

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2024)11-0066-05

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.11.015



高效液相色谱法同时测定启脾丸中9种成分含量

米振清¹, 胡小凤²

(1. 山东省泰安市食品药品检验检测研究院·山东省泰安市纤维检验所, 山东 泰安 271000; 2. 山东鲁抗医药集团赛特有限责任公司, 山东 泰安 271200)

摘要:目的 建立同时测定启脾丸中9种成分含量的高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)法。方法 色谱柱为 Agilent Extend C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈(1:1, V/V)-0.08% 磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长分别为 237 nm(甘草苷、甘草酸铵)、283 nm(橙皮苷)、203 nm(人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re)、220 nm(白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅰ、茯苓酸), 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果 甘草苷、甘草酸铵、橙皮苷、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅰ、茯苓酸的质量浓度分别在 3.66~58.48 μg/mL、6.21~99.41 μg/mL、9.53~152.54 μg/mL、3.06~48.89 μg/mL、1.51~24.11 μg/mL、2.54~40.60 μg/mL、1.24~19.78 μg/mL、2.10~33.64 μg/mL、3.57~57.08 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.9995$, $n=6$); 精密度、重复性、稳定性试验结果的 RSD 均小于 2.0% ($n=6$); 平均加样回收率分别为 100.34%, 101.35%, 101.18%, 99.65%, 98.73%, 98.86%, 100.86%, 99.30%, 100.86%, RSD 分别为 1.43%, 1.52%, 0.68%, 1.43%, 1.00%, 1.19%, 1.31%, 0.75%, 1.36% ($n=6$)。样品中9种成分的含量分别为 0.5264~1.1007 mg/g、0.9562~1.7002 mg/g、1.1252~1.8762 mg/g、0.5709~0.8256 mg/g、0.1014~0.5026 mg/g、0.2269~0.6117 mg/g、0.0994~0.3705 mg/g、0.1525~0.4164 mg/g、0.3952~0.7556 mg/g ($n=3$)。结论 该方法操作简便、专属性强、稳定性好、结果准确, 可用于启脾丸中9种成分含量的同时测定。

关键词: 高效液相色谱法; 二极管阵列检测器; 启脾丸; 含量测定

Simultaneous Determination of Nine Components in Qipi Pills by HPLC

MI Zhenqing¹, HU Xiaofeng²

(1. Tai'an Institute of Food and Drug Control · Tai'an Fiber Inspection Institute, Tai'an, Shandong, China 271000; 2. Shandong Lukang Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tai'an, Shandong, China 271200)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD) method for simultaneous determination of nine components in Qipi Pills. **Methods** The chromatographic column was Agilent Extend C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol acetonitrile (1:1, V/V)-0.08% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was set at 237 nm for liquiritin and ammonium glycyrrhizinate, 283 nm for hesperidin, 203 nm for ginsenoside R_{g1} and ginsenoside Re, 220 nm for atracylenolide III, atracylenolide II, atracylenolide I, and pachymic acid, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Result** The linear ranges of liquiritin, ammonium glycyrrhizinate, hesperidin, ginsenoside R_{g1}, ginsenoside Re, atracylenolide III, atracylenolide II, atracylenolide I and pachymic acid were 3.66-58.48 μg/mL, 6.21-99.41 μg/mL, 9.53-152.54 μg/mL, 3.06-48.89 μg/mL, 1.51-24.11 μg/mL, 2.54-40.60 μg/mL, 1.24-19.78 μg/mL, 2.10-33.64 μg/mL, and 3.57-57.08 μg/mL, respectively. The precision, repeatability, and stability test results of RSD were all less than 2.0% ($n=6$). The average recovery rates were 100.34%, 101.35%, 101.18%, 99.65%, 98.73%, 98.86%, 100.86%, 99.30%, 100.86%, and the RSD values were 1.43%, 1.52%, 0.68%, 1.43%, 1.00%, 1.19%, 1.31%, 0.75%, and 1.36% ($n=6$). The contents of nine components in the sample were 0.5264-1.1007 mg/g, 0.9562-1.7002 mg/g, 1.1252-1.8762 mg/g, 0.5709-0.8256 mg/g, 0.1014-0.5026 mg/g, 0.2269-0.6117 mg/g, 0.0994-0.3705 mg/g, 0.1525-0.4164 mg/g, and 0.3952-0.7556 mg/g ($n=3$). **Conclusion** This method is simple, specific, stable, and accurate, and can be used for the simultaneous determination of nine components in Qipi Pills.

