

虎驹乙肝胶囊特征图谱研究及其3种活性成分定量测定

钱 静^{1,2,3}, 李 杰^{1,2,3}, 狄留庆^{1,2,3*}, 李 晨^{1,2,3}, 贡 磊^{1,2,3}, 狄亚维^{1,2,3}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046

2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210046

3. 南京市中药微丸产业化工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 建立虎驹乙肝胶囊的 HPLC-ELSD 和 HPLC-UV 2 种特征图谱以及胶囊中虎杖苷、丹酚酸 B 和五味子醇甲 3 种活性成分的定量测定方法。方法 HPLC-ELSD 特征图谱: Thermo C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水为流动相梯度洗脱, 漂移管温度 85 ℃, 气体压力 275.80 kPa, 增益 500, 柱温 35 ℃, 体积流量 1 mL/min, 进样量 10 μL。HPLC-UV 特征图谱: Hedra ODS-2 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量为 0.8 mL/min, 检测波长为 215 nm, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL。结果 建立了虎驹乙肝胶囊的 HPLC-ELSD 和 HPLC-UV 2 个特征图谱, 分别确定了 10、12 个共有峰, 指认其中的 11 个共有峰为虎杖苷、三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、黄芪甲苷、绿原酸、大黄素、丹酚酸 B、五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素, 共有峰的参数符合“中药注射剂指纹图谱技术要求”的有关规定。定量测定中虎杖苷、丹酚酸 B、五味子醇甲 3 种活性成分的分度良好, 线性范围分别为 2.24~287.33 μg/mL ($r=0.999\ 9$)、1.95~250 μg/mL ($r=0.999\ 9$) 和 1.10~141.66 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 测定结果具有很好的重复性和稳定性。结论 特征图谱结合 3 种成分的定量测定, 能更好地控制虎驹乙肝胶囊的质量。

关键词: 虎驹乙肝胶囊; HPLC-ELSD; HPLC-UV; 特征图谱; 虎杖苷; 丹酚酸 B; 五味子醇甲

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)24-3559-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.24.011

HPLC specific chromatogram of Huju Yigan Capsule and determination of its three active ingredients

QIAN Jing^{1,2,3}, LI Jie^{1,2,3}, DI Liu-qing^{1,2,3}, LI Chen^{1,2,3}, GONG Lei^{1,2,3}, DI Ya-wei^{1,2,3}

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing 210046, China

3. Nanjing Engineering and Technology Research Center for TCM Pellets, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To establish the HPLC-ELSD and HPLC-UV specific chromatograms of Huju Yigan Capsule and an HPLC method for simultaneous determination of three active ingredients. **Methods** HPLC-ELSD: HPLC analysis was performed on a Thermo C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with a mixture of acetonitrile and water as mobile phase in gradient mode. The drift tube temperature was at 85 ℃, gas pressure was 275.80 kPa, gain value was 500, and column temperature was at 35 ℃. HPLC-UV: The Hedra OSD-2 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used. Acetonitrile and water containing 0.1% phosphate were used as mobile phase of HPLC with gradient elution, monitored with the wavelength of 215 nm. Flow rate was set at 0.8 mL/min and column temperature was 30 ℃. **Results** The two chromatographic fingerprints were completed with 10 and 12 recognizable peaks, of which 11 peaks (polydatin, notoginsenosides R₁, ginsenosides R_{g1}, R_{b1}, astragaloside, chlorogenic acid, emodin, bsalvianolic acid B, schisandrin, schizandrin A, and γ-schizandrin B) were determined. The parameters of the common peaks were accorded with the stipulation of “Traditional Chinese Medicinal Injection Fingerprint Technical Requirements”. Three active components were finely separated and showed good linearity in the concentration range of detection with repeatability and stability, and the ranges were 2.24—287.33 μg/mL for polydatin ($r=0.999\ 9$), 1.95—250 μg/mL for bsalvianolic acid B ($r=0.999\ 9$), and 1.10—141.66 μg/mL for

收稿日期: 2014-06-23

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD); 江苏省“青蓝工程”创新团队支持计划资助 (QLP)

作者简介: 钱 静 (1990—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药药剂学研究。Tel: (025)85811230 E-mail: qian_jing2012@126.com

*通信作者 狄留庆, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药剂学研究。Tel: (025)85811230 E-mail: diliuqing@hotmail.com

schisandrin ($r = 0.999\ 9$). **Conclusion** The combination of specific chromatograms and determination of three components is capable of effectively controlling the quality of Huju Yigan Capsule.

