

HPLC-QAMS 同时测定芪桑益肝丸中 8 种成分的含量

骆航, 周振华, 李华生, 孙兴力, 李玉婷(永州职业技术学院医学院, 湖南 永州 425100)

摘要: 目的 建立高效液相一测多评法(HPLC-QAMS)同时测定芪桑益肝丸中虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的含量。方法 采用 Agilent HC-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 °C; 乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长分别为 290 nm(检测虎杖苷、白藜芦醇和大黄素)、243 nm(检测獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷)和 254 nm(检测毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素)。以獐牙菜苦苷为内参物, 建立其他 7 个成分的相对校正因子, 计算含量。结果 虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素质量浓度分别在 3.46~69.20, 2.09~41.80, 2.77~55.40, 6.71~134.20, 2.88~57.60, 1.19~23.80, 0.56~11.20, 0.89~17.80 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好($r \geq 0.999 1$), 平均加样回收率(RSD)分别为 100.05%(0.82%), 97.79%(1.07%), 98.41%(0.99%), 99.75%(0.65%), 98.72%(1.21%), 99.07%(1.19%), 96.99%(1.04%), 97.65%(1.38%), 一测多评法计算结果与外标法实测值无显著性差异。结论 所建立的 HPLC-QAMS 方法专属性强、准确度高, 为芪桑益肝丸的质量评价提供了参考依据。

关键词: 一测多评法; 芪桑益肝丸; 虎杖苷; 白藜芦醇; 大黄素; 獐牙菜苦苷; 龙胆苦苷; 獐牙菜苷; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 芒柄花素

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)09-1049-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.09.005

引用本文: 骆航, 周振华, 李华生, 等. HPLC-QAMS 同时测定芪桑益肝丸中 8 种成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(9): 1049-1054.

Simultaneous Determination of Eight Components in Qisang Yigan Pills by HPLC-QAMS

LUO Hang, ZHOU Zhenhua, LI Huasheng, SUN Xingli, LI Yuting(*College of Medical, Yongzhou Vocational Technical College, Yongzhou 425100, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a HPLC-QAMS method for the determination of polydatin, resveratrol, emodin, swertiamarin, gentiopicroin, sweroside, calycosin 7-*O*-β-D-glucopyranoside and formononetin in Qisang Yigan pills. **METHODS** The separation and detection procedure was performed on an Agilent HC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) at 30 °C. The mobile phase was composed of acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution using gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detecting wavelength was set at 290 nm for polydatin, resveratrol and emodin, 243 nm for swertiamarin, gentiopicroin and sweroside, and 254 nm for calycosin 7-*O*-β-D-glucopyranoside and formononetin. Using swertiamarin as an internal standard, the relative correction factors of the other seven constituents were calculated, after which the content determination was made. **RESULTS** Polydatin, resveratrol, emodin, swertiamarin, gentiopicroin, sweroside, calycosin 7-*O*-β-D-glucopyranoside and formononetin showed good linear relationships within the ranges of 3.46–69.20, 2.09–41.80, 2.77–55.40, 6.71–134.20, 2.88–57.60, 1.19–23.80, 0.56–11.20, 0.89–17.80 μg·mL⁻¹($r \geq 0.999 1$), whose average recoveries(RSD) were 100.05%(0.82%), 97.79%(1.07%), 98.41%(0.99%), 99.75%(0.65%), 98.72%(1.21%), 99.07%(1.19%), 96.99%(1.04%), 97.65%(1.38%), respectively. There was no significant difference between the calculated values and the measured values of the external standard method. **CONCLUSION** The established HPLC-QAMS method is specific, reliable and can be used to provide a reference standard for quality evaluation of Qisang Yigan pills.

