

HPLC一测多评法测定乳宁颗粒中柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、王不留行环肽A和王不留行环肽B

李占芳¹, 李俊卿¹, 许伟¹, 任强², 周金辉²

1. 东营市食品药品检验中心, 山东 东营 257091

2. 济宁医学院 药学院, 山东 日照 276800

摘要: 目的 建立HPLC一测多评(QAMS)法同时检测乳宁颗粒中柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、王不留行环肽A、王不留行环肽B的含量。方法 采用Agilent HC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温30℃; 乙腈-0.1%磷酸为流动相, 梯度洗脱, 体积流量1.0 mL/min, 检测波长分别为210 nm (检测柴胡皂苷a和柴胡皂苷d) 和280 nm (检测二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、王不留行环肽A和王不留行环肽B)。以丹参酮II_A为内参物, 建立其与柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、王不留行环肽A、王不留行环肽B的相对校正因子(RCF), 计算各成分含量, 同时与外标法(ESM)实测值进行比较, 以验证HPLC-QAMS法的可行性。结果 柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、王不留行环肽A、王不留行环肽B分别在4.08~102.00、2.97~74.25、0.74~18.50、1.56~39.00、1.98~49.50、3.69~92.25、0.66~16.50、0.54~13.50 μg/mL ($r \geq 0.9991$) 线性关系良好, 平均加样回收率(RSD)分别为100.08% (0.54%)、99.68% (0.67%)、97.85% (1.64%)、98.99% (0.92%)、98.81% (1.35%)、100.06% (0.62%)、96.81% (0.73%)、97.79% (1.41%), 乳宁颗粒中各成分一测多评法计算值与外标法实测含量值无显著性差异。结论 所建立的HPLC-QAMS法为乳宁颗粒提供了一种准确可行的多指标质量控制模式。

关键词: 高效液相一测多评法; 乳宁颗粒; 相对校正因子; 多指标; 质量控制

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2021) 07-1434-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.07.010

Determination of saikosaponin a, saikosaponin d, 15, 16-dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I, tanshinone II_A, segetalin A and segetalin B in Runing Granule by HPLC-QAMS

LI Zhanfang¹, LI Junqing¹, XU Wei¹, REN Qiang², ZHOU Jinhui²

1. Dongying Food and Drug Inspection Center, Dongying 257091, China

2. College of pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276800, China

Abstract: Objective To establish an HPLC-QAMS method for the determination of saikosaponin a, saikosaponin d, 15, 16-dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I, tanshinone II_A, segetalin A and segetalin B in Runing granule. **Methods** The samples were separated on an Agilent HC-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), gradient elution conditions were the mobile phase using acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength were 210 nm for saikosaponin a and saikosaponin d, and 280 nm for 15, 16-dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I, tanshinone II_A, segetalin A and segetalin B, the column temperature was 30℃. Using tanshinone II_A as an internal standard, the relative correction factors of saikosaponin a, saikosaponin d, 15, 16-dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I, segetalin A and segetalin B were calculated, after which the content determination was made. The method was validated by comparison of the quantitative results between external standard method (ESM) and HPLC-QAMS method. **Results** Saikosaponin a, saikosaponin d, 15, 16-dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I, tanshinone II_A, segetalin A and segetalin B showed good linear relationships within the ranges of 4.08 — 102.00, 2.97 — 74.25, 0.74 — 18.50, 1.56 — 39.00, 1.98 — 49.50, 3.69 — 92.25, 0.66 — 16.50 and 0.54 — 13.50 μg/mL ($r \geq 0.9991$),

收稿日期: 2021-04-01

基金项目: 山东省中医药科技发展计划项目(2019-0449)

第一作者: 李占芳(1976—), 女, 本科, 副主任药师, 研究方向为药物分析及质量控制。Tel: 0546-8087835 E-mail: qjinyvy92@163.com

whose average recoveries (RSD) were 100.08% (0.54%), 99.68% (0.67%), 97.85% (1.64%), 98.99% (0.92%), 98.81% (1.35%), 100.06% (0.62%), 96.81% (0.73%), 97.79% (1.41%), respectively. No significant differences were found in the quantitative analysis of components by ESM and HPLC-QAMS method. **Conclusions** The HPLC-QAMS method can provide a accurate and feasible method with determination to establish multi-index component quality evaluation model for Runing granule.

