁香酚}}$	$\Delta t_{\text{丁香酚/丁香酚}}$	$\Delta t_{\text{β-细辛醚/丁香酚}}$	$\Delta t_{\text{α-细辛脑/丁香酚}}$	$\Delta t_{\text{甘草酸铵/丁香酚}}$
Zorbax SB-C ₁₈	-24.090	-21.370	-15.205	-9.765	0	4.805	6.766	15.542
Inertsil ODS-3	-26.976	-23.141	-15.460	-8.362	0	5.599	7.939	16.508
BDS Hypersil TM C ₁₈	-22.538	-21.431	-14.740	-10.728	0	3.719	5.569	13.201
RSD/%	-9.18	-4.57	-2.41	-12.37	0	20.05	17.54	11.27

酸、鞣花酸、丁香酚、β-细辛醚、α-细辛脑、甘草酸铵的保留时间差相差较大, 其 RSD 值均大于 5%, 表明不能用保留时间差定位色谱峰。

本实验进一步采用两点校正法^[12-13]定位色谱峰。精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液 7 μL, 以确定的色谱条件分别在 3 根色谱柱上测定, 分别得到没食子酸、绿原酸、沉香四醇、鞣花酸、丁香

酚、β-细辛醚、α-细辛脑、甘草酸铵的保留时间, 以 Agilent 1260 仪器和 Inertsil ODS-3 色谱柱为标准仪器和标准色谱柱, 以此仪器和色谱柱测定的没食子酸和甘草酸铵的保留时间为横坐标 (x), 其他仪器和色谱柱测定的没食子酸和甘草酸铵的保留时间为纵坐标 (y), 分别建立线性方程, 再将标准仪器和标准色谱柱上的绿原酸、沉香四醇、鞣花酸、丁

香酚、 β -细辛醚、 α -细辛脑的保留时间为自变量, 分别代入各对应色谱柱线性方程中, 求得绿原酸、沉香四醇、鞣花酸、丁香酚、 β -细辛醚、 α -细辛脑在相应的各色谱柱上的理论预测保留时间, 将计算得到的各待测组分理论预测保留时间与该组分在相应柱上实测的保留时间差为绝对误差 (absolute

error, AE, AE=测量值-真实值), 结果见表 8。结果显示, 在色谱条件相同, 色谱仪器和色谱柱不同时, 没食子酸、绿原酸、沉香四醇、鞣花酸、丁香酚、 β -细辛醚、 α -细辛脑、甘草酸铵的实测保留时间与理论预测保留时间的差值较小, 故本实验用两点校正法来定位色谱峰。

表 8 不同仪器和色谱柱时预测出峰时间

Table 8 Peak time with different instruments and different chromatographic columns

色谱仪	色谱柱	校正方程	tr/min								
			没食子酸	绿原酸	沉香四醇	鞣花酸	丁香酚	β-细辛醚	α-细辛脑	甘草酸铵	
Agilent 1260	Inertsil ODS-3	$y=0.9114x-0.6557$	实测	4.304	8.139	15.820	22.918	31.280	36.879	39.219	47.788
	Zorbax SB-C ₁₈		实测	3.267	5.987	12.152	18.592	27.357	32.162	34.123	42.899
			预测	3.267	6.572	13.763	20.232	27.853	32.956	35.088	42.898
			AE	0	0.585	1.611	1.640	0.496	0.794	0.965	0.001
	BDS Hypersil™ C ₁₈	$y=0.8219x-0.1624$	实测	3.375	4.482	11.173	17.185	25.913	29.632	31.482	39.114
			预测	3.375	6.527	12.840	18.674	25.733	30.148	32.072	39.115
			AE	0	2.045	1.667	1.489	0.366	0.516	0.590	0.001
LC-20A (20A)	Inertsil ODS-3	$y=1.316x+1.2862$	实测	4.378	9.843	19.531	28.151	38.733	46.167	48.364	61.604
			预测	4.378	9.425	19.533	28.874	39.878	47.247	50.326	61.603
			AE	0	0.418	0.002	0.723	1.145	1.080	1.962	0.001
	Zorbax SB-C ₁₈	$y=1.1435x-1.6226$	实测	3.299	5.893	15.761	23.268	33.421	38.886	41.286	53.023
			预测	3.299	7.684	16.468	24.584	34.146	40.549	43.224	53.023
			AE	0	1.791	0.707	1.316	0.725	1.663	1.938	0
	BDS Hypersil™ C ₁₈	$y=1.0567x-1.1969$	实测	3.351	5.893	13.448	21.044	31.410	36.781	39.119	49.299
			预测	3.351	7.404	15.520	23.021	31.857	37.773	40.246	49.301
			AE	0	1.511	2.072	1.977	0.447	0.992	1.127	0.002