第一作者: 米振清, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为药品检验, (电子信箱)1224528469@qq.com。

motes human colorectal cancer metastasis through activation of the ERK / Elk - 1 / Snail and AKT / GSK3β / β - catenin pathways[J]. Molecular Cancer, 2017, 16(1): 1-15.

[16] OZMAN Z, OZBEK IPTEC B, SAHIN E, et al. Regulation of valproic acid induced EMT by AKT / GSK3β / β - catenin signaling pathway in triple negative breast cancer[J]. Molecular Biology Reports, 2021, 48(2): 1335-1343.

[17] YAN Y, ZHAO P, WANG Z, et al. PRMT5 regulates colorectal cancer cell growth and EMT via EGFR / AKT / GSK3β signaling cascades[J]. Aging, 2021, 13(3): 4468-4481.

[18] 甄洪涛, 王朝亮. Oct4B1 基因沉默通过调控 AKT / GSK-3β / β - catenin 通路对膀胱癌 T24 细胞上皮间质转化的影响及机制研究[J]. 实用癌症杂志, 2022, 37(8): 1219-1228.

[19] ZHANG S, WANG J, CHEN T, et al. α - Actinin1 promotes

tumorigenesis and epithelial - mesenchymal transition of gastric cancer via the AKT / GSK3β / β - Catenin pathway. [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 5688-5704.

[20] LIU ZL, BIAN M, PANG L. LncRNA CRNDE Deteriorates Delayed Encephalopathy After Acute Carbon Monoxide Poisoning to Inactivate AKT / GSK3β / β - catenin Pathway via miR - 212 - 5p[J]. Neurotoxicity Research, 2022, 40(5): 1208-1222.

[21] LEE IH, IM E, LEE H, et al. Apoptotic and antihepatofibrotic effect of honokiol via activation of GSK3β and suppression of Wnt / β - catenin pathway in hepatic stellate cells[J]. Phytother Res, 2021, 35(1): 452-462.

(收稿日期: 2023-05-24; 修回日期: 2023-11-05)

57.08 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ($r \geq 0.999\ 5, n = 6$). The *RSDs* of precision, repeatability, and stability test results were all lower than 2.0% ($n = 6$). The average recoveries of the above nine components were 100.34%, 101.35%, 101.18%, 99.65%, 98.73%, 98.86%, 100.86%, 99.30% and 100.86%, with *RSDs* of 1.43%, 1.52%, 0.68%, 1.43%, 1.00%, 1.19%, 1.31%, 0.75%, and 1.36% ($n = 6$), respectively. The contents of the above nine components in samples were in the ranges of 0.526 4 – 1.100 7 mg / g, 0.956 2 – 1.700 2 mg / g, 1.125 2 – 1.876 2 mg / g, 0.570 9 – 0.825 6 mg / g, 0.101 4 – 0.502 6 mg / g, 0.226 9 – 0.611 7 mg / g, 0.099 4 – 0.370 5 mg / g, 0.152 5 – 0.416 4 mg / g, and 0.395 2 – 0.755 6 mg / g ($n = 3$), respectively. **Conclusion** The method is simple, has strong specificity, good stability, and accurate results, which can be used for the simultaneous determination of nine components in Qipi Pills.

Key words: HPLC; DAD; Qipi Pills; content determination

启脾丸由人参、麸炒白术、茯苓、甘草、陈皮、山药、莲子(炒)、炒山楂、六神曲(炒)、炒麦芽、泽泻11味药材组方,收载于2020年版《中国药典(一部)》,含量测定项下仅考察指标性成分甘草酸^[1]。目前,对启脾丸质量控制方面的研究较少,主要集中于该制剂的临床应用及药理学作用^[2-4]。寇亮^[5]采用高效液相色谱(HPLC)法测定了启脾丸中橙皮苷的含量,尚未发现关于其他成分的定量研究。鉴于中药的临床疗效是多种有效成分协同作用的结果,单一指标成分无法有效、全面地评价药品质量,本研究中参考2020年版《中国药典(一部)》对各味药材的质量控制方法及文献^[6-8],结合前处理时各成分的溶出率和色谱峰的分离效果等,最终采用波长切换-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)法同时测定启脾丸中人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re 、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅰ、茯苓酸、甘草苷、甘草酸铵、橙皮苷9种成分的含量,为其质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司,配有 Waters 2996 型 DAD); TE214S 型电子分析天平(德国赛 Sartorius 公司,精度为万分之一); KQ-250DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 250 W,频率为 40 kHz)。