Key words: Huju Yigan Capsule; HPLC-ELSD; HPLC-UV; specific chromatogram; polydatin; bsalvianolic acid B; schisandrin

虎驹乙肝胶囊是由虎杖、丹参、蚂蚁、五味子、茵陈、柴胡、板蓝根、枸杞子、黄芪、三七、大枣 11 味中药组成,具有疏肝健脾、清热利湿、活血化瘀的功效,用于慢性乙型肝炎肝郁脾虚兼湿热瘀滞证。其中,虎杖苷是虎杖中的有效活性成分,具有良好的抗菌^[1]、抗病毒活性^[2-3]。丹酚酸 B 属于丹参中水溶性有效成分,具有强烈的抗氧化和清除氧自由基的活性^[4]。五味子醇甲为五味子的主要有效成分,有明显促进肝糖元生成、降低转氨酶、保护肝细胞等作用^[5]。在中药成分系统研究基础上建立的特征图谱分析是一种综合且有效的评价手段,已成为公认的最有效的中药或天然药物质量控制方法之一^[6-7]。本实验根据处方药物所含皂苷类和具有紫外吸收的相关活性成分的性质,分别建立了虎驹乙肝胶囊的 HPLC-ELSD 和 HPLC-UV 特征图谱,同时测定了虎驹乙肝胶囊中主要活性成分虎杖苷、丹酚酸 B 和五味子醇甲的量。本实验对综合应用特征图谱和多个主要活性成分定量测定方法控制中药复方制剂质量具有一定的参考意义。

1 仪器与材料

美国 Waters e2695 高效液相色谱系统,包括在线脱气机,自动进样器 Prominence SIL-20A,柱温箱 CTO-20A, Waters 2424 蒸发光散射检测器和 2998 紫外可见光检测器; FA1204B 电子分析天平,上海精密科学有限公司; Milli-Q Synthesis 108 超纯水仪,美国密理博公司; PTHW 电热套,上海丞伍仪器科技有限公司; Anke TGL-16C 高速离心机,上海安亭科学仪器厂; HH-2K6 恒温水浴锅,巩义市予华仪器有限责任公司。

乙腈,色谱纯,美国 Tedia 试剂公司; 甲醇,色谱纯,江苏汉邦科技有限公司; 重蒸水由 Milli-Q Synthesis 108 超纯水仪制得; 正丁醇,分析纯,西陇化工股份有限公司; 氨水,分析纯,南京化学试剂有限公司。虎杖苷(批号 111575-200502,质量分数 $\geq 98\%$)、三七皂苷 R₁(批号 110745-200617,质量分数 $\geq 98\%$)、人参皂苷 Rg₁(批号 110703-201128,质量分数 $\geq 93.4\%$)、人参皂苷 Rb₁(批号 110704-201122,质量分数 $\geq 95.9\%$)、黄芪甲苷(批号 110781-200613,质量分数 $\geq 98.0\%$)、大黄素(批

号 110756-200110,质量分数 $\geq 98.0\%$)、绿原酸(批号 110753-201314)、丹酚酸 B(批号 111562-201212,质量分数 $\geq 95.4\%$)、五味子醇甲(批号 110857-201211,质量分数 $\geq 99.9\%$)、五味子甲素(批号 110764-201010,质量分数 $\geq 98\%$)、五味子乙素(批号 110765-200710,质量分数 $\geq 98\%$)以上对照品均购自中国食品药品检定研究院。

10 批次虎驹乙肝胶囊(批号分别为 20130103、20130105、20130602、0130702、20131001、20131003、20131102、20140101、20140102、20140104,分别标记为 S1~S10)由江苏仁寿药业有限公司提供。虎杖阴性制剂、丹参阴性制剂、五味子阴性制剂、茵陈阴性制剂均由江苏仁寿药业有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 虎驹乙肝胶囊 HPLC-ELSD 特征图谱的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Thermo C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 漂移管温度 85 $^{\circ}$ C, 喷雾器模式: 加热, 动力级别: 65%; 气体压力 275.80 kPa, 增益: 500, 柱温 35 $^{\circ}$ C, 流动相为水-乙腈, 梯度洗脱: 0~4 min, 10%乙腈; 4~5 min, 10%~20%乙腈; 5~14 min, 20%乙腈; 14~15 min, 20%~23%乙腈; 15~25 min, 23%乙腈; 25~26 min, 23%~32%乙腈; 26~30 min, 32%乙腈; 30~33 min, 32%~35%乙腈; 33~51 min, 35%~60%乙腈; 51~53 min, 60%~10%乙腈; 53~55 min, 10%乙腈; 体积流量 1 mL/min, 进样量 10 μ L。