Key words: HPLC-QAMS; Runing granule; relative correction factor; multi-index; quality control

乳宁颗粒由柴胡、丹参、王不留行、当归、醋香附、赤芍、炒白芍、炒白术、茯苓、青皮、陈皮和薄荷共12味中药材加工而成,主要用于肝气郁结型乳癖或乳腺增生所致经前乳房胀痛、两胁胀痛、乳房结节、经前疼痛加重等临床病症的治疗^[1]。现代临床研究表明乳宁颗粒治疗乳腺增生临床效果显著^[2],其联合泡茶方能显著缩小乳腺囊性增生症患者囊肿大小,并缓解乳痛^[3];有效降低肝郁痰凝型乳腺增生伴乳痛患者血清内分泌激素雌二醇、催乳素、黄体生成素和血管生成素-2、缺氧诱导因子-1 α 、血管内皮细胞生长因子和碱性成纤维细胞生长因子水平,提高孕酮和卵泡刺激素水平^[4];对肝郁血瘀型乳痛病症临床治疗效果显著^[5]。现行质量标准《中国药典》2020年版一部^[1]和文献报道仅对乳宁颗粒中原儿茶醛、芍药苷等1~2种成分进行定量控制,中药及其制剂含多种成分,且各成分间相互协同、相互制约,具有多靶点、多通道、整体性等特点,现有质量控制手段难以全面评价其整体质量,多组分评价模式已逐步应用于中成药复方制剂的质量控制中。高效液相一测多评(HPLC-QAMS)法通过中药及其制剂所含成分间的内在函数关系,建立内参物与其他成分的相对校正因子,实现中药多成分的同时定量控制。本研究依据中药质量标志物选取原则,选取乳宁颗粒处方中的君药柴胡主要成分柴胡皂苷a和柴胡皂苷d,臣药丹参活性成分二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮II_A,佐药王不留行特征性成分王不留行环肽A和王不留行环肽B为目标成分,以对照品价廉易得、质量稳定、含量较高的丹参酮II_A作为内参物,采用HPLC-QAMS法同时检测乳宁颗粒中8种成分的含量,为乳宁颗粒多指标成分的质量控制提供参考依据。

1 仪器与试药

Agilent 1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);UltiMate 3000型高效液相色谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);Agilent HC-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)、Kromasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)、Capcell C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m),BT-125D型电子分析天平(德国Sartorius公

司);JK-250DB型超声波清洗器(合肥金尼机械制造有限公司)。对照品隐丹参酮(批号110852-201807,质量分数99.0%)、柴胡皂苷a(批号110777-201912,质量分数94.8%)、柴胡皂苷d(批号110778-201912,质量分数96.3%)和丹参酮II_A(批号110766-202022,质量分数98.9%)均购于中国食品药品检定研究院;对照品二氢丹参酮I(批号PRF7082701,质量分数99.6%)、丹参酮I(批号PRF8103143,质量分数98.7%)、王不留行环肽A(批号CFS201907,质量分数98.0%)和王不留行环肽B(批号CFS201902,质量分数98.5%)均购于武汉天植生物技术有限公司;乙腈和甲醇为色谱纯(德国默克公司);磷酸为分析纯(南京化学试剂股份有限公司);乳宁颗粒(规格:每袋装15 g,批号191102、191201、191206、200103、200301、200402、200507、200703、200905、201004)购于南京同仁堂药业有限责任公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

以乙腈-0.1%磷酸为流动相,梯度洗脱(0~9 min, 26.0%乙腈;9~16 min, 26.0%→42.0%乙腈;16~38 min, 42.0%→80.0%乙腈;38~49 min, 80.0%→85.0%乙腈;49~60 min, 85.0%→26.0%乙腈);采用Agilent HC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)色谱柱,柱温30 $^{\circ}$ C;检测波长分别为210 nm(0~16 min检测柴胡皂苷a和柴胡皂苷d)^[8-10]和280 nm(16~60 min检测二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、王不留行环肽A和王不留行环肽B)^[11-14];体积流量1.0 mL/min,进样量10 μ L。

2.2 供试品溶液的制备

取乳宁颗粒供试品适量,研细混匀,取约2.0 g,精密称定,加70%甲醇20 mL,45 min超声处理,放冷后用70%甲醇稀释至25 mL,摇匀过滤,制得乳宁颗粒供试品溶液;取按乳宁颗粒质量标准工艺处方及制法制备的柴胡阴性供试品、丹参阴性供试品、王不留行阴性供试品各适量,再按上述方法制成阴性供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备

取柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹

参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、王不留行环肽A、王不留行环肽B对照品各适量,用70%甲醇制成质量浓度分别为0.816、0.594、0.148、0.312、0.396、0.738、0.132、0.108 mg/mL的混合储备液。精密吸取上述储备液1.0 mL,用70%甲醇稀释20倍,制得混合对照品溶液(柴胡皂苷a 40.8 μg/mL、柴胡皂苷d 29.7 μg/mL、二氢丹参酮I 7.4 μg/mL、隐丹参酮 15.6 μg/mL、丹参酮I 19.8 μg/mL、丹参酮II_A 36.9 μg/mL、王不留行环肽A 6.6 μg/mL、王不留行环肽B 5.4 μg/mL)。

2.4 方法学考察

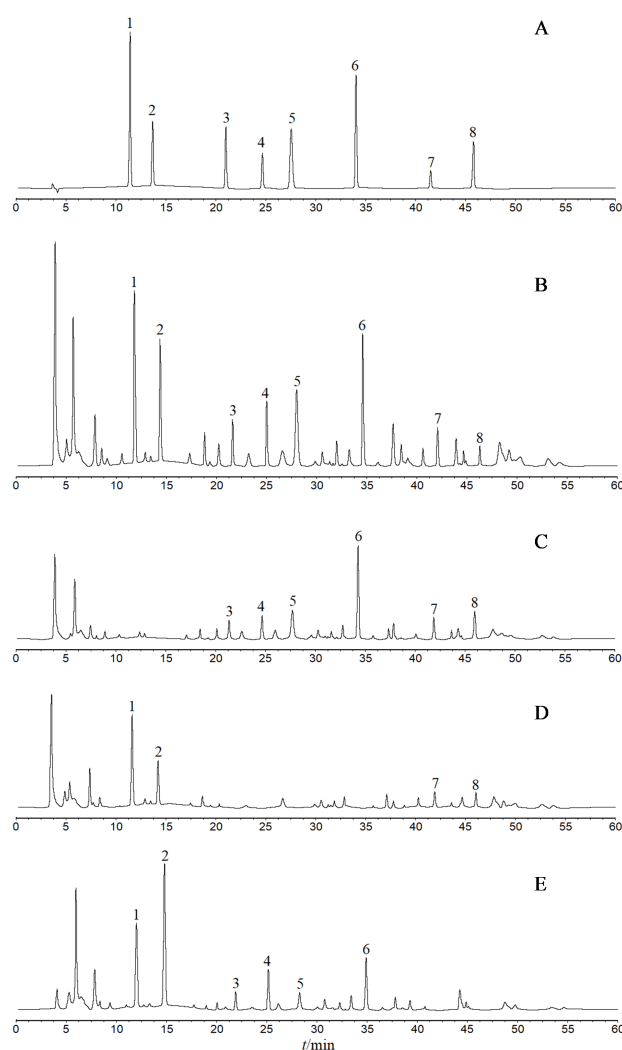
2.4.1 系统适用性 精密吸取“2.2”项4种供试品溶液及“2.3”项混合对照品溶液各10 μL,依法分析检测,记录色谱图(图1)。结果显示,乳宁颗粒中柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、王不留行环肽A、王不留行环肽B色谱峰与相邻色谱峰能够有效分离(分离度均>1.5);目标成分色谱峰对称,拖尾因子符合规定;理论板数按8个成分色谱峰计均≥3 500;阴性供试品对乳宁颗粒中柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、王不留行环肽A、王不留行环肽B同时测定无干扰。结果表明该系统适用性良好。

2.4.2 线性关系 精密吸取“2.3”项储备液0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,分别用70%甲醇稀释至20 mL,制得系列溶液,精密吸取上述溶液各10 μL,进样分析检测,以峰面积对柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、王不留行环肽A、王不留行环肽B质量浓度进行线性回归。结果见表1,表明8种成分在各自的范围内线性关系良好。

2.4.3 精密度 精密吸取混合对照品溶液10 μL,连续进样分析检测6次,测得柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、王不留行环肽A、王不留行环肽B峰面积的RSD分别为0.57%、0.82%、1.16%、1.04%、0.91%、0.65%、1.10%、1.28%,表明仪器精密度良好。