1.2 试剂

甘草苷对照品(批号为 111610-201908,纯度为 95.0%),橙皮苷对照品(批号为 110721-202019,纯度为 95.3%),人参皂苷 Rg_1 对照品(批号为 110703-202034,纯度为 94.0%),人参皂苷 Re 对照品(批号为 110754-202129,纯度为 96.0%),白术内酯Ⅲ对照品(批号为 111978-201501,纯度为 99.9%),白术内酯Ⅱ对照品(批号为 111976-201501,纯度为 99.9%),白术内酯Ⅰ对照品(批号为 111975-201501,纯度为 99.9%),甘草酸铵对照品(批号为 110731-202021,纯度为 99.9%),均购自中国食品药品检定研究院;茯苓酸对照品(四川维克奇生物有限公司,批号为 906151066,纯度为 96.6%);甲醇、乙腈均为色谱纯,其

他试剂均为分析纯,水为超纯水;启脾丸均为大蜜丸,规格为每丸 3 g,分别购于北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂(厂家 A,批号分别为 20113481,21062652,21093077),药都制药集团股份有限公司(厂家 B,批号分别为 201022,210416,210510),兰州佛慈制药股份有限公司(厂家 C,批号分别为 20201215,20210523,20210911)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Extend C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: A 为甲醇-乙腈(1:1, V/V), B 为 0.08% 磷酸水溶液,梯度洗脱(0~15 min 时 15%A $\rightarrow$ 27%A, 15~26 min 时 27%A $\rightarrow$ 42%A, 26~40 min 时 42%A $\rightarrow$ 60%A, 40~52 min 时 60%A $\rightarrow$ 35%A, 52~60 min 时 35%A $\rightarrow$ 10%A); 流速: 1.0 mL / min; 检测波长: 237 nm(甘草苷、甘草酸铵), 283 nm(橙皮苷), 203 nm(人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re), 220 nm(白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅰ、茯苓酸); 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL 。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液: 取甘草苷、橙皮苷、人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re 、甘草酸铵、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅰ、茯苓酸对照品各适量,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇溶液,超声(功率为 250 W,频率为 20 kHz)使溶解,制成甘草苷、橙皮苷、人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re 、甘草酸铵、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅰ、茯苓酸质量浓度分别为 365.51, 953.37, 305.58, 150.66, 621.30, 253.73, 123.62, 210.22, 356.78 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 的混合对照品贮备液;精密量取 2 mL,置 50 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇溶液定容,摇匀,滤过,即得。

供试品溶液: 取样品 5 丸,剪碎,混匀,取 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加 50% 甲醇溶液 50 mL,密塞,称定质量,放置过夜,超声处理(功率为 250 W,频率为 20 kHz)45 min,取出,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液: 按处方比例及工艺制备缺人参、麸炒白术、茯苓、甘草、陈皮的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备溶液,即得。

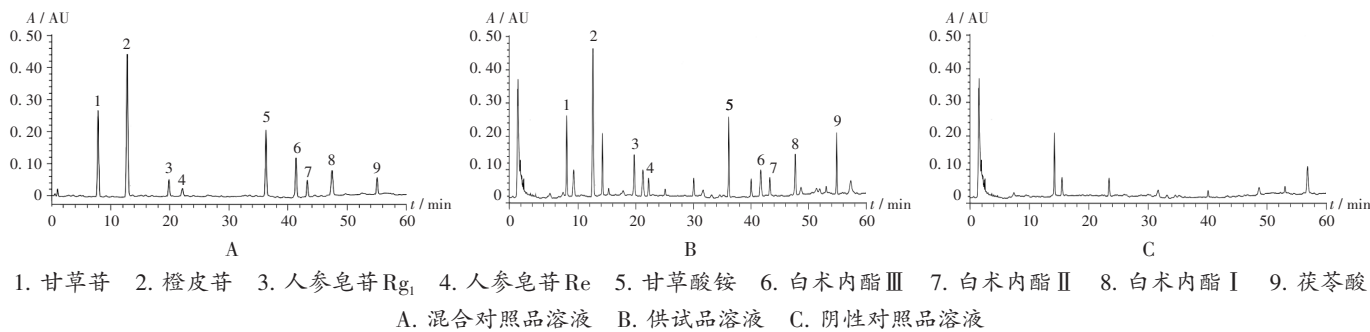


图1 高效液相色谱图

1. Liquiritin 2. Hesperidin 3. Ginsenoside R_{g1} 4. Ginsenoside Re 5. Ammonium glycyrrhizinate 6. Atracylenolide Ⅲ 7. Atracylenolide Ⅱ 8. Atracylenolide Ⅰ 9. Pachymic acid

