

对照品替代法用于莪术油中 3 个倍半萜类成分的含量测定研究

唐登峰, 罗镭, 马临科, 陈碧莲* (浙江省食品药品检验研究院, 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 杭州 310052)

摘要: 目的 建立对照品替代法(substitution of reference substance method, SRSM)测定莪术油中 3 种倍半萜类成分的含量。方法 采用 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-水为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 216 nm, 柱温为 30 ℃。以牻牛儿苗酮为参照物, 计算呋喃二烯、莪术二酮的相对校正因子和相对保留时间, 采用外标法和 SRSM 分别测定它们在莪术油中的含量。结果 3 种成分在各自范围内线性关系良好($R^2 \geq 0.9999$), 相对校正因子及相对保留时间稳定, SRSM 测定结果与外标法测定结果无显著性差异。结论 建立的 SRSM 操作简单、重复性好, 能够替代外标法用于莪术油中 3 种倍半萜类成分的含量测定。

关键词: 对照品替代法; 倍半萜类成分; 莪术油

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)04-0447-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.04.012

引用本文: 唐登峰, 罗镭, 马临科, 等. 对照品替代法用于莪术油中 3 个倍半萜类成分的含量测定研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(4): 447-454.

Studies on the Determination of Three Sesquiterpenoids in the Zedoary Turmeric Oil by Substitution of Reference Substance Method

TANG Dengfeng, LUO Lei, MA Linke, CHEN Bilian* [Zhejiang Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory of Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine(Traditional Chinese Patent Medicine), Hangzhou 310052, China]

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop substitution of reference substance method(SRSM) for simultaneous determination of furanodiene, curdione and germacrone in the Zedoary Turmeric oil. **METHODS** The determination of furanodiene, curdione and germacrone were performed on a C₁₈ analytical column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) with acetonitrile-water as mobile phase in a gradient elution program at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was maintained at 30 ℃. The detection wavelength was 216 nm. Germacrone was used as the internal reference substance, RCFs and RRTs of furanodiene and curdione were calculated. The contents of furanodiene and curdione were determined by both the external standard method(ESM) and SRSM. **RESULTS** Furanodiene, curdione and germacrone had a good linearity rangings respectively($R^2 \geq 0.9999$). RCFs and RRTs of furanodiene and curdione were stable. There was no significant difference between the results of SRSM and ESM. **CONCLUSION** The developed SRSM is simple and stable, which can determine the contents above mentioned in the Zedoary Turmeric oil instead of the ESM.

KEYWORDS: substitution of reference substance method(SRSM); sesquiterpenoid; Zedoary Turmeric oil

随着标准的不断提升, 含量测定用对照品需求量也日益增加, 特别是中药对照品大多从天然产物中分离纯化而得, 来之不易, 价格不菲, 日常检测的成本攀升, 同时有些对照品稳定性欠佳, 使用时间较短。面对这些不足, 利用 1 个对照品的测定结果进行相关多个成分含量表征的文献不断增加^[1-4], 逐步提出一系列方法学层面上的指南^[5]和探讨^[4,6], 也有指导原则的提出^[7], 为中药标准物质替代法的研究进行了较好的探索研究。

对照品替代法(substitution of reference substance

method, SRSM)涵盖了一测多评法、双标多测法和多替代对照品法, 是以相对保留时间定性、相对校正因子表征定量关系, 选择的参照物大多为样品自身含有的、稳定易测的成分, 且能够 1 次表征多个化合物的定量关系, 测定原理在文献上已有描述^[5], 该方法在中国药典 2015 年版^{[8]76-77, 101, 416-417, 1182-1184, 1491-1494}上已有一定的应用。

莪术油为温莪术的干燥根茎 (*Curcuma wenyujin* Y.H.Chen et C.Ling)经水蒸气蒸馏提取的挥发油^{[8]412-413}, 课题组曾对其中 3 个倍半萜类成

基金项目: 浙江省科技厅分析测试科技计划项目(2016C37064)

作者简介: 唐登峰, 男, 博士, 主任中药师 Tel: (0571)87180345
师, 硕导 Tel: (0571)86459402 E-mail: zsyonly@hotmail.com

E-mail: tdfengde@163.com

*通信作者: 陈碧莲, 女, 主任中药

分进行了定量测定^[9],实验中发现呋喃二烯较不稳定,需避光冷藏,保存困难,同时样品中含有的莪术二酮的对照品价格较高,针对以上问题,课题组尝试以稳定易得的牻牛儿酮为参照物,根据SRSM同时测定莪术油中另2个倍半萜类成分:莪术二酮和呋喃二烯,并进行方法学的验证。

