

HPLC-QAMS 同时测定益肾养元颗粒中 9 种成分的含量

康亚琪¹, 窦艳丽², 许珍宝¹, 王汝奎¹ (1. 山东大学第二医院药品调剂科, 济南 250033; 2. 山东省食品药品检验研究院化学药品室, 济南 250101)

摘要: 目的 建立一测多评法(quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS)同时测定益肾养元颗粒中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷、虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚、薯蓣皂苷元、齐墩果酸、乌索酸、蔷薇酸和坡模酸的含量。方法 采用 Spursil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m)进行 HPLC 测定, 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 甲醇-0.1%甲酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长分别为 280 nm(检测 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷、虎杖苷、大黄素和大黄素甲醚)和 210 nm(检测薯蓣皂苷元、齐墩果酸、乌索酸、蔷薇酸和坡模酸)。以薯蓣皂苷元为内参物, 建立其与其他组分的相对校正因子, 计算各成分含量, 同时将外标法实测值与 QAMS 计算值进行比较, 验证 QAMS 的准确性和可靠性。结果 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷、虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚、薯蓣皂苷元、齐墩果酸、乌索酸、蔷薇酸和坡模酸的线性范围分别为 23.89~477.80, 8.67~173.40, 4.26~85.20, 2.99~59.80, 9.86~197.20, 0.69~13.80, 2.17~43.40, 1.28~25.60, 1.66~33.20 μ g·mL⁻¹, r 为 0.999 4~0.999 9; 平均回收率分别为 99.45%, 98.49%, 97.94%, 98.91%, 100.03%, 96.90%, 99.02%, 97.86% 和 98.35%, RSD 分别为 1.01%, 0.87%, 1.37%, 1.19%, 0.70%, 0.98%, 1.03%, 0.82% 和 1.53%($n=9$); 经独立样本 T-检验, 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷、虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚、薯蓣皂苷元、齐墩果酸、乌索酸、蔷薇酸和坡模酸含量的计算值和实测值之间无明显差异。结论 所建立的 QAMS 操作便捷、结果准确, 可同时测定益肾养元颗粒中 9 种成分含量。

关键词: 益肾养元颗粒; 一测多评法; 相对校正因子; 含量测定

中图分类号: 917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)15-1835-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.15.007

引用本文: 康亚琪, 窦艳丽, 许珍宝, 等. HPLC-QAMS 同时测定益肾养元颗粒中 9 种成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(15): 1835-1841.

Simultaneous Determination of Nine Components in Yishen Yangyuan Granules by HPLC-QAMS

KANG Yaqi¹, DOU Yanli², XU Zhenbao¹, WANG Ruxi¹ (1. Department of Drug Administration, The Second Hospital, Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan 250033, China; 2. Department of Chemical Drugs, Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a quantitative analysis of multi-components by single-marker(QAMS) method for simultaneous determination of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*- β -D-glucoside, polydatin, emodin, physcion, diosgenin, oleanolic acid, ursolic acid, euscaphic acid and pomolic acid in Yishen Yangyuan granules. **METHODS** HPLC analysis was performed on an Spursil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μ m) with a mobile phase consisted of methanol-0.1% formic acid solution in gradient elution manner at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was maintained at 30 $^{\circ}$ C. The detection wavelength were 280 nm for 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*- β -D-glucoside, polydatin, emodin, physcion, and 210 nm for diosgenin, oleanolic acid, ursolic acid, euscaphic acid, pomolic acid. Diosgenin was used as the internal reference substance, its relative correction factor with other components was established and its content was calculated, at the same time, the method was evaluated by comparison of the quantitative results between external standard method and QAMS method. **RESULTS** 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-*O*- β -D-glucoside, polydatin, emodin, physcion, diosgenin, oleanolic acid, ursolic acid, euscaphic acid and pomolic acid had good relations within the range of 23.89~477.80, 8.67~173.40, 4.26~85.20, 2.99~59.80, 9.86~197.20, 0.69~13.80, 2.17~43.40, 1.28~25.60, 1.66~33.20 μ g·mL⁻¹($r=0.999\ 4\sim0.999\ 9$), The average recovery were 99.45%, 98.49%, 97.94%, 98.91%, 100.03%, 96.90%, 99.02%, 97.86% and 98.35%, RSDs were 1.01%, 0.87%, 1.37%, 1.19%, 0.70%, 0.98%, 1.03%, 0.82% and 1.53%($n=9$), respectively. There was no significant difference between the calculated and measured values of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*- β -D-glucoside, polydatin, emodin, physcion, diosgenin, oleanolic acid, ursolic acid, euscaphic acid and pomolic acid according to T-test analysis. **CONCLUSION** The QAMS method can simultaneously determine the content of nine components in Yishen Yangyuan granules, the method is simple and accurate.

