

· 一测多评法 ·

编者按:中药多成分、多靶点及整体作用的特点,决定了任何一个单一成分作为指标都不能准确反映其质量,多指标质量控制已经成为中药质量评价的重要发展方向之一。基于中药的化学成分多为一类或几类相似物,各成分间存在某些内在关系。2006 年,王智民等率先提出了一测多评法(quantitative analysis of multicomponents by single marker, QAMS),即利用中药有效成分内在的函数关系和比例关系,只测定一个成分,来实现多个成分(对照品难以得到或难供应)的同步测定,从方法的适应范围、方法学验证等多方面进行了深入研究和完善,并建立了 QAMS 质量评价技术指南。

该方法提出以后逐渐被行业内研究学者接受和认可,形成了完善的方法学验证体系。《中国药典》2010 年版首次收载黄连药材及饮片 QAMS 评价标准,成为首个采用一测多评定量评价模式进行质量评价的标准,由此一测多评方法正式应用于生产实际。目前已完成了近 100 多种单味药材和 50 多种制剂中应用 QAMS 的技术可行性研究。QAMS 应用于药材的质量评价主要包括不同药材来源、部位、产地、采收加工以及含不稳定成分药材的质量评价和品质比较研究等;在炮制方面的应用主要是中药饮片以及炮制品的质量评价及其炮制工艺优化;在中药制剂方面的应用主要体现在中药材、中间体及其制剂的质量评价以及同品种不同剂型中药制剂间通用标准的建立等方面。

QAMS 相关研究论文逐年增长,据统计,自 2006 年由本课题组发表第一篇关于 QAMS 的研究论文至今,已发表 QAMS 论文近 300 篇,其中关于药材 QAMS 研究论文 160 余篇,成方制剂 QAMS 研究论文近 100 篇,其他近 30 篇。尤其是近两年, QAMS 技术在复方中的应用报道显著增加。基于目前的研究, QAMS 应用于中药复杂体系中同类成分之间的评价是基本可行的。一测多评作为适宜于中药特点的多指标质量控制评价新模式和新方法,会越来越地应用于中药的科研和生产实际中,成为未来中药质量评价的重要发展方向。

一测多评法结合 UPLC-Q-TOF/MS 评价天舒胶囊中 主要苯酞类成分

王晶晶^{1,2}, 梁娟娟^{1,2}, 陈两绵², 高慧敏^{2*}, 王智民^{2*}, 萧伟³, 王振中³

(1. 河南中医学院 药学院, 郑州 450008;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700;

3. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001)

【摘要】 目的:建立天舒胶囊中丁基苯酞、洋川芎内酯 A 和 Z-藜本内酯的一测多评法。**方法:**采用 HPLC 建立丁基苯酞、洋川芎内酯 A 和 Z-藜本内酯的同步测定法,基于在线全波长扫描光谱和 UPLC-Q-TOF/MS 提供的精确相对分子质量确证待测色谱峰;以丁基苯酞为内参物,通过斜率法分别于单一波长和不同波长下计算丁基苯酞对洋川芎内酯 A 和 Z-藜本内酯的相对校正因子,并用相对保留时间对待测色谱峰进行定位;采用外标法进行测定结果准确性验证。**结果:**建立了天舒胶囊中 3 种成分的一测多评质量评价模式,洋川芎内酯 A 和 Z-藜本内酯对丁基苯酞的相对校正因子分别为 0.272 和 1.056;18 批次天舒胶囊样品中三者含量范围分别为 0.008% ~ 0.036%, 0.023% ~ 0.125%, 0.028% ~ 0.084%;外标法和 QAMS 测定结果无差异。**结论:**建立的以丁基苯酞为内参物,测定洋川芎内酯 A 和 Z-藜本内酯含量的一测多评质量评价模式,适合用于天舒胶囊成品和生产过程的质量控制。

【关键词】 一测多评法; 相对校正因子; 天舒胶囊; 高效液相色谱; 超高压液相色谱-四级杆串联质谱

【中图分类号】 R284.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2015)22-0086-08

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.2015220086

【收稿日期】 20150819(003)

【基金项目】 中国博士后基金项目(2012M510731);中药制药过程新技术国家重点实验室开放基金项目(SKL2010M0204)

【第一作者】 王晶晶,在读硕士, Tel/Fax:010-84014128, E-mail:jingwqt@163.com

【通讯作者】 *高慧敏,研究员,从事中药化学与质量评价研究, Tel/Fax:010-84014128, E-mail:hmgao@icmm.ac.cn;