1 仪器、试剂与试药

Agilent 1100 液相色谱仪、Agilent 1200 液相色谱仪、Shimadzu LC-20A 液相色谱仪、Waters 2695 液相色谱仪;Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Agilent ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Agilent Eclipse XDB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)、SHIMADZU VP-ODS 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);AG285 电子天平(Mettler Toledo);高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司);Advantage A10 Millipore 纯水仪(美国 Millipore 公司)。

牻牛儿酮对照品(批号:111665-201204;纯度:100%)、呋喃二烯对照品(批号:111824-201001;纯度:99.4%)、莪术二酮对照品(批号:111800-201001;纯度:99.8%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈(色谱纯,Merck 公司);水为超纯水。

莪术油样品,为市售2家企业的17批产品,批号见表15。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);以乙腈(A)-水(B)为流动相进行梯度洗脱:0~20 min, 60%→95%A, 20~35 min, 95%A;流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:216 nm;柱温:30 ℃;进样量:5 μL。在此条件下,混合对照品以及样品中的目标色谱峰与其他组分均能达到分离,对照品和样品色谱图见图1。

2.2 混合对照品溶液的制备

取呋喃二烯、牻牛儿酮和莪术二酮对照品适量,加无水乙醇制成浓度分别为50, 30, 100 μg·mL⁻¹的混合对照品溶液,即得。实验者甲、乙、丙分别制备混合对照品溶液2份,共6份,作为相对校正因子测定用对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取莪术油样品(批号:TR5120601)0.1 g,精密

称定,置50 mL量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀,精密量取5 mL,置25 mL量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

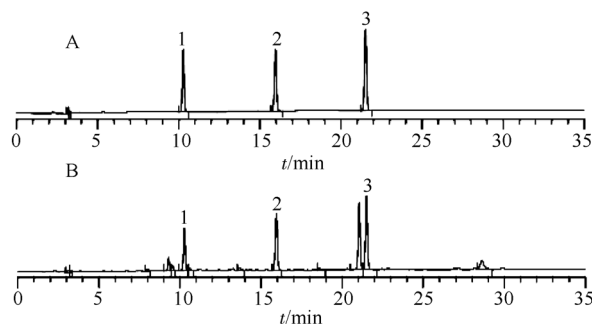


图1 高效液相色谱图

A-混合对照品溶液; B-供试品溶液; 1-莪术二酮; 2-牻牛儿酮; 3-呋喃二烯。

Fig. 1 HPLC chromatography

A-mixed standard solution; B-sample solution; 1-curdione; 2-germacrone; 3-furanodiene.

2.4 测定方法

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各5 μL,按“2.1”项下色谱条件进行测定,计算样品中呋喃二烯、牻牛儿酮和莪术二酮的相对校正因子、相对保留时间以及含量。

2.5 相对校正因子及相对保留时间的确定

2.5.1 线性关系及不同进样量相对校正因子考察精密吸取相对校正因子测定用对照品溶液1, 2, 5, 10, 20, 25, 30 μL,按“2.1”项下色谱条件进行测定,每个浓度进样3次,取峰面积平均值,以峰面积(y)为纵坐标,进样量(x, ng)为横坐标绘制标准曲线,计算回归方程和线性范围,结果表明,3个倍半萜类成分均具有较好的线性关系,见表1。

表1 莪术油中3种倍半萜类成分的标准曲线、线性范围
Tab. 1 Standard's calibration curves, linear ranges of three sesquiterpenoids in the Zedoary Turmeric oil

对照品	线性方程 1	线性方程 2	线性范围/ng
莪术二酮	$y=818.7x+3\ 592$ ($R^2=1.000\ 0$)	$y=820.43x$	49.10~294 6.24
牻牛儿酮	$y=2\ 897.8x+16\ 557$ ($R^2=0.999\ 9$)	$y=2\ 913.1x$	25.60~1 536.00
呋喃二烯	$y=2\ 851.5x+12\ 714$ ($R^2=0.999\ 9$)	$y=2\ 863.7x$	24.75~1 485.04

同时以牻牛儿酮为参照物,分别计算各个浓度水平下莪术二酮相对于牻牛儿酮的相对校正因子($f_{C/G}$)、呋喃二烯相对于牻牛儿酮的相对校正因子($f_{F/G}$)。在上述线性范围内,不同进样量水平相对校正因子数值稳定, RSD<1%,结果见表2。

表 2 以牻牛儿酮作为参照物的不同进样量相对校正因子考察结果

Tab. 2 Results of RCFs used germacrone as the internal reference substance with different amount

进样量/ μL	$f_{C/G}$	$f_{F/G}$
1	3.579 4	1.028 9
2	3.576 5	1.021 4
5	3.576 0	1.019 3
10	3.592 2	1.018 7
15	3.572 1	1.020 9
20	3.562 3	1.017 6
25	3.546 4	1.016 1
30	3.537 7	1.016 7
平均 f	3.576 4	1.020 9
RSD/%	0.53	0.76