2.1.2 对照品溶液的制备 取虎杖苷、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、黄芪甲苷对照品适量,精密称定,用甲醇溶解,制成含虎杖苷 144 μ g/mL、三七皂苷 R₁ 56 μ g/mL、人参皂苷 Rg₁ 104 μ g/mL、人参皂苷 Rb₁ 77 μ g/mL、黄芪甲苷 70 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液制备 取胶囊内容物 2 g,精密称定,精密加入甲醇 40 mL,超声处理(功率 500 W,频率 40 kHz) 40 min,放冷,滤过,滤器用适量甲醇洗涤,合并滤液和洗涤液,水浴蒸干,残留物用 30 mL 水溶解,滤过,取滤液,滤器用适量水洗涤,合并滤液及洗涤液并用水饱和的正丁醇萃取 3 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,用浓氨水洗涤 2 次,

每次 20 mL, 弃去氨水, 取正丁醇液水浴蒸干, 残留物用适量甲醇溶解, 定容至 2 mL, 即得。

2.1.4 特征图谱方法学考察

(1) 精密度试验: 精密吸取混合对照品溶液, 精密吸取 10 μ L, 按上述色谱条件重复进样 5 次, 记录色谱图, 导入“中药色谱特征图谱相似度评价系统”(国家药典委员会 2004A 版), 相似度在 0.999~1.000, 表明方法的精密度符合要求。

(2) 重复性试验: 取 S2 号样品, 按“2.1.3”项方法制备 6 份, 各精密吸取 10 μ L, 依上述色谱条件进样, 记录色谱图, 导入“中药色谱特征图谱相似度评价系统”(国家药典委员会 2004A 版), 计算相似度在 0.999~1.000, 表明方法的重复性符合要求。

(3) 稳定性试验: 精密吸取 S2 号供试品, 按上述色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 记录色谱图, 导入“中药色谱特征图谱相似度评价系统”(国家药典委员会 2004A 版), 计算相似度在 0.994~0.999, 表明样品在 24 h 内稳定。

2.1.5 特征图谱的建立及共有特征峰的标定 对 10 批虎驹乙肝胶囊样品测定, 应用“中药指纹图谱相似度评价系统”(国家药典委员会 2004A 版) 建立其 HPLC-ELSD 特征图谱(图 1-A)。结果各主要色谱峰的出峰时间基本一致。比较各批次样品的色谱图, 其中 10 个色谱峰是共有的, 且蒸发光检测条件下峰面积较大, 分离度较好, 因此确定这 10 个峰为共有峰。通过对照品图谱(图 1-B) 指认了其中 5 个共有峰为虎杖苷(1 号峰)、三七皂苷 R₁(3 号峰)、人参皂苷 Rg₁(4 号峰)、人参皂苷 Rb₁(7 号峰)、黄芪甲苷(8 号峰)。

2.1.6 特征图谱相似度评价 将 10 批虎驹乙肝胶囊样品色谱图导入“中药色谱特征图谱相似度评价系统”(国家药典委员会 2004A 版), 得到 10 批样品 HPLC-ELSD 特征图谱叠加图, 见图 1-A。通过多点校正法对色谱峰进行自动匹配, 生成虎驹乙肝胶囊提取液的色谱特征鉴别图谱共有模式, 并在分析检验模式下, 以 S1 样品图谱作为参照图谱, 时间窗为 0.01 s, 以中位数法进行相似度计算。与生成的对照图谱相比, 供试品特征图谱与对照特征图谱的相似度均 $\geq$ 0.967, 分别为 0.998、0.994、0.981、0.984、0.994、0.999、0.967、0.999、0.995、0.997。

2.2 虎驹乙肝胶囊 HPLC-UV 特征图谱的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱 Hedra ODS-2 (250 mm $\times$

