

一测多评法同时测定蒙药吉如合-6 中 6 种成分含量

刘小伟¹, 宝鲁尔², 荣君¹, 新图雅², 陈红梅^{1*}, 王秀兰^{2,3}(1.内蒙古民族大学附属医院, 内蒙古 通辽 028000; 2.内蒙古民族大学蒙医药学院, 内蒙古 通辽 028000; 3.内蒙古蒙医药工程技术研究院, 内蒙古 通辽 028000)

摘要: 目的 利用一测多评法同时测定蒙药吉如合-6 中鞣花酸、肉桂酸、丁香酚、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚等 6 种成分的含量, 并验证该方法在蒙药吉如合-6 质量控制研究中的可行性与科学性。方法 采用一测多评法; 供试品采用 75% 甲醇回流提取; 以丁香酚为内标物, 测定其他 5 种成分相对校正因子($f_{k/m}$); 采用一测多评法与外标法进行含量计算、比对。结果 所测定的鞣花酸、肉桂酸、丁香酚、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚等 6 种成分分别在其各自范围内有良好的线性关系(即 $r>0.999\ 9$), 平均加样回收率为 94.80%~98.85%, $RSD<2.0\%$, 外标法与一测多评法所测得结果之间相对误差 $<2\%$ 。结论 一测多评法操作简便、准确可行、重复性好, 可用于蒙药吉如合-6 的质量控制。

关键词: 蒙药; 吉如合-6; 成分; 一测多评法; 外标法; 校正因子

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2022)19-2457-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.19.005

引用本文: 刘小伟, 宝鲁尔, 荣君, 等. 一测多评法同时测定蒙药吉如合-6 中 6 种成分含量[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(19): 2457-2464.

Simultaneous Determination of Six Components in Mongolian Medicine Jiruhe-6 by Quantitative Analysis of Multi-components by Single-marker

LIU Xiaowei¹, BAO Lu'er², RONG Jun¹, XIN Tuyu², CHEN Hongmei^{1*}, WANG Xiulan^{2,3}(1. Affiliated Hospital of Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao 028000, China; 2. School of Mongolia Medicine and Pharmacy, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China; 3. Inner Mongolia Research Institute of Traditional Mongolian Medicine Engineering Technology, Tongliao 028000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the ellagic acid, cinnamic acid, eugenol, costunolide, dehydrocostus lactone and dehydrodiisoeugenol in Mongolian medicine Jiruhe-6 by quantitative analysis multi-components by single marker(QAMS). And to verify the feasibility and scientificity of this method in the quality control study of Mongolian medicine Jiruhe-6. **METHODS** QAMS method was used. The test sample was extracted with 75% methanol under reflux. Relative calibration factors($f_{k/m}$) of other 5 components were determined with eugenol as internal standard substance. QAMS and external standard method were used for content calculation and comparison. **RESULTS** There was a good linear relationship between ellagic acid, cinnamic acid, eugenol, costunolide, dehydrocostus lactone and dehydrodiisoeugenol in their respective ranges ($r>0.999\ 9$). The average recovery was 94.80%~98.85%, $RSD<2.0\%$. The relative error between external standard method and QAMS was $<2\%$. **CONCLUSION** QAMS method is simple, accurate, feasible and reproducible. It can be used for the quality standard control of Mongolian medicine Jiruhe-6.

KEYWORDS: Mongolian medicine; Jiruhe-6; component; quantitative analysis multi-components by single marker(QAMS); external standard method; correction factor

蒙药吉如合-6 是蒙医药经典复方制剂, 又名安神补心六味丸、蒙文名为吉如合-6、宝日格宁-6。根据现行执行标准《中华人民共和国卫生部药品标准·蒙药分册》(1998 版)^[1]中记载, 吉如合-6(安神补心六味丸)是由枫香脂、牛心、肉豆蔻、广木香、广枣、丁香等 6 味药材配伍组成, 具有镇静、祛“赫依”等功效, 用于心慌气短等病症, 主治心脏赫依病。对该制剂质量控制方面也仅有显微鉴别、木香薄层鉴别等定性鉴别, 并无对化学成

分含量的定量测定方法, 导致很难全面评价该药物的质量及疗效。查阅文献后发现, 现今为止仅对该复方制剂中丁香酚、原儿茶酸等单一化学成分的含量测定及临床疗效有过研究报道^[2-6]。

蒙成药复方制剂是由多味药材配伍组成, 因而其成分有着复杂多样性, 对其进行多种成分的含量测定, 为其建立质量控制体系。这不仅能够了解蒙成药复方制剂的配伍规律, 更能全面评价该药物的特点以及临床应用疗效。中蒙药材具有

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1708205); 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: 刘小伟, 男, 硕士生 E-mail: mdfylxw@126.com