KEYWORDS: QAMS; Qisang Yigan pills; polydatin; resveratrol; emodin; swertiamarin; gentiopicroin; sweroside; calycosin 7-*O*-β-D-glucopyranoside; formononetin

芪桑益肝丸由虎杖、青叶胆、黄芪、苦参、桑寄生等 8 味中药材按照中医理论配伍而成, 临床上主要用于对湿热瘀阻、脾肾两虚所致的慢性乙型肝炎的治疗, 方中黄芪补气升阳、行滞通痹,

桑寄生祛风湿、补肝肾, 共为君药; 附以青叶胆清肝利胆, 冬虫夏草、龟板滋阴补肾、益肾健骨, 虎杖、苦参清热利湿, 三七活血化瘀, 诸药共奏, 以达健脾益肾、活血化瘀、清利湿热的临床功效。

基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目(19C1851)

作者简介: 骆航, 男, 讲师 Tel: 18974649050 E-mail: luohang9050@163.com

芪桑益肝丸收载于国家药品标准 WS-10261(ZD-0261)-2002-2011Z^[1], 现行质量标准和文献报道^[2]中仅对大黄素进行了定量研究, 中药及其制剂具有多组分、多靶点及其组分间协同作用的复杂体系, 单一成分难以全面评价中药及其制剂的内在质量, 同时现有的控制成分大黄素来源广泛, 专属性不足, 利用中药质量标志物确定原则对多种成分同时定量测定的多指标成分质量控制模式, 近年来已逐步应用于中药及其制剂, 尤其中成药复方制剂的质量控制中。本研究依据以君药为首选, 兼顾臣佐使药的中药质量标志物确定原则, 选取方中君药黄芪^[3-4]所含活性成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素, 臣药青叶胆所含代表性成分獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和獐牙菜苷, 以及佐药虎杖所含特征成分虎杖苷、白藜芦醇和大黄素为定量测定目标成分, 以獐牙菜苦苷为内参物, 建立高效液相色谱一测多评法同时检测芪桑益肝丸中 8 种成分含量, 为芪桑益肝丸质量标准的提升提供了有力的数据参考。

1 材料

毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(批号: 111920-201606; 含量: 97.6%)、白藜芦醇对照品(批号: 111535-201703; 含量: 99.4%)、大黄素对照品(批号: 110756-201913; 含量: 96.0%)、獐牙菜苦苷对照品(批号: 110785-201404; 含量: 98.3%)和龙胆苦苷对照品(批号: 110770-201918; 含量: 97.1%)均购于中国食品药品检定研究院; 虎杖苷对照品(批号: PRF8071241; 含量: 98.8%)、獐牙菜苷对照品(批号: PRF8061441; 含量: 99.4%)和芒柄花素对照品(批号: PRF8091225; 含量: 99.9%)均购自成都普瑞法科技开发有限公司; 乙腈为色谱纯, 其余试剂为分析纯; 芪桑益肝丸(云南希陶绿色药业股份有限公司, 规格: 每 10 丸重 0.7 g, 批号: 181105, 190107, 190315)。

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Waters 2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); BP211D 型分析天平(德国 Sartorius 公司); KQ5200B 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 对照品储备液和混合对照品溶液的制备

精密称取虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖

苷和芒柄花素对照品各适量, 用甲醇制成质量浓度分别为 0.692, 0.418, 0.554, 1.342, 0.576, 0.238, 0.112, 0.178 mg·mL⁻¹ 的 8 种对照品储备液; 精密吸取 8 种对照品储备液各 2.5 mL, 用甲醇制成虎杖苷 34.6 μg·mL⁻¹、白藜芦醇 20.9 μg·mL⁻¹、大黄素 27.7 μg·mL⁻¹、獐牙菜苦苷 67.1 μg·mL⁻¹、龙胆苦苷 28.8 μg·mL⁻¹、獐牙菜苷 11.9 μg·mL⁻¹、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 5.6 μg·mL⁻¹、芒柄花素 8.9 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液和阴性样品溶液的制备

取芪桑益肝丸样品研成细粉, 取 0.2 g, 精密称定, 加入甲醇 25 mL, 称重, 超声波清洗器超声处理 30 min, 放冷后称重, 用甲醇补充后过滤, 制成芪桑益肝丸供试品溶液; 按芪桑益肝丸国家药品标准 WS-10261(ZD-0261)-2002-2011Z 项下工艺处方分别制备缺虎杖、缺青叶胆和缺黄芪的阴性样品, 再按上述方法制成阴性样品溶液。

