

八珍益智合剂 3 种成分的含量测定及稳定性考察

王迎利^{1,2}, 马丽娟³, 牛阳^{1,2}, 张波^{1,2}, 刘军⁴, 马学琴^{1,2}, 侯延辉^{1,2*} (1.宁夏医科大学药学院, 银川 750004; 2.宁夏医科大学回医药现代化教育部重点实验室, 银川 750004; 3.宁夏医科大学总医院, 银川 750004; 4.宁夏中医医院, 银川 750004)

摘要: 目的 建立一测多评法同时测定八珍益智合剂中甘草苷、芹糖甘草苷和橙皮苷 3 种成分的含量, 并对八珍益智合剂 3 种成分的稳定性进行考察。方法 采用 HPLC-DAD 法, 以橙皮苷为参照物, 测定其他 2 种成分的相对校正因子和相对保留时间, 并计算各成分含量; 以外标法为对照, 比较一测多评法(single marker, QAMS)与外标法(external standard method, ESM)实测值的差异, 探讨一测多评法的可行性。同时测定八珍益智合剂在高温、强光照射、加速试验和长期室温条件下的稳定性, 为其贮藏条件和保质期提供数据。结果 经过方法学验证, 3 种成分在 4.512~108.2, 10.13~101.30, 4.496~107.90 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好($r>0.999$); 平均加样回收率为 95.9%~104.7%, $\text{RSD}\leq 3\%$; 2 种成分相对橙皮苷的相对校正因子分别为 0.49 和 0.38, 且在不同实验条件下相对校正因子重复性良好; 含量测定 QAMS 计算结果与 ESM 实测值无明显差异。稳定性考察结果表明, 在高温条件下长时间放置芹糖甘草苷和橙皮苷含量下降速度较快, 甘草苷含量下降较为平缓, 提示中药合剂在高温条件下不宜放置过长时间。结论 本研究所建方法准确可靠、重复性好, 可用于八珍益智合剂的质量控制, 本合剂应密封置阴凉处保存。

关键词: 八珍益智合剂; 一测多评; 甘草苷; 橙皮苷; 芹糖甘草苷; 稳定性

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)23-2985-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.23.012

引用本文: 王迎利, 马丽娟, 牛阳, 等. 八珍益智合剂 3 种成分的含量测定及稳定性考察[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(23): 2985-2991.

Investigation on Contents and Stability of Three Components of Bazhen Yizhi Mixture

WANG Yingli^{1,2}, MA Lijuan³, NIU Yang^{1,2}, ZHANG Bo^{1,2}, LIU Jun⁴, MA Xueqin^{1,2}, HOU Yanhui^{1,2*} [1.Department of Pharmacology, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2.Key Laboratory of Hui Ethnic Medicine Modernization, Ministry of Education(Ningxia Medical University), Yinchuan 750004, China; 3.General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 4.Ningxia Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yinchuan 750004, China]

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the stability of Bazhen Yizhi mixture and to develop a quantitative analysis of simultaneous determination of liquiritin, liquiritin apioside and hesperidin by single-marker method. **METHODS** The analysis of this mixture was performed on HPLC-DAD and by using hesperidin as a standard reference, the relative correction factors(RCFs) and relative retention time of the other two constituents were measured and calculated. Moreover, comparison of the difference between the quantitative analysis of multicomponents by single marker(QAMS) and external standard method(ESM) was used to explore the feasibility of QAMS. Meanwhile, the stability of Bazhen Yizhi mixture was investigated under high temperature, bright lights, acceleration and long-term room temperature test conditions for its storage conditions and expiration dating to provide data. **RESULTS** By methodological study, three constituents showed good linear relationships within 4.512~108.2, 10.13~101.30, 4.496~107.90 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r>0.999$), whose average recoveries were 95.9%~104.7% with the RSDs of $\leq 3\%$. The RCFs of liquiritin apioside and liquiritin were calculated by methods validated as 0.49 and 0.38, respectively. The determination results reflected the good reproducibility of the RCFs in different influence factors. There was no significant difference between the calculated values by QAMS method and the measured values by ESM. The results of stability investigation showed that the contents of liquiritin apioside and hesperidin decreased rapidly under high temperature condition for long time, while liquiritin decreased gently, implied that the storage time of traditional Chinese medicine mixture should not be too long. **CONCLUSION** The method applied in this study is accurate, reliable, reproducible, and can be used for the quality control of Bazhen Yizhi mixture. This mixture should be sealed and stored in a cool place.