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.3 方法学考察

专属性试验:分别精密吸取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与混合对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰,甘草苷、橙皮苷、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、甘草酸铵、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅰ、茯苓酸的分离度良好,理论板数以9种成分色谱峰计均大于3 000,且阴性对照无干扰。详见图1。

线性关系考察:精密量取2.2项下混合对照品贮备液0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mL,分别置50 mL容量瓶中,加50%甲醇溶液定容,按2.1项下色谱条件进样测定,以对照品溶液质量浓度($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标、各成分峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表1,表明甘草苷、橙皮苷、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、甘草酸铵、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅰ、茯苓酸在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好。

表1 线性关系考察结果($n=6$)

Tab. 1 Results of the linear relation test ($n=6$)

成分	回归方程	r	线性范围($\mu\text{g/mL}$)
甘草苷	$Y=423\,652\,X-34.38$	0.999 8	3.66~58.48
橙皮苷	$Y=226\,507\,X+19.63$	0.999 9	9.53~152.54
人参皂苷 R _{g1}	$Y=806\,145\,X-52.01$	0.999 6	3.06~48.89
人参皂苷 Re	$Y=621\,334\,X+15.66$	0.999 7	1.51~24.11
甘草酸铵	$Y=395\,203\,X+113.48$	0.999 7	6.21~99.41
白术内酯Ⅲ	$Y=247\,056\,X+51.37$	0.999 8	2.54~40.60
白术内酯Ⅱ	$Y=348\,311\,X-85.62$	0.999 5	1.24~19.78
白术内酯Ⅰ	$Y=641\,007\,X+47.15$	0.999 9	2.10~33.64
茯苓酸	$Y=524\,362\,X+93.65$	0.999 7	3.57~57.08

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液10 μL ,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果甘草苷、橙皮苷、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、甘草酸铵、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅰ、茯苓酸峰面积的RSD

分别为0.21%,1.03%,0.34%,1.10%,0.64%,0.74%,0.53%,0.83%,0.71%($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为20113481)样品,按2.2项下方法平行制备供试品溶液6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量。结果甘草苷、橙皮苷、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、甘草酸铵、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅰ、茯苓酸的平均含量分别为0.741 1,1.876 2,0.618 8,0.286 2,1.204 2,0.476 0,0.225 7,0.381 5,0.730 7 mg/g,RSD分别为0.73%,0.66%,1.12%,0.39%,0.48%,1.20%,0.63%,0.35%,1.17%($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取重复性试验项下供试品溶液适量,分别于制备后0,2,4,6,8,12 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果甘草苷、橙皮苷、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、甘草酸铵、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅰ、茯苓酸峰面积的RSD分别为0.55%,0.96%,1.23%,0.94%,0.62%,0.91%,0.38%,1.23%,0.92%($n=6$),表明供试品溶液室温放置12 h内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为20113481)6份,每份约0.5 g,精密称定,分别置锥形瓶中,精密加入2.2项下混合对照品贮备液1 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表2。

2.4 样品含量测定

分别取不同批次的样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定3次,以外标法计算供试品中9种成分的含量。结果见表3。

3 讨论

3.1 指标性成分选择^[9-11]

启脾丸中有效成分较多,同时测定多指标较单一指标能更准确地评价药品质量,仅用中使药甘草的活性成分甘草酸无法全面控制启脾丸的质量。方中,人参

表 2 加样回收试验结果 (n = 6)
Tab. 2 Results of the recovery test (n = 6)