KEYWORDS: Yishen Yangyuan granules; QAMS; relative correction factor; content determination

作者简介: 康亚琪, 女, 硕士, 药师

Tel: 13869121630

E-mail: kyq1630@yeah.net

益肾养元颗粒由金樱子、何首乌、狗脊、补骨脂、菟丝子、当归、黄精、陈皮等 8 味中药配伍加工而成,主要用于肝肾不足、脾气虚弱、面色萎黄、倦怠纳差、遗精遗梦等病症的治疗^[1]。方中金樱子补肾固精、摄纳精气为君药;何首乌消痼截疟、润肠通便,狗脊补肝肾、强腰膝,补骨脂温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻,菟丝子补益肝肾、固精缩尿,合为臣药;黄精^[2]补气健脾、润肺益肾,当归补血活血、润肠通便,合为佐药;陈皮理气健脾、燥湿化痰,引药以达病灶为使药,诸药同用,共达补益肝肾、健脾益气、涩精止遗之功效。益肾养元颗粒现执行标准为国家药品标准 YBZ18142005-2009Z^[1],标准中仅对方中何首乌所含大黄的含量进行定量测定,也仅检索到对该制剂单一成分定量检测的报道^[3-4],中药及其复方制剂具有多成分、多靶点的特点,单一成分难以全面反映益肾养元颗粒的产品质量。一测多评法(quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS)^[5]利用中药及其制剂所含组分间存在的一定函数关系,选取其中质量稳定、对照品易得的 1 个成分为内参物,建立该成分与其他成分间的相对校正因子(relative correction factor, RCF),再通过 RCF 计算其他成分的含量。为全面评价益肾养元颗粒的产品质量,本实验参考中药质量标志物确定原则,选取 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚、薯蓣皂苷元、齐墩果酸、乌索酸、蔷薇酸和坡模酸为定量检测指标,以薯蓣皂苷元为内参物,建立其与其他组分的 RCF,实现对益肾养元颗粒中 9 种成分含量的同时测定,提高益肾养元颗粒的质量标准,确保产品疗效。

1 仪器与试药

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Waters 2697 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);JWCS-6-180 型全自动数码超声波清洗机(上海锦玖仪器设备有限公司);BSA224S 型电子分析天平[赛多利斯仪器(北京)有限公司]。

2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷对照品(批号:110844-201814;含量:91.0%)、虎杖苷对照品(批号:111575-201603;含量:87.3%)、大黄素对照品(批号:110756-201512;含量:98.7%)、大黄素甲醚对照品(批号:110758-201817;含量:99.2%)、齐墩果酸对照品(批号:110709-

201808;含量:91.1%)和乌索酸对照品(批号:110742-201823;含量:99.9%)均购于中国食品药品检定研究院;薯蓣皂苷元对照品(批号:18031441;含量:96.0%)、蔷薇酸对照品(批号:18052123;含量:98.8%)和坡模酸对照品(批号:18071222;含量:95.6%)均购于上海同田生物技术股份有限公司;益肾养元颗粒(规格:每袋装 4 g,批号:20180809,20181002,20190407)购于贵州德良方药业股份有限公司;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Spursil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m),柱温 30 $^{\circ}$ C;流动相:甲醇(A)-0.1%甲酸溶液(B),线性梯度洗脱(0~10.0 min, 35.0%A; 10.0~28.0 min, 35.0%A→46.0%A; 28.0~39.0 min, 46.0%A→72.0%A; 39.0~62.0 min, 72.0%A→88.0%A; 62.0~70.0 min, 88.0%A→35.0%A),体积流量 1.0 mL·min⁻¹;检测波长分别为 280 nm^[6](0~28.0 min 检测 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、虎杖苷、大黄素和大黄素甲醚)和 210 nm^[7-9](28.0~70.0 min 检测薯蓣皂苷元、齐墩果酸、乌索酸、蔷薇酸和坡模酸);进样量 10 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚、薯蓣皂苷元、齐墩果酸、乌索酸、蔷薇酸和坡模酸对照品各适量,用 70%乙醇制成质量浓度分别为 4.778, 1.734, 0.852, 0.598, 1.972, 0.138, 0.434, 0.256 和 0.332 mg·mL⁻¹的对照品储备液。精密量取上述 9 种对照品储备液各适量,用 70%乙醇制成质量浓度分别为 238.9, 86.7, 42.6, 29.9, 98.6, 6.9, 21.7, 12.8 和 16.6 μ g·mL⁻¹的混合对照品溶液。

