

HPLC-QAMS法测定金果含片中哈巴苷、哈巴俄苷、柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B

李占芳¹, 许伟¹, 宋建建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 建立高效液相结合一测多评(HPLC-QAMS)法同时测定金果含片中哈巴苷、哈巴俄苷、柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B的方法。方法 采用Agilent HC C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.05%磷酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长为210 nm(哈巴苷和哈巴俄苷)和296 nm(柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B); 体积流量1.0 mL/min; 进样量10 μL; 柱温30 ℃。进行专属性试验、线性关系考察、精密度试验、稳定性试验、重复性试验、加样回收率试验。以橙皮苷为内参物, 建立该成分与哈巴苷、哈巴俄苷、柚皮芸香苷、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B的相对校正因子(RCF), 并计算金果含片中8种成分的含量, 同时与外标法的测定结果进行比较, 验证该方法的可行性。结果 哈巴苷、哈巴俄苷、柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B检测质量浓度的线性范围分别为6.54~163.50、2.27~56.75、8.16~204.00、17.95~448.75、1.88~47.00、0.54~13.50、1.48~37.00和0.76~19.00 μg/mL(*r*值范围0.999 1~0.999 8); 平均加样回收率及RSD值分别为99.85%(0.76%)、97.62%(1.07%)、100.09%(0.64%)、99.80%(0.71%)、97.48%(1.44%)、98.25%(1.60%)、96.90%(1.03%)、96.87%(1.31%), 方法学验证结果均符合要求。HPLC-QAMS法计算值与外标法实测值无显著性差异。结论 所建立的HPLC-QAMS法简便、有效、准确, 可用于金果含片中多指标成分含量的同时测定, 为提升金果含片的质量控制方法提供参考依据。

关键词: 金果含片; 高效液相一测多评法; 相对校正因子; 哈巴苷; 哈巴俄苷; 柚皮芸香苷; 橙皮苷; 川陈皮素; 橘红素; 麦冬甲基黄烷酮A; 甲基麦冬二氢高异黄酮B

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)09-1916-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.09.015

Determination of harpagide, harpagoside, narirutin, hesperidin, nobiletin, tangeretin, methylophipogonanone A and methylophipogonanone B in Jinguo Hanpian by HPLC-QAMS

LI Zhanfang¹, XU Wei¹, SONG Jianjian¹, 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 develop an HPLC-QAMS method for simultaneous determination of harpagide, harpagoside, narirutin, hesperidin, nobiletin, tangeretin, methylophipogonanone A and methylophipogonanone B in Jinguo Hanpian. **Methods** The determination was performed on an Agilent HC C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with gradient elution, and the mobile phase consisted of acetonitrile-0.05% phosphoric acid at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were set at 210 nm for harpagide and harpagoside, 296 nm for narirutin, hesperidin, nobiletin, tangeretin, methylophipogonanone A and methylophipogonanone B. The column temperature was set at 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. Using hesperidin as an internal standard, the relative correction factor (RCF) of harpagide, harpagoside, narirutin, nobiletin, tangeretin,

收稿日期: 2021-03-02

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: gtjj39697@163.com

methylophipogonanone A and methylophipogonanone B were calculated. The RCFs value were used to calculate the contents of eight components in Jinguo Hanpian, and compared with the results of the external standard method (ESM) to verify the feasibility of the method. **Results** The linear range was 6.54—163.50 $\mu\text{g/mL}$ for harpagide, 2.27—56.75 $\mu\text{g/mL}$ for harpagoside, 8.16—204.00 $\mu\text{g/mL}$ for narirutin, 17.95—448.75 $\mu\text{g/mL}$ for hesperidin, 1.88—47.00 $\mu\text{g/mL}$ for nobiletin, 0.54—13.50 $\mu\text{g/mL}$ for tangeretin, 1.48—37.00 $\mu\text{g/mL}$ for methylophipogonanone A, 0.76—19.00 $\mu\text{g/mL}$ for methylophipogonanone B ($r = 0.999\ 1\text{--}0.999\ 8$). The average recovery and RSD were 99.85% (0.76%), 97.62% (1.07%), 100.09% (0.64%), 99.80% (0.71%), 97.48% (1.44%), 98.25% (1.60%), 96.90% (1.03%) and 96.87% (1.31%). Significant difference weren't found between the calculated value of HPLC-QAMS method and the measured value of external standard method. **Conclusion** The HPLC-QAMS is simple, effective and accurate, which can be used for simultaneous determination of multi-index component in Jinguo Hanpian, and it can provide reference for the increase of quality control method of Jinguo Hanpian.