成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}(\%)$	$RSD(\%)$	成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}(\%)$	$RSD(\%)$
甘草苷	0.510 5	0.378 3	0.365 5	0.742 5	99.64	100.34	1.43	白术内酯Ⅲ	0.498 6	0.600 4	0.621 3	1.238 8	102.75	98.86	1.19
	0.508 4	0.376 8	0.365 5	0.736 9	98.52				0.500 4	0.602 6	0.621 3	1.232 1	101.32		
	0.511 7	0.379 2	0.365 5	0.744 2	99.86				0.503 6	0.606 4	0.621 3	1.227 7	100.00		
	0.498 6	0.369 5	0.365 5	0.744 5	102.60				0.510 5	0.243 0	0.253 7	0.498 6	100.75		
	0.500 4	0.370 8	0.365 5	0.736 5	100.05				0.508 4	0.242 0	0.253 7	0.492 1	98.58		
	0.503 6	0.373 2	0.365 5	0.743 8	101.40				0.511 7	0.243 6	0.253 7	0.493 3	98.42		
橙皮苷	0.510 5	0.957 8	0.953 4	1.922 3	101.16	101.18	0.68	白术内酯Ⅱ	0.498 6	0.237 3	0.253 7	0.490 4	99.76	100.86	1.31
	0.508 4	0.953 9	0.953 4	1.921 4	101.48				0.500 4	0.238 2	0.253 7	0.486 5	97.87		
	0.511 7	0.960 1	0.953 4	1.930 0	101.73				0.503 6	0.239 7	0.253 7	0.487 7	97.75		
	0.498 6	0.935 5	0.953 4	1.903 6	101.54				0.510 5	0.115 2	0.123 6	0.237 4	98.87		
	0.500 4	0.938 9	0.953 4	1.890 7	99.83				0.508 4	0.114 7	0.123 6	0.240 7	100.94		
	0.503 6	0.944 9	0.953 4	1.911 2	101.35				0.511 7	0.115 5	0.123 6	0.239 6	100.40		
人参皂苷 R _{g1}	0.510 5	0.315 9	0.305 6	0.622 2	100.23	99.65	1.43	白术内酯Ⅰ	0.498 6	0.112 5	0.123 6	0.238 2	101.70	99.30	0.75
	0.508 4	0.314 6	0.305 6	0.626 4	102.03				0.500 4	0.112 9	0.123 6	0.236 5	100.00		
	0.511 7	0.316 6	0.305 6	0.618 4	98.76				0.503 6	0.113 7	0.123 6	0.240 1	102.27		
	0.498 6	0.308 5	0.305 6	0.613 4	99.77				0.510 5	0.194 8	0.210 2	0.402 2	98.67		
	0.500 4	0.309 6	0.305 6	0.612 9	99.25				0.508 4	0.194 0	0.210 2	0.401 7	98.81		
	0.503 6	0.311 6	0.305 6	0.610 7	97.87				0.511 7	0.195 2	0.210 2	0.403 2	98.95		
人参皂苷 Re	0.510 5	0.146 1	0.150 7	0.296 6	99.87	98.73	1.00	茯苓酸	0.498 6	0.190 2	0.210 2	0.398 1	98.91	100.86	1.36
	0.508 4	0.145 5	0.150 7	0.294 5	98.87				0.500 4	0.190 9	0.210 2	0.401 2	100.05		
	0.511 7	0.146 4	0.150 7	0.293 1	97.35				0.503 6	0.192 1	0.210 2	0.403 2	100.43		
	0.498 6	0.142 7	0.150 7	0.291 5	98.74				0.510 5	0.373 0	0.356 8	0.736 2	101.79		
	0.500 4	0.143 2	0.150 7	0.290 7	97.88				0.508 4	0.371 5	0.356 8	0.728 6	100.08		
	0.503 6	0.144 1	0.150 7	0.294 3	99.67				0.511 7	0.373 9	0.356 8	0.732	100.36		
甘草酸铵	0.510 5	0.614 7	0.621 3	1.236 3	100.05	101.35	1.52	0.498 6	0.364 3	0.356 8	0.731 8	103.00	99.08		
	0.508 4	0.612 2	0.621 3	1.235 4	100.31			0.500 4	0.365 6	0.356 8	0.725 5	100.87			
	0.511 7	0.616 2	0.621 3	1.260 3	103.67			0.503 6	0.368 0	0.356 8	0.721 5	99.08			

表 3 样品中 9 种成分含量测定结果 (mg / g, n = 3)
Tab. 3 Results of the content determination of nine components in samples (mg / g, n = 3)