2.2.2 益肾养元颗粒供试品溶液 取益肾养元颗粒适量,剪开内包装,内容物研细,取 2.0 g,精密称定,精密加 70%乙醇 25 mL,称重,超声提取 30 min,放冷,用 70%乙醇补重,摇匀,过滤,取续滤液,经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按益肾养元颗粒的处方比例和制备工艺,分别制备不含何首乌、不含黄精和不含金樱子的阴性样品,再按上述方法制成相应的阴性样品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性试验 精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液分别进样检测,记录色谱图,结果见图1。结果表明所记录色谱图基线平稳,理论板数按所测成分计均

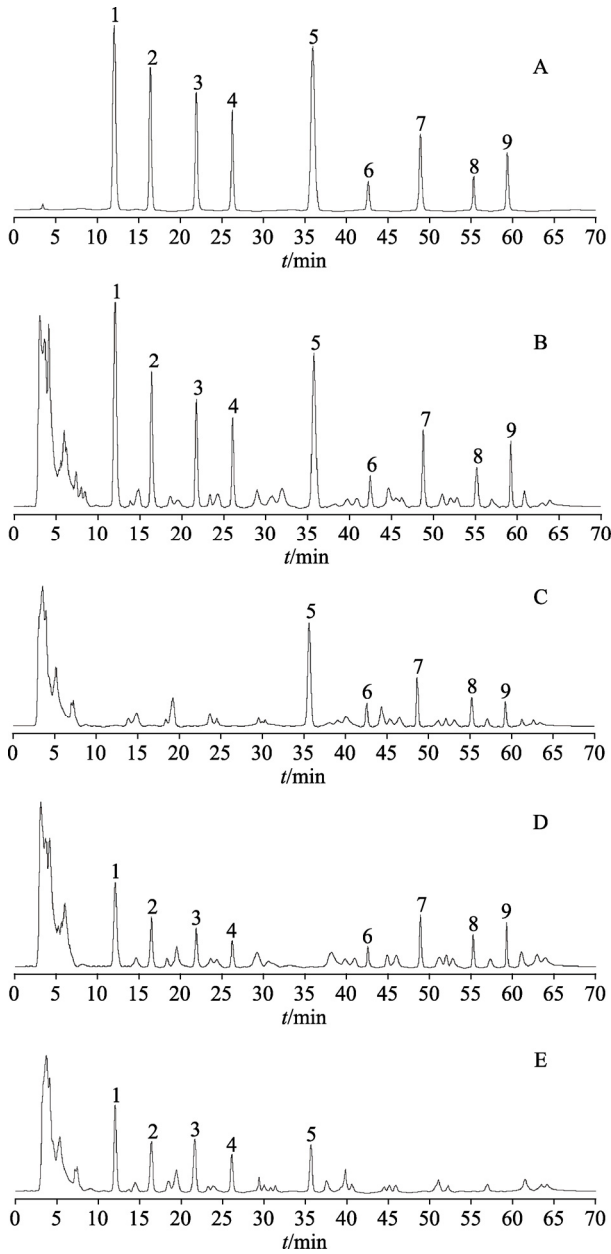


图1 HPLC 色谱图

A-混合对照品溶液; B-益肾养元颗粒供试品溶液; C-何首乌阴性样品溶液; D-黄精阴性样品溶液; E-金樱子阴性样品溶液; 1-2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷; 2-虎杖苷; 3-大黄素; 4-大黄素甲醚; 5-薯蓣皂苷元; 6-齐墩果酸; 7-乌索酸; 8-蔷薇酸; 9-坡模酸。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-mixed reference substances solution; B-sample solution of Yishen Yangyuan granules; C-negative sample solution of Polygoni Multiflori Radix; D-negative sample solution of Polygonati Rhizoma; E-negative sample solution of Rosae Laevigatae Fructus; 1-2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside; 2-polydatin; 3-emodin; 4-phycion; 5-diosgenin; 6-oleanolic acid; 7-ursolic acid; 8-euscaphic acid; 9-pomolic acid.