KEYWORDS: Bazhen Yizhi mixture; QAMS; liquiritin; hesperidin; liquiritin apioside; stability

中药八珍益智合剂系宁夏医科大学附属中医医院和银川市第一人民医院用于治疗老年痴呆的经验方, 由龙眼肉、陈皮、甘草、山药、白术、莲子肉、茯苓、益智仁等 8 味中药加工而成, 具

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划(东西部科技合作)项目(2017BY084)

作者简介: 王迎利, 男, 硕士生 Tel: 18419592618 E-mail: 3321164@qq.com *通信作者: 侯延辉, 女, 硕士, 副教授 Tel: 13709576774 E-mail: hyh928928@163.com

有开胃健脾、补虚长智的功效,主要用于预防和治疗老年痴呆引起的健忘等症状^[1]。本品处方以汤剂应用于临床多年,疗效确切且作用稳定。龙眼肉性平味甘,为君药,长于补益心脾,《神农本草经》称其:“主安志,厌食,久服强魂魄,聪明”。莲子肉甘涩而平,既能补脾养心,又可益肾固精^[2-3];茯苓健脾安神,《本草正》称“茯苓,能利窍祛湿”,利窍则开心益智,导浊生津,共为臣药。佐以山药补脾气、益脾阴,且能补肾填精,《日华子本草》称其“主泄精,健忘”,可增强龙眼肉补益心脾之力^[4];益智仁能温脾、暖肾、固精^[5];更佐以白术健脾益气^[6]。陈皮理气调中,以助君药补脾之功^[7],具有“燥湿化痰,理气健脾”的功效,用于“脘腹胀满、食少吐泻、咳嗽痰多”等症状的治疗,其主要化学成分以黄酮类(橙皮苷、芸香柚皮苷等)为主,此外还含有生物碱类及挥发油类等^[8-9];炙甘草为佐使之药,既能助龙眼肉、茯苓、白术补脾气,又可调和诸药,性偏温,具有改善免疫、调节心律失常及抗抑郁等功能,其主要成分为黄酮类和三萜类成分,另外还含有生物碱和少量香豆素等^[10-11]。本实验采用一测多评法,以橙皮苷为参照物,同时测定八珍益智合剂中橙皮苷、甘草苷和芹糖甘草苷 3 种成分的含量,建立了八珍益智合剂多指标成分质量评价模式。同时,对合剂进行了系统的稳定性研究,为其贮藏条件和保质期提供数据。

1 材料

1.1 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪, Waters 2998 紫外检测器, Empower 色谱数据处理系统(美国 Waters 公司); CPA225D 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);全自动煎药壶(竹水溪, 3 L, 220 V-50 Hz, 500 W); YER-201D 旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限公司); 200 目标标准筛(孔径 0.074 mm, 浙江上虞市道墟五四仪器厂)。

1.2 试药

八珍益智合剂(宁夏银川市中医医院, 批号: 20190801, 2190802, 20190803; 规格: 每瓶 200 mL)。甘草苷(批号: 111610-201607; 纯度: 93.10%)、橙皮苷(批号: 110721-201617; 纯度: 96.10%)对照品均购自中国食品药品检定研究院; 芹糖甘草苷对照品(批号: AF8062702; 纯度>98%)购自成都埃法生物科技有限公司; 甲醇、乙腈均

为色谱纯(Fisher Chemical 公司); 冰乙酸为分析纯(天津市大茂化学试剂厂, 批号: 20150512); 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取甘草苷、芹糖甘草苷以及橙皮苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 1.624, 1.520, 1.619 mg 各成分的对照品储备液, (4 °C 下避光保存)。分别取各对照品储备液 1 mL 于 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,即得混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密量取本品合剂(批号: 20190803)1 mL,置 5 mL 量瓶中,加甲醇定容,即得。

2.1.3 阴性样品溶液的制备 按处方和生产工艺,分别制备不含甘草以及不含陈皮的阴性样品溶液,按“2.1.2”项下方法制备,即得。

2.2 色谱条件

Waters 液相色谱系统, 色谱柱 TSK-GEL ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%乙酸溶液, 梯度洗脱(0~12 min, 15%→30%乙腈; 12~13 min, 30%→15%乙腈; 13~15 min, 15%乙腈); 检测波长 237 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL。

2.3 专属性试验

精密吸取“2.1”项下对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 10 μL 溶液,按照“2.2”项下色谱条件依次进样检测,色谱图见图 1。

结果表明,阴性无干扰,专属性良好。

2.4 线性关系考察

精密吸取 6 种不同浓度的对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样检测,以质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归,结果见表 1。

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	线性范围/ μg·mL ⁻¹	r
芹糖甘草苷	Y=12 620X-17 736	4.512~108.29	0.999 2
甘草苷	Y=16 349X-9 362	10.13~101.30	0.999 3
橙皮苷	Y=60 926X+3 264.2	4.496~107.90	0.999 3

