

芪蓉润肠口服液HPLC-QAMS多指标成分定量控制联合化学计量学的综合质量评价研究

冯晓川¹, 徐延昭², 张 静¹, 张 蕊¹

1. 北京积水潭医院中药房 (北京 100035)
2. 中国食品药品检定研究院 (北京 100050)

【摘要】目的 建立高效液相色谱-一测多评法 (HPLC-QAMS) 多指标成分定量控制与化学计量学相结合的芪蓉润肠口服液综合质量评价方法。**方法** 以毛蕊花糖苷为内参物, 建立其与其他 9 种成分的相对校正因子, 采用外标法和 HPLC-QAMS 法计算各成分含量并对检验结果进行对比, 验证所建立的 HPLC-QAMS 法准确性和可行性, 再运用化学计量学方法对 HPLC-QAMS 法检测结果进行聚类分析、主成分分析和偏最小二乘法-判别分析, 建立芪蓉润肠口服液综合质量评价方法。**结果** 芪蓉润肠口服液中 10 种定量控制指标成分线性关系良好 ($r > 0.9990$); 平均加样回收率在 96.92%~100.11% 之间 ($RSD < 2.0\%$); 两种方法所测得各成分含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 聚类分析结果显示 12 批样品聚成 3 类; 主成分分析和偏最小二乘法-判别分析显示松果菊苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、白术内酯 III、管花苷 A 和毛蕊花糖苷是影响不同批次芪蓉润肠口服液样品差异性的主要标记物。**结论** 所建立的 HPLC-QAMS 多指标成分定量控制联合化学计量的综合质量评价方法结果准确、重复性和稳定性好, 可用于芪蓉润肠口服液的质量控制。

【关键词】 高效液相色谱-一测多评法; 芪蓉润肠口服液; 相对校正因子; 综合质量评价; 化学计量学; 多指标成分; 定量控制

Comprehensive quality evaluation of Qirong Runchang oral liquid based on HPLC-QAMS quantitative control of multi-components and chemometrics analysis

Xiao-Chuan FENG¹, Yan-Zhao XU², Jing ZHANG¹, Rui ZHANG¹

1. Department of Chinese Pharmacy, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China

2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Corresponding author: Rui ZHANG, Email: ceix45@163.com

【Abstract】Objective To establish a comprehensive quality evaluation method of Qirong Runchang oral liquid based on HPLC-QAMS quantitative control of multi-components and chemometrics analysis. **Methods** Verbascoside as the internal reference substance, the relative correction factor with other nine components was established. The contents of each component were calculated by external standard method and HPLC-QAMS method, and the test results were compared to verify the accuracy and feasibility of the established HPLC-

DOI: 10.19960/j.issn.1005-0698.202304006

基金项目: 北京市中医管理局第二批中药骨干人才培养项目 (京中医科字 [2018]213 号)

通信作者: 张蕊, 硕士, 副主任药师, Email: ceix45@163.com

QAMS method. The cluster analysis, principal component analysis and partial least squares-discriminant analysis of HPLC-QAMS test results were performed by chemometrics methods to establish the comprehensive quality evaluation method of Qirong Runchang oral liquid. **Results** There was a good linear relationship among the 10 quantitative control components in Qirong Runchang oral liquid ($r>0.9990$). The average recovery was 96.92% -100.11% ($RSD<2.0\%$). There was no significant difference in the content between the two methods ($P>0.05$). The 12 batches of samples could be clustered into three categories by cluster analysis. The principal component analysis and partial least squares-discriminant analysis show that echinacoside, calycosin-7-*O*- β -*D*-glucopyranoside, atracylenolide III, tubuloside A and verbascoside were the main markers affecting the difference of samples from different batches of Qirong Runchang oral liquid. **Conclusion** The comprehensive quality evaluation method of HPLC-QAMS quantitative control of multi-components combined with chemometrics is accurate, repeatability and stability, which can be used for the quality control of Qirong Runchang oral liquid.

【Keywords】 HPLC-QAMS; Qirong Runchang oral liquid; Relative correction factor; Comprehensive quality evaluation; Chemometrics; Multi-components; Quantitative control

芪蓉润肠口服液由炙黄芪、肉苁蓉、地黄、玄参、白术等 15 味中药材加工而成，主要用于气阴两虚、脾肾不足、大肠失于濡润引起的虚证便秘，同时还能降低化疗后便秘的发生率^[1]，可以促进小肠运动，提高结肠的蠕动能力，增加肠管容积，缩短患者排便的时间，增加排便次数，有效改善患者便秘症状^[2]，还可以从根本上对抗阿片类药物引起的大便干结、变硬^[3]，能有效控制肛肠术后患者的排便次数，减少腹泻的风险^[4]。芪蓉润肠口服液为中药复方制剂，疗效显著，原有质量标准仅采用紫外分光光度法测定了黄芪中黄芪甲苷的含量，未对其他药材进行定量控制^[5]。有文献对该制剂中肉苁蓉所含松果菊苷和毛蕊花糖苷进行了定量分析^[6]，但芪蓉润肠口服液组方较复杂，1~2 种成分的定量分析不能表征产品的内在质量。方中黄芪益气补中；肉苁蓉补肾阳、益精血、润肠通便；两者共同起到健脾益肾通便的作用，为君药。白术健脾益气、燥湿利水；太子参益气健脾；两者助君药加强益气润肠通便的作用，共为臣药。地黄清热凉血、养阴生津；玄参滋阴降火、解毒散结；麦冬养阴生津；当归补血活血、润肠通便；黄精补气养阴、健脾益肾；郁李仁润肠通便、下气利水；火麻仁润肠通便；黑芝麻补肝肾、润肠燥；桑葚补血滋阴、生津止渴；枳壳理气行滞；共为佐药。蜂蜜补中润燥、止痛解毒，为使药。全方具有益气养阴、健脾滋肾、

润肠通便的功效。本试验以君药黄芪和肉苁蓉、臣药白术及佐药地黄和玄参为研究对象，对黄芪所含主要成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素，肉苁蓉所含主要成分松果菊苷、管花苷 A、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷，地黄所含主要成分松果菊苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷，玄参所含主要成分毛蕊花糖苷，白术所含主要活性成分白术内酯 III 和白术内酯 I 采用高效液相色谱-一测多评法（HPLC-QAMS）进行了同步定量检测，并对测得数据运用统计软件进行聚类分析和主成分分析，以期芪蓉润肠口服液多指标质量评价模式提供科学便捷的方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 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 ThermoFisher Scientific 公司）；液相色谱柱 Thermo BDS C₁₈、Capcell C₁₈ 和 Hadera C₁₈（规格均为 4.6 mm × 250 mm，5 μm）；Mettler XS105DU 型电子分析天平（梅特勒托利多公司）；KQ-250DBG 型数控超声清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 试剂