***通信作者:** 陈红梅, 女, 博士, 教授, 硕导 E-mail: mdfyhcm@163.com

多成分、多指标等共性,而中药研究为蒙成药研究奠定了基础。近年来在中草药及中药复方制剂研究领域及研究方法中一测多评法^[7-9]较为常见且有准确率高、可行性强、操作简便等特点。据文献^[10-14]记载及报道,鞣花酸、肉桂酸、丁香酚、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚等6种待测成分均有安神、镇静等生理作用或对心血管系统疾病有不同程度的药理活性。因而本实验采用一测多评法同时测定吉如合-6中所含以上6种化学成分的含量^[15-20],为其质量控制与进一步开发研究奠定基础,提供实验依据。

1 材料与试药

1.1 仪器

LC-20A(20A)型高效液相色谱仪(日本岛津);SQP 型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];DK-S24 型电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司、太仓精宏仪器设备有限公司)。

1.2 试药

供试品:吉如合-6(安神补心六味丸)9批,批号为190722,190816,190913,190928,191006,191026,191103,191128,191218,由内蒙古奥特奇蒙药股份有限公司提供;对照品:鞣花酸(批号:111959-201602;含量:89.3%)、肉桂酸(批号:110786-201604;含量:98.8%)、丁香酚(批号:110725-201917;含量:99.1%)、木香烃内酯(批号:111524-201208;含量:99.5%)、去氢木香内酯(批号:111525-201912;含量:99.5%)、去氢二异丁香酚(批号:111838-201804;含量:98.6%)共6种对照品均购自中国食品药品检定研究院。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Inertsil ODS-3C₁₈(4.6 mm×250 mm 5 μm);流动相甲醇(A)-0.1%磷酸水(B),梯度洗脱(0~15 min, 49% B; 15~27 min, 49%→35% B; 27~43 min, 35%→40% B; 43~59 min, 40%→33% B; 59~73 min, 33%→20% B; 80 min),检测波长λ为0~15 min, 254 nm(鞣花酸), 15~27 min, 281 nm(肉桂酸、丁香酚), 27~59 min, 225 nm(木香烃内酯、去氢木香内酯), 59~73 min, 273 nm(去氢二异丁香酚);进样量为10 μL;流量为1.0 mL·min⁻¹;柱温为30℃。该色谱条件下对照品及样品色谱图见图1。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取鞣花酸、肉桂酸、丁香酚、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢

二异丁香酚等6种对照品适量,以甲醇制成质量浓度分别为0.512, 0.38, 4.264, 1.344, 1.196, 0.172 mg·mL⁻¹的储备液,精密吸取各溶液2.5 mL置于50 mL量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液(鞣花酸0.025 6 mg·mL⁻¹、肉桂酸0.019 mg·mL⁻¹、丁香酚0.213 2 mg·mL⁻¹、木香烃内酯0.067 2 mg·mL⁻¹、去氢木香内酯0.059 8 mg·mL⁻¹、去氢二异丁香酚0.008 6 mg·mL⁻¹)。并保存于2~10℃冰箱中备用。

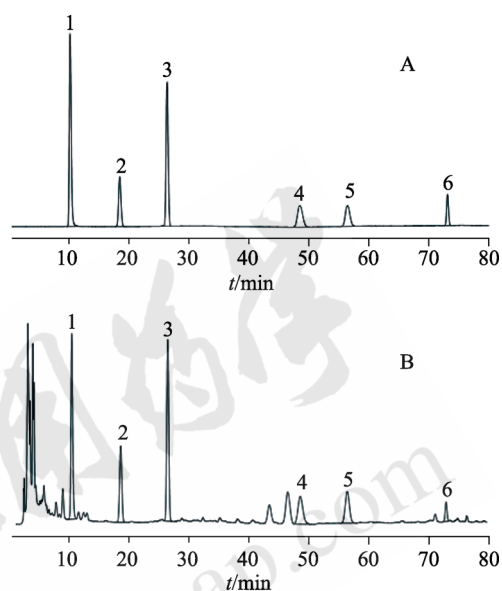


图1 混合对照品和吉如合-6的HPLC图

A-混合对照品; B-吉如合-6; 1-鞣花酸; 2-肉桂酸; 3-丁香酚; 4-木香烃内酯; 5-去氢木香内酯; 6-去氢二异丁香酚。

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances and Jiruhe-6 sample

A-mixed reference substances; B-Jiruhe-6 sample; 1-ellagic acid; 2-cinnamic acid; 3-eugenol; 4-costunolide; 5-dehydrocostus lactone; 6-dehydrodiisoeugenol.