Key words: Jinguo Hanpian; HPLC-QAMS; RCF; harpagide; harpagoside; narirutin; hesperidin; nobiletin; tangeretin; methylophipogonanone A; methylophipogonanone B

金果含片收载于《中国药典》2020年版一部,由玄参、陈皮、麦冬、地黄等9味中药材按照制备工艺加工而成,具有养阴生津、清热利咽的临床功效,主要用于肺热阴伤或急、慢性咽炎引起的咽部红肿、咽痛、口干咽燥等临床病症^[1]。近年来金果含片的质量控制研究^[2-4]以及目前收载的质量标准^[1]仅对其所含橙皮苷进行含量测定,仅涉及方中佐药陈皮所含的单个成分,不能全面反映金果含片的内在质量。中成药复方制剂不同于化药制剂,由多味中药材配伍组方而成,具有多成分、多靶点、多通道的整体特征,所含化学成分复杂多样,且每种化学成分含量受原药材种属、产地、采收季节、初加工方法以及制剂生产过程差异的影响较大,多指标成分质量控制模式有助于药品生产企业从原药材源头和制剂生产过程加强产品质量控制,稳定产品质量,以达到临床用药的稳定性和一致性。本研究以君药玄参所含特征成分哈巴苷和哈巴俄苷,臣药麦冬所含药效成分麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B以及佐药陈皮所含主要成分柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素和橘红素为目标成分,采用高效液相结合一测多评(HPLC-QAMS)法同时测定金果含片中上述8种成分含量,并与外标法(ESM)进行对比,验证HPLC-QAMS法用于金果含片多成分质量控制模式的可行性,为全面评价金果含片整体质量提供参考。

1 仪器与试剂

Agilent 1200型HPLC仪(美国Agilent公司); Waters 2695型HPLC仪(美国Waters公司); Mettler AB135-S型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); JK-250DB型超声波清洗器(合肥金尼机械制造有限公司); 液相色谱柱(Agilent HC C₁₈柱、Waters Xbridge C₁₈柱、CNW Athena C₁₈柱),规格

均为250 mm×4.6 mm, 5 μm 。

金果含片(批号200316、200522、200701,每片0.57 g)来源于江西南昌济生制药有限责任公司;对照品哈巴苷(批号111729-201707,质量分数96.8%)、哈巴俄苷(批号111730-201709,质量分数95.9%)、橙皮苷(批号110721-202019,质量分数95.3%)和川陈皮素(批号112055-202001,质量分数99.6%)均来源于中国食品药品检定研究院;对照品柚皮芸香苷(批号PRF9062802,质量分数99.8%)、橘红素(批号PRF8063048,质量分数98.7%)、麦冬甲基黄烷酮A(批号PRF8041122,质量分数99.9%)和甲基麦冬二氢高异黄酮B(批号PRF7102423,质量分数98.3%)均来源于成都普瑞法科技开发有限公司;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备

精密称取哈巴苷、哈巴俄苷、柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B对照品各适量,用50%甲醇制得每毫升含哈巴苷1.308 mg、哈巴俄苷0.454 mg、柚皮芸香苷1.632 mg、橙皮苷3.590 mg、川陈皮素0.376 mg、橘红素0.108 mg、麦冬甲基黄烷酮A 0.296 mg和甲基麦冬二氢高异黄酮B 0.152 mg的混合对照品贮备液。精密吸取上述贮备液2.5 mL置50 mL量瓶中,用50%甲醇定容至刻度,制得混合对照品溶液(哈巴苷65.4 $\mu\text{g/mL}$ 、哈巴俄苷22.7 $\mu\text{g/mL}$ 、柚皮芸香苷81.6 $\mu\text{g/mL}$ 、橙皮苷179.5 $\mu\text{g/mL}$ 、川陈皮素18.8 $\mu\text{g/mL}$ 、橘红素5.4 $\mu\text{g/mL}$ 、麦冬甲基黄烷酮A 14.8 $\mu\text{g/mL}$ 和甲基麦冬二氢高异黄酮B 7.6 $\mu\text{g/mL}$)。