对照品：毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊花糖苷、白术内酯 III 和白术内酯 I（中国食品药品检定研究院，批号分别为 111920-201907、111530-

201914、111978-201501、111975-201501, 纯度依次为 96.8%, 95.2%, 99.9%, 99.9%); 芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、松果菊苷、管花苷 A 和异毛蕊花糖苷(成都普瑞法科技开发有限公司, 批号分别为 PRF9060501、PRF8062601、PRF8091225、PRF8092503、PRF9091721、PRF9010243, 纯度依次为 99.6%, 99.6%, 99.9%, 98.3%, 98.9%, 97.0%)。乙腈(色谱级, 天津大茂化学试剂厂), 娃哈哈纯净水, 其余试剂为分析纯。芪蓉润肠口服液(北京北卫药业有限责任公司, 每支装 20 mL, 批号: 20210333、20210435、20210632、20210633、20210933、20210935、20211031、20211032、20211035、20220124、20220132、20220233, 编号依次为 S1~S12)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Thermo BDS C₁₈液相色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温: 30 °C; 以乙腈(A)-0.1%磷酸(B)为流动相进行梯度洗脱(0~10.0 min, 13.0%A; 10.0~23.0 min, 13.0% → 39.0%A; 23.0~41.0 min, 39.0% → 60.0%A; 41.0~55.0 min, 60.0% → 64.0%A; 55.0~65.0 min, 64.0% → 13.0%A); 体积流量: 1.0 mL · min⁻¹, 波长切换: 0~23 min, 在 257 nm^[7-9]检测毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素, 23~42 min, 在 330 nm^[10-14]检测松果菊苷、管花苷 A、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷, 42~65 min, 在 220 nm^[15-17]检测白术内酯 III 和白术内酯 I; 进样量: 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液

精密称取对照品毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、松果菊苷、管花苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、白术内酯 III、白术内酯 I 各适量, 用 70% 甲醇制成质量浓度分别为 0.1580, 0.0920, 0.0680, 0.2740, 1.3140, 0.3620, 0.7500, 0.3380, 0.0740, 0.0560 mg · mL⁻¹ 的混合贮备液。精密吸取 2.5 mL 混合贮备液稀释 20 倍得到混合对照品溶液(毛蕊异黄酮葡萄糖苷 7.90 μg · mL⁻¹、芒柄花苷 4.60 μg · mL⁻¹、毛蕊异黄酮 3.40 μg · mL⁻¹、芒柄花素 13.70 μg · mL⁻¹、松果菊苷 65.70 μg · mL⁻¹、管花苷 A 18.10 μg · mL⁻¹、

毛蕊花糖苷 37.50 μg · mL⁻¹、异毛蕊花糖苷 16.90 μg · mL⁻¹、白术内酯 III 3.70 μg · mL⁻¹、白术内酯 I 2.80 μg · mL⁻¹)。

2.2.2 供试品溶液

精密吸取芪蓉润肠口服液 2.0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇 20 mL, 超声处理(频率: 40 kHz, 功率: 250 W) 30 min, 放冷至室温, 加 70% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 作为芪蓉润肠口服液供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液

按芪蓉润肠口服液质量标准中的处方及制法分别制备缺炙黄芪、缺肉苁蓉地黄和玄参、缺白术的阴性样品, 分别按“2.2.2”项下方法制成炙黄芪阴性样品溶液、肉苁蓉地黄玄参阴性样品溶液、白术阴性样品溶液。

2.3 系统适用性与专属性试验

依法进样“2.2”项中对照品溶液、芪蓉润肠口服液供试品溶液及 3 个阴性样品溶液, 所得芪蓉润肠口服液色谱图(图 1)中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、松果菊苷、管花苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、白术内酯 III、白术内酯 I 与相邻峰的分度均符合要求(不小于 1.5), 对称因子符合规定(0.95~1.05 之间), 理论板数按各成分均符合规定(≥ 5 500), 处方中其他成分不干扰检测。

2.4 线性回归试验及相对校正因子(RCF)计算

精密量取“2.2.1”项混合贮备液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mL, 分别用 70% 甲醇稀释成 20 mL, 得到 6 个质量浓度的混合对照品溶液, 依次进样分析, 以毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、松果菊苷、管花苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、白术内酯 III、白术内酯 I 的峰面积(Y)对质量浓度(X, μg · mL⁻¹)进行线性回归计算, 结果见表 1。以毛蕊花糖苷为内参物, 按照 RCF 计算公式: $RCF_{RS} = f_R \div f_S = (A_S \times C_R) \div (A_R \times C_S)$ (式中 A 代表峰面积, C 代表质量浓度, 下标 R 和 S 分别代表内参物和其他成分), 分别计算毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、松果菊苷、管花苷 A、异毛蕊花糖苷、白术内酯 III、白术内酯 I 的 RCF, 结果见表 2, 各成分 RCF 的 RSD 在 0.23%~1.84% (n=6) 之间。