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取3批吉如合-6的供试品各1.0 g,分别置于具塞锥形瓶中,精密加入75%甲醇25 mL后密塞,称定重量。置水浴锅加热回流0.5 h,放冷,称定重量,加75%甲醇补足减失重量,摇匀,滤过,溶液定容至25 mL量瓶中,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 将“2.2.1”项下混合对照品溶液按“2.1”项下色谱条件分别进样5, 10, 15, 20, 25 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),绘制标准曲线得到鞣花酸、肉桂酸、丁香酚、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚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。

表 1 各成分的线性关系、检测限和定量限

Tab. 1 Linearity, detection limit and quantitation limit of each component

待测成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/ μg	检测限/ng	定量限/ng
鞣花酸	$Y=235\ 703X+26\ 425$	0.999 9	0.13~0.64	0.29	0.99
肉桂酸	$Y=146\ 457X+23\ 878$	0.999 9	0.09~0.48	5.27	17.58
丁香酚	$Y=239\ 246X+45\ 134$	0.999 9	1.07~5.33	0.65	2.57
木香烃内酯	$Y=79\ 419X+2\ 867.4$	0.999 9	0.34~1.68	19.99	68.80
去氢木香内酯	$Y=77\ 283X+7\ 035.8$	0.999 9	0.30~1.50	7.88	26.28
去氢二异丁香酚	$Y=29\ 603X+6\ 552.8$	0.999 9	0.04~0.22	10.04	33.48

2.3.2 仪器精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液,以“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次,记录峰面积,鞣花酸、肉桂酸、丁香酚、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚峰面积的 RSD 值分别为 0.33%, 0.05%, 0.32%, 0.79%, 0.23%, 0.76%, 表明在该条件下仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批次吉如合-6 粉末(批号: 190722)1.0 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备共 6 份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,计算鞣花酸、肉桂酸、丁香酚、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚峰面积的 RSD 值分别为 0.14%, 0.03%, 0.11%, 0.38%, 0.74%, 0.41%, 表明该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 任意选取一批次吉如合-6 粉末 1.0 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,室温放置,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h 按“2.1”项下色谱条件进样,记录峰面积,鞣花酸、肉桂酸、丁香酚、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚峰面积的 RSD 值分别为 0.10%, 0.15%, 0.07%, 1.18%, 0.49%, 0.50%, 表明该供试品溶液在室温下 48 h 内稳定。

2.3.5 加样回收率试验 精密称取 6 种成分的含量已知样品 6 份,分别置于具塞锥形瓶中,精密加入适量 6 种对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液($n=6$),在以“2.1”项下色谱条件进样测定含量并计算其回收率,测得鞣花酸、肉桂酸、丁香酚、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚的平均回收率分别为 99.47%, 96.27%, 96.97%, 96.22%, 94.35%, 96.14%, RSD 分别为 1.23%, 1.69%, 1.08%, 1.02%, 1.28%, 1.79%, 结果见表 2。表明该方法回收率良好。

2.4 相对校正因子的确定及耐用性考察

2.4.1 相对校正因子的测定 精密吸取“2.2.1”进样分析,记录各成分的峰面积,按照相对校正

表 2 加样回收率结果

Tab. 2 Sample recovery results

成分	原有值/ mg	加入值/ mg	测得值/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/%
鞣 花 酸	0.452	0.468	0.912	98.29	99.47	1.23
	0.449	0.465	0.904	97.85		
	0.451	0.462	0.910	99.35		
	0.448	0.461	0.908	99.78		
	0.446	0.453	0.903	100.88		
	0.450	0.458	0.911	100.65		
肉 桂 酸	0.283	0.284	0.559	97.18	96.27	1.69
	0.292	0.281	0.562	96.08		
	0.290	0.285	0.561	95.09		
	0.275	0.288	0.558	98.26		
	0.289	0.290	0.561	93.79		
	0.279	0.285	0.556	97.19		
丁 香 酚	4.087	4.122	8.027	95.58	96.97	1.08
	4.075	4.101	8.022	96.24		
	4.011	4.025	7.953	97.94		
	4.010	4.021	7.952	98.03		
	4.028	4.051	7.986	97.70		
	4.017	4.101	7.967	96.32		
木 香 烃 内 酯	1.380	1.392	2.703	95.04	96.22	1.02
	1.373	1.383	2.693	95.44		
	1.375	1.365	2.695	96.70		
	1.372	1.351	2.689	97.48		
	1.370	1.355	2.685	97.05		
	1.369	1.372	2.681	95.63		
去 氢 木 香 内 酯	1.228	1.231	2.364	92.28	94.35	1.28
	1.220	1.201	2.368	95.59		
	1.211	1.210	2.362	95.12		
	1.214	1.221	2.360	93.86		
	1.212	1.205	2.358	95.10		
	1.217	1.209	2.355	94.13		
去 氢 二 异 丁 香 酚	0.126	0.119	0.244	99.16	96.14	1.79
	0.124	0.122	0.241	95.90		
	0.120	0.123	0.238	95.93		
	0.123	0.121	0.237	94.21		
	0.121	0.122	0.239	96.72		
	0.122	0.118	0.234	94.92		