2.2 供试品溶液的制备

取金果含片数片,除去薄膜衣后,研匀,称取细粉约2.0 g,精密称定,置25 mL量瓶中,加入50%甲

醇 20 mL, 室温下 30 min 超声处理, 放冷并用 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得金果含片供试品溶液。取按《中国药典》2020 年版一部金果含片项下处方比例制备的缺玄参、缺陈皮、缺麦冬的阴性供试品适量, 并按“2.2”项方法分别制备阴性供试品溶液。

2.3 色谱条件及专属性试验

Agilent HCC₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 乙腈-0.05% 磷酸溶液, 梯度洗脱程序见表 1, 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长分别为 210 nm (0~17 min 检测哈巴苷和哈巴俄苷)^[5-8] 和 296 nm (17~55 min 检测柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮 A 和甲基麦冬二氢高异黄酮 B)^[9-15]; 进样量 10 μL 。精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液及“2.2”项下溶液各 10 μL , 注入 HPLC 仪中进样检测并记录色谱图(图 1)。金果含片中哈巴苷、哈巴俄苷、柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮 A 和甲基麦冬二氢高异黄酮 B 与相邻色谱峰能够有效分离, 分离度均 >1.5 ; 理论塔板数按各成分色谱峰计均 $\geq 3\,500$ 。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution procedure of mobile phase

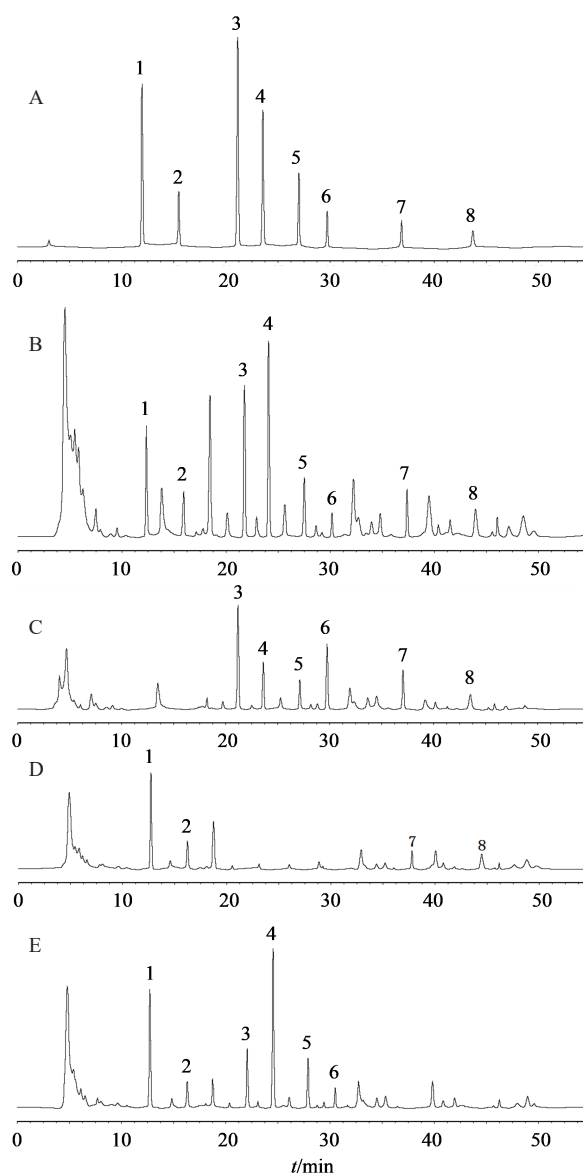
t/min	乙腈/%	0.05% 磷酸溶液/%
0~11	12.0	88.0
11~17	12.0 $\rightarrow$ 24.0	88.0 $\rightarrow$ 76.0
17~33	24.0 $\rightarrow$ 65.0	76.0 $\rightarrow$ 35.0
33~46	65.0 $\rightarrow$ 80.0	35.0 $\rightarrow$ 20.0
46~55	80.0 $\rightarrow$ 12.0	20.0 $\rightarrow$ 88.0