另对 3 个对照品的标准曲线按直接求斜率的比值(曲线未强制过原点和强制过原点回归处理),得到 $f_{C/G}$ 、 $f_{F/G}$ 与外标法(external standard method, ESM)在各浓度水平分别求得平均的 $f_{C/G}$ 、 $f_{F/G}$ 比较, RSD<1%, 结果见表 3。可见 2 种方法求得的相对校正因子基本一致, 莪术二酮、牻牛儿酮和呋喃二烯 3 种倍半萜类成分的标准曲线基本上可以看作近似过原点。

表 3 不同方式计算相对校正因子结果

Tab. 3 Results of RCFs with different pattern

相对校正因子	$f_{C/G}$	$f_{F/G}$
标准曲线 1(未强制过原点)	3.539 5	1.016 2
标准曲线 2(强制过原点)	3.550 7	1.017 3
外标单点平均相对校正因子	3.576 4	1.020 9
平均相对校正因子	3.555 5	1.018 1
RSD/%	0.53	0.24

2.5.2 相对校正因子及其相对保留时间重复性的测定 在线性范围内, 对不同浓度的 3 个对照品进行相对校正因子及其相对保留时间重复性的测定, 结果不同浓度水平相对校正因子($f_{C/G}$ 、 $f_{F/G}$)数值稳定, RSD<2%, 结果见表 4。莪术二酮相对于牻牛儿酮的相对保留时间($RT_{C/G}$)和呋喃二烯相对于牻牛儿酮的相对保留时间($RT_{F/G}$)数值稳定, RSD<1%, 结果见表 5。

2.5.3 相对校正因子及其相对保留时间中间精密度的测定 3 个不同试验人员, 按“2.2”项下方法分别配制莪术二酮、牻牛儿酮、呋喃二烯混合对照品溶液, 精密吸取 1, 2, 5, 10, 20, 30 μL ,

按“2.1”项下色谱条件进行测定, 每个浓度进样 3 次, 取峰面积平均值, 以牻牛儿酮为内参物, 分别计算莪术二酮、呋喃二烯相对于牻牛儿酮间的相对校正因子($f_{C/G}$ 、 $f_{F/G}$)及相对保留时间($RT_{C/G}$ 、 $RT_{F/G}$), 结果见表 6~7。

表 4 相对校正因子重复性试验结果

Tab. 4 Results of RCFs repeatability test

编号	样品	$f_{C/G}$	$f_{F/G}$
对照品溶液 I	浓度 1	3.549 7	1.024 0
	浓度 2	3.550 4	1.024 5
	浓度 3	3.552 9	1.025 6
	浓度 4	3.564 9	1.025 4
	浓度 5	3.570 6	1.027 5
	浓度 6	3.571 6	1.031 5
对照品溶液 II	浓度 1	3.489 7	0.985 1
	浓度 2	3.509 8	0.987 3
	浓度 3	3.507 2	0.986 1
	浓度 4	3.517 7	0.987 4
	浓度 5	3.512 0	0.985 4
	浓度 6	3.531 9	0.988 4
对照品溶液 III	浓度 1	3.537 7	1.016 7
	浓度 2	3.562 3	1.017 6
	浓度 3	3.592 2	1.018 7
	浓度 4	3.576 0	1.019 3
	浓度 5	3.576 5	1.021 4
	浓度 6	3.579 4	1.028 9
平均相对校正因子		3.547 4	1.011 2
RSD/%		0.84	1.81

表 5 相对保留时间重复性试验结果

Tab. 5 Results of RRTs repeatability test

编号	样品	$RT_{C/G}$	$RT_{F/G}$
对照品溶液 I	浓度 1	0.635 3	1.377 1
	浓度 2	0.634 6	1.377 8
	浓度 3	0.634 4	1.376 8
	浓度 4	0.634 8	1.376 3
	浓度 5	0.634 8	1.376 2
	浓度 6	0.635 0	1.375 8
对照品溶液 II	浓度 1	0.626 1	1.358 0
	浓度 2	0.626 3	1.357 0
	浓度 3	0.626 7	1.357 1
	浓度 4	0.626 9	1.356 9
	浓度 5	0.626 6	1.357 5
	浓度 6	0.626 0	1.358 7
对照品溶液 III	浓度 1	0.626 0	1.357 9
	浓度 2	0.627 2	1.355 4
	浓度 3	0.627 7	1.354 9
	浓度 4	0.628 0	1.354 4
	浓度 5	0.628 1	1.354 4
	浓度 6	0.628 0	1.354 5
平均相对校正因子		0.629 6	1.363 1
RSD/%		0.61	0.73

