

## 昆仙胶囊 HPLC 特征指纹图谱和多成分定量测定研究

许春芳<sup>1</sup>, 崔莉莉<sup>2</sup>, 鄢红霞<sup>3</sup>, 陶玉龙<sup>1</sup>, 姜玉<sup>1</sup>, 高守红<sup>1</sup>, 陈万生<sup>1</sup>, 杨宏<sup>1\*</sup>, 陶霞<sup>1\*</sup>

1. 海军军医大学第二附属医院 药学部, 上海 200003

2. 江西宜春学院化学与生物工程学院, 江西 宜春 336000

3. 云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650000

**摘要:** 目的 建立昆仙胶囊 HPLC 特征指纹图谱结合多成分含量测定的方法, 为其质量控制提供参考。方法 采用 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 体积流量为 0.8 mL/min, 柱温 33 °C, 检测波长 270 nm。以朝藿定 A 为参照峰, 建立 15 批昆仙胶囊特征指纹图谱, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2012A 版)、聚类分析及偏最小二乘法-判别分析方法进行评价, 同时测定金丝桃苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷以及宝藿苷 I 的含量。结果 建立了昆仙胶囊特征指纹图谱, 共标定了 21 个共有峰, 并通过对照品指认了其中的 15 个成分, 各批次样品的相似度均大于 0.9。金丝桃苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷及宝藿苷 I 在各自范围内线性关系良好 ( $r>0.999$ ), 15 批昆仙胶囊样品中上述 6 个成分的质量分数分别为 2.817~7.527、7.287~9.103、8.730~18.675、33.377~70.371、35.297~50.291、4.059~9.079 mg/g。结论 建立了昆仙胶囊特征指纹图谱结合多成分同时测定的方法, 简便、准确、重现性好, 可用于昆仙胶囊的质量控制。

**关键词:** 昆仙胶囊; 特征指纹图谱; 金丝桃苷; 朝藿定 A; 朝藿定 B; 朝藿定 C; 淫羊藿苷; 宝藿苷 I; 质量控制

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)24-6213-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.24.010

## HPLC characteristic chromatograms and quantitative analysis of Kunxian Capsules

XU Chun-fang<sup>1</sup>, CUI Li-li<sup>2</sup>, YAN Hong-xia<sup>3</sup>, TAO Yu-long<sup>1</sup>, JIANG Yu<sup>1</sup>, GAO Shou-hong<sup>1</sup>, CHEN Wan-sheng<sup>1</sup>, YANG Hong<sup>1</sup>, TAO Xia<sup>1</sup>

1. Department of Pharmacy, Second Affiliated Hospital to Naval Medical University, Shanghai 200003, China

2. School of Chemistry and Bioengineering, Yichun University, Yichun 336000, China

3. School of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650000, China

**Abstract: Objective** In order to provide a scientific basis for the quality control of Kunxian Capsules (KC), HPLC characteristics chromatogram combined with multi-components determination was established. **Methods** The analysis was performed on Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), using acetonitrile and 0.1% phosphoric acid solution as the mobile phase at a flow rate of 0.8 mL/min for gradient elution, the column temperature was 33 °C, and the detection wavelength was 270 nm. The fingerprints of 15 batches of KC were established and evaluated by the similarity evaluation system of TCM (2012A version), hierarchical cluster analysis and discriminant analysis of partial least squares. Furthermore, the content of hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin and baohuoside I were determined. **Results** The HPLC fingerprint with 21 common peaks of KC was established, and the similarities of samples were over 0.9. The linearity relationships separated with hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin and baohuoside I were good, and the contents of the above-mentioned components in 15 batches of preparations were 2.817—7.527, 7.287—9.103, 8.730—18.675, 33.377—70.371, 35.297—50.291 and 4.059—9.079 mg/g, respectively. **Conclusion** The

收稿日期: 2020-08-09

项目简介: 国家重点研发项目 (2018YFC1707300)

作者简介: 许春芳, 女, 硕士, 初级药师, 研究方向为中药活性成分及中药质量控制研究。Tel: 18516154975 E-mail: 215190465@qq.com

\*通信作者 陶霞, 女, 博士, 教授, 研究方向为药物经济学、心血管药理学、中药质量控制。

Tel: (021)81886182 E-mail: taoxia2003@126.com, taoxia@smmu.edu.cn

杨宏, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为心血管药理学与中药质量控制。Tel: 13917255842 E-mail: yangh@tju.edu.cn

combination methods of HPLC characteristic chromatograms and simultaneous determinations of multiple components are rapid, simple and reproducible, which can provide methodological reference for the quality control of KC.

**Key words:** Kunxian Capsules; characteristic chromatogram; hyperoside; epimedin A; epimedin B; epimedin C; icariin; baohuoside I; quality control

昆仙胶囊(Kunxian Capsules, KC)是国家“九五攻关”项目成果转化的中药 6 类新药,由昆明山海棠、淫羊藿、枸杞子、菟丝子 4 味中药组成,主治类风湿关节炎属风湿痹阻兼肾虚证<sup>[1-2]</sup>。现代药理学及临床研究发现,昆仙胶囊具有免疫抑制、细胞因子拮抗及抗炎镇痛等作用,与昆明山海棠片等相比,具有不良反应小、疗效显著等优势,尤其在风湿性关节炎、系统性红斑狼疮和强直性脊柱炎等免疫性疾病的治疗中发挥了重要作用<sup>[3-7]</sup>。目前,昆仙胶囊的质量控制仍按照国家食品药品监督管理局颁布的国家药品标准(YBZ07522006-2009Z),以昆仙胶囊中的雷公藤甲素和淫羊藿苷的含量测定作为主要的质控指标。而《中国药典》2020 年版对淫羊藿药材的质量控制要求进行了提升,新增对朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 及淫羊藿苷的总量控制<sup>[8]</sup>。如此,现行质量控制标准已难以实现对昆仙胶囊的整体性质量控制。

