

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)03-0081-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.03.019



超高效液相色谱法同时测定抗瘤丸(活血益气方)中 10 种活性成分含量*

陈菲¹, 王海征¹, 孙靓¹, 特列巴力德·阿布都瓦力², 林晓兰^{1△}

(1. 首都医科大学宣武医院药学部, 北京 100053; 2. 首都医科大学, 北京 100053)

摘要:目的 建立同时测定抗瘤丸(活血益气方)中 10 种活性成分含量的超高效液相色谱(UPLC)法。方法 色谱柱为 Waters Acquity BEH C₁₈ 柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为水-乙腈(梯度洗脱), 流速为 0.3 mL/min, 检测波长为 220 nm(山柰酚、落新妇苷、槲皮素、大黄酸、大黄素、大黄素甲醚)和 203 nm(人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、三七皂苷 R₁、薯蓣皂苷), 柱温为 40 °C, 进样量为 2 μL。结果 10 种活性成分在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.999 5, n = 7$); 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 4.0% ($n = 6$); 平均加样回收率为 89.02%~94.65%, RSD 为 0.66%~8.70% ($n = 6$)。样品中 10 种活性成分的平均含量为 0.07~7.32 mg/g ($n = 3$)。结论 该方法操作简便、重复性好、结果准确, 可用于同时测定抗瘤丸(活血益气方)中 10 种活性成分的含量。**关键词:**超高效液相色谱法; 抗瘤丸(活血益气方); 医院制剂; 活性成分; 含量测定

Simultaneous Determination of 10 Active Ingredients in Kangliu Pills (Huoxue Yiqi Formula) by UPLC

CHEN Fei¹, WANG Haizheng¹, SUN Liang¹, Teliebalide·ABUDUWALP², LIN Xiaolan¹

(1. Department of Pharmacy, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing, China 100053; 2. Capital Medical University, Beijing, China 100053)

Abstract: Objective To establish an ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) method for simultaneous determination of 10 active ingredients in Kangliu Pills (Huoxue Yiqi Formula). **Methods** The chromatographic column was Waters Acquity BEH C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was water-acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 0.3 mL/min, the detection wavelength was set at 220 nm (kaempferol, taxifolin 3-O-rhamnoside, quercetin, rhein, emodin, emodin-3-methyl ether) and 203 nm (ginsenoside R_{g1}, ginsenoside R_{b1}, notoginsenoside R₁, dioscin), the column temperature

*基金项目: 北京市中医管理局第二批中药骨干人才培养项目[京中医科字[2022]4号]; 北京市教育委员会首都中医药研究专项[17ZY13]。

第一作者: 陈菲, 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向为中药制剂、中药临床药学、药事管理学, (电子信箱)chenfeijill@163.com。

△通信作者: 林晓兰, 女, 大学本科, 主任药师, 研究方向为中药制剂与医院药学, (电子信箱)xllin83@163.com。

醇)对样品中五味子醇甲的提取效果, 结果以甲醇的提取效果最佳, 故样品提取溶剂选择甲醇。

3.2 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、结果准确、重复性好, 可用于生脉饮(党参方)中五味子醇甲的含量测定。

参考文献

[1] WS₃-B-1911-95, 中华人民共和国卫生部药品标准 中药成方制剂第十册[S].
[2] 刘媛媛, 黄仕其, 李玉泽, 等. 五味子属植物木脂素类化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(6): 1903-1918.
[3] 周晓洁, 王琪, 闫博文, 等. 五味子对神经、精神疾病作用及机制的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(3): 338-342.
[4] 李宁, 沈璐, 牛丽君, 等. 肝肠首过效应对五味子醇甲在大鼠体内生物利用度的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(3): 228-235.
[5] 杨继革, 臧瑞, 李正, 等. 五味子醇甲对脑缺血再灌注损伤大鼠室管膜下区神经干细胞增殖分化的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20(3): 445-449.
[6] 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: 835-836.
[7] 杨帆, 范洪岩, 黄龙梅. 利用 HPLC 法建立五味子醇甲的检测方法及其方法学考察[J]. 广东化工, 2017, 44(21): 151-152.