下混合对照品溶液(5, 10, 15, 20, 25, 30 μL), 因子 $f_{k/m}$ 公式, 以丁香酚为内标物, 取多个质量点计算所得的 $f_{k/m}$, 取平均值作为定量用 $f_{k/m}$ ^[21-23]。计算待测组分以丁香酚为内标物, 以“2.1”项色谱条件下进样测定鞣花酸、肉桂酸、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚的相对校正因子 $f_{k/m}$, 结果见表 3。

相对校正因子 $f_{k/m}=f_k/f_m=(W_k\times A_m)/(W_m\times A_k)$, W_k 为内标物含量, W_m 为待测成分含量, A_k 为内标物峰面积, A_m 为待测成分峰面积。

表 3 各成分相对校正因子

Tab. 3 Relative correction factor of each component

进样量/ μL	相对校正因子 $f_{k/m}$ (丁香酚为内标物)				
	鞣花酸	肉桂酸	木香烃内酯	去氢木香内酯	去氢二异丁香酚
5	0.133 6	0.147 1	0.990 4	0.891 7	0.332 9
10	0.131 8	0.146 1	0.975 6	0.873 5	0.327 7
15	0.131 5	0.146 1	0.969 9	0.875 2	0.327 3
20	0.131 2	0.145 8	0.957 9	0.875 0	0.327 4
25	0.131 1	0.145 8	0.964 1	0.873 1	0.326 7
30	0.131 1	0.147 0	0.960 4	0.879 2	0.328 7
平均值	0.131 8	0.146 3	0.969 7	0.877 9	0.328 4
RSD/%	0.74	0.40	1.24	0.80	0.71

2.4.2 不同仪器和色谱柱对相对校正因子的影响 以丁香酚为内标物, 考察了在 LC-20A(20A) 型 HPLC 色谱仪(日本岛津)和 Agilent 1260 型 HPLC 色谱仪(美国安捷伦)2 种设备上分别使用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈、Inertsil ODS-3C₁₈、BDS HypersilTM C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)对相对校正因子所产生的影响, 测得不同仪器和不同色谱柱所测得相对校正因子的 RSD<2.0%, 结果见表 4, 表明 $f_{k/m}$ 在不同色谱仪器和色谱柱下具有良

表 4 不同仪器和色谱柱对相对校正因子的影响

Tab. 4 Influence of different instrument and column on relative correction factors

仪器	色谱柱	相对校正因子 $f_{k/m}$ (丁香酚为内标物)				
		鞣花酸	肉桂酸	木香烃内酯	去氢木香内酯	去氢二异丁香酚
LC-20A(20A)	ZORBAX SB-C ₁₈	0.131 7	0.145 9	0.971 7	0.873 4	0.325 7
	Inertsil ODS-3C ₁₈	0.126 9	0.145 1	0.961 3	0.882 1	0.334 9
	Hypersil TM C ₁₈	0.130 1	0.149 3	0.957 3	0.894 9	0.334 0
平均值		0.129 5	0.146 8	0.963 5	0.883 5	0.331 6
RSD/%		1.89	1.53	0.77	1.22	1.53
Agilent 1260	ZORBAX SB-C ₁₈	0.022 1	0.065 3	1.228 3	1.410 3	0.111 1
	Inertsil ODS-3C ₁₈	0.021 7	0.063 9	1.193 0	1.419 5	0.108 4
	Hypersil TM C ₁₈	0.021 9	0.065 8	1.210 8	1.402 7	0.109 1
平均值		0.021 9	0.065 0	1.210 7	1.410 9	0.109 5
RSD/%		1.07	1.46	1.46	0.60	1.27

好的耐用性。

2.4.3 考察体积流量的变化对相对校正因子的影响 以丁香酚为内标物, 考察了不同体积流量(1.0, 1.2, 1.4 mL $\cdot$ min⁻¹)对相对校正因子的影响, 测得各成分 RSD<2.0%, 结果见表 5。表明 $f_{k/m}$ 在柱温有波动时具有良好的耐用性。

2.4.4 考察不同柱温对相对校正因子的影响 本实验以丁香酚为内标物, 在 28, 30, 32, 35, 40 $^{\circ}\text{C}$ 等不同柱温条件下, 对其相对校正因子的影响进行了考察。测得各成分 RSD<2.0%, 结果见表 6, 表明 $f_{k/m}$ 在体积流量有变化时具有良好的耐用性。

2.5 待测组分数谱峰的定位

2.5.1 相对保留时间定位色谱峰 以丁香酚为内标物, 采用内标物与待测成分保留时间之比的相对保留时间法, 对其他各成分所对应的色谱峰进行定位^[24-25], 考察了“2.4.2”项下不同仪器、色谱柱在相同色谱条件下对相对保留时间的影响, 得知在同一色谱条件下变换色谱仪、色谱柱时各成分相对保留时间 RSD>2.0%, 表明不能用相对保留时间法来定位各成分相对应的色谱峰, 结果见表 7。

