

· 中药工业 ·

保卵安坤颗粒HPLC特征图谱的建立 及多成分含量测定[△]

张瑶^{1,2}, 欧则民², 严林^{2,3}, 王艳静^{1,2}, 程怡², 王梓丞⁴, 仝燕², 刘德文², 王锦玉^{2*}, 黄欲晓^{5*}

1. 天津中医药大学 药学院, 天津 301617;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

3. 江西中医药大学 药学院, 江西 南昌 330004;

4. 北京城市学院 生物医药学部, 北京 100089;

5. 中国中医科学院 西苑医院, 北京 100091

[摘要] 目的: 建立保卵安坤颗粒高效液相色谱法(HPLC)特征图谱及其葛根素、虎杖苷、淫羊藿苷的含量测定方法。方法: 按传统方法制备保卵安坤颗粒样品, 以葛根素为参照峰, 建立保卵安坤颗粒HPLC特征图谱, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)进行相似度评价, 确定共有峰并建立保卵安坤颗粒中3个指标成分的含量测定方法。结果: 在特征图谱研究中, 共标定10个共有峰, 与对照品比较后, 指认了6个色谱峰, 并对其中的葛根素、虎杖苷、淫羊藿苷进行含量测定, 3批保卵安坤颗粒与其对照图谱相似度均大于0.99。葛根素、虎杖苷、淫羊藿苷质量浓度在一定范围内与峰面积呈良好线性关系, 平均加样回收率分别为99.58%、102.34%、101.82%, RSD分别为1.94%、2.33%、2.00%, 3批样品中葛根素、虎杖苷、淫羊藿苷的质量分数分别为13.48~13.50、1.03~1.08、2.14~2.23 mg·g⁻¹。结论: 建立方法简便、准确、重复性好, 可为保卵安坤颗粒质量评价提供参考。

[关键词] 保卵安坤颗粒; 高效液相色谱法; 特征图谱; 含量测定

[中图分类号] R286 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2023)05-1086-06

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20221010002

Establishment of Characteristic HPLC Chromatogram and Content Determination of Multiple Components of Baoluan Ankun Granules

ZHANG Yao^{1,2}, OU Ze-min², YAN Lin^{2,3}, WANG Yan-jing^{1,2}, CHENG Yi², WANG Zi-cheng⁴, TONG Yan²,LIU De-wen², WANG Jin-yu^{2*}, HUANG Yu-xiao^{5*}

1. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

4. Department of Biomedical Sciences, Beijing City University, Beijing 100089, China;

5. Xiyuan Hospital, Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100091, China

[Abstract] **Objective:** To establish the characteristic high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of Baoluan Ankun Granules and the method for determining the contents of puerarin, polydipside and icariin. **Methods:** The samples of Baoluan Ankun Granules were prepared according to the traditional method. The characteristic HPLC chromatogram of Baoluan Ankun Granules was prepared using HPLC with puerarin as the reference peak. The similarity

[△] **[基金项目]** 中国中医科学院中央级公益性科研院所基本科研项目(ZZ15-XY-PT-04); 中国中医科学院中央级公益性科研院所基本科研项目(ZZ15-XY-PT-04)

^{*} **[通信作者]** 王锦玉, 研究员, 研究方向: 中药新药研发及新剂型研究; E-mail: jinyu024@163.com
黄欲晓, 主任医师, 研究方向: 中西医结合治疗子宫内膜异位症及生殖内分泌疾病; E-mail: hyx12386@163.com

evaluation was performed using the "Similarity Evaluation System for Characteristic Chromatogram of Traditional Chinese Medicines (2012 version)". **Results:** In the characteristic chromatogram study, a total of 10 common peaks were demarcated, while 6 chromatographic peaks were identified by comparing with the reference substance. Moreover, the contents of puerarin, polydatin and icariin were determined. The similarities between the three batches of Baoluan Ankun Granules and their control chromatograms were determined to be above 0.99. Puerarin, polygonin and icariin all showed good linear relationship. The average standard recovery rates were 99.58%, 102.34%, and 101.82%, respectively, while the RSDs were 1.94%, 2.33%, and 2.00%, respectively. The mass fractions of puerarin, polydatin and icariin in the three batches of samples were 13.48-13.50, 1.03-1.08, 2.14-2.23 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** The established method for content determination and the characteristic HPLC chromatograms were convenient, accurate and reproducible, which may provide references for quality evaluation of Baoluan Ankun Granules.