*王智民,研究员,从事中药化学与质量评价研究, Tel/Fax:010-84014128, E-mail:zhmw123@263.net

Analysis of Phthalides in Tianshu Capsule by QAMS Combined with UPLC-Q-TOF/MS

WANG Jing-jing^{1,2}, LIANG Juan-juan^{1,2}, CHEN Liang-mian², GAO Hui-min^{2*}, WANG Zhi-min^{2*}, XIAO Wei³, WANG Zhen-zhong³ (1. Pharmacy College, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Herbal Medicine, Beijing 100700, China; 3. Jiangsu Kanion Pharmaceut Co. Ltd., Lianyungang 222001, China)

[**Abstract**] **Objective:** To develop quantitative analysis of multi-components with single marker (QAMS) for determination of butylphthalide, senkyunolide A, and *Z*-ligustilide in Tianshu capsule. **Method:** An HPLC method was developed for simultaneous determination of butylphthalide, senkyunolide A and *Z*-ligustilide, and the chromatographic peaks were identified based on the UV spectra and accurate molecular weights obtained by UPLC-Q-TOF/MS. With butylphthalide as the internal substance, relative correction factors (RCFs) of senkyunolide A and *Z*-ligustilide to butylphthalide were calculated at single wavelength and different wavelengths respectively through slope analysis method. Relative retention value method was used for positioning of chromatographic peaks; external standard method (ESM) was used to verify the result accuracy. **Result:** QAMS method was established for the determination of butylphthalide, senkyunolide A and *Z*-ligustilide in Tianshu capsule and RCFs of senkyunolide A and *Z*-ligustilide to butylphthalide were 0.272 and 1.056, respectively. The contents of these three marker compounds were 0.008% - 0.036%, 0.023% - 0.125% and 0.028% - 0.084% in 18 batches of Tianshu capsule samples. No significant differences on the quantitative results were found between QAMS and ESM. **Conclusion:** The established QAMS method with butylphthalide as the internal substance could be used for the determination of butylphthalide, senkyunolide A and *Z*-ligustilide in finished products and manufacturing process of Tianshu capsule.

[**Key words**] quantitative analysis of multi-components with single marker; relative correction factor; Tianshu capsule; HPLC; UPLC-QTOF/MS

一测多评 (quantitative analysis of multi-components with single marker, QAMS) 质量评价模式自提出以来,经过多年的完善与发展,逐渐被行业内的同行接受和认可,并上升为国家标准^[1],成为 2015 年版《中国药典》重点推广的实用技术。目前, QAMS 广泛应用于中药材和中成药质量评价、炮制工艺优选和制剂过程考察等研究,在其应用的过程中,相对校正因子 (RCF) 的准确性是影响测定结果的关键。本文以天舒胶囊为例,对影响 RCF 准确性的关键因素 (计算方法和波长选择) 进行了重点考察,为完善 QAMS 的方法学建立模式提供参考。

天舒胶囊由川芎和天麻 2 味药材提取精制而成,收载于 2010 年版《中国药典》一部,具有活血平肝之功效,主要用于血瘀所致血管神经性头痛等疾病的治疗^[2]。天舒胶囊主要活性成分包括天麻素及其双糖苷、巴利森苷、阿魏酸,藁本内酯及其二聚物等^[3],建立涵盖不同类别成分的天舒胶囊整体质量控制策略,对于保障其产品质量一致性和临床用药安全至关重要。天舒胶囊中天麻素和阿魏酸为代表的酚苷类和有机酸类的分析方法已经建立^[4],本

文关注其另一类重要成分藁本内酯类化合物。藁本内酯类成分在当归、川芎、藁本等伞形科植物中含量较高,是该类植物来源的中药中主要特征成分之一,具有舒张血管、改善微循环、抑制血小板聚集等多种与临床功效相关的药理活性^[5]。由于该类成分具有热敏和光敏性,稳定性差,目前尚缺乏市场持续供应的含量测定级别的对照品,适合采用 QAMS 建立质量评价模式。丁基苯酞是从植物源衍生的上市药物 (丁苯酞软胶囊),在苯酞类成分中具有相对好的稳定性。因此,本研究以丁基苯酞为内参物,通过斜率法、多点法分别于单一波长和不同波长下,建立了丁基苯酞对洋川芎内酯 A 和 *Z*-藁本内酯的 RCFs,并用相对保留值法对待测色谱峰进行定位;采用建立的 RCF 计算 18 批次天舒胶囊中洋川芎内酯 A 和 *Z*-藁本内酯的含量,与外标法测定结果比较,两者没有明显的差异。

1 仪器和试剂

LC-20A 型高效液相色谱系统, LC solution 工作站 (Shimadzu 公司); 1100 系列高效液相色谱系统, Agilent chemstation 工作站 (Agilent 公司); 2695-