≥3000, 目标成分 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚、薯蓣皂苷元、齐墩果酸、乌索酸、蔷薇酸和坡模酸色谱峰峰形对称,与相邻杂质峰均能达到有效分离,分离度均>1.5,阴性样品对目标成分的测定无干扰。

2.3.2 线性关系考察 分别精密量取“2.2.1”项下9种对照品储备液各适量,用70%乙醇制成所测成分20倍质量浓度差的6个混合对照品溶液I~VI,分别进样测定,记录2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚、薯蓣皂苷元、齐墩果酸、乌索酸、蔷薇酸和坡模酸的色谱峰峰面积,以进样浓度 $x(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,进行线性回归,结果见表1。

表1 9种成分的回归方程和线性范围

Tab. 1 Regression equations and linear ranges of nine components

成分	回归方程	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	r
2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷	$Y=3.022\ 6\times 10^5x-786.4$	23.89~477.80	0.999 8
虎杖苷	$Y=4.396\ 3\times 10^5x+1\ 016.6$	8.67~173.40	0.999 9
大黄素	$Y=7.176\ 0\times 10^5x-844.2$	4.26~85.20	0.999 6
大黄素甲醚	$Y=8.213\ 1\times 10^5x+486.5$	2.99~59.80	0.999 8
薯蓣皂苷元	$Y=5.661\ 8\times 10^5x-1\ 027.2$	9.86~197.20	0.999 9
齐墩果酸	$Y=3.439\ 7\times 10^5x+993.9$	0.69~13.80	0.999 8
乌索酸	$Y=7.656\ 2\times 10^5x+759.4$	2.17~43.40	0.999 6
蔷薇酸	$Y=4.645\ 3\times 10^5x+946.2$	1.28~25.60	0.999 4
坡模酸	$Y=6.482\ 7\times 10^5x-1\ 068.9$	1.66~33.20	0.999 7

2.3.3 仪器精密度、重复性与稳定性试验 精密吸取混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件重复进样6次,记录2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚、薯蓣皂苷元、齐墩果酸、乌索酸、蔷薇酸和坡模酸的峰面积,结果各成分峰面积的RSD分别为0.66%,0.97%,1.03%,1.11%,0.85%,1.24%,1.09%,1.18%和1.30%,表明仪器精密度良好。

取同一批号(批号:20180809)益肾养元颗粒,平行制备6份供试品溶液,依法进样检测,记录2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚、薯蓣皂苷元、齐墩果酸、乌索酸、蔷薇酸和坡模酸的峰面积,计算得9种成分含量的RSD分别为1.17%,1.25%,0.46%,1.67%,

1.31%, 1.79%, 1.65%, 0.82%和 1.52%, 表明重复性良好。

取同一批号(批号: 20180809)益肾养元颗粒供试品溶液(临用新配)于配制后 0, 2, 4, 6, 12, 18 h 进样检测, 记录 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷、虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚、薯蓣皂苷元、齐墩果酸、乌索酸、蔷薇酸和坡模酸的峰面积。结果益肾养元颗粒供试品溶液室温下 18 h 内稳定, 9 种成分峰面积的 RSD 分别为 0.62%, 0.87%, 0.96%, 1.07%, 0.79%, 1.22%, 1.04%, 1.16%和 1.32%。

表 2 9 种成分的加样回收率试验结果($n=9$)

Tab. 2 Recovery results of nine components($n=9$)