表 6 相对校正因子中间精密度试验结果

Tab. 6 Results of RCFs intermediate precision test

进样量/ μL	人员 1		人员 2		人员 3		平均	
	$f_{C/G}$	$f_{F/G}$	$f_{C/G}$	$f_{F/G}$	$f_{C/G}$	$f_{F/G}$	$f_{C/G}$	$f_{F/G}$
1	3.507 1	1.068 4	3.555 3	1.017 6	3.748 2	1.054 1	3.624 6	1.049 0
2	3.525 7	1.066 7	3.551 7	1.018 5	3.778 3	1.056 2		
5	3.522 8	1.066 6	3.588 1	1.022 0	3.784 9	1.056 9		
10	3.520 6	1.067 4	3.585 8	1.020 2	3.761 8	1.056 7		
20	3.525 4	1.069 1	3.585 7	1.021 9	3.775 6	1.053 0		
30	3.542 0	1.075 7	3.584 9	1.023 6	3.798 1	1.068 2		
平均相对校正因子	3.523 9	1.069 0	3.575 3	1.020 6	3.774 5	1.057 5		
RSD/%	0.32	0.32	0.47	0.22	0.46	0.52		

表 7 相对保留时间中间精密度试验结果

Tab. 7 Results of RRTs used germacrone as the internal reference substance on intermediate precision

进样量/ μL	人员 1		人员 2		人员 3		平均	
	$RT_{C/G}$	$RT_{F/G}$	$RT_{C/G}$	$RT_{F/G}$	$RT_{C/G}$	$RT_{F/G}$	$RT_{C/G}$	$RT_{F/G}$
1	0.631 7	1.368 0	0.635 6	1.376 4	0.625 3	1.359 3	0.631 1	1.366 8
2	0.631 6	1.366 8	0.634 9	1.377 2	0.625 8	1.358 3		
5	0.632 0	1.366 1	0.634 6	1.376 4	0.626 9	1.356 7		
10	0.631 9	1.366 7	0.635 0	1.375 9	0.627 1	1.356 4		
20	0.631 3	1.367 4	0.635 1	1.375 9	0.627 6	1.355 8		
30	0.630 8	1.367 9	0.635 1	1.375 7	0.627 5	1.355 6		
平均相对保留时间	0.631 6	1.367 2	0.635 0	1.376 2	0.626 7	1.357 0		
RSD%	0.07	0.05	0.05	0.04	0.15	0.11		

2.5.4 稳定性试验 精密吸取相对校正因子测定用对照品溶液分别在 0, 1.5, 6, 10, 14, 17, 21, 25, 28, 32, 36, 40, 44 h 进样 5 μL , 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录峰面积, 考察对照品溶液峰面积、相对校正因子及相对保留时间的稳定性, 结果见表 8。不同时间点测定的相对校正因子和相对保留时间 RSD 均 $<1\%$, 平均相对校正因子和相对保留时间与方法拟定值比较, 相对平均偏差均 $<1\%$, 表明至少在 44 h 内相对校正因子和相对保留时间保持稳定。

2.5.5 不同品牌色谱柱比较 试验考察了 Kromasil C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm)、Agilent ZORBAX SB C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm)、Agilent Eclipse XDB C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm)、SHIMADZU VP-ODS(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm)、Diamonsil C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm) 4 个不同厂家色谱柱, 精密吸取相对校正因子测定用混合对照品溶液 1, 2, 5, 10, 20 μL , 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 每个浓度进样 3 次, 取平均值, 以牻牛儿酮为内参物, 计算莪术二酮、呋喃二烯对牻牛儿酮的相对校正因子及相对保留时间, 结

果见表 9。表明采用不同色谱柱, 相对校正因子及相对保留时间 RSD $<5\%$, 平均相对校正因子与方法拟定值比较, 相对平均偏差 $<2\%$ 。相对保留时间均在方法拟定值的 $\pm 5\%$ 之内。

表 8 相对校正因子和相对保留时间稳定性试验结果

Tab. 8 Results of RCFs and RRTs stability test

时间/h	$f_{C/G}$	$f_{F/G}$	$RT_{C/G}$	$RT_{F/G}$
0	3.575 4	1.024 7	0.635 7	1.374 5
1.5	3.581 1	1.024 9	0.635 9	1.374 5
6	3.586 5	1.026 2	0.635 2	1.375 2
10	3.588 2	1.025 0	0.635 3	1.375 2
14	3.579 7	1.025 1	0.635 3	1.375 1
17	3.568 1	1.025 9	0.635 6	1.374 5
21	3.566 0	1.022 5	0.636 9	1.372 7
25	3.575 0	1.024 2	0.636 4	1.372 7
28	3.568 1	1.023 1	0.637 2	1.371 8
32	3.568 0	1.022 1	0.636 4	1.372 4
36	3.570 0	1.023 9	0.636 4	1.374 3
40	3.564 8	1.024 7	0.634 9	1.375 6
44	3.566 5	1.022 7	0.636 1	1.374 4
平均	3.573 7	1.024 2	0.636 0	1.374 1
RSD/%	0.22	0.13	0.11	0.09
方法拟定值	3.589 2	1.028 2	0.630 2	1.366 8
相对平均偏差/%	0.22	0.19	0.45	0.27