[**Keywords**] Baoluan Ankun Granules; HPLC; characteristic chromatogram; content determination

卵巢储备功能减退是指女性40岁之前由于各种因素导致卵巢功能障碍而造成卵巢存留卵泡的数量减少或质量减退的一种疾病^[1]。保卵安坤方为多年临床经验凝练方剂,前期临床有效性及安全性评价充分,故将其转化为院内制剂保卵安坤颗粒。该制剂由熟地黄、菟丝子、葛根、虎杖、淫羊藿、丹参、陈皮等组成,具有填精补肾、疏调气血的功效,可用于治疗肝肾阴虚型卵巢储备功能减退^[2]。

保卵安坤颗粒药味较多,化学成分复杂,测定某种成分的含量难以综合反映其整体质量。故在考虑饮片、样品及复方制剂的关联性基础上,采用特征图谱对保卵安坤颗粒进行质量控制。特征图谱技术是一种多组分样品的质量控制方法,近年来主要用于某些特征成分的质量控制,通过特定的分析方法可反映样品中化学成分的相关信息,得到中药或复方特性图谱,实现对中药的有效质量控制^[3-5]。本研究采用高效液相法(HPLC)对保卵安坤颗粒进行特征图谱研究,并根据图谱进行共有峰的归属和指认,最终考虑到各成分的专属性,选定葛根素、虎杖苷、淫羊藿苷作为其指标成分,建立这3个成分的HPLC含量测定方法,为保卵安坤颗粒质量控制及系统性评价提供参考。

1 材料

1.1 仪器

e2695型高效液相色谱仪(包括Alliance 2695型四元梯度输液泵、2998型紫外-可见波长检测器、自动进样器、柱温箱、Empower数据处理工作站,美国Waters公司);BT125D型十万分之一电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];DB-1AB型电热板(上海力辰邦西仪器仪器有限公司)。

1.2 试药

对照品葛根素(批号:110752-201816,纯度:95.4%)、虎杖苷(批号:11575-201603,纯度:87.3%)、淫羊藿苷(批号:110737-200415,纯度:98.1%)、橙皮苷(批号:110721-201115,纯度:95.3%)均购自中国食品药品检定研究院;对照品丹酚酸B(批号:121521-90-2)、丹酚酸A(批号:96574-01-5)均购自施丹德有限公司,纯度均为98.0%;甲醇、乙腈均为色谱纯;磷酸为分析纯;水为超纯水。

葛根(批号:2105012)、虎杖(批号:2106011)、陈皮(批号:2105012)、丹参(批号:2105011)、淫羊藿(批号:2104012)、刺五加(批号:2105013)、菟丝子(批号:2105011)、熟地黄(批号:2106011)、醋龟甲(批号:2105011)、酒黄精(批号:2105011)均由河北百草康神药业有限公司提供,以上饮片由中国中医科学院何希荣主任药师鉴定,且饮片检验项目及含量测定均符合《中华人民共和国药典》2020年版规定。

保卵安坤颗粒(编号为S1~S3)为中国中医科学院中药研究所中药制剂实验室自制。

2 方法与结果

2.1 特征图谱

2.1.1 混合对照品溶液制备 分别取橙皮苷、虎杖苷、葛根素、淫羊藿苷、丹酚酸B、丹酚酸A 3.67、3.32、7.13、3.28、1.90、2.99 mg,精密称定,置50 mL量瓶中,加甲醇50 mL制成对照品溶液。

2.1.2 供试品及阴性样品溶液的制备 取保卵安坤颗粒适量,研细成粉,精密称取粉末0.5 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,称定质量,加

热回流提取30 min,放冷,补足减失质量,摇匀,过0.22 μm 滤膜,取续滤液,即得。同法制备缺淫羊藿、缺熟地黄、缺菟丝子、缺丹参、缺葛根、缺虎杖、缺陈皮、缺刺五加的阴性样品溶液。

2.1.3 对照药材溶液制备 称取葛根、虎杖、淫羊藿、熟地、陈皮、刺五加、菟丝子、丹参对照药材粉末约0.5 g,置于具塞锥形瓶中,按2.1.2项下的方法制备对照药材溶液。