成分	取样量/g	样品含有量/mg	对照品加入量/mg	测得总量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	1.001 2	3.275 9	1.638 0	4.900 9	99.20	99.45	1.01
	1.015 5	3.322 7	1.638 0	4.916 3	97.29		
	0.993 7	3.251 4	1.638 0	4.891 5	100.13		
	0.982 1	3.213 4	3.276 0	6.495 6	100.19		
	1.027 6	3.362 3	3.276 0	6.657 8	100.60		
	1.008 9	3.301 1	3.276 0	6.568 3	99.73		
	0.966 3	3.161 7	4.914 0	8.076 7	100.02		
	0.979 8	3.205 9	4.914 0	8.058 2	98.74		
虎杖苷	1.001 2	1.137 4	0.564 0	1.697 4	99.30	98.49	0.87
	1.015 5	1.153 6	0.564 0	1.700 7	97.00		
	0.993 7	1.128 8	0.564 0	1.687 3	99.02		
	0.982 1	1.115 7	1.128 0	2.228 6	98.66		
	1.027 6	1.167 4	1.128 0	2.269 1	97.67		
	1.008 9	1.146 1	1.128 0	2.251 4	97.99		
	0.966 3	1.097 7	1.692 0	2.759 2	98.20		
	0.979 8	1.113 1	1.692 0	2.784 6	98.79		
大黄素	1.001 2	0.507 6	0.256 0	0.754 2	96.32	97.94	1.37
	1.015 5	0.514 9	0.256 0	0.768 7	99.16		
	0.993 7	0.503 8	0.256 0	0.754 3	97.85		
	0.982 1	0.497 9	0.512 0	1.003 7	98.78		
	1.027 6	0.521 0	0.512 0	1.031 5	99.71		
	1.008 9	0.511 5	0.512 0	1.007 6	96.89		
	0.966 3	0.489 9	0.768 0	1.230 4	96.42		
	0.979 8	0.496 8	0.768 0	1.241 2	96.93		
大黄素甲醚	1.001 2	0.351 4	0.177 0	0.526 6	98.97	98.91	1.19
	1.015 5	0.356 4	0.177 0	0.531 3	98.79		
	0.993 7	0.348 8	0.177 0	0.519 8	96.62		
	0.982 1	0.344 7	0.354 0	0.700 2	100.42		
	1.027 6	0.360 7	0.354 0	0.712 3	99.33		
	1.008 9	0.354 1	0.354 0	0.701 5	98.13		
	0.966 3	0.339 2	0.531 0	0.867 5	99.50		
	0.979 8	0.343 9	0.531 0	0.876 2	100.24		
薯蓣皂苷元	1.001 2	0.365 3	0.531 0	0.886 5	98.16	100.03	0.70
	1.001 2	1.242 5	0.621 0	1.866 3	100.45		
	1.015 5	1.260 2	0.621 0	1.876 9	99.30		
	0.993 7	1.233 2	0.621 0	1.853 7	99.92		
	0.982 1	1.218 8	1.242 0	2.447 6	98.94		
齐墩果酸	1.001 2	0.086 1	0.044 0	0.128 8	97.04	96.90	0.98
	1.015 5	0.087 3	0.044 0	0.129 7	96.29		
	0.993 7	0.085 5	0.044 0	0.128 1	96.91		
	0.982 1	0.084 5	0.088 0	0.170 2	97.43		
	1.027 6	0.088 4	0.088 0	0.172 9	96.05		
乌索酸	1.001 2	0.312 4	0.157 0	0.468 5	99.44	99.02	1.03
	1.015 5	0.316 8	0.157 0	0.470 1	97.62		
	0.993 7	0.310 0	0.157 0	0.465 8	99.21		
	0.982 1	0.306 4	0.314 0	0.619 0	99.55		
	1.027 6	0.320 6	0.314 0	0.629 2	98.28		
蔷薇酸	1.001 2	0.179 2	0.088 0	0.266 6	99.30	97.86	0.82
	1.015 5	0.181 8	0.088 0	0.267 4	97.30		
	0.993 7	0.177 9	0.088 0	0.263 8	97.65		
	0.982 1	0.175 8	0.176 0	0.349 1	98.47		
	1.027 6	0.183 9	0.176 0	0.355 7	97.59		
坡模酸	1.001 2	0.235 3	0.119 0	0.350 6	96.91	98.35	1.53
	1.015 5	0.238 6	0.119 0	0.354 4	97.28		
	0.993 7	0.233 5	0.119 0	0.347 8	96.03		
	0.982 1	0.230 8	0.238 0	0.469 1	100.13		
	1.027 6	0.241 5	0.238 0	0.475 3	98.24		
薯蓣皂苷元	1.008 9	0.237 1	0.238 0	0.470 2	97.94	98.64	100.63
	0.966 3	0.227 1	0.357 0	0.581 6	99.31		
	0.979 8	0.230 3	0.357 0	0.582 4	98.64		
薯蓣皂苷元	1.001 2	0.244 5	0.357 0	0.603 8	100.63		
	1.015 5	0.244 5	0.357 0	0.603 8	100.63		

2.3.4 回收率试验 取已知含量的益肾养元颗粒样品(批号: 20180809)适量, 剪开内包装, 内容物研细, 取 9 份, 每份 1.0 g, 精密称定, 分别精密加入根据样品中 9 种成分含量配制的混合对照品溶液(2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷、虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚、薯蓣皂苷元、齐墩果酸、乌索酸、蔷薇酸和坡模酸质量浓度分别为 3.276, 1.128, 0.512, 0.354, 1.242, 0.088, 0.314, 0.176, 0.238 mg·mL⁻¹)0.5, 1.0, 1.5 mL3 份, 再按“2.2.2”项下方法制备加样样品溶液, 依法进样检测, 计算 9 种成分的加样回收率, 结果见表 2。