2.5.2 保留时间差定位色谱峰 以丁香酚为内标物, 采用内标物与待测成分保留时间之差之比的相对保留时间差法, 对其各成分所对应的色谱峰进行定位, 考察“2.4.2”项下不同仪器、色谱柱在相同色谱条件下对相对保留时间差的影响, 结果在同一色谱条件下变换色谱仪、色谱柱时各成分相对保留时间差 RSD 绝对值>2.0%, 表明其不能用相对保留时间差法来定位各成分相对应的色谱峰, 结果见表 8。

表 5 体积流量的变化对相对校正因子的影响

Tab. 5 Influence of volumetric flow changes on relative correction factor

体积流量/ mL·min ⁻¹	相对校正因子 $f_{k/m}$ (丁香酚为内标物)				
	鞣花酸	肉桂酸	木香烃内酯	去氢木香内酯	去氢二异丁香酚
1.0	0.131 8	0.146 1	0.975 6	0.873 5	0.327 7
1.2	0.132 0	0.147 5	0.951 6	0.879 2	0.329 4
1.4	0.131 0	0.149 4	0.942 4	0.875 6	0.325 1
平均值	0.1316	0.147 7	0.956 5	0.876 1	0.327 4
RSD/%	0.38	1.12	1.79	0.33	0.67

表 6 不同柱温对相对校正因子的影响

Tab. 6 Influence of different column temperatures on relative correction factors

柱温/ °C	相对校正因子 $f_{k/m}$ (丁香酚为内标物)				
	鞣花酸	肉桂酸	木香烃内酯	去氢木香内酯	去氢二异丁香酚
28	0.131 7	0.146 1	0.966 2	0.878 4	0.325 8
30	0.131 7	0.145 9	0.971 7	0.873 4	0.325 7
32	0.132 0	0.146 1	0.954 1	0.874 0	0.326 2
35	0.131 8	0.146 1	0.951 1	0.864 2	0.327 0
40	0.131 9	0.145 8	0.956 2	0.879 6	0.329 5
平均值	0.131 8	0.146 0	0.956 2	0.873 9	0.326 8
RSD/%	0.11	0.09	0.91	0.70	0.48

表 7 不同仪器和色谱柱测定相对保留时间

Tab. 7 Relative retention time determined by different instruments and chromatographic columns

仪器	色谱柱	鞣花酸	肉桂酸	丁香酚	木香烃内酯	去氢木香内酯	去氢二异丁香酚
LC-20A(20A)	ZORBAX SB-C ₁₈	0.388	0.701	1	1.833	2.136	2.779
	Inertsil ODS-3C ₁₈	0.306	0.685	1	2.245	2.425	3.852
	Hypersil™ C ₁₈	0.323	0.661	1	2.239	2.493	3.489
平均值		0.339	0.682	1	2.106	2.351	3.489
RSD/%		12.620	2.900	0	11.200	8.060	15.640
Agilent 1260	ZORBAX SB-C ₁₈	0.388	0.687	1	1.830	2.152	3.063
	Inertsil ODS-3C ₁₈	0.330	0.697	1	2.419	2.591	3.987
	Hypersil™ C ₁₈	0.340	0.669	1	2.328	2.554	3.752
平均值		0.353	0.685	1	2.192	2.432	3.600
RSD/%		35.260	2.050	0	14.460	10.010	13.330

表 8 不同仪器和色谱柱测定相对保留时间差

Tab. 8 Relative retention time difference between different instruments and chromatographic columns

仪器	色谱柱	鞣花酸	肉桂酸	丁香酚	木香烃内酯	去氢木香内酯	去氢二异丁香酚
LC-20A(20A)	ZORBAX SB-C ₁₈	16.086	7.859	0	-21.887	-29.829	-46.731
	Inertsil ODS-3C ₁₈	10.709	4.864	0	-19.217	-21.997	-44.028
	Hypersil™ C ₁₈	12.794	6.402	0	-23.426	-28.224	-47.072
平均值		13.196	6.375	0	-21.510	-26.683	-45.943
RSD/%		20.540	23.490	0	-9.901	-15.504	-3.630
Agilent 1260	ZORBAX SB-C ₁₈	13.683	6.986	0	-18.554	-25.749	-46.119
	Inertsil ODS-3C ₁₈	8.356	3.778	0	-17.694	-19.844	-37.252
	Hypersil™ C ₁₈	10.405	5.211	0	-20.941	-24.490	-43.372
平均值		10.814	5.325	0	-19.063	-23.361	-42.247
RSD/%		24.850	30.180	0	-8.820	-13.310	-10.740

2.5.3 两点校正法定位色谱峰 本实验定位色谱峰进一步采用两点校正法^[26-28],精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 10 μ L,以“2.1”项下色谱条件分别在 3 根色谱柱上测定,分别得到鞣花酸、肉桂酸、丁香酚、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚的保留时间,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鞣花酸与去氢二异丁香酚的保留时间为横坐标(X),其他仪器和色谱柱测定的鞣花酸与去氢二异丁香酚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肉桂酸、丁香酚、木香烃内酯、去氢木香内酯的保留时间为自变量,分别代入各对应色谱柱线性方程中,求得肉桂酸、丁香酚、木香烃内酯、去氢木香内酯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[绝对误差=测量值-真实值(即测量值与真实值之差)],结果显示,在色谱条件相同,色谱仪器和色谱柱不同时,鞣花酸、肉桂酸、丁香