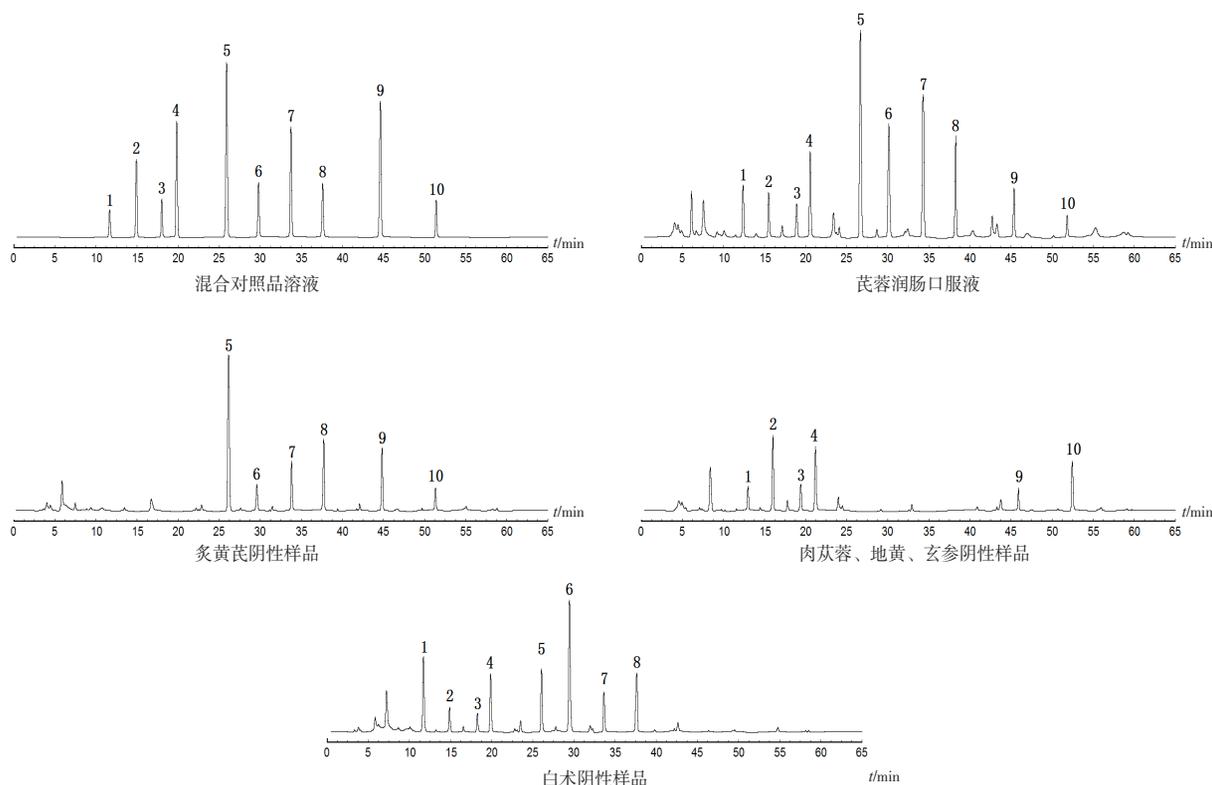


图1 HPLC色谱图

Figure 1. HPLC chromatograms

注：1.毛蕊异黄酮葡萄糖苷；2.芒柄花苷；3.毛蕊异黄酮；4.芒柄花素；5.松果菊苷；6.管花苷A；7.毛蕊花糖苷；8.异毛蕊花糖苷；9.白术内酯III；10.白术内酯I

表1 芪蓉润肠口服液中10个成分的回归方程、线性范围和相关系数

Table 1. Regression equations, linear range and correlation coefficient of ten components in Qirong Runchang oral liquid

成分	回归方程	范围 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	<i>r</i>
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y=2.6104 \times 10^6 X+1\ 102.2$	0.79~39.50	0.9997
芒柄花苷	$Y=2.1419 \times 10^6 X-560.5$	0.46~23.00	0.9992
毛蕊异黄酮	$Y=1.5677 \times 10^6 X+43.4$	0.34~17.00	0.9998
芒柄花素	$Y=3.4766 \times 10^6 X-334.1$	1.37~68.50	0.9999
松果菊苷	$Y=4.5387 \times 10^6 X-815.5$	6.57~328.50	0.9995
管花苷A	$Y=4.6345 \times 10^6 X+915.9$	1.81~90.50	0.9997
毛蕊花糖苷	$Y=3.9009 \times 10^6 X+720.5$	3.75~187.50	0.9994
异毛蕊花糖苷	$Y=4.2707 \times 10^6 X-1\ 048.6$	1.69~84.50	0.9998
白术内酯III	$Y=1.9355 \times 10^6 X+747.1$	0.37~18.50	0.9996
白术内酯I	$Y=9.7473 \times 10^5 X+1\ 028.0$	0.28~14.00	0.9994

2.5 精密度、重复性和稳定性试验

依法取“2.2.1”项混合对照品溶液重复6次进样分析检测，得毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、松果菊苷、管花苷A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、白术内酯III、白术内酯I峰面积的RSD依次为1.03%，1.18%，1.29%，0.91%，0.55%，0.70%，0.67%，0.95%，

1.12%和1.04% ($n=6$)，表明仪器精密度良好。

取芪蓉润肠口服液(编号：S1)，按照“2.2.2”项下方法制备芪蓉润肠口服液供试品溶液6份，依法进样分析，得毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、松果菊苷、管花苷A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、白术内酯III、白术内酯I平均含量分别为0.085，0.052，0.035，0.155，

表2 芪蓉润肠口服液中各成分的RCFs结果 (n=6)

Table 2. The results of relative correction factors in Qirong Runchang oral liquid (n=6)

序号	RCFs								
	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	芒柄花素	松果菊苷	管花苷A	异毛蕊花糖苷	白术内酯III	白术内酯I
1	1.4964	1.8284	2.4575	1.1179	0.8494	0.8598	0.9032	2.0322	3.9733
2	1.4893	1.8336	2.4494	1.1429	0.8717	0.8534	0.9399	2.0289	4.1313
3	1.4987	1.8291	2.4673	1.1127	0.8468	0.8238	0.9063	2.0246	4.0412
4	1.4938	1.8249	2.4707	1.0890	0.8534	0.8468	0.8988	2.0062	4.0044
5	1.4913	1.8176	2.5153	1.1441	0.8671	0.8419	0.9226	2.0078	3.9213
6	1.4946	1.8220	2.4849	1.1198	0.8586	0.8416	0.9126	2.0163	4.0099
平均值	1.4940	1.8259	2.4742	1.1211	0.8578	0.8446	0.9139	2.0193	4.0136
RSD (%)	0.23	0.31	0.95	1.84	1.15	1.47	1.66	0.54	1.76

0.869, 0.218, 0.441, 0.187, 0.043, 0.030 mg·mL⁻¹, 其RSD依次为1.60%, 1.79%, 1.81%, 1.54%, 0.98%, 1.23%, 1.15%, 1.64%, 1.75%和1.88% (n=6), 表明本法重复性良好。

取一份芪蓉润肠口服液(编号:S1)供试品溶液于制备后0, 2, 5, 10, 18和24h进样分析, 得毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、松果菊苷、管花苷A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、白术内酯III、白术内酯I峰面积的RSD依次为1.17%, 1.29%, 1.35%, 1.08%, 0.61%, 0.89%, 0.74%, 1.12%, 1.30%和1.19% (n=6), 表明芪蓉润肠口服液供试品溶液在24h内稳定。