中药指纹图谱是一种全面反映中药或中药制剂整体性化学特征的质量分析方法,被广泛应用于中药及中药制剂的质量控制<sup>[9-12]</sup>。目前,除了张雪等<sup>[13]</sup>采用一测多评法对昆仙胶囊中 10 种黄酮类成分进行定量分析外,对昆仙胶囊的指纹图谱研究还未见报道。本研究采用 HPLC 法首次建立昆仙胶囊特征指纹图谱,并结合聚类分析(HCA)及偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)评价了不同批次样品之间的质量差异;通过对照品比对指认了 15 个成分,并采用外标法对其中的金丝桃苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷及宝藿苷 I 进行了定量分析,为全面控制昆仙胶囊的质量提供实验参考。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Agilent 1260 系列高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司;BP211D 十万分之一天平,德国 Sartorius 公司;SK7200H 型超声仪,上海 Kudos 公司。

### 1.2 试剂与样品

乙腈、甲醇均为色谱纯,美国 Fisher Scientific 公司;水为杭州娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。对照品金丝桃苷(批号 111521-201809)、朝藿定 C(批号 111780-201905)、淫羊藿苷(批号 111737-

201516)及宝藿苷 I(批号 111852-201603)均购自中国食品药品检定研究院;对照品朝藿定 A(批号 A0608AS)、朝藿定 B(批号 A0608AS)、宝藿苷 II(批号 M0108AS)、异槲皮苷(批号 S1702AS)、槲皮素(批号 S0821AS)及山奈酚(批号 J1110AS)均购自大连美仑生物技术有限公司;对照品淫羊藿新苷 A(批号 DST190916-093)、朝藿定 A1(批号 DST190801-064)、箭藿苷 A(批号 DST190415-162)、箭藿苷 B(批号 DST190411-163)及 2''-O-鼠李糖基淫羊藿次苷 II(批号 DST191010-090)均购自成都德思特生物技术有限公司;以上所有对照品的质量分数均>94%。昆仙胶囊及其生产过程中相对应的药材、中间体,缺昆明山海棠阴性样品、缺淫羊藿阴性样品、缺菟丝子阴性样品、缺枸杞子阴性样品、及空白阴性样品均由广州白云山陈李济药厂有限公司提供,15 批胶囊的批号分别为 K31002、K31005、K31006、K31007、K31008、K31009、K31010、K31011、K31012、K31013、K31014、L31001、L31002、L31003、L31004,有效期 24 个月,分别编号为 S1~S15。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈(B)-0.1%磷酸水溶液(D),梯度洗脱程序:0~18 min, 15%~17%乙腈;18~30 min, 17%~23%乙腈;30~45 min, 23%~26%乙腈;45~62 min, 26%~37%乙腈;62~72 min, 37%~55%乙腈;72~80 min, 55%~95%乙腈;柱温 33 °C;体积流量 0.8 mL/min;进样量 10 μL;检测波长 270 nm。

### 2.2 对照品溶液的配制

精密称取金丝桃苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 对照品于 6 个量瓶中,分别加入甲醇制备成质量浓度分别为 1.620、2.465、2.515、2.654、2.370、3.400 mg/mL 的单一对照品储备液。分别取上述单一对照品储备液适量,加入到同一 10 mL 量瓶中,并由 70%乙醇稀释制得含金丝桃苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 质量浓度分别为 110.160、133.110、264.578、

902.360、711.000、170.000  $\mu\text{g/mL}$  的混合对照品溶液，备用。

### 2.3 供试品溶液的配制

取昆仙胶囊样品粉末 0.15 g，精密称定，置于 50 mL 锥形瓶中，加入 70%乙醇 20 mL，称定质量，超声处理（功率 250 W、频率 50 kHz）15 min，冷却至室温，用 70%乙醇补足减失的质量，摇匀，取适量体积至 EP 管中，14 000 r/min 离心 10 min，取上清液通过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜，取续滤液，即为供试品溶液。

### 2.4 阴性样品对照溶液制备

按“2.3”项下供试品制备方法分别制备得缺昆明山海棠、缺淫羊藿、缺菟丝子及缺枸杞子的阴性样品溶液。

### 2.5 指纹图谱方法学考察

**2.5.1 精密度试验** 精密称取编号为 S8 的昆仙胶囊 (K31011) 粉末 1 份 0.15 g，按“2.3”项下方法制得供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录峰面积。以 10 号峰朝藿定 A 为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间的  $\text{RSD} \leq 0.4\%$ ，相对峰面积的  $\text{RSD} \leq 4.6\%$ ，表明仪器精密度良好。

**2.5.2 重复性试验** 精密称取编号为 S8 的昆仙胶囊 (K31011) 粉末 6 份，每份 0.15 g，按“2.3”项下方法平行制得供试品溶液 6 份，按“2.1”项下色谱条件进样，记录峰面积。以 10 号峰朝藿定 A 为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间的  $\text{RSD} \leq 0.25\%$ ，相对峰面积的  $\text{RSD} \leq 4.2\%$ ，表明本方法重复性良好。