表 9 不同色谱柱下相对校正因子和相对保留时间的测定结果

Tab. 9 Results of RCFs and RRTs on different HPLC column

色谱柱	柱子编号	$f_{C/G}$	$f_{F/G}$	$RT_{C/G}$	$RT_{F/G}$
Kromasil C ₁₈	ZY-C ₁₈ -114	3.560 0	1.026 4	0.634 8	1.376 7
Agilent ZORBAX SB C ₁₈	ZY-C ₁₈ -128	3.523 9	1.069 0	0.631 6	1.367 2
Kromasil C ₁₈	ZY-C ₁₈ -115	3.511 4	0.986 6	0.626 4	1.357 5
Agilent Eclipse XDB C ₁₈	ZY-C ₁₈ -088	3.527 8	0.980 6	0.614 9	1.403 8
SHIMADZU VP-ODS	ZY-C ₁₈ -127	3.705 1	1.067 7	0.629 1	1.375 3
Diamonsil C ₁₈	ZY-C ₁₈ -106	3.524 1	0.985 4	0.643 4	1.348 4
均值		3.714 2	1.037 3	0.626 7	1.389 8
RSD/%		1.98	3.99	1.51	1.38
方法拟定值		3.589 2	1.028 2	0.630 2	1.366 8
相对平均偏差/%		1.71	0.44	0.28	0.83

2.5.6 不同柱温比较 试验考察了 20, 25, 30, 35, 40 °C 不同的柱温对相对校正因子及相对保留时间的影响, 精密吸取相对校正因子测定用混合对照品溶液 5 μ L, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 以牻牛儿酮为内参物, 计算莪术二酮、呋喃二烯对牻牛儿酮的相对校正因子和相对保留时间, 结果见表 10, 表明采用不同柱温, 相对校正因子和相对保留时间 RSD<1%, 平均相对校正因子与方法拟定值比较, 相对平均偏差<3%, 相对保留时间均在方法拟定值的 $\pm 5\%$ 之内。

表 10 不同柱温下相对校正因子和相对保留时间的测定结果

Tab. 10 Results of RCFs and RRTs on different HPLC column temperature

柱温/°C	$f_{C/G}$	$f_{F/G}$	$RT_{C/G}$	$RT_{F/G}$
40	3.506 5	0.984 6	0.633 3	1.372 6
35	3.509 6	0.978 2	0.629 1	1.366 8
30	3.508 4	0.977 0	0.626 1	1.358 9
25	3.506 6	0.985 3	0.620 7	1.357 0
20	3.504 6	0.988 1	0.616 7	1.351 0
平均	3.507 2	0.982 7	0.625 2	1.361 3
RSD/%	0.06	0.49	1.06	0.62
方法拟定值	3.589 2	1.028 2	0.630 2	1.366 8
相对平均偏差/%	1.16	2.26	0.40	0.20

2.5.7 不同流速比较 试验考察了 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2 mL $\cdot$ min⁻¹ 不同的流速对相对校正因子及相对保留时间的影响, 精密吸取相对校正因子测定用混合对照品溶液 5 μ L, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 以牻牛儿酮为内参物, 计算莪术二酮、呋喃二烯对牻牛儿酮的相对校正因子及相对保留时间, 结果见表 11, 表明流速在一定的范围内,

相对校正因子和相对保留时间 RSD<5%, 平均相对校正因子与方法拟定值比较, 相对平均偏差<3%, 相对保留时间均在方法拟定值的 $\pm 5\%$ 之内。

表 11 不同流速下相对校正因子和相对保留时间的测定结果

Tab. 11 Results of RCFs and RRTs on different velocity of flow

流速/mL $\cdot$ min ⁻¹	$f_{C/G}$	$f_{F/G}$	$RT_{C/G}$	$RT_{F/G}$
1.2	3.502 9	0.977 3	0.606 6	1.401 2
1.1	3.519 0	0.989 7	0.606 8	1.401 0
1.0	3.508 4	0.977 0	0.626 1	1.358 9
0.9	3.496 4	0.986 8	0.637 5	1.336 2
0.8	3.509 7	0.980 9	0.649 4	1.314 1
平均	3.507 3	0.982 3	0.625 3	1.362 3
RSD/%	0.24	0.58	3.02	2.85
方法拟定值	3.589 2	1.028 2	0.630 2	1.366 8
相对平均偏差/%	1.15	2.28	0.39	0.16