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.1”项下混合对照品贮备液 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL, 分别置于 20 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇稀释至刻度, 制得系列混合对照品溶液。精密吸取上述溶液各 10 μL , 注入 HPLC 仪中进样检测哈巴苷、哈巴俄苷、柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮 A 和甲基麦冬二氢高异黄酮 B 的峰面积, 以峰面积对质量浓度进行线性回归, 得各组回归方程和线性范围(表 2)。

2.5 精密度试验

精密吸取批号 200316 的金果含片的同一份供试品溶液 10 μL , 注入 HPLC 仪中进样检测哈巴苷、哈巴俄苷、柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮 A 和甲基麦冬二氢高异黄酮 B 的峰面积, 重复测定 6 次, 计算得 8 种成分峰面积的 RSD 值分别为 0.82%、1.06%、0.69%、0.53%、1.10%、



1-哈巴苷; 2-哈巴俄苷; 3-柚皮芸香苷; 4-橙皮苷; 5-川陈皮素; 6-橘红素; 7-麦冬甲基黄烷酮 A; 8-甲基麦冬二氢高异黄酮 B; A-混合对照品; B-金果含片供试品; C-玄参阴性供试品; D-陈皮阴性供试品; E-麦冬阴性供试品

1-harpagide; 2-harpagoside; 3-narirutin; 4-hesperidin; 5-nobiletin; 6-tangeretin; 7-methylophiopogonanone A; 8-methylophiopogonanone B; A-mixed reference substances; B-Jingguo Hanpian; C-sample without of *Scrophulariae Radix*; D-sample without of *Citri Reticulatae Pericarpium*; E-sample without of *Ophiopogonis Radix*

图 1 混合对照品及供试品 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of mixed reference substances and samples

1.23%、0.99%、1.15%。

2.6 稳定性试验

取批号 200316 的金果含片同一份供试品溶液, 于 0、2、4、8、16、24 h 各精密吸取 10 μL 注入 HPLC 仪中进样检测哈巴苷、哈巴俄苷、柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮 A 和甲基麦

表2 金果含片中8种成分线性范围、回归方程和相关系数

Table 2 Linear ranges, regression equations and correlation coefficients of eight components in Jingguo Hanpian

化合物	回归方程	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	<i>r</i>
哈巴昔	$Y=2.269\ 8\times 10^6 X+1\ 091.4$	6.54~163.50	0.999 3
哈巴俄昔	$Y=1.924\ 3\times 10^6 X+993.3$	2.27~56.75	0.999 6
柚皮芸香昔	$Y=2.774\ 8\times 10^6 X-859.8$	8.16~204.00	0.999 1
橙皮昔	$Y=1.482\ 3\times 10^6 X+1\ 086.2$	17.95~448.75	0.999 7
川陈皮素	$Y=1.707\ 2\times 10^6 X-640.7$	1.88~47.00	0.999 4
橘红素	$Y=6.874\ 7\times 10^5 X+353.0$	0.54~13.50	0.999 8
麦冬甲基黄烷酮A	$Y=1.229\ 8\times 10^6 X-1\ 259.2$	1.48~37.00	0.999 1
甲基麦冬二氢高异黄酮B	$Y=8.893\ 3\times 10^5 X+797.7$	0.76~19.00	0.999 4

冬二氢高异黄酮B的峰面积。金果含片供试品溶液24 h内稳定,哈巴昔、哈巴俄昔、柚皮芸香昔、橙皮昔、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B峰面积的RSD值分别为0.95%、1.13%、0.81%、0.58%、1.30%、1.29%、1.04%、1.32%。

2.7 重复性试验

取批号200316的金果含片细粉6份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,各精密吸取10 μL 注入HPLC仪中进样检测哈巴昔、哈巴俄昔、柚皮芸香昔、橙皮昔、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B的峰面积,并计算各成分含量。8种成分含量的RSD分别为1.28%、1.41%、1.17%、1.05%、1.79%、0.87%、1.68%、0.80%。