2.4 QAMS 法与外标法结果对比

取 2.0 g ZSP 样品粉末, 精密称定 9 份, 按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2.1”项下色谱条件进样检测, 记录峰面积, 采用 QAMS 法建立内参物丁香酚与没食子酸、绿原酸、沉香四醇、鞣花酸、 β -细辛醚、 α -细辛脑、甘草酸铵的相对校正因子, 对 9 个批号 ZSP 样品中各成分含量进行计算, 同时采用外标法对没食子酸、绿原酸、沉香四醇、鞣花酸、 β -细辛醚、 α -细辛脑、甘草酸铵成分进行含量测定, 并以相对误差 (relative error, RE) 为参数对 2 种方法所得结果进行比较^[14], 结果见表 9。结果显示, QAMS 法与外标法所测定结果之间差异的 RE 均小于 5%, 表明 2 种方法测之间差异较小, 所以本实验之前建立的 $f_{s/i}$ 准确可靠, 可以用于测定蒙药 ZSP 中没食子酸、绿原酸、沉香四醇、鞣花酸、丁香酚、 β -细辛醚、 α -细辛脑、甘草酸铵的

含量。

$$RE = (QAMS \text{ 测定值} - \text{外标法测定值}) / \text{外标法测定值}$$

3 讨论

3.1 蒙药 ZSP 测定指标成分的选定

蒙药 ZSP 含量测定指标及其测定方法文献已有报道, 但所选择的测定指标均为一种药材中的一种或者多种指标。本研究建立了多种药材中的多指标成分测定方法, 采用高效液相色谱法同时测定了没食子酸、绿原酸、沉香四醇、鞣花酸、丁香酚、 β -细辛醚、 α -细辛脑、甘草酸铵的含量, 用以表征蒙药 ZSP 的质量, 能更加全面地反映安全质量。

3.2 供试品制备条件的选定

本实验考察了提取溶剂 (甲醇、75%甲醇、乙腈), 超声时间 (25、35、45 min), 以所测 8 个成分的提取效率为指标, 最终确定 ZSP 供试品溶液的制备方法为以甲醇为提取溶剂、超声提取时间为

表 9 QAMS 法与外标法测得 9 批 ZSP 中 8 种成分的质量分数 ($n = 9$)

Table 9 Content of four constituents in three batches of ZSP by QAMS and external reference method ($n = 9$)