**2.5.3 稳定性试验** 精密称取编号为 S8 的昆仙胶囊 (K31011) 粉末 1 份 0.15 g，按“2.3”项下方法制得供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，分别于 0、3、6、9、24 h 进样测定，并记录峰面积，以 10 号峰朝藿定 A 为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间的  $\text{RSD} \leq 0.45\%$ ，相对峰面积的  $\text{RSD} \leq 4.45\%$ ，表明该供试品溶液在 24 h 内稳定。

### 2.6 HPLC 特征指纹图谱的生成与相似度评价、共有峰相关性分析

**2.6.1 指纹图谱的生成与相似度评价** 按“2.3”项下方法制备编号为 S1~S15 的昆仙胶囊供试品溶液，以“2.1”项下色谱条件记录各个样品的色谱图，并采用《中药指纹图谱相似度评价系统(2012A 版)》对所记录图谱的 AIA 文件进行分析。以 S1 为参照图谱，时间窗宽度设为 0.2 min，对色谱峰进行多点校正和全峰匹配，生成 15 批昆仙胶囊的特征指纹图谱匹配图以及对照特征指纹图谱 (图 1)。共获得保留时间稳定的共有峰 21 个，其中，10 号峰 (朝藿定 A) 分离度好，保留时间居中，因此，选择 10 号峰为参照峰。同时，根据对照品共指认出了 15 个化合物，结果见图 2。此外，以 10 号峰朝藿定 A 为参考峰，计算 S1~S15 号样品特征指纹图谱与对照特征指纹图谱的相似度，结果分别为 0.943、0.992、0.985、0.992、0.994、0.999、0.997、0.998、0.997、0.996、0.992、0.995、0.996、0.994、0.996，均大于 0.9，表明各批次样品的化学成分稳定存在。其他峰相对于朝藿定 A 的相对保留时间的  $\text{RSD}$  均小于 0.44%，相对峰面积的  $\text{RSD}$  为 0.00%~57.406%，

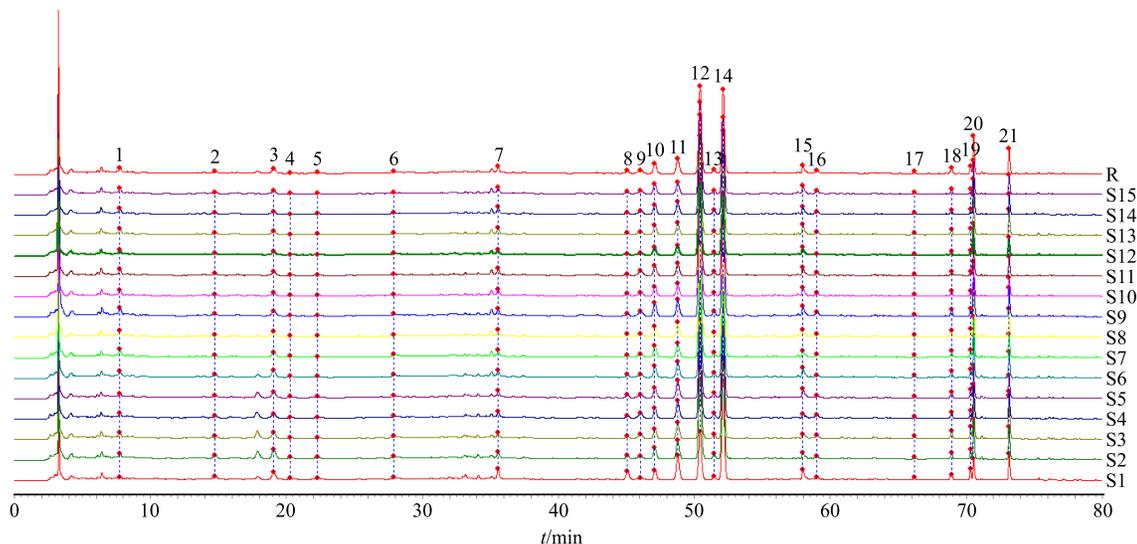
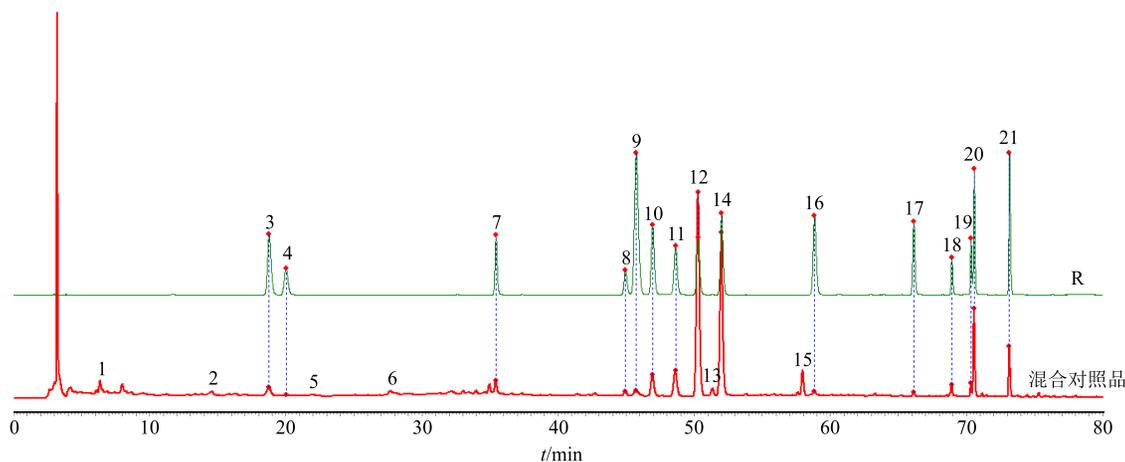