[8] 黄铭铸. HPLC 法测定生脉片中五味子醇甲的含量[J]. 临床合理用药杂志, 2009, 2(11): 64-65.
[9] 蔡雁, 于海英. HPLC 法同时测定复方天麻颗粒中天麻素和五味子醇甲的含量[J]. 中国药师, 2018, 21(8): 1480-1482.
[10] 张宁, 郭阳, 刘微, 等. 生脉饮(党参方)中五味子醇甲含量的测定方法[J]. 中国当代医药, 2019, 26(12): 52-54.
[11] 田宏, 黄海欣, 张玉洁. 生脉饮质量标准研究[J]. 中国药师, 2004, 7(9): 699-701.
[12] 黄萍, 王砚. HPLC 法同时测定五酯微丸中五味子酯甲、五味子甲素和安五酯素[J]. 中国药师, 2017, 20(8): 1499-1501.
[13] 程东岩, 王隶书, 高军, 等. 一测多评法同时测定五味子中多种木脂素含量及其在药材等级评价中的应用[J]. 中国药师, 2022, 25(4): 728-732.
[14] 张晶玲. 吉林产五味子酒制品 HPLC 指纹图谱研究及 7 个成分含量测定[J]. 中国药师, 2022, 25(2): 245-249.
[15] 向会, 蔡晓霞, 周巍. HPLC 法同时测定不同产地五味子生品及醋炙品中 5 个主要活性成分的含量[J]. 中国药师, 2020, 23(1): 186-188.
[16] 林远凤, 黄燕萍. HPLC 法同时测定肝复康丸中五味子醇甲等 4 种成分的含量[J]. 中国药师, 2012, 15(11): 1588-1590.

(收稿日期: 2023-11-29; 修回日期: 2024-06-26)

was 40 °C, and the injection volume was 2 μ L. **Results** The 10 active ingredients showed good linear relationship with peak areas within their respective mass concentration ranges ($r \geq 0.999$, $n = 7$). The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 4.0% ($n = 6$). The average recoveries of 10 active ingredients were in the range of 89.02% – 94.65%, with RSDs of 0.66% – 8.70% ($n = 6$). The average content of 10 active ingredients in the sample was in the range of 0.07 – 7.32 mg / g ($n = 3$). **Conclusion** The method is simple, reproducible and accurate, which can be used for simultaneously determination of 10 active ingredients in Kangliu Pills (Huoxue Yiqi Formula).

Key words: UPLC; Kangliu Pills (Huoxue Yiqi Formula); hospital preparations; active ingredients; content determination

抗瘤丸(活血益气方)为医院制剂,是治疗神经胶质瘤等脑瘤的纯中药复方制剂,临床使用近40年,安全有效,价格低廉^[1]。前期研究多集中在活血益气方的药理学作用^[2-3],有效成分与含量相关的研究虽有报道^[4-5],但测定成分较少,难以有效控制其质量。故本研究中建立了同时测定抗瘤丸(活血益气方)中10种活性成分含量的超高效液相色谱(UPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters Acquity UPLC I Class PDA 型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);SN-QX-32 型超声波提取仪(上海尚仪仪器设备有限公司,功率为 160 W,频率为 100 kHz);MS105DU 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司,精度为 0.1 mg)。

1.2 试剂

山柰酚对照品(批号为 110861-20B01),槲皮素对照品(批号为 100081-201509),大黄酸对照品(批号为 110769-201621),均购自中国食品药品检定研究院,纯度均大于 98%;薯蓣皂苷元对照品(批号为 C10J9Q52616),落新妇苷对照品(批号为 J2PGB153016),大黄素对照品(批号为 M2PIB216001),人参皂苷 R_{b1} 对照品(批号为 E16J9X52719),均购自上海源叶生物科技有限公司,纯度均大于 98%;大黄素甲醚对照品(批号为 CH0PA013),人参皂苷 R_{g1} 对照品(批号为 C4H72014),三七皂苷 R₁ 对照品(批号为 C471180018),均购自杭州英联科技有限公司,纯度均大于 98%;抗瘤丸(活血益气方)(首都医科大学宣武医院委托北京勃然制药公司生产,批准文号为京药制备字 Z20210045000,批号分别为 230507, 221003, 220311);甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Thermo Fisher 公司);其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Waters Acquity BEH C₁₈ 柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μ m);流动相:水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~1.5 min 时 1%B~2%B, 1.5~25 min 时 2%B~90%B, 25~30 min 时 90%B);流速:0.3 mL/min;检测波长:220 nm(山柰酚、落新妇苷、槲皮素、大黄酸、大黄素、大

黄素甲醚),203 nm(人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、三七皂苷 R₁、薯蓣皂苷);柱温:40 °C;进样量:2 μ L。理论板数按各成分色谱峰计均大于 4 000,分离度均大于 3。