2.5.8 不同液相色谱仪比较 试验考察了 Waters 2695 HPLC、Waters ACQUITY HPLC、Agilent 1260 HPLC、Agilent 1100 HPLC、Shimadzu LC-20A HPLC 等不同仪器对相对校正因子及相对保留时间的影响, 精密吸取相对校正因子测定用混合对照品溶液 1, 2, 5, 10, 20, 25 μ L, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 每个浓度进样 3 次, 取平均值, 以牻牛儿酮为内参物, 计算莪术二酮、呋喃二烯对牻牛儿酮的相对校正因子和相对保留时间, 结果见表 12, 表明用不同液相色谱仪测定, 相对校正因子和相对保留时间 RSD<4%, 平均相对校正因子与方法拟定值比较, 相对平均偏差<1%, 相对保留时间均在方法拟定值的 $\pm 5\%$ 之内。

表 12 不同液相色谱仪相对校正因子和相对保留时间的测定结果

Tab. 12 Results of RCFs and RRTs on different HPLC instruments

液相色谱仪	仪器编号	$f_{C/G}$	$f_{F/G}$	$RT_{C/G}$	$RT_{F/G}$
Waters 2695(VWD)	F-22-1	3.714 2	1.037 3	0.626 7	1.389 8
Waters ACQUITY(PDA)	F-22-68	3.705 1	1.067 7	0.629 1	1.375 3
Agilent 1260(DAD)	F-22-61	3.523 9	1.069 0	0.631 6	1.367 2
Agilent 1100(VWD)	F-22-14	3.605 3	1.007 6	0.631 4	1.373 7
Shimadzu LC-20A(PDA)	F-22-69	3.560 0	1.026 4	0.634 8	1.376 7
Shimadzu LC-20A(PDA)	F-22-41	3.511 4	0.986 6	0.626 4	1.357 5
平均		3.603 3	1.032 4	0.630 0	1.373 3
RSD/%		2.46	3.17	0.51	0.78
方法拟定值		3.589 2	1.028 2	0.630 2	1.366 8
相对平均偏差/%		0.20	0.21	0.02	0.24

2.5.9 不同测定波长的比较 试验考察了在测定波长附近进行微小变动的情况下相对校正因子的变化情况,除了现行标准中 216 nm 的测定波长外,另分别考察了 215, 217 nm 下的相对校正因子情况,精密吸取相对校正因子测定用混合对照品溶液 1, 2, 5, 10, 20, 25, 30 μ L, 按“2.1”项下色谱条件进行测定,每个浓度进样 3 次,取平均值,以牻牛儿酮为内参物,计算莪术二酮、呋喃二烯对牻牛儿酮的相对校正因子,结果见表 13,表明测定波长在(216 $\pm$ 1)nm 内,相对校正因子的测定 RSD 为 3.29%和 3.59%,相对校正因子的 RSD 均<4%,认为在(216 $\pm$ 1)nm 范围内,测定结果波动在可接受范围内($\leq$ 5%)。

表 13 不同测定波长相对校正因子测定结果

Tab. 13 Results of RCFs on different wavelength

测定波长/nm	$f_{C/G}$	$f_{F/G}$
215	3.642 1	1.042 2
216	3.567 8	1.020 0
217	3.413 8	0.971 2
均值	3.541 2	1.011 1
RSD/%	3.29	3.59

2.5.10 相对校正因子和相对保留时间的确定 取“2.5.1”和“2.5.2”项下共 6 份不同的混合对照品溶液,计算在不同浓度点得到的 36 个相对校正因子,并结合耐用性试验和含量测定项下共 6 份测定结果,计算平均相对校正因子 $f_{C/G}$ 、 $f_{F/G}$,它们分别为 3.589 2 和 1.028 2, RSD 分别为 2.46%, 2.75%; 计算平均相对保留时间 $RT_{C/G}$ 、 $RT_{F/G}$,分别为 0.630 2 和 1.366 8, RSD 分别为 0.75%, 0.84%。

最终作为相对校正因子和相对保留时间的拟定值,见表 14。

表 14 相对校正因子和相对保留时间的拟定

Tab. 14 Formulation of RCFs and RRTs

测定成分	相对保留时间	相对校正因子
牻牛儿酮	1.000 0	1.000 0
莪术二酮	0.630 2	3.589 2
呋喃二烯	1.366 8	1.028 2

2.6 样品测定

分别采用 ESM 和 SRSM 测定莪术油中莪术二酮、牻牛儿酮和呋喃二烯的含量,两者结果及比较见表 15。2 种方法测得的数据中,莪术二酮含量的相对平均偏差 $\leq$ 0.5%,呋喃二烯含量的相对平均偏差 $\leq$ 1%,说明可以用对照品替代法测定样品中莪术二酮和呋喃二烯的含量,测定结果和对照品 ESM 基本一致。