2996 型高效液相色谱系统, Empower 3 工作站, Vexo G2-S 型 UPLC Q-TOF/MS 联用仪 (Waters 公司); XS 105 型 1/10 天平, BSA224S-CW 型 1/1 万天平 (Mettler Toledo)。

Phenomenex Luna C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Agilent C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱。18 批次天舒胶囊为江苏康缘药业股份有限公司提供的市售成品。Z-藁本内酯对照品 (批号 111737-201406) 购于中国食品药品检定研究院, 洋川芎内酯 A (批号 ZA0815BC13) 和丁基苯酞 (批号 RJ0721FA14) 对照品购于上海源叶生物科技有限公司 (HPLC ≥ 98%), 甲醇和乙腈为色谱级, 娃哈哈纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司), 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 洋川芎内酯 A, 丁基苯酞和 Z-藁本内酯同步测定方法学的建立

2.1.1 色谱条件 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (42:58), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 228, 280, 328 nm, 进样量 10 μL。上述色谱条件下, 混合对照品和典型样品的 HPLC 见图 1, 洋川芎内酯 A, 丁基苯酞和 Z-藁本内酯在各检测波长下与其他色谱峰分离度良好, 峰纯度检查为单一色谱峰。进一步通过在线紫外吸收光谱和液质分析确认目标色谱峰的纯度和化合物的精确相对分子质量, 在线紫外吸收光谱见图 2, UPLC 和总离子流见图 3, 各化合物质谱数据见表 1。

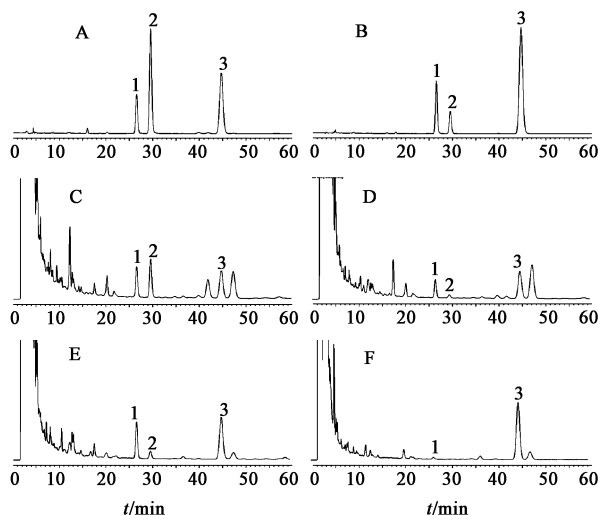
液质分析条件为 Waters XBridge 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相乙腈-0.1% 甲酸水 (42:58), 流速 0.4 mL·min⁻¹。正离子模式, 毛细管电压 3.0 kV, 锥孔电压 40 V, 离子源偏置电压 80 V, 源温 100 °C, 脱溶剂温度 150 °C, 锥孔气流速 50 L·h⁻¹, 脱溶剂气流速 300 L·h⁻¹, 扫描范围 *m/z* 100 ~ 1 200。

2.1.2 对照品溶液的制备

表 1 化合物 1~3 的质谱数据

Table 1 MS data of compounds 1-3

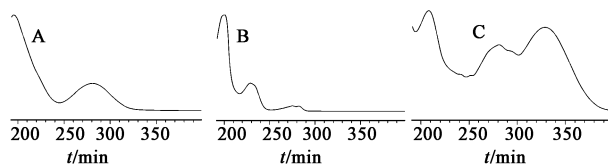
化合物	分子式	理论值/ <i>m/z</i>	测定值/ <i>m/z</i>	误差/ppm
洋川芎内酯 A	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	193.122 9 [M + H] ⁺	193.122 1 [M + H] ⁺	4.1
丁基苯酞	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	191.107 2 [M + H] ⁺	191.106 3 [M + H] ⁺	4.7
Z-藁本内酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	191.107 2 [M + H] ⁺	191.106 4 [M + H] ⁺	4.2



A. 混合对照品 (228 nm); B. 混合对照品 (280 nm); C. 样品 (228 nm); D. 样品 (254 nm); E. 样品 (280 nm); F. 样品 (328 nm); 1. 洋川芎内酯 A; 2. 丁基苯酞; 3. Z-藁本内酯