2.4 QAMS 的考察

2.4.1 待测组分 RCF 的计算 按“2.1”项下色谱条件精密吸取“2.3.2”项下混合对照品溶液 I~VI 各适量进样检测,记录色谱峰峰面积,按相对校正因子 f 的计算公式 $f_{k/s}=f_k/f_s=(W_k \times A_s)/(W_s \times A_k)$ (式中 W 为质量浓度, A 为峰面积, s 为内参物, k 为其他待测组分),以薯蓣皂苷元为内参物,分别计算其他 8 个待测组分的 RCF,结果见表 3。

2.4.2 不同仪器和色谱柱对 RCF 的影响 分别考察 Agilent 1200 型、Waters 2697 型高效液相色谱仪和 Spursil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent ZORBAX Rx-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,

5 μm)、Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱对 RCF 的影响,结果见表 4。

2.4.3 不同柱温对 RCF 的影响 分别考察不同柱温(25, 28, 30, 32, 35 °C)对 RCF 的影响,结果见表 5。

2.4.4 待测组分色谱峰的定位 以薯蓣皂苷元为内参物,分别考察待测成分的相对保留时间在 Agilent 1200 型、Waters 2697 型高效液相色谱仪和 Spursil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent ZORBAX Rx-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)条件下的重现性,结果见表 6。

表 3 以薯蓣皂苷元为内参物的 8 个成分的 RCF

Tab. 3 RCF of eight components with diosgenin as an internal standard

混合对照品溶液	相对校正因子							
	2,3,5,4'-四羟基二苯 乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷	虎杖苷	大黄素	大黄素甲醚	齐墩果酸	乌索酸	蔷薇酸	坡模酸
VI	1.925 5	1.286 7	0.801 5	0.674 6	1.661 5	0.746 4	1.232 1	0.870 0
V	1.876 7	1.284 0	0.795 7	0.687 1	1.598 2	0.745 5	1.234 6	0.889 1
IV	1.886 6	1.292 9	0.806 4	0.679 2	1.627 4	0.743 2	1.230 2	0.891 6
III	1.885 5	1.293 8	0.801 3	0.709 2	1.611 9	0.752 1	1.238 7	0.886 1
II	1.849 3	1.279 0	0.772 5	0.682 5	1.625 3	0.724 4	1.180 6	0.862 2
I	1.878 4	1.289 3	0.792 7	0.690 3	1.646 2	0.742 4	1.225 9	0.876 2
平均值	1.883 7	1.287 6	0.795 0	0.687 2	1.628 4	0.742 3	1.223 7	0.879 2
RSD/%	1.31	0.43	1.51	1.78	1.41	1.27	1.76	1.33

表 4 不同仪器和不同色谱柱待测成分 RCF

Tab. 4 RCF of the components on different instruments and chromatographic columns

仪器	色谱柱	相对校正因子							
		2,3,5,4'-四羟基二苯乙 烯-2-O-β-D-葡萄糖苷	虎杖苷	大黄素	大黄素甲醚	齐墩果酸	乌索酸	蔷薇酸	坡模酸
Agilent 1200	Spursil C ₁₈	1.899 1	1.290 6	0.777 3	0.688 6	1.616 9	0.757 6	1.211 7	0.881 5
	Agilent ZORBAX Rx C ₁₈	1.873 7	1.277 7	0.794 6	0.675 2	1.627 3	0.740 8	1.236 9	0.886 7
	Kromasil C ₁₈	1.862 6	1.258 3	0.815 5	0.669 7	1.638 5	0.746 3	1.233 2	0.877 4
Waters 2697	Spursil C ₁₈	1.888 5	1.279 5	0.799 8	0.701 7	1.6306	0.738 1	1.228 2	0.863 2
	Agilent ZORBAX Rx C ₁₈	1.891 1	1.287 4	0.786 7	0.686 5	1.621 6	0.764 7	1.207 6	0.878 3
	Kromasil C ₁₈	1.875 2	1.307 1	0.796 9	0.697 4	1.608 1	0.739 2	1.229 4	0.895 5
	平均值	1.881 7	1.283 4	0.795 1	0.686 5	1.623 8	0.747 8	1.224 5	0.880 4
	RSD/%	0.72	1.26	1.62	1.80	0.66	1.47	0.98	1.22