结果表明,芹糖甘草苷、甘草苷、橙皮苷分别在 4.512~108.29, 10.13~101.30, 4.496~107.90 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好。

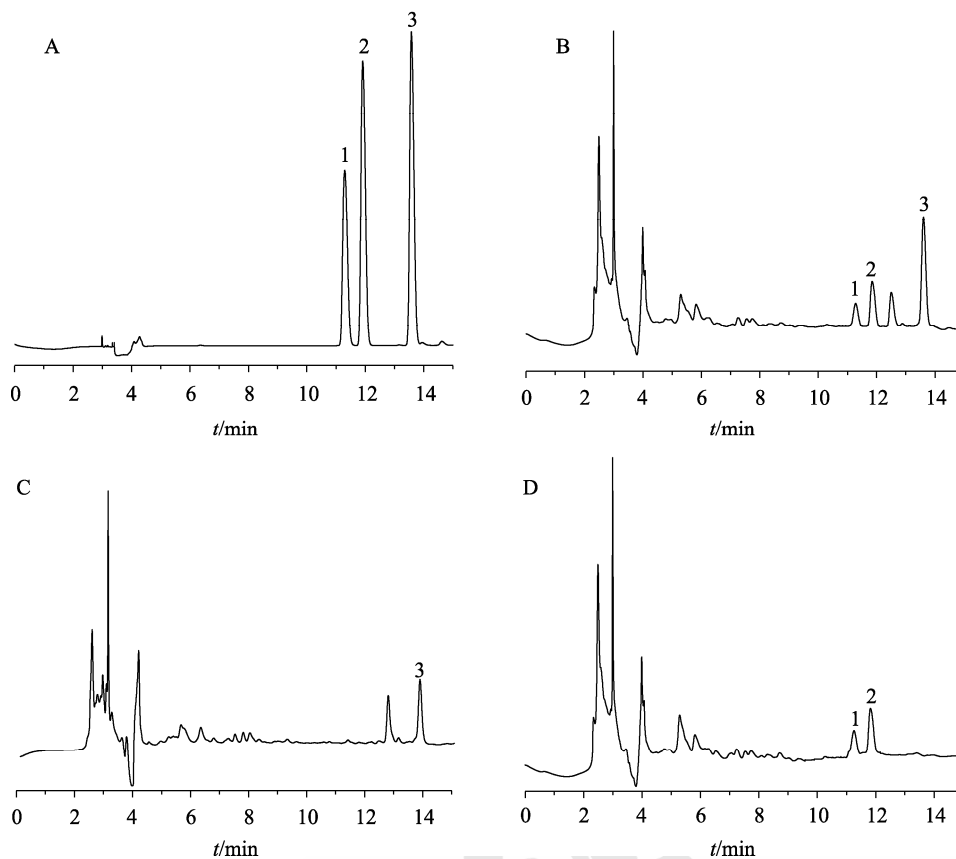


图1 高效液相色谱图

A-芹糖甘草苷、甘草苷和橙皮苷对照品；B-八珍益智合剂供试品；C-缺甘草八珍益智合剂阴性样品；D-缺陈皮八珍益智合剂阴性样品；1-芹糖甘草苷；2-甘草苷；3-橙皮苷。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-reference substance of liquiritin apioside, liquiritin and hesperidin; B-testing sample of Bazhen Yizhi mixture; C-negative samples of Bazhen Yizhi mixture without Glycyrrhizae Radix; D-negative samples of Bazhen Yizhi mixture without Citri Reticulatae Pericarpium; 1-liquiritin apioside; 2-liquiritin; 3-hesperidin.

2.5 仪器精密度试验

取“2.1.1”项下对照品溶液，按“2.2”项下色谱条件进样检测，连续测定6次，测得芹糖甘草苷、甘草苷以及橙皮苷峰面积RSD分别为1.8%，1.3%，1.3%，表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取八珍益智合剂样品(批号：20190803)6份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按照“2.2”项下色谱条件进样检测，测得芹糖甘草苷、甘草苷以及橙皮苷含量RSD分别为1.9%，1.1%，0.9%，表明该方法重复性良好。

2.7 溶液稳定性试验

取八珍益智合剂样品(批号：20190803)，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按照“2.2”项下色谱条件分别于0，2，4，6，8，10，12，24 h进样检测，测得芹糖甘草苷、甘草苷以及橙皮苷峰面积RSD分别为2.7%，1.9%，1.7%，表明供试