2.3 色谱条件与系统适应性试验

Agilent HC-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温为 30 °C; 以乙腈(A)-0.1%甲酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~9 min, 8%A; 9~20 min, 8%→17%A; 20~36 min, 17%→25%A; 36~49 min, 25%→38%A; 49~60 min, 38%→8%A), 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长分别为 290 nm(0~20 min 检测虎杖苷、白藜芦醇和大黄素)^[5]、243 nm(20~36 min 检测獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和獐牙菜苷)^[6]和 254 nm(36~60 min 毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素)^[7-9], 进样量 10 μL。在上述色谱条件下, 取“2.1”项下混合对照品溶液及“2.2”项下各溶液进样检测, 结果所记录色谱峰基线平稳, 阴性样品对芪桑益肝丸中 8 种成分的同时测定无干扰, 供试品溶液色谱图中虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素与相邻色谱峰的分度均>1.5, 理论塔板数按各成分色谱峰计均≥4 500, 色谱图见图 1。

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.1”项下 8 种对照品储备溶液各适量, 用甲醇制成虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素 20 倍质量浓度差的 6 个系列混合对照品溶液, 依法进样测定 8 种成分的峰面积, 以峰面积(Y)为纵坐标, 虎杖苷、白藜芦醇、

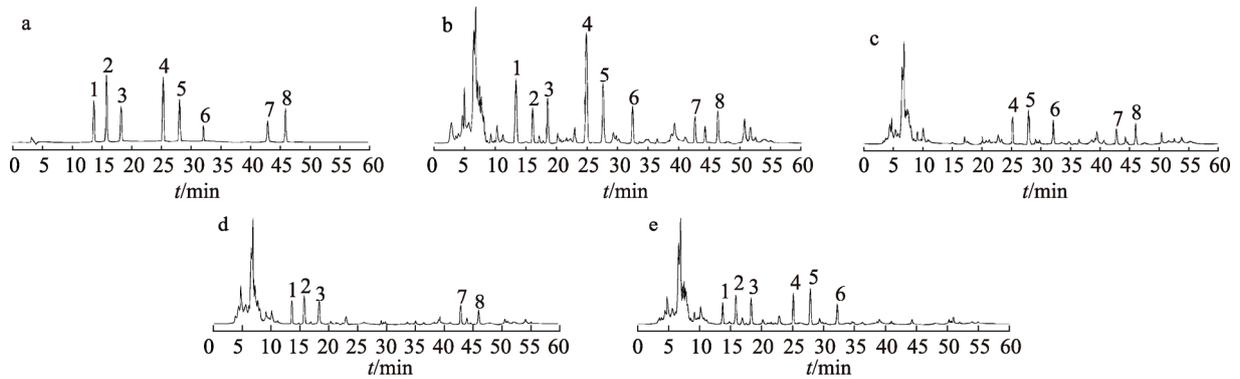


图1 混合对照品(a)、芪桑益肝丸(b)、虎杖阴性样品(c)、青叶胆阴性样品(d)和黄芪阴性样品(e)的HPLC色谱图
1-虎杖苷; 2-白藜芦醇; 3-大黄素; 4-獐牙菜苦苷; 5-龙胆苦苷; 6-獐牙菜苷; 7-毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 8-芒柄花素。

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference(a), Qisang Yigan pills(b), negative sample without *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix*(c), negative sample without *Swertiae Mileensis Herba*(d) and negative sample without *Astragali Radix*(e)
1-polydatin; 2-resveratrol; 3-emodin; 4-swertiamarin; 5-gentiopicroin; 6-sweroside; 7-calycosin-7-O- β -D-glucopyranoside; 8-formononetin.

大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素质量浓度(X , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标进行线性回归, 结果见表1。

表1 8种成分线性关系和范围

Tab. 1 Linearity and range of eight components

成分	回归方程	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	相关系数 r
虎杖苷	$Y=1.096\ 0\times 10^6X-895.6$	3.46~69.20	0.999 4
白藜芦醇	$Y=8.996\ 5\times 10^5X+437.3$	2.09~41.80	0.999 2
大黄素	$Y=1.014\ 9\times 10^6X-1\ 048.8$	2.77~55.40	0.999 7
獐牙菜苦苷	$Y=1.325\ 4\times 10^6X-476.9$	6.71~134.20	0.999 1
龙胆苦苷	$Y=1.129\ 6\times 10^6X+621.6$	2.88~57.60	0.999 3
獐牙菜苷	$Y=8.981\ 7\times 10^5X-1\ 065.1$	1.19~23.80	0.999 4
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y=7.290\ 8\times 10^5X-488.4$	0.56~11.20	0.999 5
芒柄花素	$Y=9.287\ 2\times 10^5X+545.3$	0.89~17.80	0.999 2