生产厂家	批号	甘草苷	橙皮苷	人参皂苷 R _{g₁}	人参皂苷 Re	甘草酸铵	白术内酯Ⅲ	白术内酯Ⅱ	白术内酯Ⅰ	茯苓酸
A	20113481	0.741 1	1.876 2	0.618 8	0.286 2	1.204 2	0.476 2	0.225 7	0.381 5	0.730 7
	21062652	0.730 9	1.756 6	0.623 4	0.280 4	1.175 6	0.503 1	0.210 4	0.365 3	0.755 6
	21093077	0.748 9	1.706 5	0.640 7	0.291 4	1.253 7	0.495 2	0.200 7	0.369 6	0.722 4
B	201022	0.526 4	1.156 7	0.801 2	0.502 6	0.956 2	0.602 4	0.364 7	0.414 5	0.410 2
	210416	0.552 1	1.171 5	0.825 6	0.495 2	0.984 1	0.611 7	0.370 5	0.401 0	0.395 2
	210510	0.532 6	1.125 2	0.796 8	0.488 1	0.975 8	0.600 4	0.360 4	0.416 4	0.400 8
C	20201215	1.010 2	1.523 0	0.592 3	0.103 2	1.685 6	0.232 1	0.105 1	0.166 0	0.562 3
	20210523	1.033 4	1.498 5	0.588 7	0.101 4	1.700 2	0.247 5	0.099 4	0.171 4	0.533 6
	20210911	1.100 7	1.506 2	0.570 9	0.115 9	1.687 7	0.226 9	0.102 3	0.152 5	0.550 7

具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺、生津止渴、安神益智等功效,临床用于体虚欲脱、脾虚食少、肺虚喘咳等症,其活性成分有人参皂苷;麸炒白术具有健脾益气、燥湿利水、止汗、安胎等作用,用于脾虚食少、腹胀泄泻、痰饮眩悸等症,其活性成分有白术内酯类为主的挥

发油类成分;茯苓具有利水渗湿、健脾、宁心等功效,临床用于水肿尿少、脾虚食少、心神不安等症,其活性成分有三萜类化合物茯苓酸;甘草和陈皮中的黄酮类物质具有抗炎、抗氧化、保护心血管等作用。本研究中选择人参中的皂苷 R_{g₁} 和人参皂苷 Re,麸炒白术中白

术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ和白术内酯Ⅰ,茯苓中的茯苓酸,甘草中的甘草酸铵和甘草苷,陈皮中的橙皮苷作为指标性成分。

3.2 检测波长选择^[1,12-15]

本研究中采用DAD进行光谱扫描,人参皂苷R_{g1}、人参皂苷Re于203 nm波长处有最大吸收,白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ和白术内酯Ⅰ于(219±2)nm波长处有最大吸收,茯苓酸于233 nm波长处有最大吸收,甘草苷和甘草酸铵于238 nm波长处有最大吸收,橙皮苷于283 nm波长处有最大吸收。综合考虑各色谱峰的最大吸收波长、色谱峰的干扰情况及试验的可操作性,最终确定以波长切换法测定上述9种成分,其中甘草苷、甘草酸铵检测波长均为237 nm,橙皮苷检测波长为283 nm,人参皂苷R_{g1}、人参皂苷Re检测波长均为203 nm,白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅰ、茯苓酸检测波长均为220 nm。

3.3 流动相选择^[16-18]

曾考察甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液和甲醇-乙腈-磷酸水溶液不同流动相体系对9种成分的洗脱情况,结果以甲醇-乙腈(1:1,V/V)为流动相A,以0.08%磷酸水溶液为流动相B时的洗脱效果最佳,人参皂苷R_{g1}、人参皂苷Re能完全分离,基线平稳,各色谱峰的分离度均大于2.0,理论板数均大于5 000。

3.4 提取方式选择^[19-21]

曾考察不同提取溶剂(甲醇、乙醇、水、流动相)对各成分溶出率的影响,结果甲醇提取效果较好,各成分溶出率与甲醇体积分数呈正比。白术内酯Ⅲ在经50%甲醇溶液提取时溶出率最大,之后溶出率随甲醇体积分数的提高呈下降趋势,其余成分溶出率无显著差异,故提取溶剂选择50%甲醇溶液。同时,考察了超声和加热回流2种提取方式在不同提取时间对各成分溶出率的影响,结果超声处理(功率为250 W,频率为20 kHz)45 min时9种成分提取完全。茯苓酸属三萜类化合物,热稳定性较差,提取时的溶出率不稳定,故应采用低温提取。