样品	没食子酸/(mg·g ⁻¹)			绿原酸/(mg·g ⁻¹)			沉香四醇/(mg·g ⁻¹)			鞣花酸/(mg·g ⁻¹)		
	外标法	QAMS	RE/%	外标法	QAMS	RE/%	外标法	QAMS	RE/%	外标法	QAMS	RE/%
1908003	1.597 5	1.598 9	0.09	0.483 5	0.493 4	2.05	0.941 4	0.939 9	-0.16	0.620 3	0.622 5	0.35
1908005	1.599 1	1.600 5	0.09	0.478 3	0.488 0	2.03	0.942 4	0.940 8	-0.17	0.620 5	0.622 7	0.35
1908008	1.598 7	1.600 0	0.08	0.479 8	0.489 6	2.04	0.942 5	0.940 9	-0.17	0.618 2	0.620 4	0.36
1909010	1.587 0	1.588 3	0.08	0.476 6	0.486 3	2.04	0.939 2	0.937 5	-0.18	0.651 9	0.654 2	0.35
1909011	1.589 0	1.590 4	0.09	0.476 5	0.486 3	2.06	0.940 0	0.938 4	-0.17	0.651 8	0.654 1	0.35
1909016	1.585 4	1.586 7	0.08	0.478 7	0.488 5	2.05	0.933 4	0.931 7	-0.18	0.650 4	0.652 7	0.35
1911004	1.660 5	1.661 7	0.07	0.503 6	0.514 1	2.08	0.976 3	0.974 5	-0.18	0.665 8	0.667 9	0.32
1911005	1.658 5	1.659 9	0.08	0.504 1	0.514 9	2.06	0.975 1	0.973 4	-0.17	0.667 2	0.669 4	0.33
1911006	1.656 7	1.658 0	0.08	0.508 6	0.519 3	2.10	0.971 4	0.969 6	-0.19	0.666 1	0.668 3	0.33

样品	β -细辛醚/(mg·g ⁻¹)			α -细辛脑/(mg·g ⁻¹)			甘草酸铵/(mg·g ⁻¹)			丁香酚/(mg·g ⁻¹)		
	外标法	QAMS	RE/%	外标法	QAMS	RE/%	外标法	QAMS	RE/%	外标法	QAMS	RE/%
1908003	0.281 5	0.281 7	0.07	0.240 6	0.245 0	1.83	0.672 2	0.698 3	3.88	1.643 4		
1908005	0.284 9	0.285 1	0.07	0.234 9	0.239 1	1.79	0.664 5	0.691 0	3.99	1.640 7		
1908008	0.280 7	0.280 9	0.07	0.233 6	0.237 8	1.80	0.670 1	0.696 3	3.91	1.653 4		
1909010	0.278 6	0.278 8	0.07	0.238 9	0.243 3	1.84	0.681 6	0.707 1	3.74	1.668 9		
1909011	0.282 9	0.283 1	0.07	0.237 3	0.241 6	1.81	0.676 8	0.702 7	3.83	1.659 1		
1909016	0.282 7	0.282 9	0.07	0.234 2	0.238 4	1.79	0.682 2	0.707 8	3.75	1.659 7		
1911004	0.294 1	0.294 3	0.07	0.248 6	0.253 3	1.89	0.676 4	0.702 2	3.81	1.762 3		
1911005	0.294 1	0.294 3	0.07	0.246 6	0.251 2	1.87	0.665 8	0.692 6	4.03	1.721 9		
1911006	0.294 4	0.294 6	0.07	0.253 1	0.253 1	1.89	0.690 3	0.715 4	3.64	1.755 4		

35 min, 过滤纸过滤方法来处理供试品。

3.3 色谱条件的选定

在流动相条件摸索中, 考察了甲醇-水、甲醇-0.05%磷酸水溶液、乙腈-0.05%磷酸水溶液、甲醇-0.1%磷酸水溶液流动相体系, 以 ZSP 中所测 8 种成分的分离效果为指标, 最终确定以甲醇为流动相 C、以 0.1%磷酸水溶液为流动相 D, 考察不同体积流量 (0.8、1.0、1.2、1.4 mL/min)、不同柱温 (25、30、35、40 °C)、不同进样量 (5、7、10、15、20 μ L), 在保证各色谱峰分离度的前提下, 尽量缩短分析时间, 确定最终条件为甲醇-0.1%磷酸水溶液梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30°C, 进样量 7 μ L。

3.4 检测波长的选定

蒙药复方制剂所含成分复杂, 各成分的最大吸收波长不同, 当采用某一个固定波长时, 难以确保所测出各成分的灵敏度和精密度、获得最大吸收, 影响定量测定结果^[15]。本实验采用 DAD 检测器在 190~400 nm 进行光谱扫描, 对不同波长下检测得