2.5 仪器精密性、重复性和稳定性考察

取“2.1”项下混合对照品溶液重复进样6次, 测得虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素色谱峰峰面积的RSD分别为0.63%, 0.94%, 0.89%, 0.58%, 0.71%, 1.07%, 1.20%和1.15%。

取同一批号芪桑益肝丸样品(批号: 181105), 按“2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液, 依法进样检测虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素色谱峰的峰面积, 计算得8种成分含量的RSD分别为0.99%, 1.11%, 1.02%, 0.83%, 0.96%, 1.59%, 1.86%和1.71%。

取芪桑益肝丸同一份供试品溶液(批号: 181105), 于0, 2, 4, 6, 10, 18, 24 h进样检测

虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素色谱峰的峰面积, 结果芪桑益肝丸供试品溶液24 h内稳定, 8种成分峰面积的RSD分别为0.67%, 0.95%, 0.86%, 0.57%, 0.72%, 1.04%, 1.18%和1.13%。

2.6 加样回收率试验

取虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素含量已知的同一批号芪桑益肝丸样品(批号: 181105)适量, 研成细粉, 取9份, 每份0.5 g, 精密称定, 随机分成3组, 分别精密加入混合对照品溶液(虎杖苷 $0.472\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、白藜芦醇 $0.236\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、大黄素 $0.318\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、獐牙菜苦苷 $0.982\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、龙胆苦苷 $0.408\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、獐牙菜苷 $0.174\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 $0.082\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、芒柄花素 $0.126\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 0.5, 1.0, 1.5 mL各一组, 使其符合中国药典2015年版四部规定, 待测目标成分对照品加入量约为样品含有量的50%, 100%和150%, 再按“2.2”项下方法制成加样供试品溶液, 依法进样检测虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的峰面积, 计算各成分测得量, 采用测得量与样品含有量之差除以对照品加入量计算8种成分的加样回收率, 结果8种成分的加样回收率和RSD分别为100.05%(0.82%), 97.79%(1.07%), 98.41%(0.99%), 99.75%(0.65%), 98.72%(1.21%), 99.07%(1.19%), 96.99%(1.04%)和97.65%(1.38%)。

2.7 相对校正因子的测定

取“2.4”项下6个系列混合对照品溶液，每份溶液平行进样3次，依法进样测定虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的峰面积，以獐牙菜苦苷为内参物，按照计算公式 $f_{k/s}=f_k/f_s=(\rho_k A_s)/(\rho_s A_k)$ (式中 ρ 代表质量浓度， A 代表峰面积， k 代表内参物獐牙菜苦苷， s 代表其他成分)计算虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的相对校正因子，结果见表2。

表2 以獐牙菜苦苷为内参物的7种成分的相对校正因子
Tab. 2 Relative correction factors of seven components with swertiamarin as an internal standard

系列混合对照品溶液	虎杖苷	白藜芦醇	大黄素	龙胆苦苷	獐牙菜苷	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	芒柄花素
1	1.186 1	1.463 5	1.271 9	1.154 5	1.471 9	1.784 2	1.413 5
	1.193 5	1.461 2	1.273 5	1.157 2	1.483 5	1.789 5	1.419 8
	1.182 3	1.477 6	1.278 1	1.151 6	1.479 2	1.780 2	1.416 4
2	1.188 9	1.508 7	1.272 9	1.173 9	1.463 9	1.803 9	1.423 7
	1.193 7	1.517 2	1.264 3	1.176 2	1.468 1	1.798 4	1.430 5
	1.189 3	1.514 6	1.268 5	1.180 1	1.470 2	1.806 1	1.428 3
3	1.221 5	1.487 2	1.286 9	1.181 5	1.447 6	1.839 5	1.446 1
	1.226 9	1.495 7	1.281 5	1.186 4	1.450 2	1.842 9	1.447 9
	1.218 7	1.481 3	1.293 7	1.179 1	1.448 3	1.843 7	1.451 3
4	1.199 7	1.447 4	1.291 2	1.163 4	1.452 6	1.801 6	1.408 4
	1.193 6	1.439 8	1.293 6	1.160 7	1.448 4	1.805 3	1.412 6
	1.197 5	1.443 2	1.287 3	1.171 6	1.456 1	1.798 6	1.406 7
5	1.220 9	1.470 8	1.339 1	1.178 1	1.483 8	1.843 2	1.425 9
	1.217 6	1.479 5	1.345 9	1.181 3	1.495 7	1.847 9	1.427 3
	1.223 4	1.468 3	1.341 2	1.179 6	1.482 5	1.845 1	1.422 6
6	1.206 3	1.471 5	1.295 4	1.173 5	1.473 6	1.810 7	1.425 9
	1.204 7	1.476 2	1.298 7	1.176 2	1.472 1	1.8243	1.423 7
	1.203 1	1.468 9	1.293 6	1.169 8	1.475 4	1.819 6	1.429 4
平均值	1.203 8	1.476 3	1.293 2	1.171 9	1.467 9	1.815 8	1.425 6
RSD/%	1.20	1.52	1.91	0.87	0.99	1.26	0.89