图 1 15 批昆仙胶囊 HPLC 特征指纹图谱 (S1~S15) 及其对照特征指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC characteristic chromatograms (S1—S15) and its control characteristic fingerprints (R) of 15 batches of KC



3-金丝桃苷 4-异槲皮苷 7-淫羊藿新苷 A 8-朝藿定 A1 9-槲皮素 10-朝藿定 A 11-朝藿定 B 12-朝藿定 C 14-淫羊藿苷 16-山奈酚  
 17-宝藜苷 II 18-箭藜苷 A 19-箭藜苷 B 20-2''-O-鼠李糖基淫羊藿次苷 II 21-宝藜苷 I  
 3-hyperoside 4-isoquercitrin 7-epimedeside A 8-epimedin A1 9-quercetin 10-epimedin A 11-epimedin B 12-epimedin C 14-icariin  
 16-kaempferol 17-baohuoside II 18-sagittatoside A 19-sagittatoside B 20-2''-O-rhamnosylcariside II 21-baohuoside I

图 2 昆仙胶囊的对照特征指纹图谱 (R) 及混合对照品的 HPLC 图谱

Fig. 2 Reference characteristic chromatogram (R) and mixed reference substances of KC

结果表明各批次间共有峰的含量存在较大差异。

**2.6.2 单味药材及其中间体与昆仙胶囊的相关性分析** 按“2.3”项下的方法制得各单味药材及中间体的供试品溶液,按“2.1”项下的色谱条件进样测定,结果见图 3、4。比对分析可知,1、7、8、10~15、17、19~21 号峰为淫羊藿药材中的成分;2、6、16 号峰为菟丝子中的成分;3、9 号峰则为淫羊藿和菟丝子药材中的共有成分,且各共有峰均能从药材→中间体→胶囊稳定传递。在此条件下所得的 HPLC 特征指纹图谱中,暂无共有峰来自昆明山海棠和枸杞子药材,这可能与 2 味药材所含化学成分紫外吸

收能力弱有关。

**2.6.3 HCA 及 PLS-DA 化学模式分析** 采用 SPSS 21.0 分析软件,运用组间均联法 Euclidean 距离平方为测度,对 15 批昆仙胶囊特征指纹图谱中的 21 个共有峰峰面积数据进行模式识别分析,结果见图 5-A。据图 5-A 可知,15 批样品被分成了 4 大类: S1 为第 1 类、S9 为第 2 类、S12 为第 3 类、其余 12 个批次聚为第 4 大类。说明不同批次的合格药材所生产的产品含量存在较大差异,此可能与药材的来源、药品的贮藏、药材的加工等有关。为进一步评价不同批次样品之间的成分含量差异,以样品

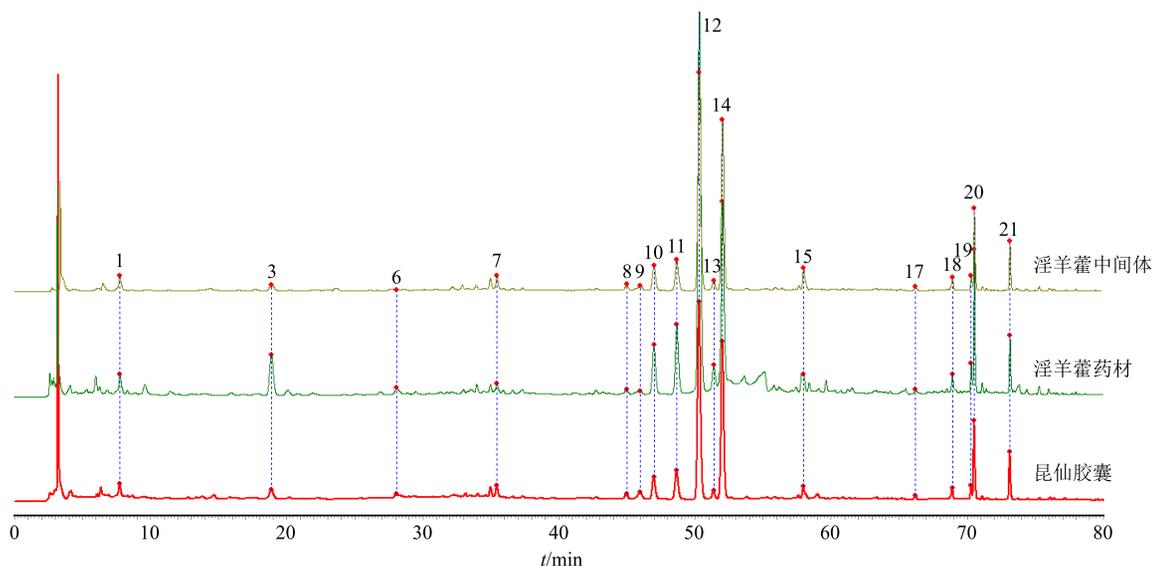


图 3 昆仙胶囊、淫羊藿药材及淫羊藿中间体的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatograms of KC, *Epimedium Folium* and intermediate product of *Epimedium Folium*