2.4.4 重复性 取批号191102乳宁颗粒适量,按“2.2”项制备步骤制备6份供试品溶液,进样分析检测柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、王不留行环肽A、王不留行环肽B峰面积,计算得8种成分含量的RSD分别为1.10%、1.27%、1.73%、1.43%、1.62%、1.05%、1.86%、1.89%,表明重复性良好。

2.4.5 稳定性 取批号191102乳宁颗粒的同一份



A-混合对照品;B-乳宁颗粒;C-柴胡阴性供试品;D-丹参阴性供试品;E-王不留行阴性供试品;1-柴胡皂苷a;2-柴胡皂苷d;3-二氢丹参酮I;4-隐丹参酮;5-丹参酮I;6-丹参酮II_A;7-王不留行环肽A;8-王不留行环肽B

A-mixed reference substances; B-Runing granule; C-sample without *Radix Bupleuri*; D-sample without *Salviae Miltiorrhizae Radix et Miltiorrhizae*; E-sample without *Vaccariae Semen*; 1-saikosaponin a; 2-saikosaponin d; 3-15, 16-dihydrotanshinone I; 4-cryptotanshinone; 5-tanshinone I; 6-tanshinone II_A; 7-segetalin A; 8-segetalin B

图1 混合对照品及供试品HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances and samples

供试品溶液,于0、2、4、8、18、24 h进样分析检测柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、王不留行环肽A、王不留行环肽B峰面积,乳宁颗粒供试品溶液24 h内稳定,8种成分峰面积的RSD分别为0.64%、0.75%、1.01%、0.98%、0.80%、0.79%、1.09%、1.20%。

2.4.6 加样回收率 取已知柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、王不留行环肽A、王不留行环肽B含量批号为191102的

表1 乳宁颗粒中柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、王不留行环肽A、王不留行环肽B的回归方程和线性范围

Table 1 Regression equations and linear ranges of saikosaponin a, saikosaponin d, 15, 16-dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I, tanshinone II_A, segetalin A and segetalin B in Runing granule

目标成分	回归方程	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	r
柴胡皂苷a	$Y=1.8133\times 10^6X+500.9$	4.08~102.00	0.999 2
柴胡皂苷d	$Y=1.3361\times 10^6X-1036.4$	2.97~74.25	0.999 7
二氢丹参酮I	$Y=1.4595\times 10^6X+1189.1$	0.74~18.50	0.999 2
隐丹参酮	$Y=1.1500\times 10^6X+677.7$	1.56~39.00	0.999 5
丹参酮I	$Y=1.0463\times 10^6X-961.4$	1.98~49.50	0.999 6
丹参酮II _A	$Y=1.2099\times 10^6X+721.2$	3.69~92.25	0.999 1
王不留行环肽A	$Y=9.3139\times 10^5X+1025.9$	0.66~16.50	0.999 3
王不留行环肽B	$Y=6.9743\times 10^5X+328.1$	0.54~13.50	0.999 7

乳宁颗粒9份,研细,每份1.0 g,精密称定,随机分成3组,每组分别精密加入混合对照品溶液(柴胡皂苷a 0.542 mg/mL、柴胡皂苷d 0.434 mg/mL、二氢丹参酮I 0.118 mg/mL、隐丹参酮 0.246 mg/mL、丹参酮I 0.322 mg/mL、丹参酮II_A 0.526 mg/mL、王不留行环肽A 0.094 mg/mL、王不留行环肽B 0.052 mg/mL) 0.8、1.0、1.2 mL,再按“2.2”项步骤制备加样供试品溶液,依法进样分析检测。目标成分柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、王不留行环肽A、王不留行环肽B的平均加样回收率及RSD分别为100.08%(0.54%)、99.68%(0.67%)、97.85%(1.64%)、98.99%(0.92%)、98.81%(1.35%)、100.06%(0.62%)、96.81%(0.73%)、97.79%(1.41%),表明该方法准确度高。

2.5 相对校正因子(RCF)的测定

精密吸取“2.4.2”项系列对照品溶液进样分析检测柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、王不留行环肽A、王不留行环肽B的峰面积,以丹参酮II_A为内参物,计算公式: $f_{k/s}=f_k/f_s=(W_kA_s)/(W_sA_k)$ (W_s 为内参物丹参酮II_A质量浓度, A_s 为内参物丹参酮II_A峰面积, W_k 为其他待测组分质量浓度, A_k 为其他待测组分的峰面积)。分别计算丹参酮II_A对柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、王不留行环肽A和王不留行环肽B的RCF,结果见表2。