品溶液在24 h内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验

精密量取已知含量(芹糖甘草苷 $90.58 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、甘草苷 $104.61 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、橙皮苷 $668.74 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的八珍益智合剂样品(批号：20190803)9份，每份1 mL，置5 mL量瓶中，取芹糖甘草苷、甘草苷以及橙皮苷对照品溶液，高、中、低浓度按照对照品加入量与供试品中含量之比为1.5:1，1:1，0.5:1精密加入，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按照“2.2”项下色谱条件进样检测，结果见表2。

结果表明，芹糖甘草苷、甘草苷、橙皮苷平均回收率($n=9$)分别为104.7%，98.9%，95.9%。RSD分别为2.8%，3.0%，3.0%。

2.9 相对校正因子及相对保留时间的测定^[12]

以橙皮苷为参照物，精密吸取“2.4”项下制备的系列混合对照品溶液，按照“2.2”项下色谱

表2 回收率试验结果(n=9)

Tab. 2 Results of recovery tests(n=9)

成分	原有量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
芹糖甘 草苷	90.58	135.87	230.14	102.7	104.7	2.8
		135.87	231.16	103.5		
		135.87	230.30	102.8		
		90.58	180.47	99.2		
		90.58	186.14	105.5		
		90.58	186.31	105.7		
		45.29	138.89	106.7		
		45.29	139.75	108.6		
甘草苷	104.61	156.92	267.46	103.8	98.9	3.0
		156.92	260.22	99.2		
		156.92	261.94	100.3		
		104.61	207.84	98.7		
		104.61	207.38	98.2		
		104.61	203.06	94.1		
		52.31	156.14	98.5		
		52.31	154.73	95.8		
橙皮苷	668.74	1003.11	1680.78	100.9	95.9	3.0
		1003.11	1654.21	98.2		
		1003.11	1639.90	96.8		
		668.74	1299.41	94.3		
		668.74	1285.28	92.2		
		668.74	1289.07	92.8		
		334.37	990.72	96.3		
		334.37	983.07	94.0		
	334.37	996.48	98.0			

条件进样检测,记录3种成分的峰面积及保留时间,按照计算公式(1)和(2)分别计算相对校正因子和相对保留时间。结果见表3。

$$f_{xs} = \frac{f_x}{f_s} = \frac{c_x}{c_s} \times \frac{A_x}{A_s} \quad (1)$$

$$R = \frac{R_x}{R_s} \quad (2)$$

公式(1)中 f_{xs} 为各成分相对校正因子, f_x 为待测成分校正因子, f_s 为参照物校正因子, C_x 为待测成分的浓度, C_s 为参照物的浓度, A_s 为参照物的峰面积, A_x 为待测成分的峰面积;公式(2)中 R_x 为待测成分的保留时间; R_s 为参照物的保留时间。

结果表明,芹糖甘草苷和甘草苷的相对校正因子分别为0.49和0.38,相对保留时间分别为0.83和0.89,RSD均<3%。

2.9.1 不同进样体积对 f 的影响 考察了不同进样体积(2,4,6,8,10 μL)对各 f 的影响,结果见表4,芹糖甘草苷和甘草苷的 f 值在不同进样体积下的RSD均为2.7%,表明不同进样体积对2种成分的 f 无显著影响。

表3 2种成分的相对校正因子和相对保留时间(n=6)

Tab. 3 RCFs and RTTs of 2 components(n=6)

序号	相对校正因子		相对保留时间	
	芹糖甘草苷	甘草苷	芹糖甘草苷	甘草苷
1	0.49	0.40	0.82	0.89
2	0.50	0.38	0.83	0.89
3	0.51	0.38	0.83	0.89
4	0.48	0.39	0.83	0.89
5	0.49	0.37	0.83	0.89
6	0.49	0.38	0.83	0.89
平均值	0.49	0.38	0.83	0.89
RSD/%	2.1	2.7	0.5	0.1

2.9.2 不同色谱柱对 f 的影响 考察了2种色谱柱(TOSOH TSKgel ODS-V, YMC-Pack ODS-A C₁₈)对 f 的影响,结果见表4,芹糖甘草苷和甘草苷的 f 值在不同色谱柱下的相对平均偏差(relative average deviation, RAD)依次为2.1%和1.4%,表明不同色谱柱对2种成分的 f 无显著影响。

表4 不同因素对2种成分相对校正因子 f 的影响

Tab. 4 RCFs of 2 components by different factors

影响因素	指标	芹糖甘草苷	甘草苷
不同进样体积/μL	2	0.50	0.38
	4	0.49	0.36
	6	0.47	0.37
	8	0.48	0.36
	10	0.47	0.38
	不同色谱柱	TOSOH TSKgel ODS-V	0.49
YMC-Pack ODS-A C ₁₈		0.47	0.36
不同人员	人员1	0.48	0.37
	人员2	0.49	0.38
不同柱温/°C	30	0.47	0.38
	32	0.50	0.40
	35	0.49	0.39
	37	0.48	0.37
	40	0.50	0.39
不同流速/mL·min ⁻¹	0.8	0.49	0.38
	1.0	0.47	0.37
	1.2	0.49	0.37