图 1 天舒胶囊典型样品的 HPLC

Fig. 1 HPLC profiles of mixed reference substances and Tianshu capsule



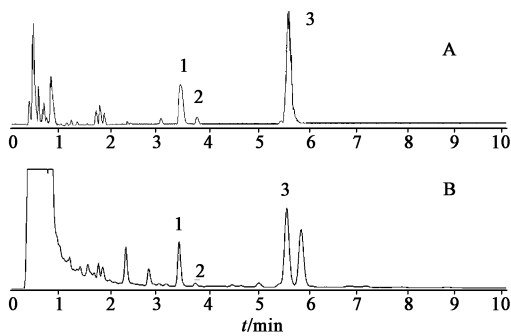
A. 洋川芎内酯 A; B. 丁基苯酞; C. Z-藁本内酯

图 2 化合物 1~3 的全波长紫外吸收

Fig. 2 Ultraviolet spectra of senkyunolide A (A), butylphthalide (B) and Z-ligustilide (C)

丁基苯酞和 Z-藁本内酯对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成质量浓度为洋川芎内酯 A 0.375 g·L⁻¹, 丁基苯酞 0.268 g·L⁻¹, Z-藁本内酯 0.430 g·L⁻¹ 的对照品溶液。分别对上述对照品溶液依次稀释, 制成 8 个浓度的系列对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取天舒胶囊内容物, 研细, 称取约 1 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 200 W, 频率 53 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 离心 (14 800



1. 洋川芎内酯 A; 2. 丁基苯酞; 3. Z-藁本内酯
图 3 天舒胶囊的正离子模式基峰离子流 (A) 和 UPLC (B)
Fig. 3 BPI (A) and UPLC (B) profiles of Tianshu capsule

表 2 测定成分的标准曲线、检测限和定量限

Table 2 Regression equation of senkyunolide A, butylphthalide and Z-ligustilide

待测成分	线性方程	R^2	线性范围/ μg	定量限/ ng	检测限/ ng
洋川芎内酯 A (228 nm)	$Y = 6\,612.0X + 13\,087$	0.999 7	0.029 3 ~ 3.75	-	-
丁基苯酞 (228 nm)	$Y = 2\,7867X + 49\,292$	0.999 8	0.020 9 ~ 2.68	2.69	1.35
Z-藁本内酯 (228 nm)	$Y = 15\,766X + 37\,066$	0.999 7	0.033 6 ~ 4.30	-	-
洋川芎内酯 A (280 nm)	$Y = 7\,543.9X + 15\,607$	0.999 7	0.029 3 ~ 3.75	11.1	3.71
丁基苯酞 (280 nm)	$Y = 4\,942.3X + 7\,473.3$	0.999 8	0.020 9 ~ 2.68	-	-
Z-藁本内酯 (280 nm)	$Y = 23\,244X + 53\,572$	0.999 8	0.033 6 ~ 4.30	-	-
Z-藁本内酯 (328 nm)	$Y = 29\,398X + 67\,255$	0.999 8	0.033 6 ~ 4.30	83.9	42.0

280 nm 下测得洋川芎内酯 A, 丁基苯酞峰面积的 RSD 分别为 0.4%, 0.4% 和 0.4%, 0.7%; 在 228, 280, 328 nm 下测得 Z-藁本内酯峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 0.5%, 0.4%。

2.1.6 稳定性试验 取同一供试品溶液分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72 h 进样测定。结果 228, 280 nm 下测得洋川芎内酯 A, 丁基苯酞峰面积的 RSD 分别为 0.8%, 0.4% 和 0.5%, 1.9%; 228, 280, 328 nm 下测得 Z-藁本内酯峰面积的 RSD 分别为 0.9%, 0.8%, 0.9%。结果表明处理后的供试品溶液在 72 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一批天舒胶囊 (批号 110607) 内容物约 1 g, 共 6 份, 按供试品溶液制备方法平行制备样品, 分别进样 10 μL , 在各成分最大吸收波长处测得洋川芎内酯 A (280 nm), 丁基苯酞 (228 nm) 和 Z-藁本内酯 (328 nm) 的质量分数分别为 0.067%, 0.024%, 0.045%, RSD 分别为 0.6%, 0.4% 和 0.8%。

2.1.8 加样回收率 称取同一批天舒胶囊 (批号 110607) 约 0.5 g, 精密称定, 分别精密加入对照品洋

$\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$) 10 min, 取上清液, 即得。

2.1.4 线性关系及检测限、定量限 取 2.1.2 项下的对照品溶液进样 10 μL , 分别在 228, 280 和 328 nm 处记录洋川芎内酯 A, 丁基苯酞和 Z-藁本内酯的峰面积。每个浓度进样 3 次, 取平均值, 以质量浓度对峰面积积分值进行回归处理, 分别计算不同波长下各成分的回归方程, 结果见表 2。分别在各成分的最大吸收波长处, 信噪比 (S/N) 为 3 时的进样量为检测限, S/N 为 10 时的进样量为定量限。