2.2 溶液制备

取 10 种对照品各适量,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,加乙腈定容,摇匀,即得质量浓度为 1.0 mg/mL 的对照品贮备液,4 °C 保存。取 10 种对照品贮备液等体积混合,制成质量浓度均为 100 μ g/mL 的混合对照品溶液,4 °C 保存。

取样品 20 丸,研细,混匀,取 2.4 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 10 mL 75% 乙醇,称定质量,25 °C 超声(功率为 160 W,频率为 100 kHz)提取 20 min,再称定质量,加 75% 乙醇补足减失的质量,静置,摇匀,取上清液,滤膜滤过,即得供试品溶液,4 °C 保存。

按抗瘤丸(活血益气方)处方及工艺分别制备缺三七、土茯苓、首乌、白花蛇舌草、白英、枇杷叶的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液,4 °C 保存。

2.3 方法学考察

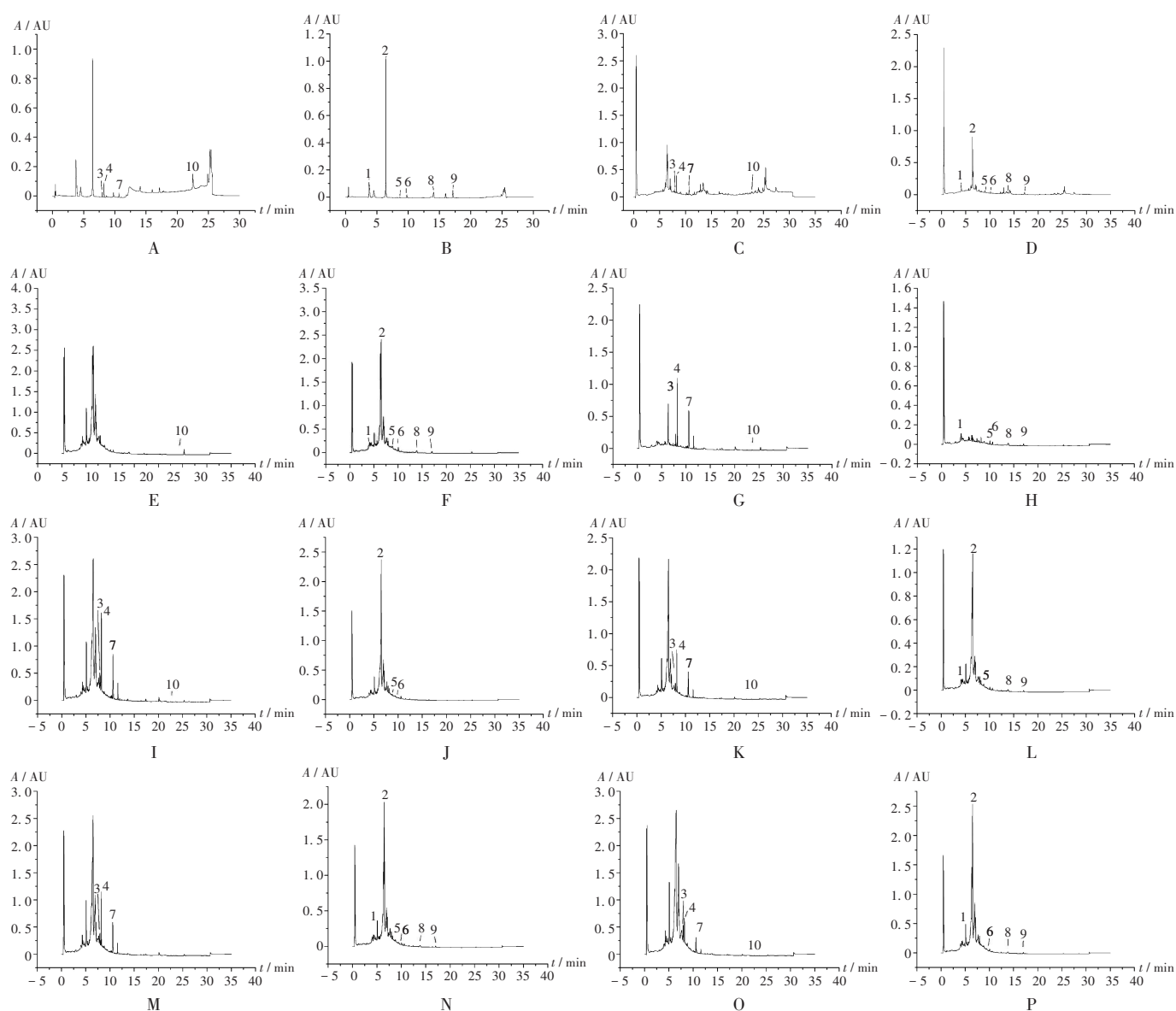
专属性试验:分别取 2.2 项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰出现,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。详见图 1。