2.1.4 色谱条件 采用Welch Ultimate ODS-3 C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);以乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)为流动相梯度洗脱(0~50 min, 10%~30%A; 50~60 min, 30%~40%A);柱温为30 $^{\circ}\text{C}$;流速为1 min $\cdot\text{mL}^{-1}$;检测波长为280 nm;进样量为10 μL 。

2.1.5 特征图谱方法建立

2.1.5.1 精密度试验 称取保卵安坤颗粒样品,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.4项下谱条件下进样分析,连续6次,采集特征图谱,以葛根素色谱峰作为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间,其RSD均小于3.0%,表明该仪器精密度良好。

2.1.5.2 稳定性试验 称取保卵安坤颗粒样品,按2.1.2项下方法制备保卵安坤供试品溶液,按2.1.4项下色谱条件分别在制备后0、2、4、6、8、12、24 h进样检测,采集每份样品的色谱图。以葛根素色谱峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间,其RSD均小于3.0%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.1.5.3 重复性试验 取同一批保卵安坤颗粒样品,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,平行6份,按2.1.4项下色谱条件下进样分析,以葛根素色谱峰为参照峰,测得各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.13%,表明该方法的重复性良好。

2.1.5.4 特征图谱的建立及分析 取3批保卵安坤颗粒,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.4项下色谱条件进样,采集样品的HPLC图,使用“中药指纹图谱相似度评价系统”(2012版)对色谱图进行分析,时间窗设为0.2 min,使用平均数法进行多点校正和主峰匹配后,确定共有峰,生成对照图谱,见图1。根据匹配结果,确定10个共有峰,以3号峰作为参照,记录其峰面积,计算相似度。结果3批保卵安坤颗粒样品特征图谱与对照图谱的相似度均大于0.99,1、2、4~10号峰的平均相对保留时间分别为0.341、0.703、1.085、1.372、

1.779、2.338、2.960、3.230、3.481,相对保留时间的RSD分别为0.25%、0.11%、0.12%、0.10%、0.05%、0.03%、0.03%、0.04%、0.04%,表明3批样品质量差异不大。

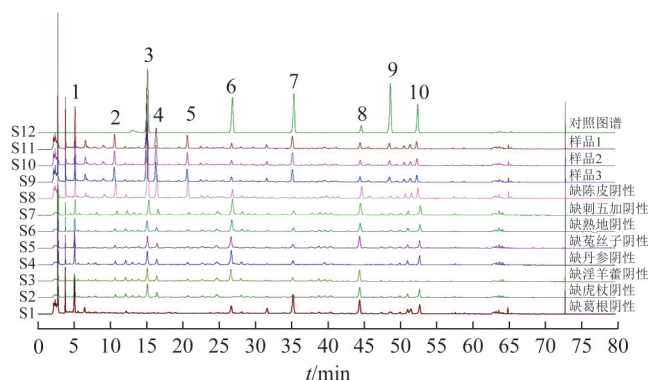


图1 保卵安坤颗粒、阴性样品及对照品 HPLC 特征图谱

2.1.5.5 特征峰的归属与指认 取2.1.1和2.1.3项下各对照药材样品溶液和混合对照品溶液,按2.1.4项下色谱条件进样,通过保留时间和紫外图谱对照分析,确定保卵安坤颗粒样品HPLC指纹图谱中各峰的归属。结果显示,在保卵安坤颗粒样品HPLC特征图谱中,2~5号峰来源于葛根,6号峰来源于虎杖,7号峰来源于陈皮,8、9号峰来源于丹参,10号峰来源于淫羊藿。通过比对供试品溶液色谱图与混合对照品溶液色谱图的紫外吸收值,共指认出10个共有成分,其中,3号色谱峰为葛根素、6号色谱峰为虎杖苷、7号色谱峰为橙皮苷、8号色谱峰为丹酚酸B、9号色谱峰为丹酚酸A、10号色谱峰为淫羊藿苷,见图1。

2.2 指标成分含量测定

2.2.1 色谱条件 除检测波长为330 nm外,其他条件同2.1.4项。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别取葛根素、虎杖苷、淫羊藿苷对照品4.41、2.55、2.07 mg精密称定,置50 mL量瓶中,加甲醇50 mL制成葛根素、虎杖苷、淫羊藿苷的混合对照品溶液,过0.22 μm 微孔滤膜,备用。另分别称取葛根素、虎杖苷、淫羊藿苷对照品4.17、4.07、3.14 mg,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为2.105、0.407、0.314 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。