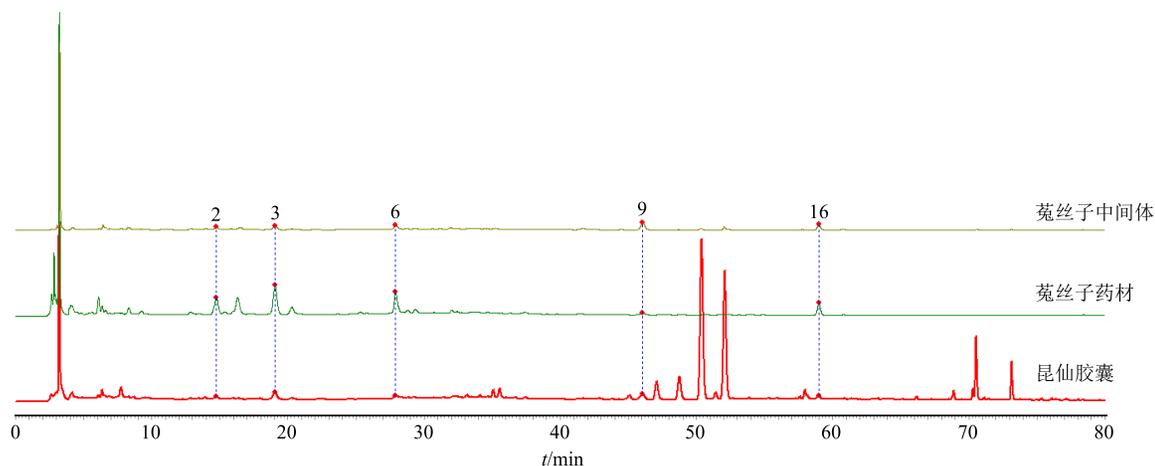


图 4 昆仙胶囊、菟丝子药材及菟丝子中间体的图谱

Fig. 4 Chromatograms of KC, *Cuscuta chinensis* and intermediate product of *Cuscuta chinensis*