2.9.3 不同人员对 f 的影响 考察了2个不同人员对 f 的影响,结果见表4,芹糖甘草苷和甘草苷的 f 值在不同人员测定下的RAD依次为1.3%和1.0%,表明不同人员对2种成分的 f 无显著影响。

2.9.4 不同柱温对 f 的影响 考察了不同柱温(30,32,35,37,40 °C)对 f 的影响,结果见表4,芹糖甘草苷和甘草苷的 f 值在不同柱温下的RSD依次为2.4%和3.0%,表明不同柱温对2种成分的 f 无显著影响。

2.9.5 不同流速对 f 的影响 考察了不同流速(0.8, 1.0, 1.2 mL·min⁻¹)对 f 的影响, 结果见表 4, 芹糖甘草苷和甘草苷的 f 值在不同流速下的 RSD 依次为 2.4%和 1.6%, 表明不同流速对 2 种成分的 f 无显著影响。

2.10 一测多评(single marker, QAMS)法与外标法(external standard method, ESM)测定结果比较

取八珍益智合剂 3 批样品, 每批 2 份, 每份 1 mL, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.2”项下色谱条件进样检测, 分别采用 QAMS 法和 ESM 法计算 3 种成分的含量, 按照计算公式(3)计算相对偏差(STD mean difference, SMD)。结果见表 5。

$$SMD = \frac{|W_{\text{外标法}} - W_{\text{本法}}|}{W_{\text{外标法}}} \times 100\% \quad (3)$$

表 5 QAMS 法和外标法测得 3 种成分的含量($n=2$)
Tab. 5 Contents of 3 constituents by QAMS and ESM method($n=2$)

批号	成分	QAMS/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	ESM/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	SMD/%
20190801	芹糖甘草苷	112.34	117.19	4.1
	甘草苷	112.02	112.06	0.1
	橙皮苷	1 507.30	1 507.30	0.1
20190802	芹糖甘草苷	147.62	151.78	2.7
	甘草苷	154.95	154.65	0.2
	橙皮苷	1 439.64	1 439.64	0.1
20190803	芹糖甘草苷	127.03	131.60	3.5
	甘草苷	149.74	149.19	0.4
	橙皮苷	1 191.61	1 191.61	0.1

结果表明, 外标实测值与 QAMS 计算值间的相对偏差均 $<5\%$, 说明 2 种方法测定结果无显著性差异, 建立的 QAMS 法可用于八珍益智合剂中芹糖甘草苷、甘草苷和橙皮苷的质量评价研究。

2.11 稳定性试验

2.11.1 影响因素试验

2.11.1.1 高温试验 取八珍益智合剂样品(批号 20190801)于 40, 60 °C 条件下放置 10 d, 分别在 0,

5, 10 d 取样, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样 10 μL 检测, 考察芹糖甘草苷、甘草苷以及橙皮苷的含量变化。结果见图 2。

结果表明, 在高温 40 °C 条件下, 与 0 d 对照组相比, 第 5, 10 天芹糖甘草苷含量分别下降 11.9%, 20.1%, 甘草苷含量分别下降 15.6%, 13.8%, 橙皮苷含量分别下降 30.1%, 32.6%; 在高温 60 °C 条件下, 与 0 d 对照组相比, 第 5, 10 天芹糖甘草苷含量分别下降 19.9%, 20.4%, 甘草苷含量分别下降 12.8%, 9.5%, 橙皮苷含量分别下降 33.9%, 35.1%。

2.11.1.2 强光照试验 取八珍益智合剂样品(批号: 20190801)于光照强度 4 500 lx 条件下放置 10 d, 分别在 0, 5, 10 d 取样, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.2”项下色谱条件进样 10 μL 检测, 考察芹糖甘草苷、甘草苷以及橙皮苷的含量变化。结果见图 2。

结果表明, 在光照强度 4 500 lx 条件下, 与 0 d 对照组相比, 第 5, 10 天芹糖甘草苷含量分别下降 17.0%, 21.0%, 甘草苷含量分别下降 16.7%, 15.1%, 橙皮苷含量分别下降 27.9%, 32.1%。

2.11.2 加速试验 取八珍益智合剂 3 批样品(20190801, 20190802, 20190803), 置于温度 40 °C 下 6 个月, 分别在 0, 1, 2, 3 及 6 月末时取样, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样检测, 考察芹糖甘草苷、甘草苷以及橙皮苷的含量变化。结果见图 3。