的三维图谱进行分析对比。结果显示, 没食子酸的最大吸收波长为 271 nm、绿原酸与沉香四醇的最大吸收波长为 252 nm、鞣花酸的最大吸收波长为 254 nm、丁香酚的最大吸收波长为 281 nm、 β -细辛醚与 α -细辛脑的最大吸收波长为 257 nm, 甘草酸铵的最大吸收波长为 237 nm。为了使各成分在同一色谱图中均被采集, 故采用 VWD 检测器切换波长法进行含量测定^[16]。

3.5 内参物的选定

建立一测多评法中选定好内参物是很重要, 选定内参物的标准是易得、价廉、有效者、峰面积和保留时间稳定、供试品中的含量高, 故本实验选定丁香酚为内参物^[17]。

3.6 色谱峰定位法的选定

各待测成分色谱峰的准确定位是一测多评法成功应用的关键之一。根据文献报道^[18], 大多数采用相对保留时间和保留时间差法定位待测成分色谱峰。本实验当中考察了相对保留时间法和保留时间

差法、两点校正法在不同厂家仪器和色谱柱中的重现性。实验结果显示,在不同色谱仪和不同色谱柱测得的各待测成分出峰时间有所不同,相对保留时间法和保留时间差法的RSD均大于5%,故不适合对本实验一测多评法色谱峰定位。采用两点校正法进行定位色谱峰时,所得各待测成分色谱峰实测保留时间与预测保留时间差值较小,最终本实验选定采用两点校正法定位待测成分色谱峰。

本实验建立QAMS法同时测定ZSP(9个批次)中8种成分的含量,对QAMS法的可行性进行探讨,结果表明QAMS法测得结果与外标法测得结果没有显著差异,表明在对照品难以得到的情况下可以通过测定蒙药ZSP中丁香酚的含量来计算出其他7种成分的含量,实现多指标同步质量控制,反映蒙药ZSP的质量。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准 [M]. 北京: 中华人民共和国卫生部药典委员会, 1998: 70.
- [2] 都布新. 蒙药扎冲十三味丸临床应用及药物作用概况 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(10): 152.
- [3] 刘宏. 扎冲十三药理与临床研究进展 [J]. 北方药学, 2017, 14(5): 135-136.
- [4] 白英. 蒙药嘎日迪-13 味丸的临床应用研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2014, 23(14): 1.
- [5] 何兵, 杨世艳, 张燕. 一测多评中待测成分校正和定位的新方法研究 [J]. 药学学报, 2012, 47(12): 1653-1659.
- [6] 窦志华, 安莉萍, 陈敏, 等. 一测多评法同时测定五味子中6种木脂素类成分含量 [J]. 中国药学杂志, 2014, 49(2): 147-151.
- [7] 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.
- [8] 邵进明, 戴胜云, 徐文芬, 等. 一测多评法同时测定虎杖中4种不同类型成分的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(24): 2045-2049.
- [9] 郭国栋, 郭叶, 李刚, 等. 一测多评法同时测定蒙药古日古木-13 丸中6种成分 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1542-1547.
- [10] 何兵, 刘艳, 杨世艳, 等. 一测多评同时测定款冬花中10个成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(9): 1518-1524.
- [11] 刘香南, 李明珠, 尚晓娜, 等. “一测多评”法测定甘草中6种有效成分含量 [J]. 中国实验方剂杂志, 2013, 19(24): 56-59.
- [12] 贾文婷, 张媛彦, 郭娜, 等. 一测多评法同时测定肉豆蔻-8散中5种成分 [J]. 中成药, 2018, 40(6): 1307-1312.
- [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.
- [14] 窦志华, 乔进, 卞理, 等. 指纹图谱与一测多评法相结合的大黄质量控制方法 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(5): 442-448.
- [15] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [16] 沈静琳, 丁莹. HPLC 波长切换法同时测定麝香心脑乐片中7种成分 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(3): 520-526.
- [17] 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.
- [18] 唐安福, 李思, 王银娟, 等. 一测多评法在中药化学成分分析中的应用及其研究进展 [J]. 中南药学, 2014, 12(2): 144-147.

[责任编辑 郑礼胜]