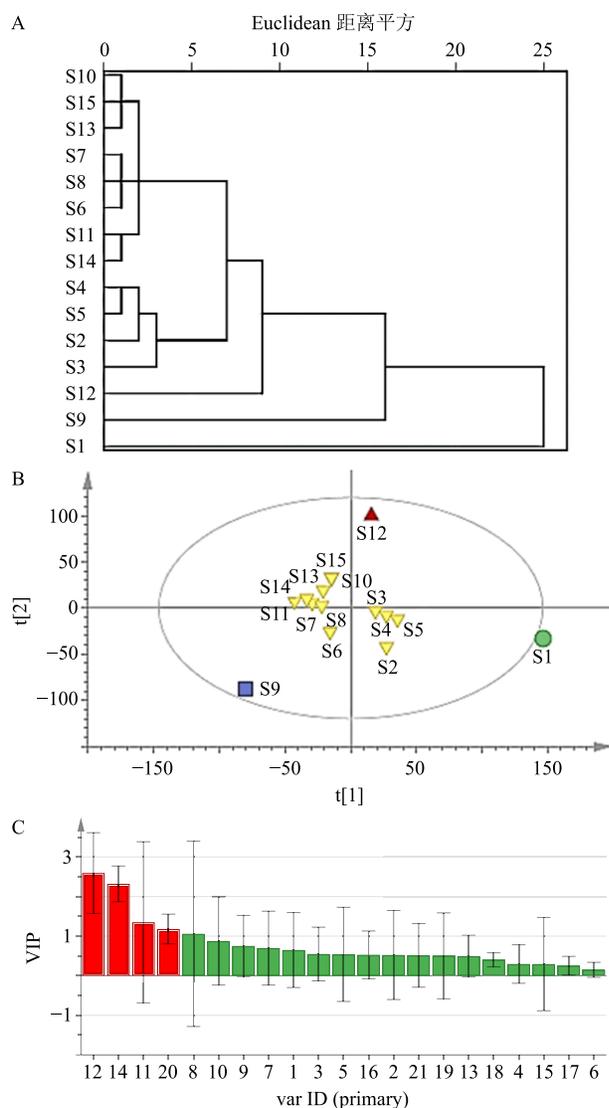


图 5 15 批昆仙胶囊的聚类分析 (A)、PLS-DA 得分 (B) 及 VIP 值 (C) 图

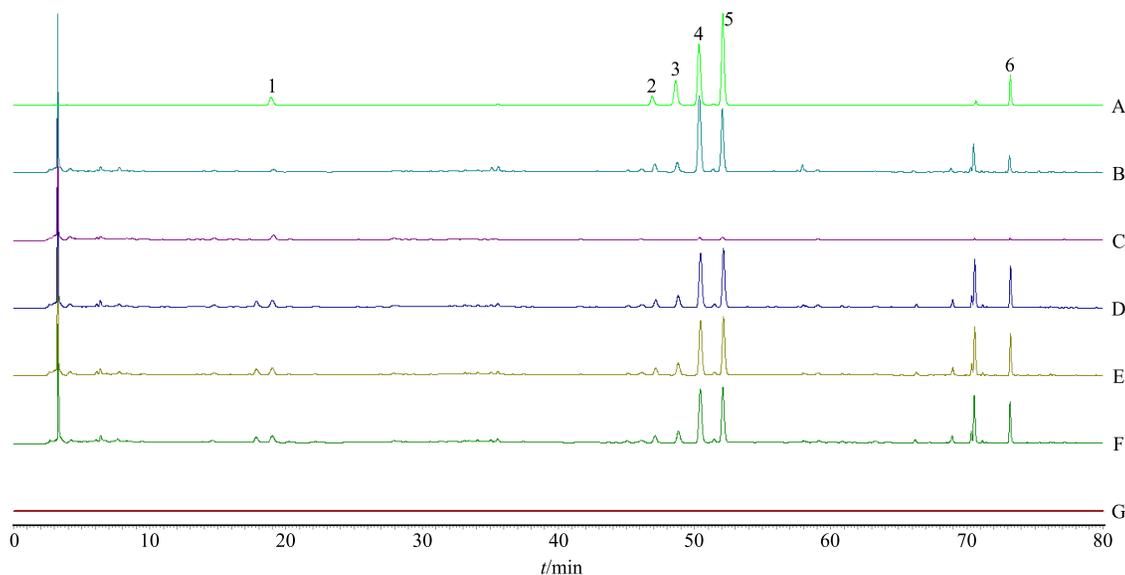
Fig. 5 HCA (A), PLS-DA score plot (B) and VIP plot (C) of 15 batches of KC

S1~S15 为 Y 变量, 21 种成分的峰面积为 X 变量, 利用 SIMCA 14.1 软件进行 PLS-DA, 结果见图 5-B、C。在 95% 置信区间内, 同样可将 15 批样品分为了 4 类, 进一步验证了聚类分析的结果; 另外, PLS-DA 模型中的变量重要性投影值 (VIP 值) 可直观体现不同批次样品间的差异性成分, VIP 值越大, 说明对样品分类的贡献度越大。据图 5-C 可知, 12 号峰 (朝藿定 C)、14 号峰 (淫羊藿苷)、11 号峰 (朝藿定 B) 及 20 号峰 (2''-O-鼠李糖基淫羊藿次苷 II) 的 VIP 值均大于 1, 说明这 4 种成分是影响不同批次样品之间质量差异贡献较大的标志物, 可作为昆仙胶囊质量控制的关键成分。

## 2.7 昆仙胶囊中 6 个成分的含量测定

**2.7.1 系统适应性及专属性试验** 按照“2.1”项下色谱条件下分别测定混合对照品溶液、昆仙胶囊供试品溶液和各阴性样品溶液, 结果显示, 样品中各成分分离度和理论塔板数均较好, 且阴性无干扰, 说明该方法专属性良好, 见图 6。

**2.7.2 线性关系考察** 按“2.1”项下方法制备各对照品储备液, 分别用 70% 乙醇稀释, 配制成系列梯度浓度的对照品混合溶液。按“2.1”项下色谱条件下测定峰面积, 记录色谱图。以对照品峰面积为纵坐标 (Y), 分析物质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 得出各组分的线性回归方程和范围分别为金丝桃苷  $Y=23.9875X+2.9859$ ,  $r=0.9998$ , 线性范围 2.754~110.160  $\mu\text{g/mL}$ ; 朝藿定 A  $Y=19.363X+3.2938$ ,  $r=0.9998$ , 线性范围 3.328~133.110  $\mu\text{g/mL}$ ; 朝藿定 B  $Y=20.603X+1.6491$ ,  $r=0.9999$ , 线性范围 6.614~264.578  $\mu\text{g/mL}$ ; 朝藿定 C  $Y=21.1672X+34.2114$ ,  $r=0.9997$ , 线性范围



A-混合对照品 B-昆仙胶囊样品 C-缺淫羊藿阴性样品 D-缺昆明山海棠阴性样品 E-缺菟丝子阴性样品 F-缺枸杞子阴性样品 G-空白阴性  
 性 1-金丝桃苷 2-朝藿定 A 3-朝藿定 B 4-朝藿定 C 5-淫羊藿苷 6-宝藿苷 I  
 A-mixed reference substances B-KC sample C-negative sample without *Epimedii Folium* D-negative sample without *Tripterygium hypoglaucum*  
 E-negative sample without *Cuscuta chinensis* F-negative sample without *Lycii Fructus* G-blank sample 1-hyperoside 2-epimedin A 3-epimedin  
 B 4-epimedin C 5-icariin 6-baohuoside I

图 6 昆仙胶囊样品中 6 种成分的 HPLC 色谱图

Fig. 6 HPLC chromatograms of six ingredients of KC

22.559~902.360  $\mu\text{g/mL}$ ; 淫羊藿苷  $Y=25.8402X+44.8318$ ,  $r=0.9998$ , 线性范围 17.775~711.000  $\mu\text{g/mL}$ ; 宝藿苷 I  $Y=36.1649X+11.6498$ ,  $r=0.9998$ , 线性范围 4.250~170.000  $\mu\text{g/mL}$ 。

**2.7.3 精密度试验** 分别精密吸取同一份混合对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 在“2.1”项色谱条件下连续进样 6 次, 记录 6 种成分的峰面积并计算 RSD。结果显示金丝桃苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷及宝藿苷 I 峰面积的 RSD 分别为 0.68%、0.67%、0.74%、0.73%、0.74%、0.76%, 表明仪器精密度良好。