2.8 加样回收率试验

取已知哈巴昔、哈巴俄昔、柚皮芸香昔、橙皮昔、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B含量的批号为200316金果含片细粉9份,每份约1.0 g,随机分成3组,精密加入混合对照品溶液(哈巴昔0.708 mg/mL、哈巴俄昔0.242 mg/mL、柚皮芸香昔0.836 mg/mL、橙皮昔1.952 mg/mL、川陈皮素0.198 mg/mL、橘红素0.056 mg/mL、麦冬甲基黄烷酮A0.150 mg/mL、甲基麦冬二氢高异黄酮B0.088 mg/mL)0.8、1.0、1.2 mL各3份,再按“2.2”项方法处理制得加样供试品溶液,精密吸取上述溶液各10 μL 注入HPLC仪中,进样检测哈巴昔、哈巴俄昔、柚皮芸香昔、橙皮昔、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B的峰面积,计算得8种成分的平均加样回收率(RSD)分别为99.85%(0.76%)、97.62%(1.07%)、100.09%(0.64%)、99.80%(0.71%)、97.48%(1.44%)、98.25%(1.60%)、96.90%(1.03%)、96.87%(1.31%)。

2.9 相对校正因子(RCF)的建立

精密吸取“2.4”项下6个系列混合对照品溶液各10 μL 注入HPLC仪中,进样检测哈巴昔、哈巴俄昔、柚皮芸香昔、橙皮昔、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B的峰面积,以橙皮昔为内参物,按计算公式 $f_{k/s}=f_k/f_s=(X_k\times Y_s)/(X_s\times Y_k)$ (其中 X 和 Y 分别代表质量浓度和峰面积,下标 k 和 s 分别代表其他待测成分和内参物)分别计算得哈巴昔、哈巴俄昔、柚皮芸香昔、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B的RCF(表3)。

2.10 RCF耐用性考察

精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液10 μL 注入HPLC仪中,进样检测哈巴昔、哈巴俄昔、柚皮芸香昔、橙皮昔、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B的峰面积,分别对比考察不同HPLC仪(Agilent 1200型和Waters 2695型)、色谱柱(Agilent HC C₁₈、Waters Xbridge C₁₈、CNW Athena C₁₈)、体积流量(0.8、0.9、1.0、1.1、1.2 mL/min)和柱温(28、29、30、31、32 $^{\circ}\text{C}$)对所建立的RCF的影响。不同仪器及色谱柱条件下哈巴昔、哈巴俄昔、柚皮芸香昔、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B平均RCF分别为0.644 4、0.764 6、0.526 3、0.865 0、2.139 0、1.199 5、1.656 8, RSD值分别为1.49%、1.36%、1.83%、1.45%、1.17%、1.49%、1.09%;不同体积流量条件下各成分平均RCF分别为0.642 3、0.762 7、0.531 3、0.862 1、2.144 7、1.196 7、1.654 2, RSD值分别为1.63%、1.49%、1.79%、1.68%、1.42%、1.81%、1.33%;不同柱温条件下各成分平均RCF分别为0.655 1、0.770 6、0.535 8、0.865 1、2.143 4、1.205 6、1.663 2, RSD值分别为1.74%、1.54%、1.89%、1.53%、0.90%、1.30%、1.24%,表明不同仪器、色谱柱、体积流量和柱温对所建立

表3 以橙皮苷为内参物的各成分RCF

Table 3 RCFs of components with Hesperidin as internal reference substance

序号	RCF						
	哈巴苷	哈巴俄苷	柚皮芸香苷	川陈皮素	橘红素	麦冬甲基黄烷酮A	甲基麦冬二氢高异黄酮B
1	0.639 1	0.764 1	0.524 5	0.848 0	2.085 8	1.185 6	1.646 0
2	0.634 5	0.750 7	0.524 3	0.859 8	2.134 3	1.184 8	1.632 9
3	0.659 5	0.772 3	0.530 8	0.876 3	2.169 2	1.222 4	1.665 3
4	0.665 3	0.777 3	0.548 7	0.876 0	2.151 4	1.222 4	1.692 0
5	0.648 0	0.777 4	0.531 4	0.860 1	2.167 9	1.187 0	1.657 8
6	0.651 9	0.763 7	0.532 1	0.870 3	2.146 7	1.210 5	1.663 1
平均值	0.649 7	0.767 6	0.532 0	0.865 1	2.142 6	1.202 1	1.659 5
RSD/%	1.80	1.33	1.67	1.28	1.44	1.53	1.21