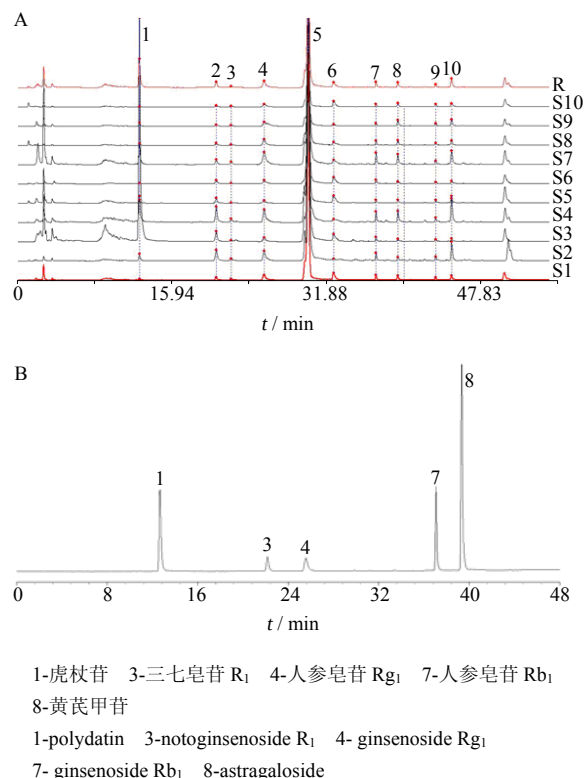


图 1 10 批虎驹乙肝胶囊 HPLC-ELSD 特征图谱叠加图 (A) 和混合对照品的 HPLC 色谱图 (B)

Fig. 1 HPLC-ELSD specific chromatogram layout chart of 10 batches of Huju Yigan Capsules (A) and HPLC of mixed reference substances (B)

4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~6 min, 10%~12%乙腈; 6~14 min, 12%乙腈; 14~15 min, 12%~24%乙腈; 15~28 min, 24%乙腈; 28~29 min, 24%~26%乙腈; 29~46 min, 26%~60%乙腈; 46~47 min, 60%~75%乙腈; 47~57 min, 75%乙腈; 57~58 min, 75%~80%乙腈; 58~68 min, 80%乙腈; 68~69 min, 80%~10%乙腈; 体积流量 0.8 mL/min; 测定波长 215 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L。

2.2.2 供试品溶液的制备 取 10 粒胶囊内容物, 精密称定, 置 250 mL 圆底烧瓶中, 加入稀乙醇 100 mL, 称定质量, 加热回流提取 60 min, 放冷, 补足质量, 滤过, 弃去初滤液, 取续滤液, 即得。

2.2.3 特征图谱方法学考察

(1) 精密度试验: 精密吸取混合对照品溶液, 精密吸取 10 μ L, 按上述色谱条件重复进样 5 次, 记录色谱图, 导入“中药色谱特征图谱相似度评价系统”(国家药典委员会 2004A 版), 计算相似度均在 0.990 以上, 表明方法的精密度合乎要求。

(2) 重复性试验: 取 20140105 批次胶囊, 按“2.2.2”项方法制备 6 份, 各精密吸取 10 μ L, 依上述色谱条件进样, 记录色谱图, 导入“中药色谱特征图谱相似度评价系统”(国家药典委员会 2004A 版), 计算相似度在 0.996~0.997, 表明方法的重复性合乎要求。

(3) 稳定性试验: 精密吸取 S2 批次供试品, 按上述色谱条件分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样, 记录色谱图, 导入“中药色谱特征图谱相似度评价系统”(国家药典委员会 2004A 版), 计算相似度均在 0.993~0.999, 表明样品在 24 h 内稳定。

2.2.4 特征图谱的测定及共有特征峰的标定 将 10 批虎驹乙肝胶囊供试品溶液分别注入液相色谱仪, 记录色谱图。比较各批次样品的色谱图, 其中 12 个色谱峰是共有的, 确定为共有特征峰, 见图 2-A。通过和对照品色谱峰(图 2-B)比较, 结合专属性考察, 特征图谱中的 1 号峰为绿原酸, 归属于茵陈; 2 号峰为虎杖苷, 10 号峰为大黄素, 归属于虎杖; 5 号峰为丹酚酸 B, 归属于丹参; 8 号峰为五味子醇甲, 11 号峰为五味子甲素, 12 号峰为五味子乙素, 归属于五味子。