表3 不同仪器、不同色谱柱待测成分相对校正因子

Tab. 3 Relative correction factors of the components on different instruments and chromatographic columns

仪器	色谱柱	虎杖苷	白藜芦醇	大黄素	龙胆苦苷	獐牙菜苷	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	芒柄花素
Agilent 1200	Agilent HC-C ₁₈	1.206 6	1.479 3	1.295 8	1.174 5	1.470 1	1.817 4	1.426 9
	Hypersil C ₁₈	1.185 3	1.443 1	1.260 6	1.169 8	1.451 8	1.781 2	1.413 5
	Kromasil C ₁₈	1.203 4	1.470 5	1.291 7	1.170 4	1.460 7	1.807 7	1.422 8
Waters 2695	Agilent HC-C ₁₈	1.222 2	1.494 6	1.317 4	1.192 5	1.489 2	1.823 5	1.436 3
	Hypersil C ₁₈	1.210 1	1.486 8	1.300 9	1.177 7	1.473 3	1.800 6	1.419 1
	Kromasil C ₁₈	1.224 9	1.501 2	1.326 8	1.191 6	1.487 0	1.848 9	1.454 4
平均值		1.208 7	1.479 3	1.298 9	1.179 4	1.472 0	1.813 2	1.428 8
RSD/%		1.19	1.40	1.77	0.87	0.99	1.26	1.03

2.8 相对校正因子耐用性考察

2.8.1 不同仪器、不同色谱柱 精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液，在 Agilent 1200 型、Waters 2695 型 2 种高效液相色谱仪和 Agilent HC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Hypersil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)3 种色谱柱条件下，依法进样测定虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的峰面积，计算各成分的相对校正因子，对比考察不同仪器、不同色谱柱对相对校正因子的影响，结果见表3。

2.8.2 不同柱温 精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液，在 28, 29, 30, 31, 32 °C 5 种柱温条件下，依法进样测定虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的峰面积，计算各成分的相对校正因子，对比考察不同柱温对相对校正因子的影响，结果见表4。

2.9 待测组分色谱峰的定位

精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液，在 Agilent 1200 型、Waters 2695 型 2 种高效液相色谱仪和 Agilent HC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Hypersil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)3 种色谱柱条件下，依法进样测定，记录虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的保留时间，以内参物獐牙菜苦苷色谱峰为基准峰，采用相对保留时间值法对待测成分色谱峰进行定位，结果见表5。

2.10 样品含量测定 取3个批号的芪桑益肝丸样品适量，按“2.2”项下方法每个批号平行制备

3 份芪桑益肝丸供试品溶液, 依法进样检测虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的峰面积, 采用外标法和一测多评法分别计算虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的含量, 结果见表 6。

表 4 不同柱温待测成分相对校正因子

Tab. 4 Relative correction factors of the components on different column temperature

柱温/℃	虎杖苷	白藜芦醇	大黄素	龙胆苦苷	獐牙菜苷	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	芒柄花素
28	1.191 3	1.460 0	1.275 9	1.168 5	1.456 2	1.800 9	1.419 6
29	1.198 2	1.475 5	1.290 4	1.170 7	1.462 1	1.807 6	1.420 7
30	1.205 0	1.477 8	1.294 3	1.171 1	1.467 9	1.815 3	1.424 4
31	1.213 7	1.480 9	1.300 2	1.182 5	1.473 7	1.824 0	1.435 9
32	1.219 6	1.498 3	1.319 8	1.187 9	1.489 3	1.849 6	1.447 8
平均值	1.205 6	1.478 5	1.296 1	1.176 1	1.469 8	1.819 5	1.429 7
RSD/%	0.95	0.93	1.23	0.73	0.86	1.04	0.84