2.6 RCF耐用性考察

在不同仪器(Agilent 1100型和UltiMate 3000型高效液相色谱仪)、不同色谱柱(Agilent HC-C₁₈柱、Kromasil C₁₈柱、Capcell C₁₈柱,规格均为250 mm×4.6 mm,5 μm)、不同柱温(28、29、30、31、32 $^{\circ}\text{C}$)、不同体积流量(0.8、0.9、1.0、1.1、1.2 mL/min)及不同检测波长变化(± 2 nm)条件下精密吸取混合对照品溶液进样分析检测柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、王不留行环肽A、王不留行环肽B的峰面积,进行RCF耐用性考察,结果在不同仪器、色谱柱条件下柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、王不留行环肽A和王不留行环肽B的平均RCF分别为0.663 5、0.902 5、0.833 5、1.053 4、1.157 3、1.292 3、1.727 5,RSD值0.74%~1.82%;不同柱温条件下平均RCF分别为0.661 4、0.899 3、0.828 6、1.045 6、1.150 2、1.291 2、1.724 4,RSD值0.84%~1.73%;不同体积流量条件下平均RCF分别为0.666 9、0.902 6、0.829 0、1.049 3、1.147 7、1.292 5、1.723 4,RSD值0.70%~1.86%;不同检测波长变化条件下平均RCF分别为0.662 7、0.901 2、0.827 8、1.045 2、1.149 5、

表2 以丹参酮II_A为内参物的7种成分RCFs

Table 2 RCFs of seven components with tanshinone II_A as internal reference substance

序号	RCF						
	柴胡皂苷a	柴胡皂苷d	二氢丹参酮I	隐丹参酮	丹参酮I	王不留行环肽A	王不留行环肽B
1	0.651 3	0.895 0	0.839 2	1.040 9	1.113 4	1.298 4	1.691 9
2	0.675 6	0.900 6	0.842 2	1.053 9	1.158 0	1.291 8	1.752 2
3	0.673 9	0.904 9	0.830 0	1.049 8	1.165 9	1.290 9	1.711 8
4	0.658 1	0.902 6	0.813 3	1.047 6	1.148 0	1.297 9	1.724 6
5	0.666 9	0.920 6	0.829 8	1.061 1	1.167 8	1.305 7	1.769 1
6	0.669 4	0.897 5	0.832 5	1.047 8	1.151 0	1.294 2	1.717 7
平均值	0.665 9	0.903 5	0.831 2	1.050 2	1.150 7	1.296 5	1.727 9
RSD/%	1.41	1.01	1.22	0.65	1.73	0.42	1.63

1.291 4、1.726 1, RSD 值 0.49%~1.63%。表明所建立的 RCF 耐用性良好。

2.7 目标化合物色谱峰的定位

考察相对保留时间值(其他目标化合物与内参物丹参酮II_A保留时间的比值)在不同仪器和色谱柱条件下的重现性,对目标化合物进行色谱峰定位,结果(表3)测得柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、王不留行环肽A和王不留行环肽B与丹参酮II_A相对保留时间值的RSD<2.0%,表明采用相对保留时间值法能够对目标化合物色谱峰进行准确定位。

2.8 QAMS与外标法(ESM)含量测定结果比较

取10批乳宁颗粒供试品适量,每批按“2.2”项

下方法制备乳宁颗粒供试品溶液3份,进样分析检测柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、王不留行环肽A、王不留行环肽B的峰面积,采用外标法和一测多评法分别计算得柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、王不留行环肽A、王不留行环肽B的含量(表4),SPSS 26.0统计软件独立样本 t 检验结果显示,QAMS法计算值与ESM实测值无明显差异,表明本实验所建立的方法可用于乳宁颗粒中多指标成分的质量控制。

3 讨论

3.1 指标成分的选择

乳宁颗粒由柴胡、丹参、王不留行、当归、醋香

表3 不同仪器、色谱柱待测成分色谱峰的相对保留值

Table 3 Relative retention value of components under test on different instruments and columns