2.6 加样回收率试验

精密吸取已知毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、松果菊苷、管花苷A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、白术内酯III、白术内酯I含量的芪蓉润肠口服液(编号:S1)1.0 mL, 共吸取9份样品, 分为3组, 每组分别精密加对照品溶液(含毛蕊异黄酮葡萄糖苷0.0850 mg·mL⁻¹、芒柄花苷0.0510 mg·mL⁻¹、毛蕊异黄酮0.0380 mg·mL⁻¹、芒柄花素0.1550 mg·mL⁻¹、松果菊苷0.8760 mg·mL⁻¹、管花苷A0.2190 mg·mL⁻¹、毛蕊花糖苷0.4330 mg·mL⁻¹、异毛蕊花糖苷0.1890 mg·mL⁻¹、白术内酯III0.0420 mg·mL⁻¹和白术内酯I0.031 mg·mL⁻¹)0.8, 1.0, 1.2 mg, 再按“2.2.2”项步骤处理得供试品溶液, 依法进样分析, 计算毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、松果菊苷、管花苷A、毛蕊花糖苷、

异毛蕊花糖苷、白术内酯III、白术内酯I的加样回收率及RSD分别为96.94% (1.32%), 97.48% (1.61%), 97.80% (1.72%), 98.81% (1.50%), 100.11% (0.56%), 99.10% (0.91%), 100.06% (0.76%), 98.60% (1.18%), 98.41% (1.25%)和96.92% (0.85%) (n=9)。

2.7 RCF耐用性考察

2.7.1 仪器及色谱柱

选用不同高效液相色谱仪(Agilent 1260型和UltiMate 3000型)及不同液相C₁₈色谱柱(Thermo BDS C₁₈、Capcell C₁₈和Hedera C₁₈), 取“2.2.1”项混合对照品溶液进样分析检测, 得毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、松果菊苷、管花苷A、异毛蕊花糖苷、白术内酯III、白术内酯I RCF的RSD在0.52%~1.94% (n=6)之间(表3)。

2.7.2 流速

在设定不同流速条件下进样“2.2.1”项混合对照品溶液分析检测, 得毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、松果菊苷、管花苷A、异毛蕊花糖苷、白术内酯III、白术内酯I RCF的RSD在0.51%~1.91% (n=5)之间(表4)。

2.7.3 柱温

在设定不同柱温条件下进样“2.2.1”项混合对照品溶液分析检测, 得毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、松果菊苷、管花苷A、异毛蕊花糖苷、白术内酯III、白术内酯I RCF的RSD在0.63%~1.85% (n=5)之间(表5)。

表3 不同仪器、色谱柱测得的RCFs (n=6)

Table 3. Relative correction factors measured by different instruments and chromatographic columns of different brands (n=6)

仪器	色谱柱	RCFs								
		毛蕊异黄酮 葡萄糖苷	芒柄花苷	毛蕊异 黄酮	芒柄花素	松果菊苷	管花苷A	异毛蕊 花糖苷	白术内酯III	白术内酯I
Agilent	Thermo BDS C ₁₈	1.4921	1.8215	2.4709	1.1186	0.8553	0.8422	0.9101	2.0175	4.0111
1260	Capcell C ₁₈	1.5006	1.8382	2.5093	1.1453	0.8770	0.8638	0.9367	2.0401	4.1386
	Hedera C ₁₈	1.4783	1.8069	2.4406	1.0829	0.8463	0.8270	0.8894	1.9873	3.9169
UltiMate	Thermo BDS C ₁₈	1.4879	1.8173	2.4625	1.1034	0.8502	0.8351	0.9028	2.0058	4.0002
3000	Capcell C ₁₈	1.4964	1.8256	2.4882	1.1273	0.8569	0.8568	0.9215	2.0396	4.0375
	Hedera C ₁₈	1.4880	1.8128	2.4607	1.1055	0.8471	0.8335	0.8979	2.0237	3.9650
平均值		1.4905	1.8204	2.4720	1.1138	0.8555	0.8431	0.9097	2.0190	4.0116
RSD (%)		0.52	0.60	0.97	1.94	1.33	1.70	1.88	1.01	1.87

表4 不同流速下测得的RCFs (n=5)

Table 4. Relative correction factors for different velocity measurements(n=5)

流速 (mL · min ⁻¹)	RCFs								
	毛蕊异黄酮 葡萄糖苷	芒柄花苷	毛蕊异 黄酮	芒柄花素	松果菊苷	管花苷A	异毛蕊 花糖苷	白术内酯III	白术内酯I
0.8	1.5082	1.8463	2.5006	1.1490	0.8681	0.8639	0.9391	2.0609	4.0905
0.9	1.5019	1.8379	2.4971	1.1358	0.8702	0.8560	0.9266	2.0457	4.0522
1.0	1.4966	1.8280	2.4779	1.1235	0.8598	0.8473	0.9158	2.0214	4.0167
1.1	1.4937	1.8155	2.4518	1.1136	0.8437	0.8322	0.9072	2.0041	3.9860
1.2	1.4884	1.8072	2.4330	1.0927	0.8382	0.8298	0.8954	1.9885	3.9510
平均值	1.4978	1.8270	2.4721	1.1229	0.8560	0.8458	0.9168	2.0241	4.0193
RSD (%)	0.51	0.87	1.18	1.91	1.68	1.75	1.84	1.46	1.36

表5 柱温不同测得的RCFs (n=5)

Table 5. Relative correction factors measured at different column temperatures (n=5)

柱温 (°C)	RCFs								
	毛蕊异黄酮 葡萄糖苷	芒柄花苷	毛蕊异 黄酮	芒柄花素	松果菊苷	管花苷A	异毛蕊 花糖苷	白术内酯III	白术内酯I
28	1.4779	1.8075	2.4407	1.0965	0.8408	0.8392	0.8971	1.9916	3.9283
29	1.4806	1.8160	2.4592	1.1128	0.8485	0.8405	0.9069	2.0133	3.9768
30	1.4959	1.8272	2.4768	1.1247	0.8590	0.8457	0.9163	2.0208	4.0161
31	1.4995	1.8394	2.4971	1.1351	0.8672	0.8599	0.9213	2.0374	4.0407
32	1.4872	1.8407	2.5180	1.1508	0.8716	0.8634	0.9365	2.0109	4.0850
平均值	1.4882	1.8262	2.4784	1.1240	0.8574	0.8497	0.9156	2.0148	4.0094
RSD (%)	0.63	0.79	1.23	1.85	1.49	1.32	1.63	0.82	1.50

2.8 各成分色谱峰的定位

以毛蕊花糖苷为内参物, 依法进样“2.2.1”项混合对照品溶液检测分析, 考察其他9种成分在 Agilent 1260 型和 UltiMate 3000 型高效液相色谱仪及液相色谱柱 Thermo BDS C₁₈、Capcell C₁₈ 和 Hedera C₁₈ 条件下相对保留时间的重现性(表6), 相对保留时间值的RSD在0.61%~1.45%($n=6$)之间。