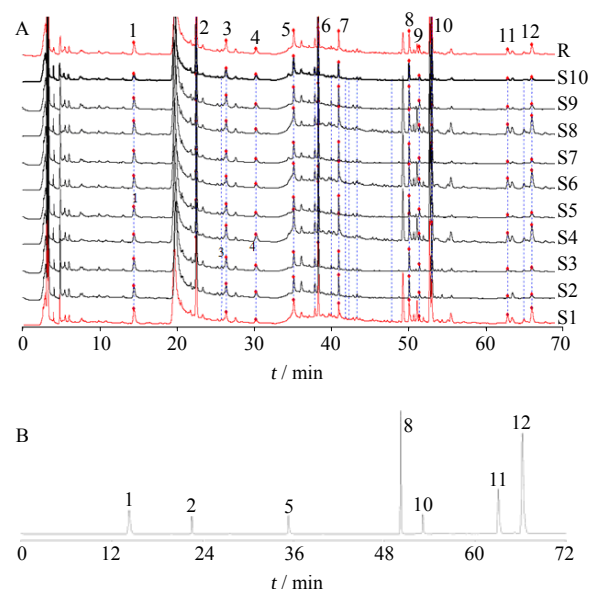
2.2.5 特征图谱相似度评价 将 10 批虎驹乙肝胶囊样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(国家药典委员会 2004A 版), 在分析检验模式下, 以样品 S1 图谱作为参照图谱, 采用平均数法生成 10 批虎驹乙肝胶囊的对照特征图谱, 计算相似度, 分别为 0.956、0.977、0.966、0.972、0.978、0.967、0.965、0.966、0.976、0.98。10 批虎驹乙肝胶囊的 HPLC-UV 特征图谱叠加图见图 2-A。

2.3 虎杖苷、丹酚酸 B 和五味子醇甲的定量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 分别取对照品虎杖苷、丹酚酸 B 和五味子醇甲适量, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解稀释至刻度, 摇匀, 分别配成质量浓度为 862、750、425 μ g/mL 的对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 参照“2.2.2”项方法。

2.3.3 色谱条件 色谱柱为 Hedra ODS-2 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~8 min, 23%乙腈; 8~9 min, 23%~30%乙腈; 9~19 min, 30%乙腈; 19~20 min, 30%~73%乙腈; 20~30 min, 73%乙腈; 30~31 min, 73%~23%乙腈; 体积流量 0.8 mL/min; 测定波长 215 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L。理论塔板数按虎杖苷计应不低于 3 000。



1-绿原酸 2-虎杖苷 5-丹酚酸 B 8-五味子醇甲 10-大黄素
11-五味子甲素 12-五味子乙素
1-chlorogenic acid 2-polydatin 5-bsalvianolic acid B
8-schisandrin 10-emodin 11-schizandrin A 12- γ -schizandrin B

图 2 10 批虎驹乙肝胶囊的 HPLC-UV 特征图谱 (A) 和混合对照品的 HPLC 图 (B)

Fig. 2 HPLC-UV specific chromatogram of 10 batches of Huju Yigan Capsules (A) and HPLC of mixed reference substances (B)

2.3.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 1 mL, 混匀后, 依次稀释成 1、2、4、8、32、64、128 倍, 摇匀后即得系列对照品溶液, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱峰面积。分别以对照品溶液质量浓度为横坐标 (X), 相应对照品峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 各成分回归方程、相关系数 (r) 及线性范围: 虎杖苷 $Y=39\,461X-55\,380$, $r=0.999\,9$, 线性范围 2.24~287.33 μ g/mL; 丹酚酸 $Y=34\,920X-48\,535$, $r=0.999\,9$, 线性范围 1.95~250 μ g/mL; 五味子醇甲 $Y=86\,961X-52\,916$, $r=0.999\,9$, 线性范围 1.10~141.66 μ g/mL。

2.3.5 专属性试验 根据虎驹乙肝胶囊的制法分别制成缺少虎杖、丹参、五味子、茵陈药材的虎杖阴性制剂、丹参阴性制剂、五味子阴性制剂、茵陈阴性制剂, 按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液, 进样, 依法测定, 结果见图 3。表明阴性溶液 HPLC 色谱图中, 未出现与虎杖苷、丹酚酸 B、五味子醇甲对照品色谱峰相同保留时间的色谱峰, 表明阴性制剂无干扰。