2.1.5 精密度试验 取同一对照品溶液按上述色谱条件连续进样 6 次, 测得峰面积积分值, 在 228,

川芎内酯 A, 丁基苯酞和 Z-藁本内酯 (约相当于各样品含量的 80%, 100%, 120%), 按供试品制备项下方法制备供试品溶液, 在各成分最大吸收波长处测定洋川芎内酯 A (280 nm), 丁基苯酞 (228 nm) 和 Z-藁本内酯 (328 nm) 的含量, 计算加样回收率。结果见表 3。

2.2 QAMS 质量评价模式的建立

2.2.1 待测指标相对校正因子的计算 目前相对校正因子的计算方法有斜率法和多点校正法^[6]。斜率法计算时, 可以采用不同浓度的对照品溶液进样相同体积, 峰面积与进样浓度进行回归处理得到线性方程; 多点校正法为采用同一对照品浓度进样不同体积测定的峰面积与进样量进行回归处理得到线性方程。本实验分别考察了不同进样方式和计算方法得到的丁基苯酞对洋川芎内酯 A 和 Z-藁本内酯的 RCFs, 见表 4。结果表明不同浓度进相同体积或同一浓度进相同体积对 RCF 影响较小, 而斜率法与多点法比较, 斜率法得到的 RCFs 偏差较小。因此, 后续采用斜率法计算的 RCFs 进行含量计算。

表 3 天舒胶囊中洋川芎内酯 A, 丁基苯酞和 Z-藁本内酯的加样回收率

Table 3 Recovery of senkyunolide A, butylphthalide and Z-ligustilide in Tianshu capsule

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
洋川芎内酯 A	0.500 3	0.335	0.270	0.610	101.9	100.9	1.1
	0.499 7	0.335	0.270	0.610	101.9		
	0.499 8	0.335	0.270	0.609	101.5		
	0.499 9	0.335	0.338	0.675	100.6		
	0.500 1	0.335	0.338	0.670	99.11		
	0.500 0	0.335	0.338	0.676	100.9		
	0.500 4	0.335	0.401	0.737	100.2		
	0.499 5	0.335	0.401	0.744	102.0		
	0.500 3	0.335	0.401	0.734	99.50		
	Z-藁本内酯	0.500 3	0.225	0.192	0.413		
0.499 7		0.225	0.192	0.410	96.35		
0.499 8		0.225	0.192	0.409	95.83		
0.499 9		0.225	0.231	0.452	98.27		
0.500 1		0.225	0.231	0.453	98.70		
0.500 0		0.225	0.231	0.449	96.97		
0.500 4		0.225	0.269	0.482	95.53		
0.499 5		0.225	0.269	0.481	95.17		
0.500 3		0.225	0.269	0.481	95.17		
丁基苯酞		0.500 3	0.120	0.090	0.210	100.0	100.0
	0.499 7	0.120	0.090	0.210	100.0		
	0.499 8	0.120	0.090	0.211	101.1		
	0.499 9	0.120	0.112	0.228	96.43		
	0.500 1	0.120	0.112	0.233	100.9		
	0.500 0	0.120	0.112	0.235	102.7		
	0.500 4	0.120	0.135	0.253	98.52		
	0.499 5	0.120	0.135	0.256	100.7		
	0.500 3	0.120	0.135	0.255	100.0		

表 4 斜率法和多点法计算的相对校正因子

Table 4 RCFs calculated by different methods

待测成分		斜率法			多点法		
		228 nm	280 nm	最大吸收 *	228 nm	280 nm	最大吸收 *
洋川芎内酯 A	f_1	0.237	1.526	0.271	0.252	1.542	0.267
	f_2	0.240	1.543	0.273	0.231	1.511	0.264
	相对偏差%	0.63	0.55	0.37	4.3	1.0	0.56
Z-藁本内酯	f_1	0.566	4.703	1.055	0.554	4.732	1.037
	f_2	0.568	4.724	1.058	0.557	4.704	1.042
	相对偏差%	0.18	0.22	0.14	0.27	0.30	0.24

注: * 最大吸收波长处得到的 RCF; 丁基苯酞 228 nm, 洋川芎内酯 A 280 nm, Z-藁本内酯 328 nm; f_1 指不同浓度对照品溶液进样相同体积; f_2 指同一浓度对照品溶液进样不同体积。

2.2.2 相对校正因子的耐用性考察

2.2.2.1 色谱柱 采用 Shimadzu 高效液相色谱系统, 分别在单一波长 228 nm 和 280 nm 下和不同波长 228, 280, 328 nm 处, 采用 3 种色谱柱 Phenomenex Luna C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Agilent C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 和 Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 测定待测成分的峰面积, 采用斜率法计算丁基苯酞对洋川芎内酯 A 和 Z-藁本内酯的 RCF, 结果表明洋川芎内酯 A 和 Z-藁本内酯的 RCF 的