2.9 含量测定

取芪蓉润肠口服液12批, 按“2.2.2”项芪蓉润肠口服液供试品溶液制备步骤制备供试品溶液, 依法进样检测分析, 分别采用ESM和QAMS法计算各成分含量, 结果见表7。利用SPSS 26.0 统计学软件, 采用 t 检验对两种方法所测得结果进行比较, 结果差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.10 芪蓉润肠口服液的化学计量学质量分析

2.10.1 聚类分析

运用SPSS 26.0 软件组间联接和Euclidean 距离的聚类方法, 对表7中QAMS法计算的含量数据进行分析(图2)。从图2可知, 当类间距为10时, 12批芪蓉润肠口服液供试品最终聚为3类, S3、S5、S6、S1、S4和S2第I类, S8、S9和S7为第II类, S10、S11和S12为第III类。从分类结果可以看出, 各成分含量差异与生产阶段有关, 但同一阶段生产的含量也稍有波动, 这可能与生产所用原药材采收地、采收时间相关, 同时炮制过程也影响原药材质量, 因此生产中要加强原药

材产地管理, 规范炮制方法, 细化生产参数, 从根本上把控产品质量。

2.10.2 主成分分析(PCA)

将表7中QAMS法测定结果导入SPSS 26.0 软件, 采用降维的方式对主成分进行提取, 得各主成分特征值和方差贡献率(表8)及成分矩阵表(表9)。由表8可知前2个主成分特征值: 6.675和2.412(大于1), 对方差的贡献率分别为66.748%和24.116%, 累计方差贡献率为90.864%(大于85%)。从表9可以看出第一主成分的信息来自芒柄花苷、芒柄花素、松果菊苷、管花苷A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和白术内酯I等成分的综合, 第二主成分的信息来自毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮和白术内酯III的信息。同时应用统计软件SIMCA 14.1 建立PCA模型, 12批芪蓉润肠口服液样品PCA得分图(图3), 共提取出2个主成分R²X为0.908(大于0.5), 表明所建立的模型稳定性较高。从图3可以看出, S1~S6、S7~S9以及S10~S12分别呈现一定关联性。

2.10.3 偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)

将表7中QAMS法含量数据导入SIMCA 14.1 统计软件, 运行PLS-DA程序, 提取到2个主成分, 得到PLS-DA模型, 其模型解释能力参数(R²X、R²Y)分别为0.933和0.913, 预测能力参数Q²为0.840, 两者高于0.5, 说明模型拟合度较好, 具有较高的稳定性和预测率。经PLS-DA模型拟

表6 不同仪器和不同色谱柱待测成分色谱峰的相对保留值($n=6$)

Table 6. Relative retention value of the components under test on different instruments and chromatographic columns ($n=6$)

仪器	色谱柱	RRT								
		毛蕊异黄酮葡萄糖苷	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	芒柄花素	松果菊苷	管花苷A	异毛蕊花糖苷	白术内酯III	白术内酯I
Agilent 1260	Thermo BDS C ₁₈	0.3457	0.4427	0.5344	0.5873	0.7672	0.8836	1.1129	1.3210	1.5238
	Capcell C ₁₈	0.3530	0.4483	0.5365	0.5906	0.7705	0.8957	1.1175	1.3239	1.5247
	Hedera C ₁₈	0.3613	0.4519	0.5439	0.6038	0.7849	0.9093	1.1293	1.3396	1.5449
UltiMate 3000	Thermo BDS C ₁₈	0.3506	0.4506	0.5408	0.5915	0.7726	0.8874	1.1261	1.3271	1.5295
	Hedera C ₁₈	0.3544	0.4537	0.5397	0.5962	0.7760	0.9029	1.1282	1.3308	1.5306
	Capcell C ₁₈	0.3539	0.4460	0.5341	0.5933	0.7731	0.8966	1.1170	1.3065	1.5002
平均值		0.3532	0.4489	0.5382	0.5938	0.7741	0.8959	1.1218	1.3248	1.5256
RSD (%)		1.45	0.90	0.72	0.96	0.78	1.06	0.61	0.83	0.96

表7 ESM和QAMS测定芪蓉润肠口服液10个成分的质量浓度 (mg · g⁻¹, n=3)

Table 7. Mass concentrations of ten components in Qirong Runchang oral liquid by ESM and QAMS (mg · g⁻¹, n=3)

成分	方法	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	P
毛蕊花糖苷	ESM	0.438	0.413	0.342	0.390	0.331	0.316	0.287	0.230	0.263	0.518	0.567	0.467	-
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	ESM	0.083	0.097	0.084	0.092	0.097	0.089	0.063	0.079	0.079	0.073	0.068	0.066	0.876
	QAMS	0.082	0.098	0.082	0.090	0.095	0.088	0.062	0.080	0.078	0.074	0.067	0.065	
芒柄花苷	ESM	0.053	0.059	0.062	0.064	0.066	0.061	0.074	0.082	0.079	0.050	0.052	0.054	0.879
	QAMS	0.054	0.058	0.061	0.063	0.065	0.060	0.075	0.081	0.078	0.049	0.051	0.053	
毛蕊异黄酮	ESM	0.036	0.045	0.041	0.043	0.038	0.035	0.035	0.033	0.032	0.028	0.024	0.022	0.777
	QAMS	0.035	0.044	0.040	0.042	0.037	0.036	0.034	0.032	0.031	0.027	0.023	0.021	
芒柄花素	ESM	0.152	0.177	0.143	0.169	0.135	0.128	0.088	0.079	0.071	0.221	0.247	0.201	0.983
	QAMS	0.150	0.174	0.142	0.166	0.134	0.126	0.087	0.078	0.070	0.224	0.250	0.204	
松果菊苷	ESM	0.873	0.941	0.825	0.869	0.810	0.779	0.752	0.689	0.701	1.156	1.108	1.064	0.999
	QAMS	0.856	0.947	0.829	0.875	0.803	0.773	0.747	0.680	0.706	1.163	1.115	1.072	
管花苷A	ESM	0.221	0.231	0.287	0.256	0.275	0.301	0.179	0.135	0.157	0.399	0.361	0.312	0.984
	QAMS	0.220	0.234	0.291	0.261	0.278	0.306	0.177	0.140	0.155	0.394	0.352	0.314	
异毛蕊花糖苷	ESM	0.191	0.178	0.189	0.192	0.195	0.183	0.172	0.161	0.153	0.248	0.243	0.236	0.960
	QAMS	0.193	0.175	0.184	0.189	0.198	0.180	0.168	0.158	0.152	0.255	0.249	0.232	
白术内酯III	ESM	0.041	0.055	0.049	0.051	0.051	0.046	0.038	0.027	0.025	0.048	0.033	0.037	0.871
	QAMS	0.042	0.054	0.048	0.052	0.050	0.045	0.037	0.026	0.024	0.047	0.032	0.036	
白术内酯I	ESM	0.029	0.034	0.037	0.032	0.035	0.038	0.032	0.029	0.027	0.047	0.042	0.043	0.950
	QAMS	0.030	0.033	0.036	0.033	0.034	0.039	0.031	0.028	0.026	0.048	0.043	0.042	