2.3.6 精密度试验 取同一份供试品溶液, 在上述

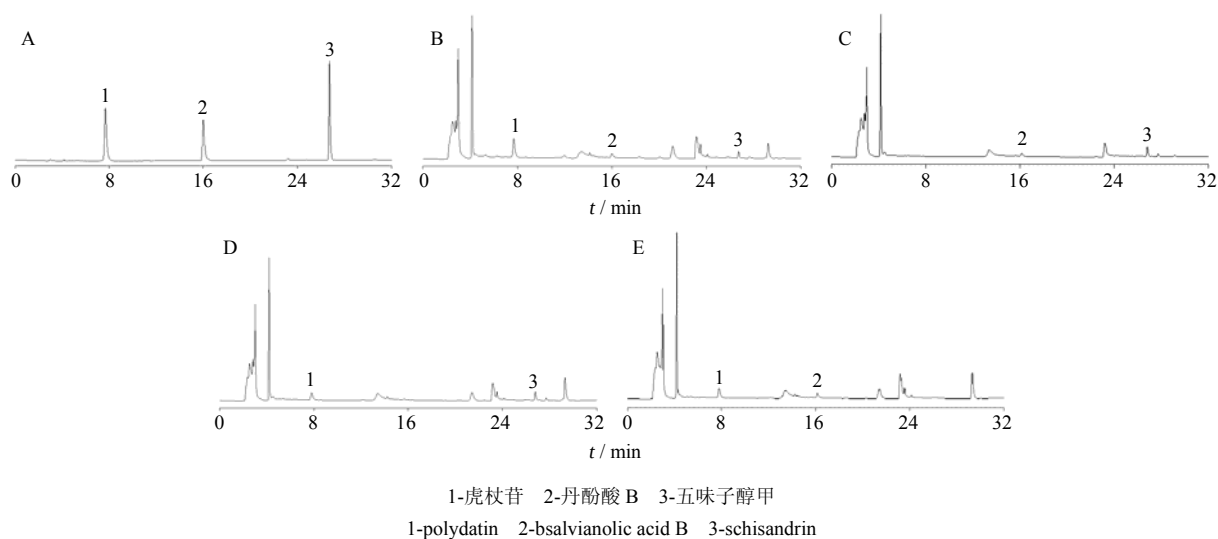


图 3 混合对照品 (A)、样品 (B)、阴性 (缺虎杖, C; 缺丹参, D; 缺五味子, E) 溶液色谱图
Fig. 3 Chromatograms of mixed reference substances (A), sample (B), and negative solution without (*Polygonum cuspidatum*, C; *Salvia miltiorrhiza*, D; *Schisandra chinensis*, E)

色谱条件下重复进样 6 次, 记录所测各组分峰面积, 结果虎杖苷、丹酚酸 B 和五味子醇甲色谱峰面积的 RSD 分别为 0.34%、0.67%、1.40%, 表明仪器精密程度良好。

2.3.7 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、12、16、24 h 按上述色谱条件分别进样, 记录所测各组分峰面积。结果虎杖苷、丹酚酸 B 和五味子醇甲色谱峰面积的 RSD 分别为 1.32%、1.46%、1.70%, 表明供试品溶液中各成分在 24 h 内稳定性良好。

2.3.8 重复性试验 取批号为 20130702 的胶囊, 按“2.2.2”项下方法制备 6 份, 进样, 测定, 按外标一点法计算。结果虎杖苷、丹酚酸 B 和五味子醇甲平均质量分数分别为 7.33、3.44、0.90 mg/g, RSD 分别为 2.85%、2.54%、1.81%, 表明重复性良好。

2.3.9 加样回收试验 取已测定的样品 (批号 20130702) 细粉 6 份, 每份约 1 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 分别加入虎杖苷 7.84 mg, 丹酚酸 B 3.27 mg, 五味子醇甲对照品 0.86 mg, 供试品溶液按照“2.2.2”项制备并按上述色谱条件进样测定, 计算回收率, 结果虎杖苷、丹酚酸、五味子醇甲的平均回收率分别为 94.93%、104.44%、91.49%, RSD 分别为 0.65%、2.51%、0.96%。

2.3.10 样品测定 取 10 个批次的样品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3.3”项色谱条件下进样分析, 外标法计算各成分的量, 测定结果见表 1。