2.2.3 供试品溶液及阴性样品溶液的制备 同2.1.2项下方法制备。

2.2.4 专属性考察 按2.2.1项下色谱条件测定葛根素、虎杖苷、淫羊藿苷的混合对照品溶液,保卵安坤供试品溶液,缺葛根、缺虎杖、缺淫羊藿的阴性样品溶液,采集HPLC图。结果显示,阴性样品溶液色谱峰在与对照品峰相应位置处无干扰,且各成分峰分离度良好,见图2。

2.2.5 线性关系考察 精密吸取2.2.2项下对照品储备液,稀释后依次制得不同质量浓度的对照品溶

液,按2.2.1项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程,见表1。

表1 保卵安坤颗粒3种待测成分的线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
葛根素	$Y=2\,828\,056.95X+43\,383.17$	0.999 8	32.50~2 105.00
虎杖苷	$Y=31\,211\,520.21X-968.68$	1.000 0	4.07~407.00
淫羊藿苷	$Y=11\,477\,437.97X+2\,448.17$	1.000 0	3.14~314.00

2.2.6 精密度试验 取2.2.2项下葛根素、虎杖苷、淫羊藿苷混合对照品溶液适量,按2.2.1项下色谱条件连续进样6次,计算葛根素、虎杖苷及淫羊藿苷峰面积的RSD分别为1.13%、0.83%、1.21%,表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一批保卵安坤颗粒样品,按2.2.3项下方法制备供试品溶液,分别于制备后0、2、4、6、8、12、24 h按2.2.1项下色谱条件测定,计算葛根素、虎杖苷、淫羊藿苷峰面积的RSD分别为1.07%、1.67%、1.39%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.8 重复性试验 取同一批保卵安坤颗粒样品,按2.2.3项下方法制备6份供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件测定,计算葛根素、虎杖苷、淫羊藿苷的平均质量分数分别为13.214 8、0.895 4、2.131 5 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD分别为0.80%、0.79%、0.45%,表明该方法重复性良好。

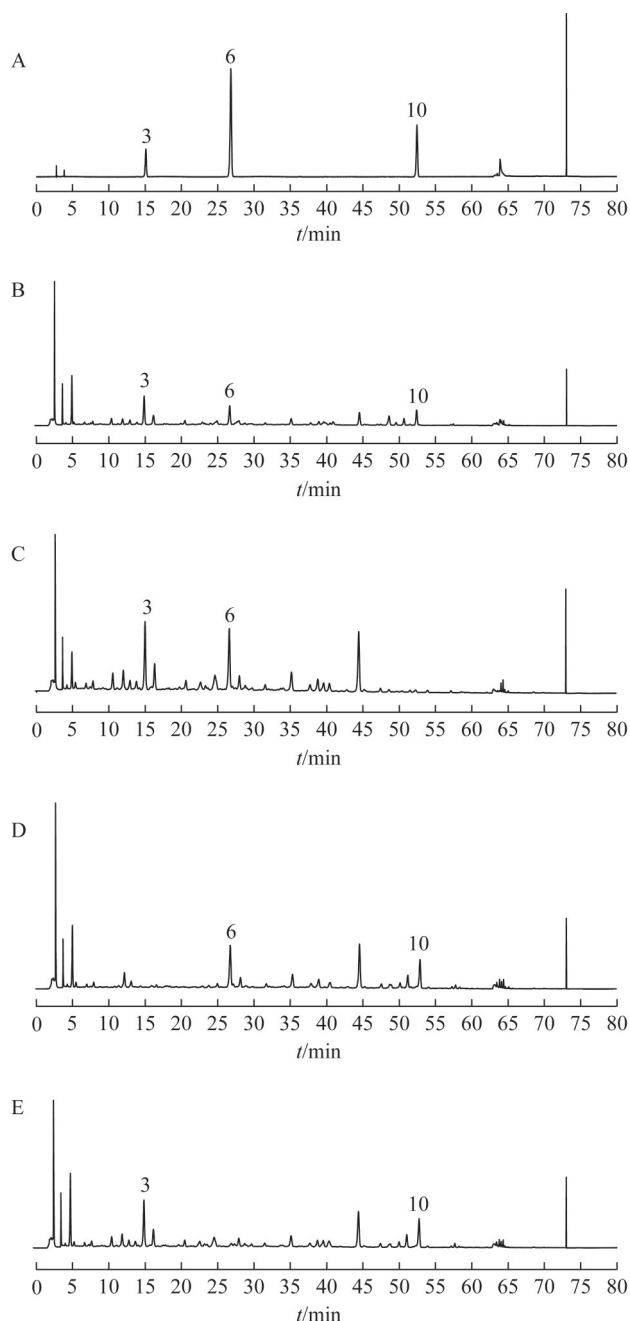
2.2.9 加样回收率试验 取同一批保卵安坤颗粒,平行精密称取6份,每份0.25 g,置于具塞锥形瓶中,按1:1分别精密加入混合对照品溶液(虎杖苷0.044 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、淫羊藿苷0.106 6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)5 mL,按等比例加入葛根素对照品,按2.2.3项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件测定,结果表明该方法准确性良好,见表2。