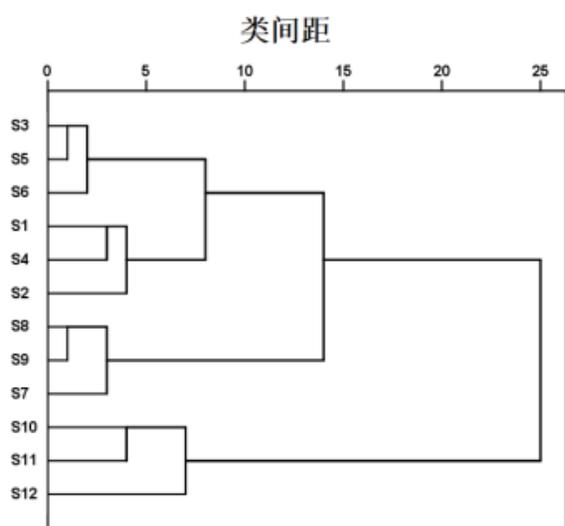


图2 12批芪蓉润肠口服液样品聚类树状图

Figure 2. Tree Diagram of cluster analysis for 12 batches of Qirong Runchang oral liquid samples

合分析分别生成得分图 (图 4) 和变量重要性投影 (VIP) 图 (图 5)。由图 4 可以看出 12 批芪蓉润肠口服液的含量数据点均落在 95%CI 内。图 5 中变量 VIP 值大于 1 的有 5 个成分 (松果菊苷 VIP=1.432、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 VIP=1.278、白术内酯 III VIP=1.212、管花苷 A VIP=1.138、毛蕊花糖苷 VIP=1.020)，表明松果菊苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、白术内酯 III、管花苷 A 和毛蕊花糖苷是影响不同批次芪蓉润肠口服液样品差异性的主要标记物。

将模型建立时分类 Y 矩阵变量定义为随机排列 200 次做置换检验, 得到 R2 拟合直线 Y 轴截距为 0.161, 小于 0.3, 表明所建立的 PLS-DA 模型结果可靠; Q2 拟合直线 Y 轴截距为 -0.221, 表明所建模型可靠, 不存在过度拟合现象。见图 6。

表8 主成分特征值和贡献率

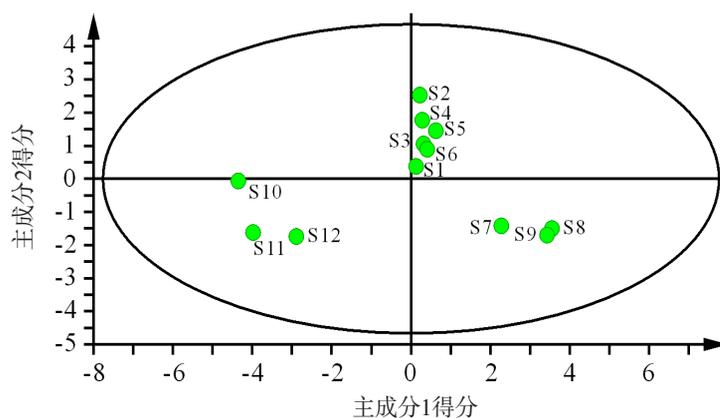
Table 8. Initial eigenvalues and contribution rate of principal components

主成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	特征值	方差贡献率 (%)	累积方差贡献率 (%)	特征值	方差贡献率 (%)	累积方差贡献率 (%)
1	6.675	66.748	66.748	6.675	66.748	66.748
2	2.412	24.116	90.864	2.412	24.116	90.864
3	0.411	4.108	94.972			
4	0.257	2.572	97.544			
5	0.109	1.089	98.634			
6	0.063	0.634	99.268			
7	0.048	0.484	99.752			
8	0.013	0.129	99.881			
9	0.009	0.086	99.967			
10	0.003	0.033	100.000			

表9 芪蓉润肠口服液10个成分成分矩阵表

Table 9. Post-rotation factor load matrix of 10 components in Qirong Runchang oral liquid

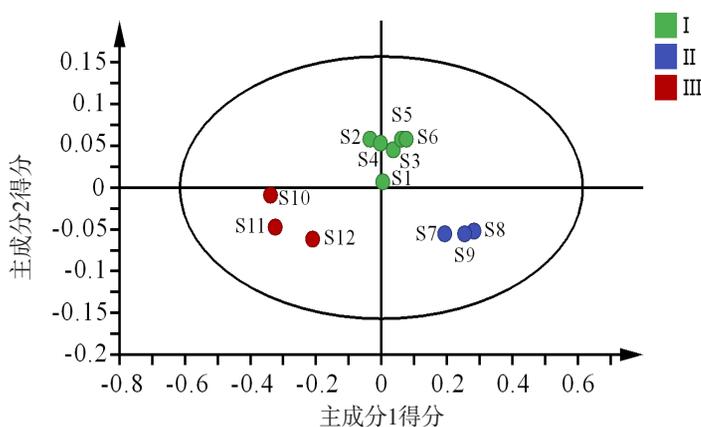
成分	主成分	
	1	2
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	-0.285	0.866
芒柄花苷	-0.916	-0.274
毛蕊异黄酮	-0.509	0.828
芒柄花素	0.965	0.113
松果菊苷	0.968	-0.020
管花苷A	0.922	0.187
毛蕊花糖苷	0.946	0.027
异毛蕊花糖苷	0.973	-0.121
白术内酯Ⅲ	0.283	0.915
白术内酯Ⅰ	0.926	-0.013



注: $R^2X[1]=0.667$; $R^2X[2]=0.241$; Ellipse: Hotelling's $T^2(95\%)$

图3 12批芪蓉润肠口服液样品的PCA得分图

Figure 3. PCA score chart for 12 batches of Qirong Runchang oral liquid samples



注: $R^2X[1]=0.874$; $R^2X[2]=0.0587$; Ellipse: Hotelling's $T^2(95\%)$

图4 12批芪蓉润肠口服液样品的PLS-DA模型得分图

Figure 4. Score chart of PLS-DA model for 12 batches of Qirong Runchang oral liquid samples