表 5 不同柱温待测成分 RCF

Tab. 5 RCF of the components on different column temperature

柱温/°C	相对校正因子							
	2,3,5,4'-四羟基二苯乙 烯-2-O-β-D-葡萄糖苷	虎杖苷	大黄素	大黄素甲醚	齐墩果酸	乌索酸	蔷薇酸	坡模酸
25	1.882 3	1.284 4	0.788 9	0.677 2	1.622 5	0.751 8	1.241 6	0.879 3
28	1.877 8	1.263 9	0.806 2	0.668 6	1.630 7	0.742 9	1.237 5	0.880 6
30	1.880 5	1.280 7	0.795 1	0.700 3	1.622 1	0.741 5	1.216 9	0.868 7
32	1.876 1	1.279 9	0.793 6	0.685 9	1.629 6	0.738 8	1.222 1	0.887 2
35	1.890 3	1.301 5	0.779 0	0.691 1	1.641 5	0.750 0	1.223 8	0.890 8
平均值	1.881 4	1.282 1	0.792 6	0.684 6	1.629 3	0.745 0	1.228 4	0.881 3
RSD/%	0.29	1.05	1.25	1.79	0.48	0.75	0.86	0.96

表 6 不同仪器和不同色谱柱待测成分色谱峰的相对保留时间值

Tab. 6 Relative retention time of the components under test on different instruments and chromatographic columns

仪器	色谱柱	相对保留时间值							
		2,3,5,4'-四羟基二苯 乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷	虎杖苷	大黄素	大黄素甲醚	齐墩果酸	乌索酸	蔷薇酸	坡模酸
Agilent 1200	Spursil C ₁₈	0.336 1	0.457 5	0.610 9	0.730 6	1.184 5	1.359 8	1.537 1	1.650 2
	Agilent ZORBAX Rx C ₁₈	0.331 9	0.452 1	0.609 7	0.723 5	1.180 1	1.350 3	1.532 4	1.642 7
	Kromasil C ₁₈	0.340 2	0.460 7	0.617 2	0.738 6	1.190 3	1.367 2	1.541 1	1.657 1
Waters 2697	Spursil C ₁₈	0.337 5	0.458 9	0.612 6	0.731 9	1.187 2	1.363 1	1.538 4	1.652 4
	Agilent ZORBAX Rx C ₁₈	0.334 3	0.454 7	0.609 9	0.726 1	1.182 2	1.356 4	1.535 9	1.647 2
	Kromasil C ₁₈	0.341 4	0.461 9	0.618 5	0.739 8	1.192 5	1.369 7	1.546 4	1.659 7
平均值		0.336 9	0.457 6	0.613 1	0.731 7	1.186 1	1.361 1	1.538 5	1.651 6
RSD/%		1.06	0.81	0.62	0.89	0.40	0.53	0.31	0.38

2.5 QAMS 与外标法(external standard method, ESM)检测结果的对比

取 3 批益肾养元颗粒样品,按“2.2.2”项下方法每个批次制备 3 份益肾养元颗粒样品溶液,按“2.1”项下色谱条件,分别注入高效液相色谱仪检测,记录 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚、薯蓣皂苷元、齐墩果酸、乌索酸、蔷薇酸和坡模酸色谱峰的峰面积,分别采用 ESM 和 QAMS 分别计算 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚、薯蓣皂苷元、齐墩果酸、乌索酸、蔷薇酸和坡模酸的含量,采用 SPSS 17.0 软件进行独立样本 T-检验比较 QAMS 与 ESM 所测结果。结果 2 种方法益肾养元颗粒中 9 种成分含量无明显差异, P 值均 >0.05 ,结果见表 7。

3 讨论

3.1 供试品提取方式的优化

本实验首先选取甲醇^[6,9-10]和乙醇^[8-11]为提取溶剂,在同一提取方式(超声提取 60 min)条件下,以益肾养元颗粒中 9 个成分的综合提取率为指标

进行对比考察,结果乙醇的综合提取率相对更佳;在此基础上,依次对不同乙醇浓度(95%乙醇、70%乙醇^[8]、50%乙醇^[11])、不同提取方式(加热回流提取^[7-9]、超声提取^[8-10])和不同提取时间(15, 30, 45, 60 min)进行对比考察,最终确定采用 70%乙醇超声提取 30 min 作为益肾养元颗粒供试品溶液的制备方法。

3.2 流动相的确定

本实验首先以乙腈-水^[6,8-9]、甲醇-水^[6,10-11]系统为流动相进行对比考察,结果发现这 2 种流动相均出现基线不平稳,色谱峰虎杖苷、大黄素甲醚分离度达不到要求,且乙腈-水流动相系统更为突出。在此基础上,以甲醇为流动相,在流动相水中加入适量浓度的酸(0.1%甲酸溶液^[10]、0.1%磷酸溶液^[11-13]、0.1%冰醋酸溶液^[6]),结果显示甲醇-0.1%甲酸溶液为流动相效果更佳,通过对流动相中有机相和水相比比例的不断摸索,最终确定采用甲醇-0.1%甲酸溶液为流动相,按“2.1”项下色谱条件流动相比比例进行梯度洗脱,此条件下所测成分完全达到基线分离,峰与峰间分离度良好,峰对称度良好。