2.2.10 样品含量测定 取3批保卵安坤颗粒(编号为S1~S3)适量,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,每批平行2份,按2.2.1项下色谱条件测定,结果见表3。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

本研究对不同流动相(乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液)进行考察,根据有效成分色谱峰的分离,结果在乙腈-0.1%磷酸水溶液系统下各成分分离效



注: A. 混合对照品; B. 供试品; C. 缺淫羊藿阴性样品; D. 缺葛根阴性样品; E. 缺虎杖阴性样品; 3. 葛根素; 6. 虎杖苷; 10. 淫羊藿苷。

图2 保卵安坤颗粒HPLC图

表 2 保卵安坤颗粒 3 个成分加样回收率试验结果

待测成分	称样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
葛根素	0.250 36	3.308 5	3.34	6.666 1	100.53	99.58	1.94
	0.250 59	3.311 5	3.31	6.699 3	102.35		
	0.250 64	3.312 2	3.30	6.520 2	97.21		
	0.250 36	3.308 5	3.32	6.631 1	100.08		
	0.250 28	3.307 4	3.29	6.515 4	97.51		
	0.250 54	3.310 8	3.32	6.623 7	99.79		
虎杖苷	0.250 36	0.224 2	0.222	0.453 6	103.37	102.34	2.33
	0.250 59	0.224 4	0.222	0.449 8	101.56		
	0.250 64	0.224 4	0.222	0.456 9	104.71		
	0.250 36	0.224 2	0.222	0.449 6	101.56		
	0.250 28	0.224 1	0.222	0.442 4	98.35		
	0.250 54	0.224 3	0.222	0.456 3	104.48		
淫羊藿苷	0.250 36	0.533 6	0.533	1.080 6	102.61	101.82	132.00
	0.250 59	0.534 1	0.533	1.065 7	99.74		
	0.250 64	0.534 2	0.533	1.076 8	101.79		
	0.250 36	0.533 6	0.533	1.079 2	102.36		
	0.250 28	0.533 5	0.533	1.063 4	99.43		
	0.250 54	0.534 0	0.533	1.093 5	104.96		

表 3 保卵安坤颗粒样品中 3 个成分质量分数测定结果 ($n=2$)

样品编号	mg·g ⁻¹		
	葛根素	虎杖苷	淫羊藿苷
S1	13.50	1.04	2.15
S2	13.48	1.03	2.14
S3	13.49	1.08	2.23

果良好。本研究在 190~400 nm 波长范围内采用对保卵安坤供试品和对照品进行检测, 最终确定保卵安坤颗粒的质量控制指标葛根素、虎杖苷、淫羊藿苷在 330 nm 波长下分离最好, 故含量测定使用 330 nm 作为检测波长。且发现在 280 nm 波长下色谱峰数目多、响应高、分离度较好, 故最终选择 280 nm 作为特征图谱的检测波长。

3.2 有效成分选择及特征图谱研究

保卵安坤颗粒是由标准化工艺提取、浓缩、干燥、制粒而成的颗粒剂, 其中淫羊藿有益精气、强筋骨的功效, 主要成分为黄酮类, 如淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C^[6]。葛根有解肌退热、生肌止渴的功效, 主要成分为黄酮类、三萜类、皂苷、多糖类等化合物^[7], 葛根素为其含量测定指标。虎杖有抗氧化的生物活性, 质量控制多对虎杖苷、大黄素等进行含量测定^[8-9]。陈皮理气健脾, 其中主要黄酮类成分有橙皮苷、柚皮苷、