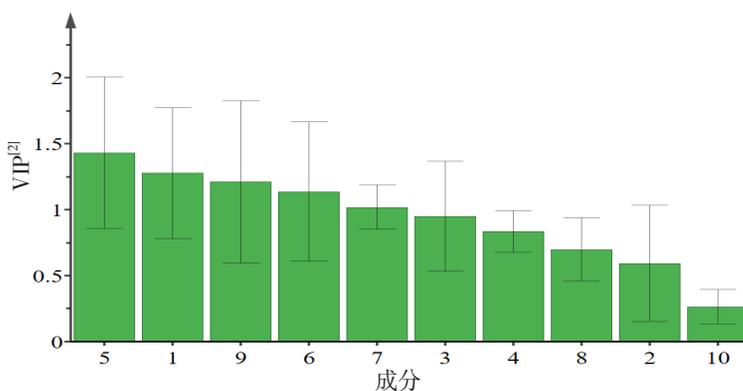


图5 12批芪蓉润肠口服液样品的VIP图

Figure 5. VIP images of 12 batches of Qirong Runchang oral liquid samples

$\$M2.DA(1)$ Intercepts: $R^2=(0.0, 0.161), Q^2=(0.0, -0.221)$

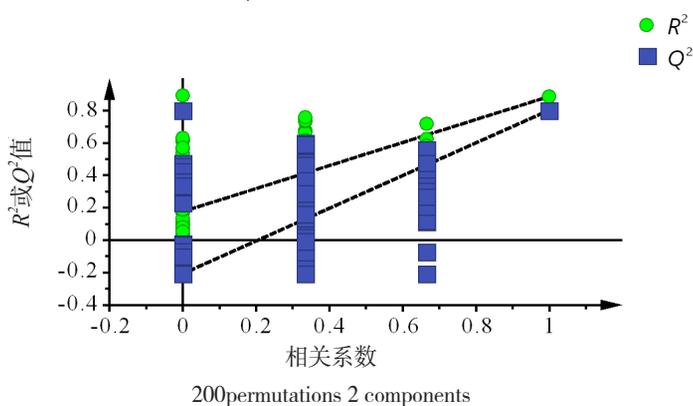


图6 PLS-DA置换检测结果图

Figure 6. Figures of PLS-DA replacement detection results

3 讨论

3.1 流动相的优化过程

本试验首先选用乙腈-水和甲醇-水系统进行对比考察, 结果发现两种流动相均出现不同程

度的基线漂移, 干扰检测, 且个别色谱峰拖尾, 甲醇-水尤为明显, 考虑采用乙腈-水体系, 加入 0.1% 磷酸溶液、0.1% 甲酸溶液或 0.1% 乙酸溶液调节改善。结果显示乙腈-0.1% 磷酸为流动相时效果最佳。通过不断摸索流动相中有机相与水

相的比例,控制待测成分的出峰时间,有效降低梯度洗脱程序变化对待测成分定量检测的影响,同时逐渐调整流动相比比例,控制流动相中有机相和水相的调整幅度,确保色谱图的基线稳定以及各待测成分检测结果的准确性,最终确定以“2.1”项下色谱条件进行梯度洗脱。此条件下芪蓉润肠口服液毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、松果菊苷、管花苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、白术内酯 III、白术内酯 I 峰形尖锐,基线分离,10 种成分与相邻色谱峰间分离度好,检测时间合理。

3.2 供试品提取方式的确定

芪蓉润肠口服液质量标准“性状”项下规定:本品为棕褐色的液体,久置可有少量沉淀。考虑到不同批次样品间沉淀量存在一定差异,同时沉淀量对各成分含量可能产生一定的影响,直接稀释法进行供试品溶液制备影响检测结果的准确性,为确保所建立方法的通用性,避免沉淀对含量检测结果的影响,分别考察了提取方式(超声提取^[8,10-17]、加热回流提取^[7])、提取溶剂(100%甲醇^[7-8,15-17]、70%甲醇^[11]、50%甲醇^[10,12,14]、水^[9])、提取时间(20,30,40,60 min)及提取次数对毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、松果菊苷、管花苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、白术内酯 III、白术内酯 I 含量的影响,最终确定采用 70% 甲醇超声处理 30 min 对供试品进行制备。

3.3 检测波长的选择

中成药复方制剂所含成分繁多,单一波长难以确保各待测物质在最佳检测波长下检测,为提高检测灵敏度,本试验采用波长切换技术对芪蓉润肠口服液中多组分含量进行同时检测。同时波长切换时间应结合各待测成分的保留时间来确定,严格掌握切换时间是高效液相色谱波长切换技术的关键,直接影响色谱峰基线的平稳性和检测结果的准确性。本课题组在试验过程中,通过对各待测成分全波长紫外扫描,同时对波长切换时间进行不断摸索和优化,最终确定在 0~23 min 采用 257 nm 对毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素进行检测,在 23~42 min 采用 330 nm 对松果菊苷、管花苷 A、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷进行检测,在 42~65 min 采用 220 nm 对白术内酯 III 和白术内酯 I 进行检测,

在此条件下,各待测成分灵敏度高,检测结果准确,各成分与相邻色谱峰均能达到完全分离。

3.4 小结

本试验采用 HPLC-QAMS 法同时检测芪蓉润肠口服液中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、松果菊苷、管花苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、白术内酯 III、白术内酯 I 含量,通过精密度试验、重复性试验、稳定性试验及准确度试验考察均符合方法学要求,一测多评法与外标法结果无明显差异,且降低了检验成本,检验用时合理,同时结合化学计量学,运用聚类分析、PCA 和 PLS-DA 模式识别找出 5 个差异标志物,对提升控制芪蓉润肠口服液样品整体质量控制和标准提供了数据参考。