的RCF无显著影响。

2.11 目标化合物色谱峰的定位

待测成分色谱峰的准确定位为HPLC-QAMS可行性的基础,精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液10 μ L注入HPLC仪中进行检测,记录哈巴苷、哈巴俄苷、柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B色谱峰的保留时间,采用相对保留时间值(RRT,待测成分保留时间除以内参物保留时间)法对色谱峰进行定位,结果见表4。

2.12 HPLC-QAMS法与ESM测定结果的比较

取3批金果含片适量,按“2.2”项下处理方法制备供试品溶液,精密吸取10 μ L注入HPLC仪中,进样检测哈巴苷、哈巴俄苷、柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B的峰面积,分别采用ESM和HPLC-QAMS法计算哈巴苷、哈巴俄苷、柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B的含量,结果见表5。2种方法测

得的各成分含量间没有显著差异,说明该QAMS法测定金果含片中的哈巴苷、哈巴俄苷、柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B准确可行。

3 讨论

3.1 检测指标及内参物的选择

金果含片由玄参、地黄、陈皮、麦冬、太子参、南沙参、蝉蜕、胖大海和西青果配伍而成,方中玄参清热凉血、滋阴降火,地黄养阴生津,合为君药;麦冬养阴生津、润肺清心,南沙参养阴清肺、益胃生津、化痰益气,胖大海清热润肺、利咽开音,共为臣药;西青果清热生津,蝉蜕散热利咽,太子参益气健脾、生津润肺,陈皮理气健脾、燥湿化痰,合为佐使药。诸药共奏,以达养阴生津、清热利咽的临床治疗效果。本研究参考中药质量标志物选取原则选取方中君药玄参所含特征成分哈巴苷和哈巴俄苷,臣药麦冬所含药效成分麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B以及佐药陈皮所含主要成分柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素和橘红素为定量控制目标

表4 不同仪器、色谱柱各成分的RRT

Table 4 RRT of components on different instruments and columns

仪器	色谱柱	RRT						
		哈巴苷	哈巴俄苷	柚皮芸香苷	川陈皮素	橘红素	麦冬甲基黄烷酮A	甲基麦冬二氢高异黄酮B
Agilent 1200	Agilent HC C ₁₈	0.508 8	0.657 1	0.898 2	1.146 0	1.263 3	1.566 4	1.856 4
	Waters Xbridge C ₁₈	0.517 0	0.660 9	0.911 4	1.165 9	1.279 9	1.593 0	1.882 2
	CNW Athena C ₁₈	0.492 5	0.647 3	0.878 6	1.123 1	1.245 6	1.532 6	1.830 5
Waters 2695	Agilent HC C ₁₈	0.500 4	0.651 8	0.890 2	1.137 5	1.251 8	1.550 7	1.849 7
	Waters Xbridge C ₁₈	0.506 9	0.652 2	0.905 8	1.152 2	1.260 4	1.571 8	1.865 0
	CNW Athena C ₁₈	0.499 1	0.653 6	0.887 9	1.138 0	1.258 3	1.540 3	1.844 7
平均值		0.504 1	0.653 8	0.895 4	1.143 8	1.259 9	1.559 1	1.854 7
RSD/%		1.71	0.72	1.36	1.28	0.93	1.43	0.96

表5 HPLC-QAMS与ESM测得金果含片中8种活性成分的含量 ($n=3$)Table 5 Content results of eight active components in Jingguo Hanpian by ESM and HPLC-QAMS method($n=3$)

批号	橙皮苷			哈巴苷			哈巴俄苷			柚皮芸香苷		
	ESM/ (mg·g ⁻¹)	QAMS/ (mg·g ⁻¹)	RAD/ %	ESM/ (mg·g ⁻¹)	QAMS/ (mg·g ⁻¹)	RAD/%	ESM/ (mg·g ⁻¹)	QAMS/ (mg·g ⁻¹)	RAD/%	ESM/ (mg·g ⁻¹)	QAMS/ (mg·g ⁻¹)	RAD/%
200316	1.957	—	—	0.715	0.703	0.85	0.249	0.253	0.8	0.831	0.819	0.73
200522	1.569	—	—	0.857	0.841	0.94	0.297	0.292	0.85	0.666	0.673	0.52
200701	1.816	—	—	0.573	0.58	0.61	0.271	0.276	0.91	0.994	0.972	1.12