3.5 色谱柱与柱温选择

曾考察不同厂家色谱柱(Agilent Extend C₁₈柱、Waters Sunfire C₁₈柱、Venusil MP-C₁₈柱,规格均为250 mm×4.6 mm,5 μm)及不同柱温(25, 30, 35℃)对色谱峰的影响,结果色谱柱为Agilent Extend C₁₈柱(250 mm×6 mm,5 μm)和柱温为30℃时各色谱峰分离效果最佳,故选择2.1项下色谱条件。

3.6 方法评价

该方法操作简便、专属性强、稳定性好、结果准确,可用于启脾丸中9种成分含量的同时测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1062-1063.
- [2] 张国莹, 张金. 启脾丸加葡萄糖酸锌治疗小儿厌食症的临床疗效观察[J]. 中国医药指南, 2016, 14(13): 186-187.
- [3] 麻林玖, 梁红梅. 加味启脾丸颗粒治疗儿童特应性皮炎疗效观察[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2006, 20(11): 698.
- [4] 李其林. 人参启脾丸加减治疗小儿脾虚腹泻64例[J]. 中国民间疗法, 2005, 13(1): 54-55.
- [5] 寇亮. 高效液相色谱法测定启脾丸中橙皮苷的含量[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2009, 30(4): 5-7.
- [6] 万鸣, 黄超, 杨玉莹, 等. 不同产地茯苓中7种三萜类成分含量的测定及聚类分析[J]. 中国药房, 2020, 31(17): 2101-2106.
- [7] 燕娜娜, 李丹, 魏敏, 等. 不同火力炒制对白术成分含量的影响[J]. 中药材, 2020, 43(2): 323-327.
- [8] 王震, 马伟, 李洪源, 等. 三个不同产地人参中皂苷含量的差异性研究[J]. 中医药信息, 2019, 36(3): 83-86.
- [9] 李文东, 梅雪, 赵玉玺, 等. 高效液相色谱法同时测定陈皮配方颗粒中3种成分的含量[J]. 安徽医药, 2018, 22(9): 1670-1673.
- [10] 李晚青, 田雅娟, 杜娟, 等. 一测多评法测定人参花中7种人参皂苷含量[J]. 中草药, 2019, 50(24): 6120-6124.
- [11] 平静, 南春红, 王思源, 等. 八珍益母丸中9个成分的含量测定及其主成分、聚类分析[J]. 中国药师, 2020, 23(5): 857-861.
- [12] 田双双, 刘晓谦, 冯伟红, 等. 基于特征图谱和多成分含量测定的茯苓质量评价研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(7): 1371-1380.
- [13] 钱钧强, 石芸, 房志仲. HPLC-DAD法同时测定参丹散结胶囊中10种成分[J]. 中草药, 2017, 48(10): 2067-2071.
- [14] 余秀萍, 崔灿. 高效液相色谱法同时测定香砂胃胃丸中7种有效成分的含量[J]. 中国药师, 2018, 21(11): 2053-2056.
- [15] 禹琦. 高效液相色谱法同时测定六君子丸中7种成分的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(11): 1162-1165.
- [16] 刘青, 申洁, 肖苏萍, 等. 基于多成分含量测定及色谱指纹图谱技术提升白术药材质量标准[J]. 中国现代中药, 2019, 21(8): 1062-1067.
- [17] 刘加元, 张建超. HPLC法同时测定保儿宁颗粒中10种成分[J]. 中成药, 2020, 42(7): 1709-1713.
- [18] 李雪莹, 魏运姣, 何小龙, 等. HPLC法同时测定健儿膏中8种成分[J]. 中成药, 2020, 42(3): 579-583.
- [19] 张松达, 李积杰, 辛晓恩, 等. HPLC-PAD-ELSD法同时测定牛黄降压丸中6个成分的含量[J]. 中国药师, 2021, 24(5): 972-976.
- [20] 宋国红, 李卿, 尹小玲. 正交试验法优选益阴消渴滴丸提取工艺[J]. 中国药业, 2019, 28(3): 22-24.
- [21] 韦宝含, 林小明, 覃祖前, 等. 正交试验法优选肺炎合剂提取工艺[J]. 中国药业, 2019, 28(6): 7-10.

(收稿日期: 2023-06-16; 修回日期: 2023-11-10)