参考文献

- 任芳,王海明,冯宇,等.芪蓉润肠口服液治疗化疗后便秘疗效观察[J].北京中医药,2017,36(10):897-899.[Ren F, Wang HM, Feng Y, et al. Clinical observation of Qirong Runchang oral liquid in the treatment of chemotherapy-induced constipation[J]. Beijing Journal of Traditional Chinese Medicine, 2017, 36(10): 897-899.] DOI: 10.16025/j.1674-1307.2017.10.010.
- 张燕玲,袁兵源,周志聪,等.芪蓉润肠口服液治疗老年慢性便秘的效果探究[J].中国实用医药,2020,15(24):107-109.[Zhang YL, Yuan BY, Zhou ZC, et al. Study on the effect of Qirong Runchang oral liquid in the treatment of chronic constipation in the elderly[J]. China Practical Medical, 2020, 15(24): 107-109.] DOI: 10.14163/j.cnki.11-5547/r.2020.24.046.
- 仪松,陈丽佳,耿怡,等.乳果糖与芪蓉润肠口服液治疗阿片类药物所致便秘的疗效比较[J].天津药学,2018,30(6):26-29.[Yi S, Chen LJ, Geng Y, et al. Comparison of lactulose and Qirong Runchang oral liquid in the treatment of opioid-induced constipation[J]. Tianjin Pharmacy, 2018, 30(6): 26-29.] DOI: 10.3969/j.issn.1006-5687.2018.06.009.
- 刘永康,杨士斌.芪蓉润肠口服液与乳果糖对肛肠术后患者排便功能的影响[J].中国现代医药杂志,2019,21(8):65-66.[Liu YK, Yang SB. Effect of Qirong Runchang oral liquid and lactulose on defecation function of patients after anorectal surgery[J]. Modern Medicine Journal of China, 2019, 21(8): 65-66.] DOI: 10.3969/

- j.issn.1672-9463.2019.08.019.
- 5 国家药品监督管理局药品标准 WS3-001(Z-001)-2003(Z)[S]. 2003.
 - 6 闫瑶, 孟新源, 许欢欢, 等. 高效液相色谱法测定芪蓉润肠口服液中心果菊苷与毛蕊花糖苷的含量[J]. 新疆医科大学学报, 2018, 41(7): 886-888,892. [Yan Y, Meng XY, Xu HH, et al. Determination of echinacoside and verbascoside in Qirong Runchang oral liquid by using HPLC[J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2018, 41(7): 886-888,892.] DOI: 10.3969/j.issn.1009-5551.2018.07.020.
 - 7 李紫岩, 杨敏, 王杰, 等. 以 7 种有效成分为指标评价内蒙古不同产地黄芪药材品质[J]. 中国现代中药, 2020, 22(1): 65-73. [Li ZY, Yang M, Wang J, et al. Evaluation of quality of astragali radix in different producing areas of Inner Mongolia with 7 active ingredients as indicators[J]. Modern Chinese Medicine, 2020, 22(1): 65-73.] DOI: 10.13313/j.issn.1673-4890.20190225006.
 - 8 刘蓬蓬, 张凡, 史辑, 等. UPLC-MS/MS 法测定不同温度定向炮制黄芪中 8 种苷类和 4 种苷元成分的含量[J]. 中国药房, 2020, 31(3): 287-293. [Liu PP, Zhang F, Shi J, et al. Determination of 8 glycosides and 4 aglycones in directionally processed astragalus membranaceus under different temperatures by UPLC-MS/MS[J]. China Pharmacy, 2020, 31(3): 287-293.] DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.03.07.
 - 9 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. [Huang SY, Chen QG, Wang FC, et al. Study on HPLC fingerprint and multicomponents determination of Huangqi- Danshen decoction[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(20): 4950-4956.] DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.20.016.
 - 10 李捷, 窦志英, 刘丽婷, 等. 不同加工方法对肉苁蓉内在质量和性状特征的影响[J]. 中药材, 2021, 44(2): 321-327. [Li J, Dou ZY, Liu LT, et al. Study on the effect of different processing methods on intrinsic quality and characters of Cistanches Herba[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2021, 44(2): 321-327.] DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2021.02.012.
 - 11 丁艳霞, 王晓琴, 张英, 等. 基于高效液相色谱的肉苁蓉属药材 6 个主要苯乙醇苷类成分的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(4): 813-816. [Ding YX, Wang XQ, Zhang Y, et al. Quantitative assay of six main phenylethanoid glycosides in Cistanche Herba by high performance liquid chromatography[J]. Lishizhen Medicine and Materia Research, 2020, 31(4): 813-816.] DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2020.04.012.
 - 12 杨国宁, 毕天琛, 张裕民, 等. 一测多评法测定不同肉苁蓉饮片中 8 个成分的含量[J]. 中药材, 2020, 43(7): 1677-1682. [Yang GN, Bi TC, Zhang YM, et al. Determination of 8 components in different Cistanche decoction pieces by QAMS method[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2020, 43(7): 1677-1682.] DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2020.07.027.
 - 13 王悦, 周巧, 张学兰, 等. HPLC 法同时测定地黄及不同炮制品中 8 种成分的含量[J]. 中药材, 2021, 44(1): 64-68. [Wang Y, Zhou Q, Zhang XL, et al. Simultaneous determination of eight compounds contents of rehmanniae radix and its different processed products by HPLC[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2021, 44(1): 64-68.] DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2021.02.012.
 - 14 喻欢欢, 钟猛, 丁锐, 等. 一测多评法测定玄参中 7 种有效成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(14): 2719-2724. [Yu HH, Zhong M, Ding R, et al. A quantitative method for simultaneous assay of seven active ingredients with one marker in Scrophularia ningpoensis root[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2017, 42(14): 2719-2724.] DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20170419.008.
 - 15 张金莲, 谢日健, 刘明贵, 等. 不同炮制方法对白术中白术内酯 I, II, III 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(21): 15-18. [Zhang JL, Xie RJ, Liu MG, et al. Effect of different processing method on contents of atractylenolide I, II, III in atractylodis macrocephalae rhizoma[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2016, 22(21): 15-18.] DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.2016210015.
 - 16 王小平, 杨丽珠, 陈育青, 等. 多波长高效液相法同时测定土炒白术中 3 种白术内酯含量[J]. 中国中医药科技, 2019, 26(1): 44-47. [Wang XP, Yang LZ, Chen YQ, et al. Simultaneous determination of three atractylenolides in soil-fried Atractylodes macrocephala by multi-wavelength high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology, 2019, 26(1): 44-47.] DOI: CNKI:SUN:TJYY.0.2019-01-015.
 - 17 崔业波, 程炎, 马晓静, 等. 焦白术饮片质量标准的研

究[J]. 中国医药导刊, 2020, 22(10): 703-708. [Cui YB, Cheng Y, Ma XJ, et al. Research on quality standards of deep-fried atractylodes macrocephala[J]. Chinese Journal of Medical Guide, 2020, 22(10): 703-708.] DOI: 10.3969/

j.issn.1009-0959.2020.10.008.

收稿日期: 2022年06月17日 修回日期: 2023年01月30日
本文编辑: 周璐敏 钟巧妮