**2.7.4 重复性试验** 精密称取编号为 S8 的昆仙胶囊 (K31011) 粉末 6 份, 依“2.3”项下方法制备供试品溶液, 测定 6 种成分的含量并计算 RSD。结果显示金丝桃苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷及宝藿苷 I 质量分数的 RSD 分别为 0.71%、1.30%、1.02%、0.98%、1.03%、0.99%, 表明本方法重复性良好。

**2.7.5 稳定性试验** 精密称取编号为 S8 的昆仙胶囊 (K31011) 粉末, 依“2.3”项下方法制备供试品溶液 1 份, 分别于 0、3、6、9、12、24、36 h 进样测定 6 种成分的峰面积并计算 RSD。结果显示金丝桃苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷

及宝藿苷 I 峰面积的 RSD 分别为 1.22%、0.95%、0.07%、0.13%、0.17%、0.10%, 表明供试品溶液在 36 h 内稳定。

**2.7.6 加样回收率试验** 精密称取“2.7.4”项实验下已知各成分含量的同一批号的供试品 6 份, 每份约 0.03 g, 按照接近 1:1 的量计算所要添加的 6 种成分的对照品, 加入到样品中, 依“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.1”项下色谱条件下进样测定, 并计算 6 种成分的加样回收率。结果显示金丝桃苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷及宝藿苷 I 的平均加样回收率分别为 103.08%、103.65%、100.72%、101.98%、99.03%、102.01%, RSD 分别为 1.01%、0.95%、1.39%、1.96%、0.65%、0.70%, 表明该方法加样回收率良好。

**2.7.7 样品测定** 分别取 15 个批次的昆仙胶囊内容物, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定 6 个成分的峰面积, 根据标准曲线计算样品中各成分质量分数, 结果见表 1。

### 3 讨论

#### 3.1 提取条件的考察

为优化昆仙胶囊提取条件, 本实验首先考察比较了超声、溶解和加热回流提取法, 结果表明 3 种

表 1 15 批样品中 6 个成分的含量测定结果  
Table 1 Contents of six components in 15 batches of samples

样品	质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )					
	金丝桃苷	朝藿定 A	朝藿定 B	朝藿定 C	淫羊藿苷	宝藿苷 I
S1	5.649	7.724	18.675	33.377	50.291	5.578
S2	7.527	8.915	14.803	55.912	48.314	6.684
S3	6.398	7.924	13.175	49.593	41.931	9.079
S4	4.172	8.218	13.603	50.649	45.662	5.474
S5	4.987	8.547	14.290	53.962	47.060	4.836
S6	5.985	9.103	12.575	65.100	44.530	5.401
S7	3.867	8.692	10.821	64.425	40.240	4.685
S8	4.698	8.867	11.393	64.758	42.190	5.844
S9	3.849	8.267	9.911	62.961	38.559	4.337
S10	3.118	7.966	9.522	62.767	39.011	4.094
S11	3.401	8.323	10.079	70.371	41.271	4.159
S12	2.817	8.549	10.216	70.028	43.404	4.332
S13	3.072	7.972	9.587	63.339	39.285	4.059
S14	2.995	7.287	8.730	58.484	35.297	4.181
S15	3.512	8.174	9.717	64.904	40.880	5.334

提取方法无明显差异,考虑样品中含有糊精、蔗糖等辅料,导致样品提取液黏度较大,溶解时底部易产生黏性沉淀物,可能影响最终的含量测定,故最终采取方便、快速、高效的超声提取法。其次,本次实验分别考察水、甲醇以及不同浓度乙醇为提取溶剂的提取效果,结果表明,以水为溶剂时,各有效成分的提取效率最低;以乙醇、甲醇和 70%乙醇为提取溶剂时,各化学成分基本无差异,考虑到乙醇安全性高,且制剂制备过程中涉及 70%乙醇为主要洗脱溶剂,故本实验最终选择 70%乙醇为提取溶剂。此外,还对超声提取的时间(15、30、60 min)、溶剂倍量等进行了考察,结果表明,以上因素均未影响有效成分及峰个数的测定。综上所述,最终的提取条件选择以 70%乙醇作为提取溶剂,超声提取 15 min 为最佳提取方案。

### 3.2 色谱条件的考察

由于昆仙胶囊中化学成分复杂,且以黄酮类成分为主,这类化学成分结构及性质相似,色谱峰容易重叠,对各成分的分离造成一定困难,如朝藿定 A、B、C 以及淫羊藿苷等。本实验通过比较 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters Sun Fire Tm C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Diamondsil C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 及 Amethyst C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 4 款不同厂家的色

谱柱,结果表明以 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱所得色谱峰的数目、分离度最佳。同时,本实验也对流动相的选择进行了考察,先后试用了 5 种不同流动相系统:乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.2%磷酸水溶液、甲醇-0.1%磷酸水溶液,结果表明,乙腈系统优于甲醇系统,且以磷酸水溶液为水相时可以进一步改善各成分峰的峰形,效果最佳。此外,本实验也考察了不同柱温(25、30、33、35 °C)、不同体积流量(0.8、1.0、1.2 mL/min)及不同检测波长(230、254、270 nm)对所得色谱峰的影响,结果发现,当柱温为 33 °C、体积流量为 0.8 mL/min,检测波长为 270 nm 时,所得色谱峰的数目较多、峰形及分离度等方面均表现良好。