仪器	色谱柱	相对保留时间						
		柴胡皂苷a	柴胡皂苷d	二氢丹参酮I	隐丹参酮	丹参酮I	王不留行环肽A	王不留行环肽B
Agilent 1100	Agilent HC-C ₁₈	0.334 2	0.400 8	0.617 6	0.724 8	0.809 6	1.220 7	1.345 4
	Kromasil C ₁₈	0.328 5	0.394 6	0.615 2	0.720 7	0.802 1	1.213 6	1.341 2
	Capcell C ₁₈	0.341 9	0.410 2	0.625 9	0.729 8	0.814 6	1.228 4	1.352 7
UltiMate 3000	Agilent HC-C ₁₈	0.331 8	0.398 5	0.615 4	0.720 1	0.805 2	1.217 3	1.341 5
	Kromasil C ₁₈	0.326 4	0.392 1	0.614 3	0.719 8	0.800 4	1.210 6	1.340 1
	Capcell C ₁₈	0.340 6	0.405 6	0.623 7	0.728 5	0.812 7	1.225 7	1.350 8
	平均值	0.333 9	0.400 3	0.618 7	0.724 0	0.807 4	1.219 4	1.345 3
	RSD/%	1.89	1.69	0.79	0.61	0.72	0.57	0.40

表4 各成分含量测定结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Results of content determination of various constituents ($\bar{x}\pm s, n=3$)

成分	方法	质量分数/(mg·g ⁻¹)										P
		191102	191201	191206	200103	200301	200402	200507	200703	200905	201004	
丹参酮II _A	ESM	0.529	0.497	0.563	0.486	0.452	0.597	0.606	0.544	0.557	0.582	—
柴胡皂苷a	ESM	0.541	0.543	0.611	0.585	0.620	0.502	0.463	0.553	0.571	0.508	0.872
	QAMS	0.533	0.550	0.604	0.578	0.614	0.489	0.471	0.547	0.579	0.496	
柴胡皂苷d	ESM	0.438	0.411	0.466	0.425	0.501	0.396	0.375	0.430	0.444	0.429	0.920
	QAMS	0.447	0.409	0.461	0.419	0.488	0.407	0.380	0.435	0.451	0.433	
二氢丹参酮I	ESM	0.116	0.122	0.101	0.114	0.099	0.108	0.132	0.123	0.117	0.103	0.918
	QAMS	0.114	0.123	0.098	0.112	0.101	0.107	0.130	0.125	0.116	0.104	
隐丹参酮	ESM	0.242	0.226	0.215	0.235	0.207	0.219	0.278	0.264	0.270	0.251	0.985
	QAMS	0.248	0.229	0.217	0.231	0.209	0.220	0.271	0.263	0.268	0.249	
丹参酮I	ESM	0.317	0.331	0.340	0.298	0.364	0.333	0.270	0.354	0.282	0.325	0.932
	QAMS	0.312	0.327	0.336	0.301	0.357	0.329	0.275	0.351	0.286	0.329	
王不留行环肽A	ESM	0.094	0.098	0.101	0.095	0.107	0.103	0.081	0.089	0.093	0.097	0.853
	QAMS	0.096	0.097	0.102	0.096	0.106	0.104	0.083	0.090	0.092	0.098	
王不留行环肽B	ESM	0.051	0.053	0.055	0.049	0.044	0.048	0.058	0.057	0.050	0.054	0.911
	QAMS	0.052	0.054	0.054	0.050	0.045	0.049	0.057	0.056	0.051	0.053	

附、赤芍、炒白芍、炒白术、茯苓、青皮、陈皮和薄荷加工而成,方中柴胡疏肝升阳,香附疏肝解郁、理气宽中,合为君药;丹参活血祛瘀、凉血消痈,当归补血活血、调经止痛,合为臣药;王不留行活血通经、下乳消肿,赤芍清热凉血、散瘀止痛,白芍养血调经、柔肝止痛,白术健脾益气,茯苓健脾宁心,青皮疏肝破气、消积化滞,陈皮理气健脾,合为佐药;薄荷疏肝行气,为使药^[15]。12味中药材所含化学成分相互协同、相互制约,共奏舒肝养血、理气解郁之效,其中柴胡皂苷a、柴胡皂苷d等皂苷类为柴胡代表性成分,柴胡皂苷a通过触发细胞凋亡抑制乳腺癌细胞的增殖或活力^[16];二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I以及丹参酮II_A等为丹参主要活性成分,通过调节雌激素受体、促进细胞凋亡的方式抑制乳腺增生、乳腺癌的发生发展^[17];王不留行环肽A、王不留行环肽B为王不留行特征成分,可用于乳腺增生、产后缺乳等病症的治疗^[18]。本研究参考中药质量标志物确认原则,选取上述8种成分为定量检测目标化合物,建立乳宁颗粒多指标成分质量控制方法,以期更加全面客观地评价乳宁颗粒的整体质量。