线性关系考察:取 2.2 项下各对照品贮备液适量,加 5% 乙腈制备 7 个系列质量浓度的混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以各成分质量浓度(X, μ g/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表 1,表明各成分在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取样品 2.4 g,精密称定,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 6 次,记录峰面积。结果见表 1,表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品 2.4 g,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,储存于 4 °C 冰箱,分别于 0, 4, 8, 12, 24, 36 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果见表 1,表明供试品溶液 4 °C 放置 36 h 内稳定性良好。

重复性试验:取样品 2.4 g,精密称定,按 2.2 项下



1. 大黄酸 2. 落新妇苷 3. 三七皂苷 R_1 4. 人参皂苷 R_{g_1} 5. 槲皮素 6. 山柰酚 7. 人参皂苷 R_{b_1} 8. 大黄素 9. 大黄素甲醚
10. 薯蓣皂苷

A - B. 混合对照品溶液(203,220 nm) C - D. 供试品溶液(203,220 nm) E - F. 缺三七阴性对照品溶液(203,220 nm) G - H. 缺土茯苓阴性对照品溶液(203,220 nm) I - J. 缺首乌阴性对照品溶液(203,220 nm) K - L. 缺白花蛇舌草阴性对照品溶液(203, 220 nm) M - N. 缺白英阴性对照品溶液(203,220 nm) O - P. 缺枇杷叶阴性对照品溶液(203,220 nm)

图1 超高效液相色谱图

1. Rhein 2. Taxifolin 3 - O - rhamnoside 3. Notoginsenoside R_1 4. Ginsenoside R_{g_1} 5. Quercetin 6. Kaempferol 7. Ginsenoside R_{b_1} 8. Emodin
9. Emodin - 3 - methyl ether 10. Dioscin

A - B. Mixed standard solution (203,220 nm) C - D. Test solution (203,220 nm) E - F. Negative reference solution lacking Notoginseng Radix et Rhizoma (203,220 nm) G - H. Negative reference solution lacking Smilacis Glabrae Rhizoma (203,220 nm) I - J. Negative reference solution lacking Polygoni Multiflori Radix (203,220 nm) K - L. Negative reference solution lacking Hedyotis Herba (203,220 nm) M - N. Negative reference solution lacking Solani Herba (203,220 nm) O - P. Negative reference solution lacking Eriobotryae Folium (203,220 nm)

Fig. 1 UPLC chromatograms

方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定6次,记录峰面积。结果见表1,表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品6份,各2.4g,精密称定,按100%比例加入10种对照品各适量,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,并计算加样回收率。结果见表1,表明方法准确度良好。

2.4 样品含量测定

取3批样品(批号分别为230507,221003,220311)各6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色

表1 方法学考察结果

Tab. 1 Results of the methodology investigation

成分	回归方程	r	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	RSD(% , n = 6)			加样回收试验(% , n = 6)	
				精密度试验	稳定性试验	重复性试验	平均回收率	RSD
山柰酚	$Y = 2\,528.30 X - 168.37$	0.999 7	10~200	0.68	2.40	1.85	92.18	2.58
薯蓣皂苷	$Y = 1\,339.6 X + 143\,107.00$	0.999 5	50~400	0.91	1.14	1.22	91.47	3.43
落新妇苷	$Y = 2\,784.3 X + 3\,065.50$	0.999 6	10~200	1.85	1.86	0.88	91.58	3.30
槲皮素	$Y = 2\,789.9 X - 175\,186.00$	0.999 7	10~200	1.05	0.34	1.27	94.28	5.88
大黄酸	$Y = 19\,186 X - 16\,192.00$	0.999 9	10~200	0.55	0.97	1.67	91.42	0.66
大黄素	$Y = 356.35 X - 6\,995.90$	0.999 6	10~200	1.65	3.52	1.81	89.02	8.70
大黄素甲醚	$Y = 151.82 X - 7\,793.30$	0.999 5	10~200	1.57	3.09	1.88	94.30	4.84
人参皂苷 R _{g₁}	$Y = 325.46 X - 19\,724.00$	0.999 6	50~400	1.74	2.09	0.42	94.65	3.06
人参皂苷 R _{b₁}	$Y = 86.18 X - 5\,677.70$	0.999 6	50~400	1.32	3.53	0.86	93.87	6.39
三七皂苷 R ₁	$Y = 172.47 X - 12\,847.00$	0.999 6	50~400	1.83	0.87	1.05	89.25	3.93