RSD 均 < 3.3%。

2.2.2.2 高效液相色谱系统 采用 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 考察了 3 种不同的高效液相色谱系统对 RCFs 的影响, 结果表明 2 个成分 RCF 的 RSD < 6.0%, 提示必要时, 需要对不同色谱系统进行波长校正, 以获得更稳定的 RCFs。

2.2.2.3 柱温 采用 Shimadzu 高效液相色谱系统, 分别在单一波长 228 nm 和 280 nm 下和不同波

长 228, 280, 328 nm 处, 采用 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 分别在柱温 34, 35, 36 °C 测定待测成分的峰面积, 斜率法计算 RCFs。结果表明柱温的变化对 RCFs 没有显著影响, RSD 在 1.8% ~ 2.8%。

2.2.2.4 流速 采用 Shimadzu 高效液相色谱系统, Phenomenex Luna C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 分别在单一波长 228 nm 和 280 nm 以及不同波长 228, 280, 328 nm 处, 测定不同流速 (0.95, 1.00, 1.05 mL · min⁻¹) 对相对校正因子的影响, 结

果表明流速对 RCFs 没有显著影响, RSD < 3.4%。

2.3 待测组分洋川芎内酯 A 和 Z-藁本内酯色谱峰的定位方法 采用相对校正因子计算和耐用性考察时记录的色谱图, 进行丁基苯酞对洋川芎内酯 A 和 Z-藁本内酯的相对保留时间 ($RT_{Ri/s}$) 和保留时间差 ($\Delta t_{Ri/s}$) 计算, 结果显示待测成分间的相对保留时间较稳定, RSD 均 < 3%; 待测成分间的保留时间差波动较大。见表 5, 6。因此, 在方法应用阶段, 相对保留时间较适宜用于洋川芎内酯 A 和 Z-藁本内酯色谱峰的定位。

表 5 不同柱温和流速下待测成分间的相对保留时间和保留时间差

Table 5 Values of Δt_{Ry-Rs} and $RT_{Ry/Rs}$ under the different column temperatures and flow rates

柱温/°C	Δt_{Ry-Rd}	$RT_{Rg/Rd}$	Δt_{Rg-Rd}	$RT_{Rg/Rd}$	流速/mL · min ⁻¹	Δt_{Ry-Rd}	$RT_{Ry/Rd}$	Δt_{Rg-Rd}	$RT_{Rg/Rd}$
34	-2.992	0.900	15.28	1.512	0.95	-3.150	0.899	15.94	1.512
35	-2.514	0.914	16.32	1.559	1.00	-2.514	0.914	16.32	1.559
36	-2.903	0.901	15.02	1.513	1.05	-2.799	0.900	14.46	1.514

注: y 为洋川芎内酯 A; g 为 Z-藁本内酯; d 为丁基苯酞。表 6 同。

表 6 不同色谱系统和色谱柱下待测成分间的相对保留时间值和保留时间差

Table 6 Values of Δt_{Ry-Rs} and $RT_{Ry/Rs}$ by using different instruments and columns

仪器	色谱柱	Δt_{Ry-Rd}	$RT_{Ry/Rd}$	Δt_{Rg-Rd}	$RT_{Rg/Rd}$
Waters_Alliance	Phenomenex Luna	-2.955	0.898	14.557	1.503
Agilent_1200	Phenomenex Luna	-3.242	0.895	16.134	1.520
Shimadzu 1	Phenomenex Luna	-3.102	0.902	15.643	1.524
Shimadzu 2	Phenomenex Luna	-3.036	0.900	15.588	1.526
	Agilent	-2.514	0.914	16.315	1.559
	Kromasil	-2.461	0.895	13.381	1.569

2.4 一测多评法与外标法测定的比较 采用外标法 (External standard method, ESM) 对天舒胶囊中 3 种待测成分进行含量测定, 再用 QAMS 建立的待测成分间的 RCFs 进行含量计算, 将 2 种方法所得结果比较, 以验证 QAMS 测定含量的可靠性, 结果表明 2 种方法测定结果无明显差异, 相对偏差均 < 5%, 见表 7 ~ 9。

3 讨论

3.1 检测波长的选择 本研究与以往 QAMS 方法学研究区别之处在于对检测波长的选择和相对校正因子的计算方法进行了系统评价。检测波长的选择依赖于内参物的紫外吸收特征, 兼顾供试品溶液的色谱分离情况确定。228 和 275 nm 为丁基苯酞的最大吸收波长, 280 nm 为洋川芎内酯 A 的最大吸收波长, 281 和 328 nm 为 Z-藁本内酯的最大吸收波长, 在不同波长下洋川芎内酯 A 和藁本内酯的分离