结果表明, 在 40 °C 的加速稳定性 1, 2, 3, 6 月中, 与 0 月对照组相比, 3 批样品芹糖甘草苷含量降低率分别为 6.7%~57.2%, 7.1%~50.3%, 11.8%~48.8%, 甘草苷含量降低率分别为 3.4%~29.2%, 1.2%~27.4%, 0.3%~17.2%, 橙皮苷含量降低率分别为 22.0%~59.8%, 24.4%~57.9%, 30.8%~59.7%。

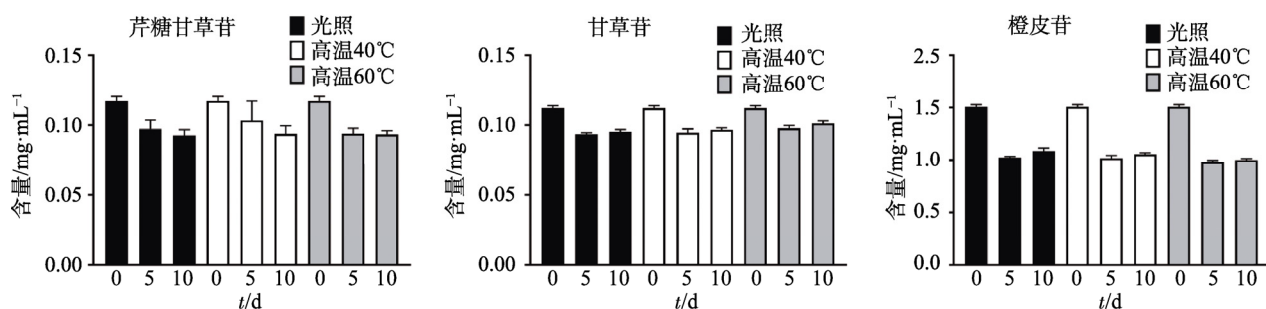


图 2 影响因素试验 3 种成分的含量
Fig. 2 Contents of 3 components in stress tests

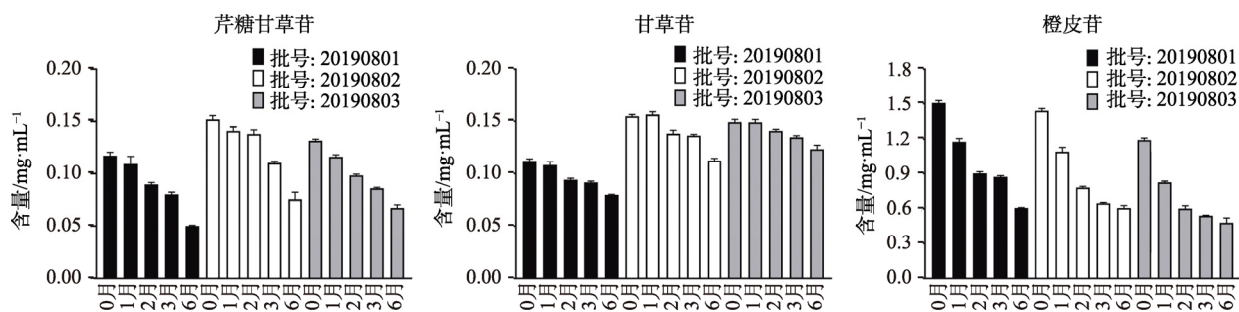


图3 加速稳定性试验3种成分的含量
Fig.3 Contents of 3 components in accelerated stability test

2.11.3 长期试验 取八珍益智合剂 3 批样品(批号: 20190801, 20190802, 20190803), 置于恒温 25℃下 12 个月, 分别在 0, 3, 6, 9 及 12 月末时取样, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样检测, 考察芹糖甘草苷、甘草苷以及橙皮苷的含量变化。结果见图 4。

结果表明, 在(25±2)℃长期稳定性 3, 6, 9, 12 月中, 与 0 月对照组相比, 3 批样品芹糖甘草苷含量降低率分别为 20.6%~30.6%, 21.0%~35.4%, 19.9%~22.0%, 甘草苷含量降低率分别为 14.3%~25.5%, 15.4%~17.5%, 10.7%~18.0%, 橙皮苷含量降低率分别为 18.7%~27.9%, 33.6%~47.9%, 37.9%~47.3%。