3.2 流动相的选择

流动相优化过程中,首先采用甲醇-水^[11,19-20]、乙腈-水^[8-10]系统对目标成分进行等度洗脱,结果甲醇-水系统基线漂移严重,干扰检测,同时检测用时较长;乙腈-水系统柴胡皂苷a色谱峰因含量高出现平头峰和拖尾现象,可能与乳宁颗粒为中成药复方制剂,所含化学成分复杂多样以及甲醇在210 nm处存在紫外吸收有关,故以乙腈为有机相,在水相中加入0.1%磷酸溶液^[12]改善峰形,同时采用梯度洗脱方式对目标成分进行检测,结果显示以乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相,按照“2.1”项洗脱程序时,所检测色谱图基线平稳,8种目标成分色谱峰峰形对称,分离度符合要求。

3.3 乳宁颗粒供试品制备过程考察

为保证乳宁颗粒中8种目标成分的提取率,实验对不同提取溶剂(50%甲醇、70%甲醇^[11,13-14]、甲醇)、不同提取方式(超声^[13-14]、回流)和不同提取时间(15、30、45、60 min)进行了筛选优化,最终确定70%甲醇超声45 min为乳宁颗粒供试品制备的最佳方式。

本研究以丹参酮II_A为内参物,采用HPLC-QMAS法对乳宁颗粒中柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、王不留行

环肽A和王不留行环肽B含量进行了同时检测,所建立的方法操作快捷、结果准确,为进一步全面客观评价乳宁颗粒质量提供了科学参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2020:1175-1176.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020: 1175-1176.
- [2] 周斌,邵清.乳宁颗粒治疗乳腺增生的临床疗效研究[J].中国社区医师,2018,34(2):92-93.
Zhou B, Shao Q. Clinical effect of Ru Ning granule in the treatment of hyperplasia of mammary glands [J]. Chin Commun Doct, 2018, 34(2): 92-93.
- [3] 解蓉婷,姚昶,李琳.乳宁颗粒联合泡茶方治疗乳腺囊性增生症临床观察[J].河北中医,2018,40(3):370-373.
Xie R T, Yao C, Li L. Clinical observation of Runing granules combined with tea infusion in the treatment of breast cystic hyperplasia [J]. Hebei J Tradit Chin Med, 2018, 40(3): 370-373.
- [4] 袁帅,袁晓航,张军,等.乳宁颗粒对乳腺增生伴乳痛患者内分泌激素和血管生成因子的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(22):187-192.
Yuan S, Yuan X H, Zhang J, et al. Effect of Runing granule on endocrine hormones and angiogenic factors in patients with hyperplasia of mammary [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2018, 24(22): 187-192.
- [5] 史晓光.乳宁颗粒治疗肝郁血瘀型乳痛症的临床研究[J].实用妇科内分泌杂志,2017,4(15):21-22.
Shi X G. Clinical study on the treatment of liver stagnation and blood stasis type of runing granule breast pain [J]. J Pract Gynecol Endocrinol, 2017, 4(15): 21-22.
- [6] 奚永兰,徐富柱.高效液相色谱法测定乳宁颗粒中芍药苷的含量[J].中国民族民间医药,2012,21(6):42-43.
Xi Y L, Xu F Z. Determination of paeoniflorin in Runing granule [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm, 2012, 21(6): 42-43.
- [7] 程龙,奚永兰.高效液相色谱法测定乳宁颗粒中原儿茶醛的含量[J].中国民族民间医药,2012,21(7):38,42.
Cheng L, Xi Y L. Determination of protocatechuic aldehyde in Runing granule [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm, 2012, 21(7): 38, 42.
- [8] 莫子晴,蔡皓,段煜,等.柴胡和白芍醋炙前后组对四逆散中5种成分的影响[J].中成药,2020,42(12):3216-3221.
Mo Z Q, Cai H, Duan Y, et al. Effects of Bupleuri Radix and Paeoniae Radix Alba with or without