酚、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚的实测保留时间与理论预测保留时间的差值较小,结果见表9。故本试验用两点校正法来定位色谱峰。

2.6 一测多评法与外标法结果对比

取各批次样品粉末 1.0 g,精密称定 9 份,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项下色谱条件进样检测,记录峰面积,采用一测多评法建立内标物丁香酚与鞣花酸、肉桂酸、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚的相对校正因子,对 9 个批号吉如合-6 样品中各成分含

量进行计算,同时采用外标法对鞣花酸、肉桂酸、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚成分进行含量测定,并以相对误差[相对误差=(一测多评法-外标法)/外标法×100%]为参数对 2 种方法所得结果进行比较^[29],结果显示,一测多评法与外标法所测定结果之间差异的相对误差<5%,表明 2 种方法测之间差异较小,所以本实验上文所建立的 $f_{k/m}$ 准确可靠,可以用于测定蒙药吉如合-6 中鞣花酸、肉桂酸、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚的含量。结果见表 10。

表 9 各成分预测出峰时间

Tab. 9 Each component predicts the peak time

									min
仪器	色谱柱	校正方程	指标	鞣花酸	肉桂酸	丁香酚	木香烃内酯	去氢木香内酯	去氢二异丁香酚
LC-20A (20A)	Inertsil ODS-3C ₁₈	Y=0.871 4X-4.139 7	实测	10.179	18.406	26.265	48.152	56.094	72.996
			预测	4.730	10.875	17.839	36.956	43.636	59.467
			绝对误差	4.730	11.899	18.747	37.819	44.740	59.469
	Hypersil™ C ₁₈	Y=0.953X-3.584 8	实测	0	1.024	0.908	0.863	1.104	0.002
			预测	6.116	12.908	20.910	41.636	48.934	65.982
			绝对误差	6.116	13.956	21.446	42.304	49.873	65.983
	ZORBAXSB-C ₁₈	Y=0.952X-1.020 4	实测	0	1.048	0.536	0.668	0.943	0.001
			预测	8.670	15.567	22.853	43.907	51.602	68.472
			绝对误差	8.670	16.502	23.984	44.820	52.381	68.472
	Hypersil™ C ₁₈	Y=0.726X-3.273 4	实测	0	0.935	1.131	0.913	0.779	0
			预测	4.117	9.695	14.673	30.667	36.617	49.725
			绝对误差	4.117	10.089	15.795	31.685	37.451	49.726
	ZORBAXSB-C ₁₈	Y=0.856 1X-3.356 1	实测	0	0.394	1.122	1.018	0.834	0.001
			预测	5.358	11.552	18.763	36.704	43.953	59.135
			绝对误差	5.358	12.401	19.129	37.867	44.666	59.136
			绝对误差	0	0.849	0.336	1.163	0.713	0.001

表 10 各成分含量测定结果

Tab. 10 Content determination results of each component

批号	丁香酚	鞣花酸			肉桂酸			木香烃内酯			去氢木香内酯			去氢二异丁香		
		外标法/ mg·g ⁻¹	一测多 评法/ mg·g ⁻¹	相对 误差/ %	外标法/ mg·g ⁻¹	一测多 评法/ mg·g ⁻¹	相对 误差/ %	外标法/ mg·g ⁻¹	一测多 评法/ mg·g ⁻¹	相对 误差/ %	外标法/ mg·g ⁻¹	一测多 评法/ mg·g ⁻¹	相对 误差/ %	外标法/ mg·g ⁻¹	一测多 评法/ mg·g ⁻¹	相对 误差/ %
190722	8.092 0	0.868 7	0.883 3	1.68	0.551 7	0.555 3	0.65	2.766 8	2.797 1	1.09	2.506 7	2.516 9	0.41	0.264 7	0.268 1	1.28
190816	8.093 1	0.867 9	0.882 5	1.68	0.552 6	0.556 2	0.65	2.775 4	2.805 8	1.09	2.516 0	2.526 2	0.41	0.264 1	0.267 6	1.29
190913	8.103 8	0.874 2	0.888 9	1.68	0.552 6	0.556 2	0.65	2.783 5	2.813 9	1.09	2.507 3	2.517 5	0.41	0.261 7	0.265 1	1.29
190928	7.788 0	0.942 9	0.960 2	1.83	0.574 8	0.578 0	0.56	2.922 3	2.952 5	1.03	2.613 8	2.640 6	0.33	0.263 4	0.266 7	1.25
191006	7.808 0	0.944 1	0.961 4	1.83	0.575 0	0.578 2	0.56	2.927 0	2.957 8	1.05	2.630 2	2.639 0	0.33	0.257 3	0.260 6	1.24
191026	7.798 4	0.943 7	0.961 0	1.83	0.575 4	0.578 5	0.54	2.916 9	2.947 1	1.03	2.628 4	2.637 2	0.33	0.264 2	0.267 5	1.25
191103	8.214 9	0.958 6	0.974 2	1.63	0.585 1	0.588 6	0.60	2.978 0	3.010 7	1.09	2.692 0	2.701 1	0.33	0.265 1	0.268 6	1.28
191128	8.212 5	0.956 9	0.981 6	1.63	0.585 1	0.588 5	0.58	2.980 5	3.013 1	1.09	2.689 6	2.698 5	0.33	0.268 9	0.272 3	1.26
191218	8.235 8	0.957 2	0.972 8	1.63	0.584 5	0.588 0	0.60	2.987 5	3.020 3	1.09	2.690 0	2.699 0	0.33	0.268 3	0.271 7	1.27