度及色谱峰纯度均较好。因此, 本实验同步考察了单一波长 228, 280 nm 以及不同检测波长 (丁基苯酞 228 nm, 洋川芎内酯 280 nm, 藁本内酯 328 nm) RCF 的重复性, 并采用不同波长下的 RCF 进行含量计算, 结果表明固定波长或可变波长 2 种检测方式均可行。考虑到 280 nm 时样品中丁基苯酞吸收较弱, 因此建议最好采用可变波长进行检测, 即丁基苯酞 228 nm, 洋川芎内酯 A 280 nm, Z-藁本内酯 328 nm。

3.2 QAMS 质量评价模式的建立 本实验建立了以丁基苯酞为内参物, 同步测定天舒胶囊中洋川芎内酯 A 和藁本内酯含量的方法。通过对 RCF、保留时间差及相对保留时间进行耐用性和系统适应性研究, 确定了可变波长模式下丁基苯酞对洋川芎内酯 A 和 Z-藁本内酯的 RCF 分别为 0.272, 1.056, 可以用于含丁基苯酞、洋川芎内酯 A 和藁本内酯的中药材、饮片及其中成药制剂中三者的

表 7 QAMS 和外标法同步测定天舒胶囊中 3 种成分的含量(228 nm)

Table 7 Contents of three marker compounds in TSC samples obtained by ESM and QAMS (228 nm)

%

批号	丁基苯酞		洋川芎内酯 A		Z-藜本内酯		
	ESM	ESM	QAMS	相对偏差	ESM	QAMS	相对偏差
090720	0.027	0.113	0.110	1.35	0.066	0.066	0
100717	0.036	0.126	0.122	1.61	0.067	0.067	0
100718	0.022	0.087	0.085	1.16	0.052	0.051	0.97
110607	0.024	0.070	0.068	1.45	0.046	0.046	0
110608	0.029	0.106	0.104	0.95	0.073	0.073	0
130306	0.008	0.041	0.041	0	0.048	0.047	1.06
130307	0.010	0.052	0.053	0.96	0.058	0.056	1.79
130308	0.009	0.022	0.023	2.27	0.030	0.029	1.72
130309	0.014	0.107	0.108	0.47	0.084	0.081	1.85
130310	0.014	0.105	0.107	0.95	0.083	0.080	1.25
130403	0.009	0.029	0.029	0	0.031	0.030	1.67
130405	0.013	0.040	0.041	1.25	0.031	0.030	1.67
130407	0.011	0.034	0.035	1.47	0.030	0.029	1.72
130408	0.009	0.030	0.031	1.67	0.032	0.031	1.61
130409	0.011	0.034	0.034	0	0.028	0.027	1.85
14050120930	0.015	0.033	0.033	0	0.047	0.045	2.22
14050120966	0.015	0.033	0.033	0	0.049	0.045	4.44
14050120973	0.015	0.033	0.034	1.52	0.049	0.047	2.13

表 8 QAMS 和外标法同步测定天舒胶囊中 3 中苯酞类成分的含量(280 nm)

Table 8 Contents of three marker compounds in TSC samples obtained by ESM and QAMS (280 nm)

%

批号	丁基苯酞		洋川芎内酯 A		Z-藜本内酯		
	ESM	ESM	QAMS	相对偏差	ESM	QAMS	相对偏差
090720	0.031	0.113	0.113	0	0.067	0.066	0.75
100717	0.037	0.125	0.126	0.40	0.067	0.066	0.75
100718	0.023	0.086	0.087	0.58	0.051	0.051	0
110607	0.026	0.068	0.069	0.73	0.046	0.046	0
110608	0.031	0.104	0.105	0.48	0.074	0.073	0.68
130306	0.008	0.041	0.040	1.25	0.048	0.045	3.33
130307	0.011	0.052	0.050	2.00	0.058	0.054	3.70
130308	0.008	0.023	0.022	2.27	0.029	0.027	3.70
130309	0.015	0.107	0.103	1.94	0.084	0.078	3.85
130310	0.016	0.106	0.101	2.48	0.083	0.077	3.90
130403	0.009	0.029	0.028	1.79	0.031	0.029	3.45
130405	0.010	0.040	0.038	2.63	0.030	0.028	3.57
130407	0.008	0.034	0.033	1.52	0.030	0.028	3.57
130408	0.007	0.030	0.029	1.72	0.032	0.029	5.17
130409	0.010	0.033	0.032	1.56	0.028	0.026	3.85
14050120930	0.014	0.032	0.031	1.61	0.046	0.043	3.49
14050120966	0.014	0.033	0.031	3.23	0.046	0.042	4.76
14050120973	0.015	0.033	0.032	1.56	0.047	0.044	3.41