表 15 SRSM 和 ESM 测定结果比较

Tab. 15 Comparison of the results between the SRSM and the ESM

序号	批号	牻牛儿酮含量/%	莪术二酮含量/%		呋喃二烯含量/%		
			ESM	SRSM	相对平均偏差	ESM	SRSM
1	TR5120601	8.5	20.1	20.0	0.3	11.2	11.4
2	TR5130303	9.1	19.9	19.8	0.2	15.6	15.9
3	TR5130401	9.0	19.3	19.3	0.2	15.0	15.3
4	TR5130402	8.8	19.1	19.0	0.3	14.1	14.4
5	TR5140101	8.8	18.2	18.3	0.2	16.5	16.7
6	TR5140201	8.4	17.5	17.6	0.2	15.9	16.0
7	TR5140301	8.9	18.4	18.5	0.2	16.7	16.8
8	DZ130101	8.7	17.3	17.2	0.3	15.8	16.1
9	DZ130202	8.6	17.3	17.2	0.2	16.1	16.4
10	DZ130303	8.7	17.4	17.4	0.1	16.6	17.0
11	DZ130404	8.6	17.3	17.2	0.2	15.9	16.2
12	DZ130505	8.7	17.5	17.4	0.1	16.0	16.4
13	DZ130606	8.7	17.4	17.3	0.2	16.1	16.5
14	DZ130707	8.8	17.5	17.5	0.2	16.7	17.0
15	DZ130808	8.8	17.5	17.5	0.3	16.4	16.7
16	DZ130809	8.8	17.6	17.5	0.4	16.6	16.9
17	DZ121209	9.3	18.5	18.4	0.2	17.3	17.6

2.7 样品测定结果的复核

为了考察方法的可行性,另一省级药检所对该方法进行了方法学的复核,复核实验室通过 7 个浓度水平,每个浓度水平 3 份共 21 份混合对照品,测定了它们的平均相对保留时间和平均相对校正因子,并通过加样回收等方法,对 SRSM 和 ESM 进行比较,认为 SRSM 重现性好,方法可行。

笔者所在己方实验室和复核方实验室测定的平均相对校正因子和平均相对保留时间结果及其比较见表 16, 2 个实验室对 3 批样品的测定结果及其比较见表 17。

表 16 2 个实验室平均相对校正因子和平均相对保留时间的比较

Tab. 16 Comparison of the RCFs and RRTs between two labs

平均值	己方/%	复核方/%	相对平均偏差/%
相对保留时间(莪术二酮)	0.630 2	0.627 2	0.24
相对保留时间(牻牛儿酮)	1.366 8	1.382 4	0.57
相对校正因子(莪术二酮)	3.587 2	3.507 5	1.12
相对校正因子(牻牛儿酮)	1.028 2	1.036 5	0.40

表 17 2 个实验室 3 批样品测定结果的比较

Tab. 17 Comparison of the results of 3 batches sample between two labs

项目	批号	己方/%	复核方/%	相对平均偏差/%
莪术二酮(SRSM)	DZ130707	17.5	15.9	4.79
	DZ130809	17.5	16.4	3.24
	TR5120601	20.0	19.2	2.04
莪术二酮(ESM)	DZ130707	17.5	16.1	4.17
	DZ130809	17.5	16.6	2.64
	TR5120601	20.1	19.4	1.77
牻牛儿酮	DZ130707	8.8	8.1	4.14
	DZ130809	8.8	8.4	2.33
	TR5120601	8.5	8.3	1.19
呋喃二烯(SRSM)	DZ130707	17.0	15.3	5.26
	DZ130809	16.9	15.7	3.68
	TR5120601	11.4	10.7	3.17
呋喃二烯(ESM)	DZ130707	16.7	15.3	4.38
	DZ130809	16.4	15.7	2.18
	TR5120601	11.2	10.7	2.28

3 讨论

方法学验证过程中, 相对校正因子和相对保留时间稳定可靠, SRSM 测定结果和 ESM 基本没有差别, 2 个独立实验室之间的测定数据基本一致, 结果认为 SRSM 能够以牻牛儿酮 1 个对照品同时测定样品中另外 2 个倍半萜类成分, 避免使用价格比较高的莪术二酮以及不太稳定的呋喃二烯对照品, 认为 SRSM 在莪术油的质量控制中可以替代 ESM 含量测定, 具有简化实验, 节约成本, 以及避免了不稳定对照品的使用等优点。

选择莪术油作为 SRSM 研究的“工具药”, 主要是由于莪术油作为提取物, 与原药材相比, 化学成分相对简单, 且实验室对莪术油的含量测定有较长时间的积累, 其所含的主要化学成分明确

(多为倍半萜类化合物), 特别是莪术烯和呋喃二烯谱峰是紧邻着, 它们的分离度为 1.6~2.1, 试验显示, 经过不同的液相色谱仪、不同品牌的 C₁₈ 色谱这对同分异构体在 C₁₈ 色谱柱(粒径为 5 μm)上的色柱(粒径为 5 μm)、不同流速、不同柱温等的“挑战”, 以相对保留时间来锁定呋喃二烯色谱峰这一方法, 均没有错位到紧挨着的莪术烯色谱峰上。尽管如此, 考虑到不同实验室仪器和设备的差别, 参照中国药典 2015 年版现有的 SRSM 含量测定项下, 将相对保留时间偏差定为±5%, 并规定若相对保留时间偏离>5%, 则应以相应的被替代对照品确证为准。