表 1 每粒胶囊定量测定结果

Table 1 Determination of each capsule

批号	虎杖苷 / mg	丹酚酸 B / mg	五味子醇甲 / mg
20130702	1.455	0.684	0.181
20131102	1.788	0.455	0.202
20131003	1.775	0.522	0.184
20131001	1.817	0.521	0.191
20130602	1.742	0.728	0.226
20140105	1.503	0.711	0.182
20140102	1.761	0.511	0.201
20140101	1.664	0.559	0.175
20140103	1.749	0.468	0.190
20140104	1.746	0.515	0.178

3 讨论

虎驹乙肝胶囊处方组成中苷类成分较多, 如黄芪中黄芪甲苷, 三七中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 等活性成分。本实验按照公认的皂苷类成分提取方法制备供试品溶液^[7], 但组方柴胡所含有的柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D 在所提取的供试液中未能发现。去除正丁醇萃取步骤所得的供试液色谱峰中杂质峰干扰较大, 故确定采用“2.1.3”项供试品溶液制备方法。在 HPLC-UV 特征图谱中, 根据虎驹乙肝胶囊原质量标准, 分别比较甲醇和稀乙醇超声提取, 稀乙醇和 70%乙醇加热回流提取虎驹乙肝胶囊, 经过 HPLC 法对其提取方法进行筛选, 发现甲醇超声和稀乙醇加热回流得到的色谱图峰形

较好,得到色谱信息较多,最终确定用稀乙醇加热回流提取。

在 HPLC-ELSD 特征图谱中,本实验考察了乙腈-水、甲醇-水 2 个流动相系统,结果表明,乙腈-水系统的分离度、峰形、出峰时间均优于甲醇-水系统,故选定乙腈-水系统作为流动相。样品 90 min 图谱显示,在 55 min 后无特征峰出现,故最终确定采样时间为 55 min。在 HPLC-UV 特征图谱中,虎驹乙肝胶囊因其成分复杂,流动相以等度洗脱方式很难短时间内将大黄素、丹酚酸 B、绿原酸和五味子甲素等成分洗脱分离出来^[8-10],因而采用梯度洗脱。以甲醇水洗脱时,色谱峰拖尾严重,因而采用乙腈-0.1%磷酸水溶液梯度洗脱,且基线平稳。选择波长时,经查文献初步采用 254 nm^[11]的波长,后经对上述几种成分在 210~400 nm 进行全波长扫描后,结果表明 215 nm 出峰较多,响应值较大,故选 215 nm 作为检测波长。

由图 1、2 和表 1 可知,根据复方组成药物所含活性成分的性质,从整体特征色谱图入手,选取共有峰,建立特征图谱,判断其峰位和比例关系,同时测定多种主要活性成分的量,可为虎驹乙肝胶囊的质量控制提供可靠的依据。

参考文献

- [1] Shan B, Cai Y Z, Brooks J D, *et al.* Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents [J]. *Food Chem*, 2008, 109(3): 530-537.
- [2] Lin H W, Sun M X, Wang Y H, *et al.* Anti-HIV activities of the compounds isolated from *Polygonum cuspidatum* and *Polygonum multiflorum* [J]. *Planta Med*, 2010, 76(9): 889-892.
- [3] Yiu C Y, Chen S Y, Chang L K, *et al.* Inhibitory effects of resveratrol on the Epstein-Barr virus lytic cycle [J]. *Molecules*, 2010, 15(10): 7115-7124.
- [4] 田影,何克江,朱靖博.丹酚酸 B 的体外抗氧化活性[J].大连工业大学学报,2008,27(4):304-308.
- [5] 李正国,于立佐,张爱岑.RP-HPLC 测定降酶灵胶囊中五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素的含量[J].中成药,2004,26(8):618-621.
- [6] 刘小丽,石丽,李华.川芎药材 HPLC 指纹图谱及阿魏酸测定研究[J].中成药,2011,33(8):1289-1292.
- [7] 李进,陈涛,王洋,等.陇西产黄芪药材 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱的研究[J].中草药,2009,40(5):804-806.
- [8] 周建军,张宏杰,杨培君,等.汉中地区虎杖中白藜芦醇苷及苷元含量的测定[J].中草药,2002,33(5):414-416.
- [9] 张延妮,岳宣峰,王喆之.反相高效液相色谱同时测定五味子中五味子醇甲、五味子酯甲和五味子乙素的含量[J].分析科学学报,2007,23(1):41-44.
- [10] 杨孝容,向清祥,熊俊如.HPLC 测定柏子养心丸中五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素的含量[J].药物分析杂志,2006,26(11):1558-1560.
- [11] 中国药典[S].一部.2010.