表2 样品中10种活性成分含量测定结果 (mg/g, n = 3)

Tab. 2 Results of the content determination of 10 active ingredients in samples (mg / g, n = 3)

成分	230507	221003	220311	\bar{X}
大黄酸	0.13	0.13	0.12	0.13
落新妇苷	1.21	1.22	1.37	1.27
三七皂苷 R ₁	0.26	0.26	0.17	0.23
人参皂苷 R _{g₁}	2.96	3.00	2.88	2.95
槲皮素	0.11	0.11	0.18	0.13
山柰酚	0.23	0.23	0.24	0.23
人参皂苷 R _{b₁}	7.18	7.36	7.42	7.32
大黄素	2.30	2.36	3.10	2.59
大黄素甲醚	3.34	3.44	3.40	3.39
薯蓣皂苷	0.07	0.07	0.06	0.07

谱条件进样测定3次,记录峰面积,按外标法计算含量。结果见表2。

3 讨论

3.1 活性成分选择

抗瘤丸(活血益气方)的成分复杂,由三七、土茯苓、白花蛇舌草、白英等中药材组方。研究发现,落新妇苷^[6]及三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_{b₁}、薯蓣皂苷^[7]均有影响肿瘤微环境和抑制肿瘤生长的作用。因此,本研究中依据活血益气方丸的组方,参考2020年版《中国药典(一部)》^[8]和文献^[9-13],选取三七的皂苷类成分^[14]、土茯苓中的落新妇苷^[15]等10种活性成分作为检测指标,采用UPLC法测定含量。

3.2 样品提取方法选择

前期试验中,考察了不同超声提取时间(10, 20, 30, 45, 60 min)的提取效果,结果提取20 min和30 min时各成分的提取率接近;考察了不同提取溶剂(甲醇、50%甲醇、75%甲醇、50%乙醇、75%乙醇、乙醇)的提取效果,结果提取溶剂为75%乙醇时各成分均提取完全;

考察了不同提取量(5, 10, 20, 30, 40 mL)的提取效果,结果提取量为10 mL时各成分均提取完全,且其色谱峰响应值便于计算。故最终确定供试品溶液制备方法为10 mL 75%乙醇超声提取20 min。

3.3 检测波长选择

前期试验中,采用光电二极管阵列紫外检测器在200~400 nm波长范围内进行扫描,发现皂苷类成分在203 nm波长处有最大吸收,其他成分在220 nm波长处有最大吸收。为保证各成分均有良好响应信号,并减少低波长的干扰,最终检测波长选择220 nm(山柰酚、落新妇苷、槲皮素、大黄酸、大黄素、大黄素甲醚)和203 nm(人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_{b₁}、三七皂苷 R₁、薯蓣皂苷)。

3.4 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、重复性好、结果准确,可用于同时测定抗瘤丸(活血益气方)中10种活性成分的含量。

参考文献

- [1] 崔晶晶, 庄伟, 冯英楠, 等. 抗瘤丸结合西医常规疗法治疗恶性神经胶质瘤临床研究[J]. 国际中医中药杂志, 2022, 44(6): 616-620.
- [2] 陈菲, 冯英楠, 王海征, 等. 活血益气方对裸鼠抑瘤作用及大鼠急性毒性实验研究[J]. 西部中医药, 2022, 35(7): 20-22.
- [3] CHEN F, CUI JJ, JIANG DC, et al. Antitumor mechanism of kangliu pill on gliomas in mice through PI3K - Akt signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 307: 116252.
- [4] 陈菲, 林晓兰, 席海为, 等. UPLC-MS-MS同时测定中药活血益气方KLW中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_{b₁}的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 156-159.
- [5] 冯英楠, 陈菲, 张鹏, 等. 抗瘤丸的质量标准研究[J]. 环球中医药, 2017, 10(5): 527-531.
- [6] 宋伟, 张育民, 马涛, 等. 基于网络药理学方法分析落新妇苷干预骨关节炎的作用机制及实验验证[J]. 药物评价