橙皮素等^[9], 本研究以橙皮苷为含量测定指标。丹参养血活血调经, 水溶性好, 且丹酚酸类化合物为主要药效成分。本研究根据中医配伍理论、各单味药所含主要药效成分及其药理作用, 结合特征图谱共有峰指认结果, 最终确定对保卵安坤颗粒中淫羊藿苷、葛根素、虎杖苷进行含量测定, 并同时建立保卵安坤颗粒 HPLC 特征图谱, 标记 10 个色谱峰, 初步确定 10 个色谱峰的药材来源及归属, 确认其中 6 个成分。

3.3 提取条件的选择

本研究在对供试品制备方法优化时, 同时考察了超声、回流 2 种提取方式, 发现回流提取时各成分含量明显较高, 故选回流作为提取方法。考察甲醇、70% 甲醇, 发现甲醇提取时各成分含量最高, 故选择甲醇作为提取溶剂。回流 30、60、90 min 各成分含量差别不大, 30 min 可基本提取完全, 选取 30 min 作为提取时间。料液比 1:50、1:100 含量差别不大, 故选料液比 1:50, 最终提取条件为料液比 1:50 甲醇回流处理 30 min。

3.4 耐用性试验

考察了 2 种色谱柱 (WELCH-ODS、INDUSTRIES-AQ)、3 个流速 (0.8、1.0、1.2 mL·min⁻¹)、3 个柱温 (25、30、35 °C) 对本色谱条件的耐用性, 结果葛

根素、虎杖苷、淫羊藿苷含量测定方法在不同色谱柱、不同流速、不同柱温条件下差异无统计学意义,特征图谱条件下色谱图中10个成分峰形对称、分离度较好,供试品溶液与对照品色谱峰中的色谱峰可对应。表明本方法在不同色谱柱、不同流速、不同柱温条件下,耐用性均良好。

4 结论

本研究对3批保卵安坤颗粒进行测定,建立了保卵安坤颗粒的HPLC特征图谱,在280 nm吸收波长下共标定了10个共有峰,结合对照品指认出其中6个主要色谱峰。在同一色谱条件下,调整吸收波长为330 nm,对保卵安坤颗粒HPLC图谱中的3个色谱峰(葛根素、虎杖苷、淫羊藿苷)进行定量分析。本研究建立了一种同时测定保卵安坤颗粒特征图谱及多成分含量测定的方法,重复性好、专属性强,可以用于保卵安坤颗粒的质量评价,可为该制剂的进一步研究提供参考。

参考文献

- [1] 王恬,王世宣.早发性卵巢功能不全的临床诊疗新进展[J].实用妇产科杂志,2021,37(10):723-726.
- [2] 黄欲晓,蔡连香,李亚俐.中药内服外用对卵巢储备功能影响的临床研究[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(10):66-67.
- [3] 王康华,张英涛,杨秀伟,等.妇科千金胶囊HPLC特征图谱和多指标成分定量分析[J].中国中药杂志,2019,44(8):1564-1572.
- [4] 秦红霖,李永中.特征图谱技术在中药质量分析中的应用[J].中国实用医药,2014,9(7):253-255.
- [5] 杨红美,陈波,曾建国,等.HPLC同时测定虎杖及其提取物中4种有效成分的含量[J].中国中药杂志,2006,31(3):202-205.
- [6] 徐智胜,黄兰岚,孙婷婷,等.羊脂油来源、产地和部位对淫羊藿炮制品总黄酮含量影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(23):149-152.
- [7] PERON G, UDDIN J, STOCCHERO M, et al. Studying the effects of natural extracts with metabolomics: A longitudinal study on the supplementation of healthy rats with *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 140: 62-70.
- [8] 季鹏,张蕾,李氏.葛根化学成分研究[J].中国药师,2020,23(6):1184-1188.
- [9] 刘江,陈兴福,邹元锋.基于中药指纹图谱多维信息的化学模式识别研究进展[J].中国中药杂志,2012,37(8):1081-1088.

(收稿日期:2022-10-10 编辑:王笑辉)