3 讨论

蒙药吉如合-6 为经典复方制剂, 考虑复方制剂的多成分多指标等特殊性质, 对其色谱条件、检测波长、供试品提取方法、各待测成分色谱峰定位方法进行了筛选。

3.1 色谱条件的选择

本实验在选择色谱条件时, 以流动相分别为乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水、甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸水、甲醇-0.2%磷酸水、甲醇-0.3%磷酸水、甲醇-0.4%磷酸水、甲醇-0.1%醋酸水, 柱温分别以 28, 30, 32, 35, 40 °C, 体积流量分别为 0.5, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mL·min⁻¹ 进行了单因素考察, 最终在流动相为甲醇-0.1%磷酸水, 柱温为 30 °C, 体积流量为 1.0 mL·min⁻¹ 的条件下梯度洗脱时, 色谱图基线平稳, 峰型相对良好, 各成分的分离度符合标准要求。

3.2 检测波长的选择

本实验选择检测波长在 190~400 nm 波长范围内利用 DAD 检测器进行光谱扫描, 并借鉴中国药典 2020 年版中对各成分检测波长的记载, 最终确定各成分检测波长(λ), 依次为 254, 281, 225, 273 nm, 为使各成分色谱峰能够在同一色谱图中被采集采用了切换波长法。

3.3 提取方法的选择

本实验在对供试品进行制备时选择了超声提取法与加热回流提取法。超声提取时提取溶剂为甲醇、95%甲醇、90%甲醇、85%甲醇、75%甲醇、60%甲醇、50%甲醇, 提取剂量为 15, 20, 25, 30 mL, 超声时间 10, 20, 30 min 进行了单因素考察。加热回流提取时提取溶剂以甲醇、95%甲醇、85%甲醇、75%甲醇、50%甲醇, 提取溶剂量以 15, 25, 30, 40, 50 mL 回流提取后再蒸干至 25 mL, 提取时间以 0.5, 1.0, 1.5 h 进行了单因素考察, 筛选。再对 2 种提取方法测定结果进行对比后最终确定以 75%甲醇溶液 25 mL 作为提取溶剂, 加热回流提取 0.5 h, 常温放冷后 75%甲醇溶液补足减失重量, 滤过, 滤过后再以 75%甲醇补足溶剂缺失量, 定容, 摇匀, 常温状态下进样测定。

3.4 各组分色谱峰的定位

一测多评法是测定多成分为质量控制的一种研究方法, 该方法是否符合该复方制剂的质量标准研究要求, 与其能否准确定位各成分所相对应色谱峰有紧密联系。本实验通过相对保留时间法、

相对保留时间差法试验后发现其差异较大, 不能准确定位 6 种成分的色谱峰, 不适合作为各成分色谱峰的定位方法。而利用两点校正法对 6 种成分的色谱峰进行定位分析时发现实际测得的出峰保留时间与预测出峰时间之间的差值较小, 故而对该 6 种成分色谱峰进行定位时采用了两点校正法。

3.5 结论

本研究建立一测多评法同时测定蒙药吉如合-6(安神补心六味丸)中 6 种成分的含量, 对一测多评法的可行性进行探讨, 结果表明, 一测多评法与外标法所测得的结果差异无统计学意义, 可用于蒙药吉如合-6 中 6 种成分的含量测定, 实现多指标同步测定及质量控制。