3 讨论

3.1 色谱条件流动相梯度条件的优化选择

本实验以待测成分虎杖苷、白藜芦醇、大黄

素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的分离效果为主要指标, 同时兼顾色谱图基线平稳情况以及杂质数量, 参考相关文献对比考察了不同流动相体系(乙腈-水^[5,8,10]、甲醇-水^[6,11]、乙腈-0.1%甲酸溶液^[9,12]、乙腈-0.1%磷酸溶液^[13]), 结果甲醇-水体系时基线不平稳, 白藜芦醇、大黄素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷色谱峰达不到基线分离; 乙腈-水体系时基线平稳且分离效果较好, 但獐牙菜苦苷、龙胆苦苷色谱峰存在拖尾现象, 乙腈-0.1%甲酸溶液体系优于乙腈-0.1%磷酸溶液体系, 所检测色谱图基线平稳, 待测成分虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素与相邻杂质峰均能达到有效分离, 同时杂质干扰较小。故最终选择采用乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 对芪桑益肝丸中 8 种指标性成分进行同时检测。

3.2 色谱峰定位方法的选择

色谱峰的准确定位通常采用保留时间差法或相对保留时间值法, 是确保所建立的一测多评法得以应用的前提, 本实验中对考察了 2 种方法的差异性, 结果保留时间差法所得结果 RSD 较大,

表 5 不同仪器、不同色谱柱待测成分色谱峰的相对保留时间值

Tab. 5 Relative retention time value of the components under test on different instruments and chromatographic columns

仪器	色谱柱	虎杖苷	白藜芦醇	大黄素	龙胆苦苷	獐牙菜苷	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	芒柄花素
Agilent 1200	Agilent HC-C ₁₈	0.537 2	0.646 7	0.746 1	1.109 5	1.302 7	1.713 2	1.863 4
	Hypersil C ₁₈	0.529 1	0.635 9	0.738 2	1.093 2	1.293 5	1.704 6	1.850 9
	Kromasil C ₁₈	0.542 9	0.651 2	0.753 7	1.114 6	1.313 9	1.728 1	1.872 9
Waters 2695	Agilent HC-C ₁₈	0.534 6	0.643 1	0.742 5	1.101 3	1.298 6	1.708 5	1.857 2
	Hypersil C ₁₈	0.522 3	0.634 7	0.732 9	1.097 1	1.292 4	1.701 3	1.847 6
	Kromasil C ₁₈	0.540 8	0.650 9	0.751 4	1.109 5	1.310 2	1.722 7	1.870 5
	平均值	0.534 5	0.643 8	0.744 1	1.104 2	1.301 9	1.713 1	1.858 4
	RSD/%	1.44	1.12	1.06	0.75	0.67	0.61	0.54

表 6 各成分含量测定结果(n=3)

Tab. 6 Results of content determination of various constituents(n=3)

成分	批号(181105)			批号(190107)			批号(190315)		
	ESM/ mg·g ⁻¹	QAMS/ mg·g ⁻¹	RAD/%	ESM/ mg·g ⁻¹	QAMS/ mg·g ⁻¹	RAD/%	ESM/ mg·g ⁻¹	QAMS/ mg·g ⁻¹	RAD/%
獐牙菜苦苷	9.847	-	-	10.225	-	-	8.970	-	-
虎杖苷	4.712	4.725	0.14	5.159	5.171	0.21	4.366	4.394	0.32
白藜芦醇	2.363	2.378	0.32	2.147	2.169	0.51	2.571	2.550	0.41
大黄素	3.165	3.187	0.35	2.853	2.866	0.23	3.468	3.447	0.30
龙胆苦苷	4.092	4.086	0.07	3.895	3.918	0.29	4.293	4.276	0.20
獐牙菜苷	1.756	1.732	0.69	1.588	1.599	0.34	1.915	1.891	0.63
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.819	0.803	0.99	0.887	0.876	0.62	0.740	0.753	0.87
芒柄花素	1.248	1.265	0.68	1.363	1.349	0.52	1.136	1.145	0.39