3 讨论

3.1 指标成分的选择

在八珍益智复方中, 甘草的水提取物具有增强学习能力、改善记忆和神经保护作用^[11]; 甘草和陈皮的化学成分均以黄酮类成分为主, 具有抗氧化活性, 可以清除自由基。参考中国药典 2020 年版一部, 在甘草和陈皮药材的“含量测定”项下, 分别以甘草苷和橙皮苷作为指标性成分, 而甘草苷和芹糖甘草苷是甘草的主要黄酮类成分^[13], 橙皮苷是陈皮的主要黄酮类成分。因此, 本研究选择上述 3 种特征性成分进行检测, 以期能更加准确地

评价该合剂的质量。

3.2 色谱条件的优化

本实验中使用的色谱柱为 C₁₈ 柱, 具有高选择性、高分离效率的优点^[14]; 同时根据色谱峰的峰形、分离度以及 3 种化学成分的差异性^[15], 最终采用梯度洗脱的方式。在流动相选择上, 参考中国药典 2020 年版一部, 甘草药材项下是以乙腈-0.05% 磷酸溶液为流动相, 测定药材中的甘草苷; 陈皮药材项下是以甲醇-醋酸-水(35 : 4 : 61)为流动相, 测定药材中的橙皮苷; 通过对比不同流动相系统, 发现以乙腈-0.1% 乙酸流动相系统进行梯度洗脱时, 分离效果较好、基线平稳、出峰稳定且峰形良好^[16], 故最终选择乙腈-0.1% 乙酸为流动相进行检测分析^[17]。另外, 参考中国药典 2020 年版一部, 甘草苷的测定波长为 237 nm, 橙皮苷的测定波长为 283 nm, 对 3 种待测成分的紫外吸收波长进行扫描, 发现在 237 nm 波长处 3 种成分均有较强的紫外吸收, 在综合其他试验方法的前提下, 选择 237 nm 作为检测波长, 此波长下, 检测强度适中、干扰峰最少、便于分析^[18]。

实验考察了不同的进样体积、色谱柱、流速、柱温和实验人员对相对校正因子的影响, 结果均无较大偏差; 通过外标法对 QAMS 法进行验证, 结果 QAMS 法计算值与外标法实测值无显著差

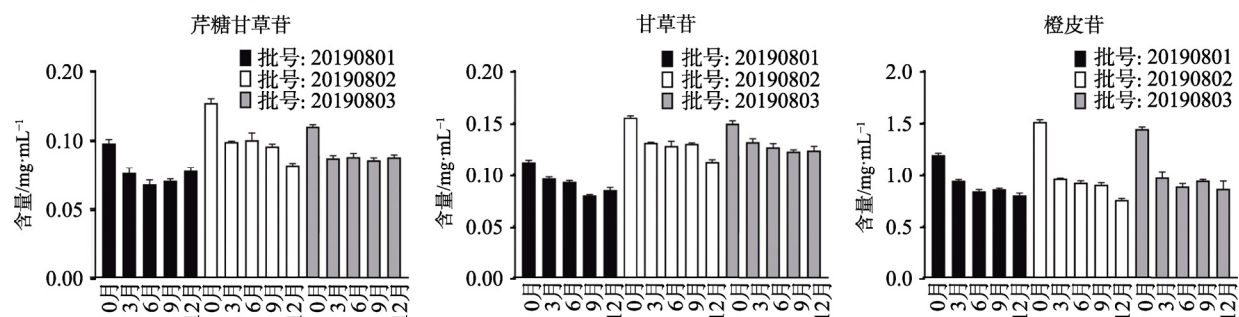


图4 长期稳定性试验3种成分的含量
Fig.4 Contents of 3 components in long-term stability test

异,表明本实验建立的相对校正因子准确可信。

3.3 稳定性试验

中药复方组成较为复杂,有效成分不完全清楚,采用单一指标性成分进行质量评价,稳定性考察等研究不能真正反映该复方的质量控制情况。因此,本研究采用 HPLC 对该合剂中蔗糖苷、甘草苷和橙皮苷含量进行测定,考察其稳定性。在 40 °C 的加速试验下,本品不稳定,稳定性试验中规定若(40±2) °C 质量发生显著变化,应该在(30±2) °C 下试验,对温度敏感的药物可在(25±2) °C 试验,由于长期稳定性试验放置于室温,温度范围为 20~30 °C,所以可认为加速 40 °C 不稳定时用长期稳定性数据即可。有文献报道蔗糖苷和甘草苷在高温条件下会发生明显的苷键断裂反应^[19],橙皮苷在强光、高温条件下会发生降解,热不稳定^[20],而且在合剂水溶液中,由于环境因素的影响,可能导致有效成分的变质、分解等。稳定性试验结果表明,蔗糖苷和橙皮苷在高温条件下长时间放置含量下降较快,而甘草苷含量下降较为平缓,提示“八珍益智合剂”的制备、储存尚待优化,需进一步研究论证,使本合剂更加稳定,从而保证药效。