REFERENCES

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部药品标准蒙药分册[S]. 1998: 94.
- [2] 乌珠木. HPLC 法测定蒙药安神补心六味丸中丁香酚的含量[J]. 中国民族医药杂志, 2013, 19(1): 49-51.
- [3] WANG H Y. Determination of protocathechuic in anshen buxin Liuwei wan by HPLC[J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2010, 24(1): 86-87.
- [4] ANLUSI, NARENQIMUGE, TANA. Clinical efficacy of Mongolian medicine ansheng buxin Liuwei pills combined with metoprolol succinate sustained-release tablets for coronary heart disease and angina pectoris[J]. Asia-Pac Tradit Med(亚太传统医药), 2018, 14(7): 192-194.
- [5] 张晶, 纳顺达来. 蒙药安神补心六味丸治疗冠心病心绞痛临床观察[J]. 中国民族医药杂志, 2008, 14(3): 12-13.
- [6] 王淑珍, 苏木亚, 白音. 蒙药宝日格宁-6 味丸改善 ST 段下移临床观察[J]. 中国民族医药杂志, 2011, 17(1): 36.
- [7] LIU C X, CHEN S L, XIAO X H, Z, et al. A new concept on quality marker of Chinese materia medica: Quality control for Chinese medicinal products[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47(9): 1443-1457.
- [8] QIN K M, YANG B, HU J, et al. Application status and thinking of quantitative analysis of multi-components by single marker in quality control of multi-components traditional Chinese medicine[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49(3): 725-731.
- [9] 王欣, 覃瑶, 王德江, 等. 一测多评法在中药质量控制中的应用进展[J]. 中成药, 2016, 38(2): 395-402.
- [10] DING Y S, SUN X H, LI Y G, et al. Recent progress of ellagic acid and its derivatives[J]. J Hefei Univ Technol: Nat Sci(合肥工业大学学报: 自然科学版), 2008, 31(11): 1809-1812.
- [11] HAO J P, GAO Y Q, HE S H, et al. Protective effect of cinnamic acid preconditioning in the myocardial ischemia reperfusion injury of rats by activating Akt signal pathway[J]. Chin J Evid-Based Cardiovasc Med(中国循证心血管医学杂志), 2016, 8(8): 932-934.
- [12] 朱金段, 袁德俊, 林新颖, 等. 丁香的药理研究现状及临床应用[J]. 中国药物经济学杂志, 2013(1): 32-35.

- [13] 张建春, 蔡雅明, 周德斌, 等. 木香的研究进展[J]. 甘肃科技, 2010, 26(20): 170-173.
- [14] 王绪颖, 贾晓斌, 陈彦. 木香类药材的研究进展[J]. 中药材, 2010, 33(1): 153-157.
- [15] 中国药典. 一部[S]. 2020.
- [16] WANG X Y, HUO T T, LI Z G. Simultaneous determination of 4 active components in Qijudihuang oral liquid by QAMS method[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2017, 37(2): 290-296.
- [17] JIA W T, ZHANG Y Y, GUO N, et al. Simultaneous determination of five constituents in Roudoukou-8 Powder by QAMS[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2018, 40(6): 1307-1312.
- [18] 夏丽珍, 李春娇, 赖增发. “一测多评”测定木香中木香烃内酯和去氢木香内酯的含量[J]. 福建中医药, 2013, 44(3): 52-54.
- [19] HUANG H Y, RAO W W, ZHONG J L. Identification of liquidambaris resina and inspection of abietic acid in Xiaozhong tablets[J]. China Pharm(中国药业), 2019, 28(7): 30-32.
- [20] CHEN H Y, LIU H D, LI B, et al. Simultaneous determination of nine components in Baihe gujin tablet by quantitative analysis of multi-components by single marker[J]. Her Med(医药导报), 2020, 39(3): 370-375.
- [21] HE B, YANG S Y, ZHANG Y. A new method of calibration and positioning in quantitative analysis of multicomponents by single marker[J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2012, 47(12): 1653-1659.
- [22] DOU Z H, AN L P, CHEN M, et al. Simultaneous determination of six lignanoids in schisandra chinensis by quantitative analysis of multi-compounds by single marker[J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2014, 49(2): 147-151.
- [23] 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.
- [24] SHI W, WANG Z Z, NI F Y, et al. Application of QAMS method in quantitative evaluation of Liuwei Dihuang Soft Capsule[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2015, 46(19): 2880-2886.
- [25] ZHANG C Y, CHEN S H, WU S X. Determination of eight glycosides in compound ginseng tablets by QAMS[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(5): 708-714.
- [26] WANG L X, XIAO H B, LIANG X M. A new method to improve the reproducibility of retention time on reversed phase C₁₈ columns in different laboratories[J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2003, 31(10): 1232-1236.
- [27] DING L Y, ZHOU L, WANG L N, et al. Multi-components quantitation by one marker for simultaneous content determination of four components in *Psoralea corylifolia*[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(5): 152-154.
- [28] JIANG M F, HU X R, LIN R C, et al. Methodology study of multi-component quantitative analysis of Sanhuang tablets by single marker[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2015, 35(12): 2148-2157.
- [29] DOU Z H, QIAO J, BIAN L, et al. Combinational quality control method of rhei *Radix* et rhizoma based on fingerprint and QAMS[J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2015, 50(5): 442-448.

收稿日期: 2021-09-29

(本文责编: 蔡珊珊)