### 3.3 指标成分的选择及测定结果分析

本实验首先参考《中国药典》2020 年版,对昆仙胶囊中各药材或饮片明确规定的监测指标进行检测,结果发现该复方制剂中来源于淫羊藿药材的朝藿定 A、B、C 和淫羊藿苷、宝藿苷 I 以及主要来源于菟丝子药材的金丝桃苷的 6 种成分,不仅含量总占比大,且均具有抗炎、增强骨修复、调节免疫功能、抗氧化、抗疲劳等药理活性<sup>[14-19]</sup>,与昆仙胶囊的功效密切相关,因此,对此 6 种成分进行了含量测定。结果也显示,不同批次样品间的 6 种成分含

量差异较大,以含量最高的朝藿定 C 为例,最低为 33.377 mg/g,最高 70.371 mg/g,其间相差达 2 倍以上;结合 HCA 和 PLS-DA 分析可知,由不同批次药材生产的不同批次产品的 21 个共有成分的含量也存在较大差异。据此,猜测引起各批次间目标成分含量差异的原因可能与不同产地药材的含量差异以及生产过程中投料真实性差异有关,提示厂家在生产该复方制剂过程中,应保证原药材来源的标准化,并细化制备过程中的每一个工艺参数,以达到量化产品指标的目的,以此保证患者用药的安全性、有效性。

本实验采用指纹图谱结合多成分含量测定的方法,建立了 15 批昆仙胶囊的特征指纹图谱,发现了共有峰 21 个,并指认了 15 个共有峰,并且这些共有峰可以稳定存在药材→中间体→胶囊三者之中,提示可以通过监测原料(单味药材)-制剂工艺(中间提取物)-制剂成品三者的共有模式图,对整个胶囊的生产线进行质量控制。其次,采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2012A 版)对 15 批胶囊进行相似度分析结果表明,15 批样品的相似度均大于 0.9,说明 15 批胶囊的相似度高,所建立的特征指纹图谱能较全面地反应制剂中的整体成分。同时,本实验建立了昆仙胶囊中金丝桃苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷及宝藿苷 I 6 种活性成分的含量测定方法,可为昆仙胶囊的整体性质量控制提供实验参考。

#### 参考文献

- [1] Firestein G S, Budd R C, Gabriel S E, *et al.* 栗占国主译. 凯利风湿病学 [M]. 第 10 版. 北京: 北京大学医学出版社, 2020.
- [2] 全 瑛, 王 菊. 昆仙胶囊联合硫酸羟氯喹治疗类风湿关节炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(10): 2638-2641.
- [3] 张 宁, 易无庸. 昆仙胶囊临床应用进展 [J]. 中医临床研究, 2014, 6(7): 147-148.
- [4] 刘艳梅, 雷易萌, 张 贝, 等. 昆仙胶囊治疗类风湿关节炎的临床研究 [J]. 解剖科学进展, 2019, 25(1): 17-20.
- [5] Li Q X, Li L, Bi L Q, *et al.* Kunxian capsules in the treatment of patients with ankylosing spondylitis: A randomized placebo-controlled clinical trial [J]. *Trials*, 2016, 17(1): 337.
- [6] Lin Q, Li L, He D. Efficacy and safety of KunXian capsule for treatment of spondyloarthropathy (SPA) and ankylosing spondylitis (AS): Results of a multi-center randomized placebo-controlled trial [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2014, 32(5):765-838.
- [7] Tang Y J, Zhang Y, Li L, *et al.* Kunxian capsule for rheumatoid arthritis: Inhibition of inflammatory network and reducing adverse reactions through drug matching [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 485.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2020.
- [9] Zhang J, Sun G X. Assessment of quality consistency in traditional Chinese medicine using multi-wavelength fusion profiling by integrated quantitative fingerprint method: Niu Huang Jie Du pill as an example [J]. *J Sep Sci*, 2019, 42(2): 509-521.
- [10] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.
- [11] 邹纯才, 鄢海燕. 我国中药色谱指纹图谱相似度评价方法 30 年(1988—2017 年)研究进展与展望 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(10): 1969-1977.
- [12] 黄诗莹, 陈秋谷, 王佛长, 等. 黄芪-丹参煎液 HPLC 指纹图谱及多指标定量测定研究 [J]. 中草药, 2019, 50(20): 4950-4956.
- [13] 张 雪, 彭富全, 何风雷. 一测多评法测定昆仙胶囊中 10 种黄酮类成分 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5823-5829.
- [14] 李 艳, 于 涛, 苗明三. 淫羊藿的化学、药理与临床应用分析 [J]. 中医学报, 2017, 32(4): 619-622.
- [15] 罗则华, 杜 倩, 奚 鑫, 等. 基于网络药理学的淫羊藿抗疲劳作用机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(11): 2997-3004.
- [16] Huang X, Wang X, Zhang Y, *et al.* Absorption and utilisation of epimedin C and icariin from *Epimedium Herba*, and the regulatory mechanism via the BMP2/Runx2 signalling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109345.
- [17] Shen R, Wang J H. The effect of icariin on immunity and its potential application [J]. *Am J Clin Exp Immunol*, 2018, 7(3): 50-56.
- [18] Xi Y, Jiang T, Yu J, *et al.* Preliminary studies on the anti-osteoporosis activity of baohuoside I. *Biomed pharmacother* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 115: 108850.
- [19] Huang C, Yang Y, Li W X, *et al.* Hyperin attenuates inflammation by activating PPAR- $\gamma$  in mice with acute liver injury (ALI) and LPS-induced RAW264.7 cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29(2): 440-447.