- vinegarprocessing on five constituents in Sinisan [J]. Chin Tradit Patent Med, 2020, 42(12): 3216-3221.
- [9] 王永杰. HPLC-DAD同时测定柴胡口服液中2种柴胡皂苷的含量[J]. 微量元素与健康研究, 2021, 38(1): 57-59.
- Wang Y J. Simultaneousdetermination of two saikosaponins in Chaihu oral solution by HPLC-DAD [J]. Stud Trace Elements Health, 2021, 38(1): 57-59.
- [10] 王隽, 李萍, 蒲思婧. 不同炮制品, 产地及采收时间柴胡的有效成分检测[J]. 山东中医杂志, 2020, 39(4): 395-400.
- Wang J, Li P, Pu S J. Determination of effective components of Chaihu (*Bupleuri Radix*) in different processed products, producing area and harvesting time [J]. Shandong J Tradit Chin Med, 2020, 39(4): 395-400.
- [11] 李志东. HPLC同时测定新泰不同区域丹参药材中8种成分的含量[J]. 泰山医学院学报, 2020, 41(3): 211-215.
- Li Z D. Simultaneous determination of 8 components in *Salvia miltiorrhiza* Bge. in different areas of Xintai by HPLC [J]. J Taishan Med Coll, 2020, 41(3): 211-215.
- [12] 张光华, 付龙, 王京辉, 等. SFC和UPLC方法用于丹参饮片中多成分研究[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(5): 940-947.
- Zhang G H, Fu L, Wang J H, et al. Multiple components analysis of *Salvia Miltiorrhiza* decoction pieces by SFC and UPLC [J]. Chin J Pharm Anal, 2020, 40(5): 940-947.
- [13] 杨贵雅, 薛紫鲸, 张丹, 等. 基于指纹图谱和多成分含量测定的丹参药材皮部和木部化学成分比较研究[J]. 中草药, 2019, 50(21): 5328-5335.
- Yang G Y, Xue Z J, Zhang D, et al. Chemical comparison of *Salvia miltiorrhiza* phloem and xylem based on fingerprint analysis and quantitative analysis of multi-components [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(21): 5328-5335.
- [14] 孟贺, 陈玉平, 秦文杰, 等. HPLC测定王不留行中王不留行黄酮苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(16): 2072-2074.
- Meng H, Chen Y P, Qin W J, et al. Determination of vaccarin in *Vaccariae Semen* by HPLC [J]. China J Chin Mater Med, 2010, 35(16): 2072-2074.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典临床用药须知(中药成方制剂卷2015年版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2017: 732.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia Guidelines for Clinical Drug Use(Chinese Medicine Prescription Preparation Volume 2015 edition)* [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2017: 732.
- [16] Ye R P, Chen Z D. Saikosaponin A, an active glycoside from *Radix bupleuri*, reverses P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in MCF-7/ADR cells and HepG2/ADM cells [J]. Xenobiotica, 2017, 47(2): 176-184.
- [17] 郭傲玮, 蒲位凌, 骆莹莹, 等. 丹参雌激素样作用及机制研究近况[J]. 天津中医药大学学报, 2017, 36(5): 324-328.
- Guo A W, Pu W L, Luo Y Y, et al. Advances in mechanism studies on estrogen-like effect of *Salvia miltiorrhiza* Bge. [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2017, 36(5): 324-328.
- [18] 高艳奎, 张莉莉, 柳荣, 等. 王不留行的临床应用及其用量[J]. 长春中医药大学学报, 2020, 36(2): 231-233.
- Gao Y K, Zhang L L, Liu R, et al. Clinical application and dosage of cowherb seed [J]. J Changchun Univ Chin Med, 2020, 36(2): 231-233.
- [19] 董红敬, 李佳, 郭英慧, 等. 高效液相色谱法测定王不留行中王不留行环肽A和王不留行环肽B[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(5): 793-796.
- Dong H J, Li J, Guo Y H, et al. HPLC simultaneous determination of segetalin A and segetalin B in *Vaccariae Semen* [J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(5): 793-796.
- [20] 周国洪, 唐力英, 寇真真, 等. 炮制对王不留行中王不留行环肽A, B, E含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(4): 29-31.
- Zhou G H, Tang L Y, Kou Z Z, et al. Effects of processing on contents of segetalin A, B, E in *Vaccariae Semen* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2016, 22(4): 29-31.

[责任编辑 兰新新]