批号	川陈皮素			橘红素			麦冬甲基黄烷酮A			甲基麦冬二氢高异黄酮B		
	ESM/ (mg·g ⁻¹)	QAMS/ (mg·g ⁻¹)	RAD/ %	ESM/ (mg·g ⁻¹)	QAMS/ (mg·g ⁻¹)	RAD/%	ESM/ (mg·g ⁻¹)	QAMS/ (mg·g ⁻¹)	RAD/%	ESM/ (mg·g ⁻¹)	QAMS/ (mg·g ⁻¹)	RAD/%
200316	0.194	0.198	1.02	0.056	0.057	0.88	0.152	0.155	0.98	0.089	0.091	1.11
200522	0.217	0.223	1.36	0.063	0.062	0.80	0.123	0.125	0.81	0.095	0.093	1.06
200701	0.231	0.228	0.65	0.046	0.047	1.08	0.180	0.178	0.56	0.073	0.074	0.68

成分,同时选取质量稳定,成分含量较高,出峰位置较为居中的橙皮苷作为内参物,以期全面评价金果含片整体质量提供参考依据。

3.2 流动相及供试品制备方法的优化

流动相的选择对目标成分含量的准确测定尤为重要,本研究对比考察了甲醇-水、乙腈-水^[13]、乙腈-0.1%甲酸^[10,15]、乙腈-0.1%磷酸溶液^[9]、乙腈-0.05%磷酸溶液^[5-8]等流动相体系,以目标成分哈巴苷、哈巴俄苷、柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B峰形、与相邻色谱峰分离度、基线噪音以及检测用时等为指标,对流动相进行不断优化,最终确定以乙腈-0.05%磷酸溶液为流动相按照表1中梯度洗脱比例对哈巴苷、哈巴俄苷、柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B进行同时测定。在对金果含片进行提取时,依次对提取溶剂(95%乙醇、甲醇^[9,11]、70%甲醇^[12,16]、50%甲醇^[5-7])、超声提取和加热回流提取2种提取方式以及提取时间15、30、45 min进行对比考察,以哈巴苷、哈巴俄苷、柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B提取效果以及杂质干扰情况为考察指标,最终筛选出50%甲醇超声处理30 min为最佳提取方式。

3.3 含量测定结果分析

含量测定结果显示,HPLC-QAMS法计算值与ESM实测值无明显差异,表明本研究建立的HPLC-QAMS法结果准确,可用于金果含片中哈巴苷、哈巴俄苷、柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮A和甲基麦冬二氢高异黄酮B含量的同时测定;同时结果也反映出各成分含量存在一定

的批间差异,尤其哈巴苷、柚皮芸香苷、麦冬甲基黄烷酮A和橘红素较为明显,表明建立金果含片多指标成分质量控制模式对稳定该制剂的整体产品质量具有重要意义,同时也提示药品生产企业应进一步加强对原药材源头质量以及产品生产过程中质量控制,确保产品质量和临床疗效的一致性,为临床合理用药提供有力保障。

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.2020:1158-1159.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020: 1158-1159.
- [2] 霍天凤. 高效毛细管电泳法测定金果含片中橙皮苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 117-119.
Huo T F. Determination of hesperidin in sucking tablets of Jingguo by high performance capillary electrophoresis [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2012, 18(12): 117-119.
- [3] 龙新华, 杨美华, 万福根, 等. 高效液相色谱法测定金果含片中橙皮苷的含量[J]. 中成药, 1998, 20(2): 42.
Long X H, Yang M H, Wan F G, et al. Determination of Hesperidin in Jingguo Hanpian by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med, 1998, 20(2): 42.
- [4] 冷文金, 况 瑛, 万 民, 等. 金果含片含量测定方法的改进[J]. 中成药, 2004, 26(11): 970-971.
Leng W J, Kuang Y, Wan M, et al. Improvement of content determination method in Jingguo Hanpian [J]. Chin Tradit Pat Med, 2004, 26(11): 970-971.
- [5] 白云娥, 袁鹏飞, 王庆辉, 等. HPLC-UV波长转换法测定玄参药材及饮片中哈巴苷与哈巴俄苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 36(19): 2697-2702.
Bai Y E, Yuan P F, Wang Q H, et al. Determination of