3.3 内参物的选择及色谱峰定位

益肾养元颗粒所测 9 个成分中薯蓣皂苷元对照品价格低廉较易获得,且出峰时间适中,因此选择薯蓣皂苷元作为 QAMS 的内参物。要确保 QAMS 得以应用就必须对待测成分色谱峰进行准确定位,通常采用保留时间差或相对保留时间值等参数对色谱峰定位。笔者通过 2 种方法所得结果的比较,最终采用相对保留时间值法对益肾养元颗粒中 9 个成分进行色谱峰定位。

本实验首次采用 QAMS 对益肾养元颗粒中 9 种成分含量进行同时测定,所建立的方法操作便

表 7 样品测定结果($n=3$)

成分	20180809		20181002		20190407		P 值
	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	
薯蓣皂苷元	1.241	—	1.123	—	1.356	—	—
2,3,5,4'-四羟基二苯 乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷	3.272	3.264	3.571	3.509	2.947	2.988	0.969
虎杖苷	1.136	1.156	1.028	1.037	1.233	1.219	0.953
大黄素	0.507	0.518	0.459	0.463	0.543	0.531	0.977
大黄素甲醚	0.351	0.357	0.320	0.323	0.383	0.379	0.949
齐墩果酸	0.086	0.088	0.095	0.094	0.078	0.076	0.965
乌索酸	0.312	0.315	0.339	0.335	0.286	0.291	0.950
蔷薇酸	0.179	0.181	0.195	0.193	0.166	0.164	0.958
坡模酸	0.235	0.239	0.214	0.217	0.255	0.252	0.936

捷, 结果准确, 重复性好, 有效地降低了检验成本, 可用于益肾养元颗粒多组分质量控制中, 为全面评价益肾养元颗粒的内在质量提供了较有力的参考。

REFERENCES

- [1] YBZ18142005-2009Z. 国家药品标准[S]. 2009.
- [2] LIU Z F. Study on enzymatic-ultrasonic assisted extraction of total flavonoids from *Tone sinensis* and its anti-oxidation activities [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2015, 36(20): 314-319, 353.
- [3] LAN Y Y, WANG A M, HE X, et al. Determination of emodin in Yishen yangyuan granules by RP-HPLC [J]. China Pharm(中国药业), 2005, 14(5): 31-32.
- [4] TAN D, ZHU D, LU Y, et al. Identification of pericarpium citri reticulatae in Yishen yangyuan granules with TLC and determination of hesperidin content with HPLC [J]. J Guiyang Med Coll(贵阳医学院学报), 2015, 40(10): 1036-1039.
- [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] XU X H, PING Y H, XIE Y H. HPLC simultaneous determination of four active ingredients content in Radix Polygonum Multiflorum [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2011, 22(1): 58-59.
- [7] SUN T T, ZHANG H, LI Y, et al. Analysis of diosgenin content in different processed products of *Polygonatum* from Shaanxi [J]. China Pharm(中国药师), 2017, 20(1): 158-160.
- [8] ZHAO X, LIU X L, LAN X J, et al. Study on the fingerprints chromatogram of *Polygonatum sibiricum* Red. by HPLC [J]. Acta Agric Boreali-Occidentalis Sin(西北农业学报), 2011, 20(2): 114-119.
- [9] 胡莹, 吴啟南, 郑嘯, 等. LC-MS/MS法同时测定金樱子中7种主要成分的含量[J]. 中药材, 2016, 39(12): 2798-2800.
- [10] YAN Z H, WAN Y T, LU K, et al. Content determination of ursolic acid and oleanolic acid in *Rosae laevigata* Michx by HPLC-MS/MS [J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med(江西中医学院学报), 2010, 22(6): 43-45.
- [11] 中国药典. 一部[S]. 2015.
- [12] HUANG X B, HUANG A X, WANG G N, et al. Determination of stilbene glycoside and anthraquinones in *Polygoni Multiflori* Radix from different origins by HPLC [J]. Food Drug(食品与药品), 2019, 21(2): 111-115.
- [13] ZHOU Y N, SUN H, BAI J, et al. Quality evaluation of *Polygoni Multiflori* Caulis by UHPLC specific chromatogram and multi-component quantitative analysis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(8): 1203-1207.

收稿日期: 2019-10-15
(本文责编: 曹粤锋)