试验中发现, 对于紫外波长下测定的样品, 造成相对校正因子差异变化最大的因素是测定波长, 主要是因为 SRSM 中测定波长的统一难以达到均为各个化合物的最大吸收, 尽管测定波长不是每个化合物的最大吸收波长, 但依然遵循 Lambert-Beer 定律这一定量分析的基石, 应尽可能在几个待测成分的最大吸收波长附近且较为平坦的区域中选择测定波长, 将所测成分的波动降到最低, 故认为 SRSM 更适合于多个光谱相似的同母核或同一类化学成分的同时测定。从另一方面来看, SRSM 对实验室液相色谱仪器检测器的波长定期校准、比例阀的精准调节、对照品的正确储存等涉及不同实验室定量的各个环节方面, 都提出了普适性的、比较高的要求。

有不少文献引用到中国药典中黄连含量测定方法来说明 SRSM, 从严格意义上而言, 该方法只是以盐酸小檗碱对照品来表征味连中表小檗碱、黄连碱和巴马汀的含量, 标准中只有相对保留时间, 未见相对校正因子的规定, 故在本研究中没有引用。

虽然 SRSM 在中国药典上已有应用, 同时也有相关技术指导原则的提出, 但它们只是一个阶段的积累和总结, 仍然有待进一步的实验研究积累和不断完善优化, 如在现行版药典标准中只有咳特灵片和咳特灵胶囊标准中的表述为“相对校正因子”, 其他所载标准均为“校正因子”, 这方面仍需进一步规范; 同时各个标准中相对校正因子和相对保留时间的有效数字的位数不统一, 从 2 位有效数字到 4 位有效数字不等, 应按各自要求予以规范; 同时参照相关药典标准, 应在 SRSM 中列出可供参考的色谱柱, 并附上方法学考察时

对应的被代替物的线性范围,以便在实际的检测过程中予以参照,并在标准中明确 SRSMS 的检测结果超出线性范围或处于限度的临界点时,应以被替代对照品进行含量再测定以便测定结果的验证;同时应对 SRSMS 展开测量不确定度的研究,以明确测定结果在测定量值传递过程中变动的可接受范围;由于 UPLC 的不断发展,小粒径(约 2 μm)填充剂装填的色谱柱在药典方法的也有应用,由于色谱柱填充粒径的改变,也会导致化合物在填料上吸附分离的色谱行为发生一定程度的改变,故在标准中应予明确色谱柱中填充剂的粒径。

虽然有一定的前提条件,但 SRSMS 在中药含量测定的分析测试报道中越来越多,充分展示了它以简驭繁、整体相关和降低成本的优越性,该方法在莪术油的倍半萜成分的测定上也显示了它的独到之处,与以前的研究结果相比,SRSMS 为莪术油的质量控制提供了更为简化和节约成本的一种方法。

REFERENCES

- [1] NIU T Z, CHEN S L, WANG H F, et al. Simultaneous determination of seven constituents in compound kushen injection with quantitative analysis of multi-components by single-marker [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药

学), 2019, 36(10): 1187-1192.

- [2] ZOU S Z, LUO Z C, ZHANG Y. Determination of six index components in Zhengtian Pills by quantitative analysis of multi-components by single marker[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药), 2019, 36(3): 331-335.
- [3] WU L, LI Y K, XIE W B, et al. Simultaneous determination of 10 chemical constituents in diabetic foot tincture by QAMS method [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(6): 750-757.
- [4] PANG Y, SUN L, JIN H y, et al. Discussion on application and technical requirements of substitution reference substance method for simultaneous determination of multi-components in traditional Chinese medicine [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2013, 33(1): 169-177.
- [5] 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.
- [6] WEI F, CHENG X L, MA L Y, et al. Discussion on technical requirements of substitution method of reference substance used for drug standards [J]. Drug Stand China(中国药品标准), 2012, 13(1): 12-15.
- [7] SUN L, JIN H Y, MA S C, et al. Guideline of substitute reference substance method for evaluation of traditional Chinese medicines [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2015, 50(4): 284-286.
- [8] 中国药典. 一部[S]. 2015: 76-77, 101, 412-413, 416-417, 1182-1184, 1491-1494.
- [9] ZHANG P, ZHU M, TANG D F, et al. Simultaneous HPLC determination of three sesquiterpenes content in Oleum Curcumae [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2009, 29(11): 1825-1827.

收稿日期: 2019-04-30

(本文责编: 沈倩)