而相对保留时间值法所得结果 RSD 均 $<2.0\%$, 故本实验采用相对保留时间值法对芪桑益肝丸中虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素进行色谱峰定位。

3.3 供试品提取方式的选择

供试品溶液制备方法选择的主要原则是最大限度地保留待测成分虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素, 同时排除干扰成分。本实验参考相关文献首先对比考察了甲醇^[6-7,9,12]、75%甲醇^[8,11]、95%乙醇和 75%乙醇^[5,10]等提取溶剂, 结果显示以甲醇为提取溶剂时所测成分虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素综合提取率最佳, 且杂质干扰较少。在此基础上对超声^[5-7,9-12]和加热回流^[8]提取方式以及提取时间进行不断优化, 最终确定采用甲醇超声提取 30 min 对芪桑益肝丸进行供试品溶液制备。

本实验首次建立了芪桑益肝丸多指标成分质量控制模式, 同时采用一测多评法有效地解决了检验成本过高、部分对照品不稳定等传统多指标成分质量控制模式的不足, 有利于检验方法的普及应用。本实验所建立的方法供试品溶液制备操作便捷, 结果准确, 重复性好, 为提升芪桑益肝丸质量标准并确保其产品质量稳定性具有一定的指导意义。中药材因产地、采收季节等因素质量差异较大, 本实验旨在通过对芪桑益肝丸多指标成分控制方法的建立, 便于药品生产企业不断优化原药材内控质量标准, 有效控制原药材来源、采收季节等因素, 从而从源头上确保产品质量的稳定性和临床疗效的一致性。

REFERENCES

- [1] 国家食品药品监督管理局国家药品标准(修订)颁布件. WS-10261(ZD-0261)-2002-2011Z 芪桑益肝丸[S]. 2012.
- [2] 方岚, 胡旭佳. 高效液相色谱法测定芪桑益肝丸中大黄素的含量[J]. 云南中医学院学报, 2004, 27(1): 44-45.

- [3] PEI W H, HE F, CHENG C S, et al. Research progress on the quality evaluation methods of traditional Chinese medicine Astragali Radix[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(5): 620-628.
- [4] GU Z R, MA T X, QI M, et al. Study on HPLC fingerprints and main chemical composition changes before and after compatibility of Astragali Radix and Angelicae Sinensis Radix[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(3): 275-281.
- [5] ZHANG Q F, FU Y J, CHEN J G, et al. Simultaneous determination of five bioactive compounds in *Polygonum cuspidatum* by HPLC[J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技), 2014, 30(3): 216-219.
- [6] XU M, ZHANG Z Q. HPLC simultaneous determination of swertiamarin gentiopicoside and sweroside in *Swertia mileensis*[J]. Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志), 2013, 40(1): 145-147.
- [7] FU J, YANG S H, HUANG L F. Simultaneous determination of six flavonoid active components in Radix Astragali by UPLC[J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2013, 48(11): 916-919.
- [8] JIAN X Y, DENG S B. Study on the relevance of the effective components in Radix Astragali[J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med(江西中医药大学学报), 2014, 26(5): 66-70.
- [9] ZHANG Y, DONG L, YONG J J, et al. Simultaneous determination of 10 flavonoids in *Astragalus membranaceus* by HPLC[J]. China Pharm(中国药房), 2017, 28(21): 2970-2973.
- [10] FENG T, LIU P, LIU H Y, et al. Determination of active ingredients in *Polygonum cuspidatum* by double wavelength HPLC[J]. Guangzhou Chem Ind(广州化工), 2015, 43(12): 106-108.
- [11] LI Y L, SHANG M Y, GENG C A, et al. Simultaneous determination of five constituents in eight Qingyedan species derived from *Swertia* plants by HPLC[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38(9): 1394-1400.
- [12] LIN H W, JIANG C X, PIAO S J, et al. Determination of four active ingredients in *Polygonum cuspidatum* from different regions by HPLC method[J]. Pharm Care Res(药学服务与研究), 2017, 17(1): 27-30.
- [13] YANG X Q, GUO Y Q, XIA C L. Ultrasonic extraction and determination of seven main effective constituents in *Swertia mileensis* by HPLC[J]. Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志), 2016, 43(8): 1692-1695.

收稿日期: 2020-04-28

(本文责编: 沈倩)