- harpagide and harpagoside in *Scrophulariae Radix* by HPLC-UV [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2011, 36(19): 2697-2702.
- [6] 程晓莉. HPLC测定中药材玄参中有效成分的含量分析[J]. *实用中医内科杂志*, 2012, 26(11): 6-7.
- Cheng X L. HPLC determination of the content of the active ingredients in Herbal Medicines *Radix scrophulariae* analysis [J]. *Intern Med J Pract Tradit Chin Med Sci*, 2012, 26(11): 6-7.
- [7] 张雪梅, 王瑞, 安睿, 等. HPLC同时测定玄参中5种成分的含量[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(6): 709-711.
- Zhang X M, Wang R, An R, et al. Simultaneous determination of five constituents in *Scrophularia ningpoensis* by HPLC [J]. *China J Chin Mater Med*, 2011, 36(6): 709-711.
- [8] 卞晓霞, 罗跃娥, 闫利华, 等. 一测多评法同步测定玄参药材中两种环烯醚萜类成分的含量[J]. *天津中医药大学学报*, 2014, 33(2): 98-100.
- Bian X X, Luo Y E, Yan L H, et al. Quantitative analysis of two iridoids in figwort roots by QAMS method [J]. *J Tianjin Univ Tradit Chin Med*, 2014, 33(2): 98-100.
- [9] 陈育青, 朱善岚, 黄红宣, 等. 多波长HPLC结合化学模式识别的漳州陈皮炮制品质量比较研究[J]. *福建医科大学学报*, 2020, 54(5): 355-360, 364.
- Chen Y Q, Zhu S L, Huang H X, et al. Comparative study on the quality of different processed *Citri Reticulatae Pericarpium* from zhangzhou based on multi-wavelength HPLC and chemical pattern recognition [J]. *J Fujian Med Univ*, 2020, 54(5): 355-360, 364.
- [10] 封宇飞, 张宏武, 邹忠梅, 等. HPLC法同时测定陈皮饮片中5种黄酮类化合物的含量[J]. *药物分析杂志*, 2009, 29(1): 10-15.
- Feng Y F, Zhang H W, Zou Z M, et al. HPLC simultaneous determination of contents of five flavonoids in *Pericarpium Citri Reticulatae* [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2009, 29(1): 10-15.
- [11] 黄华花, 张伟云, 陈景海, 等. 陈皮配方颗粒的质量标准提高研究[J]. *中国药房*, 2019, 30(7): 937-941.
- Huang H H, Zhang W Y, Chen J H, et al. Study on the improvement of quality standard for *Citrus reticulata Formula Granules* [J]. *J China Pharm*, 2019, 30(7): 937-941.
- [12] 庄泽荣, 梁咏倩, 秦楠, 等. 超高效液相色谱法测定陈皮藿香汤中4种成分的含量[J]. *广东药学院学报*, 2016, 32(4): 439-443.
- Zhuang Z R, Liang Y J, Qing N, et al. Simultaneous determination of four components from Chenpi Huoxiang decoction by UPLC [J]. *Acad J Guangdong Coll Pharm*, 2016, 32(4): 439-443.
- [13] 吴发明, 杨瑞山, 张思获, 等. 高效液相色谱法同时测定麦冬中3个黄酮成分的含量[J]. *中国药理学杂志*, 2016, 51(8): 655-658.
- Wu F M, Yang R S, Zhang S D, et al. Simultaneous determination of three flavone constituents in *Ophiopogonis Radix* by HPLC method [J]. *Chin Pharm J*, 2016, 51(8): 655-658.
- [14] 曾品涛, 周慧, 郑一敏, 等. HPLC同时测定麦冬中3种高异黄酮含量[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(1): 71-74.
- Zeng P T, Zhou H, Zheng Y M, et al. Simultaneous determination of three homoisoflavonoids in *Ophiopogon japonicus* by HPLC [J]. *China J Chin Mater Med*, 2012, 37(1): 71-74.
- [15] 谈梦霞, 陈佳丽, 邹立思, 等. 不同加工麦冬中多元活性成分的含量测定及多元统计分析[J]. *药物分析杂志*, 2019, 39(6): 992-1002.
- Tan M X, Chen J L, Zou L S, et al. Determination of multiple bioactive constituents in *Ophiopogonis Radix* processed by different methods and multivariate statistical analysis [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2019, 39(6): 992-1002.

[责任编辑 兰新新]