表 9 QAMS 和外标法同步测定天舒胶囊中 3 种苯酞类成分在各自最大吸收波长下的含量测定

Table 9 Contents of three marker compounds in TSC samples obtained by ESM and QAMS- λ_{max}

%

批号	丁基苯酞		洋川芎内酯 A		Z-藁本内酯		
	ESM	ESM	QAMS	相对偏差	ESM	QAMS	相对偏差
090720	0.027	0.113	0.114	0.44	0.067	0.066	0.75
100717	0.036	0.125	0.127	0.79	0.067	0.066	0.75
100718	0.022	0.086	0.087	0.58	0.051	0.050	0.99
110607	0.024	0.068	0.069	0.73	0.046	0.045	1.10
110608	0.029	0.104	0.105	0.48	0.073	0.073	0
130306	0.008	0.041	0.040	1.25	0.026	0.025	2.00
130307	0.010	0.052	0.051	0.98	0.057	0.055	1.81
130308	0.009	0.023	0.022	2.27	0.028	0.027	1.85
130309	0.014	0.107	0.105	0.95	0.083	0.079	2.53
130310	0.014	0.106	0.103	1.46	0.082	0.078	2.56
130403	0.009	0.029	0.028	1.79	0.030	0.029	1.72
130405	0.013	0.040	0.039	1.28	0.029	0.028	1.79
130407	0.011	0.034	0.034	0	0.029	0.028	1.79
130408	0.009	0.030	0.029	1.72	0.031	0.030	1.67
130409	0.011	0.033	0.033	0	0.028	0.026	3.85
14050120930	0.015	0.032	0.032	0	0.045	0.043	2.33
14050120966	0.015	0.033	0.032	1.56	0.044	0.042	2.38
14050120973	0.015	0.033	0.032	1.56	0.047	0.044	3.41

含量测定。文献有报道川芎、当归药材及其制剂中丁基苯酞、洋川芎内酯 A 和 Z-藁本内酯的一测多评测定法^[7-8],检测波长 280 nm 时丁基苯酞对洋川芎内酯 A 和 Z-藁本内酯 RCF 分别为 0.490 7 和 0.226 3,与本文研究结果差距较大,考虑可能是两者求得的 RCF 互为倒数关系。这也提示,在 RCF 应用时,一定要注明该参数如何用于待测成分的含量计算。

3.3 待测色谱峰的定位 通过对洋川芎内酯 A, 丁基苯酞和 Z-藁本内酯之间保留时间差和相对保留时间的比较,发现流速、柱温等微小改变,即能导致保留时间差的较大偏差,而相对保留时间则相对稳定。最终建议采用相对保留时间,结合色谱峰的全波长紫外吸收光谱,进行未知样品中待测色谱峰洋川芎内酯 A 和 Z-藁本内酯的准确定位。

3.4 天舒胶囊中 3 种成分含量差异较大 本研究报道了天舒胶囊中丁基苯酞、洋川芎内酯 A 和 Z-藁本内酯的含量,18 批次样品中三者含量范围分别为 0.008% ~ 0.036%, 0.023% ~ 0.125%, 0.028% ~ 0.084%, 含量差异相对较大,提示天舒胶囊的源头药材和生产过程的质量控制亟需加强,以保障终产品质量的一致性和稳定性。

[参考文献]

[1] 高慧敏,宋宗华,王智民,等. 适合中药特点的质量评价模式——QAMS 研究概述[J]. 中国中药杂志,2012, 37(4):405-416.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:523.

[3] Liang J J, Gao H M, Chen L M, et al. Chemical profiling of an anti-migraine herbal preparation, Tianshu capsule, based on the combination of HPLC, LC-DAD-MSⁿ and LC-DAD-ESI-IT-TOF/MS analyses[J]. eCAM, 2014 (2014), doi:10.1155/2014/580745.

[4] 梁娟娟,高慧敏,陈两绵,等. HPLC 同步测定天舒胶囊 3 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013, 19(17):81-84.

[5] 汪程远,杜俊蓉,钱忠明. 藁本内酯的研究进展[J]. 中国药学杂志,2006,41(12):889-891.

[6] 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]. 药学报,2012, 47(12): 1653-1656.

[7] 杨艳,刘云华,黄志芳,等. 一测多评法测定川芎、当归中洋川芎内酯 A 和藁本内酯的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(3):58-62.

[8] 杨艳,易进海,刘云华,等. 一测多评法测定中成药中洋川芎内酯 A 和藁本内酯[J]. 中成药,2015,37(5): 1000-1002.

[责任编辑 顾雪竹]