本实验建立了 QAMS 法同时测定八珍益智合剂中蔗糖苷、甘草苷以及橙皮苷的含量,含量测定结果与外标法相比无显著性差异。本法重复性好、准确度高,为中药复方制剂质量控制体系的建立提供参考。稳定性试验结果表明,本合剂中各有效成分的稳定性均较差,应密封,置阴凉处保存。另外多指标成分稳定性考察更能准确评价该合剂的“稳定性”,对该经验方的质量控制具有重要意义。

REFERENCES

[1] XIA L, GUO S, QIAN D W, et al. Exploration on the mechanism of Bazhen Yizhi prescription in treating Alzheimer's disease based on network pharmacology and molecular docking[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2020, 36(6): 876-881.

[2] WANG Y Y, ZHAO W M, LI K, et al. Establishment and application of an analytical method for the main active ingredients in longan[J]. J Luzhou Med Coll(西南医科大学学报), 2021, 44(2): 114-119.

[3] CHEN Z X, GOU X Y, MU J L, et al. Determination of geniposide in Qingxinlianzi decoction by HPLC[J]. Chem Engin(化学工程师), 2021, 35(4): 23-24, 49.

[4] GU C J, WANG H, PIAO C L. Experience in the treatment of puffiness with Coix Seed, Poria and common Yam

Rhizome—three prescription by professor TONG Xiaolin[J]. Jilin J Tradit Chin Med(吉林中医药), 2020, 40(6): 712-714.

[5] FENG H M. The active ingredients of *Alpinae Oxyphyllae* to improve memory and urine-reducing function[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.

[6] 李佳瑛, 景永帅, 张丹参. 白术在老年痴呆与认知障碍相关疾病的药理作用[C]/2019 全国老年痴呆与认知障碍相关疾病学术大会论文集. 贵阳, 2019: 70-71.

[7] 李皓翔, 梅全喜, 赵志敏, 等. 陈皮广陈皮及新会陈皮的化学成分药理作用和综合利用研究概况[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(6): 1460-1463.

[8] MEI Z Y, ZHANG R F, ZHAO Z M, et al. Research progress in chemical components of *Citri reticulata* 'chachi' and its quality control methods[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2020, 27(7): 136-140.

[9] DUAN Q. Studies on chemical composition and biological activity of citrus *reticulata* blanco peel of different storage period and origins[D]. Jiangmen: Wuyi University, 2019.

[10] ZHANG Y L, MENG F J, TIAN Y, et al. Study on chemical composition and pharmacological action of Licorice[J]. Chem Engin(化学工程师), 2019, 33(8): 60-63, 66.

[11] 杨豆, 张卫波. 甘草化学成分及药理作用研究[J]. 湖南饲料, 2017(3): 21-23.

[12] LUO H, ZHOU Z H, LI H S, et al. Simultaneous determination of eight components in Qisang Yigan pills by HPLC-QAMS[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2021, 38(9): 1049-1054.

[13] HUANG H, HU W N. Simultaneous determination of succinic acid, hesperidin and liquiritin in Banxia syrup by HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(8): 967-970.

[14] CHEN R, CHEN W, WANG S Y, et al. Simultaneous determination of 9 components in Shuanghuanglian preparations by HPLC[J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2020, 35(4): 517-522.

[15] KE C H, YAN H, ZHENG F, et al. Research progress in fingerprint of Licorice[J]. Pract Pharm Clin Remedies(实用药物与临床), 2018, 21(1): 98-103.

[16] CHEN J F, GUO D L, DONG Z L, et al. Simultaneous determination of 9 components in Huoxiang Zhengqi oral liquid by HPLC[J]. China Pharm(中国药房), 2019, 30(21): 2957-2962.

[17] ZHANG Y X. Study on determination of multiple components in fill in Buzhong Yiqi pills by a quantitative assay of multi-components by single-marker[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2017.

[18] LI F, GOU H J, XU X F. Simultaneous determination of 6 components in Fangfengtongsheng pills by double wavelength HPLC[J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2019, 34(1): 43-46.

[19] LU Y Q, LUO H Y, WANG L X, et al. Analysis on content change and transformation rule of main characteristic components in stir-frying process of *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma*[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2020, 26(10): 100-106.

[20] 吴梓春, 王华, 何兆锦. 不同炮制方法对陈皮中有效成分橙皮苷的影响[J]. 临床合理用药杂志, 2015, 8(32): 94-95.

收稿日期: 2021-04-06

(本文责编: 陈怡心)