

引用:倪昌荣,管敏,施敏.基于高效液相色谱及多成分测定的芪葵方基准样品质量研究[J].中医药导报,2025,31(8):79-85.

## 基于高效液相色谱及多成分测定的 芪葵方基准样品质量研究\*

倪昌荣,管敏,施敏

(南京中医药大学附属医院,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:建立芪葵方基准样品的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱及多指标成分含量测定方法。方法:根据中药饮片临床煎煮规范,制备15批芪葵方基准样品,并建立基准样品的HPLC指纹图谱,明确指纹图谱中峰归属、相似度范围以及干膏率和指标性成分含量范围,建立芪葵方基准样品的质量评价体系。结果:15批基准样品共标定24个共有峰,且相似度大于0.96。基准样品中8种指标性成分含量分别为毛蕊异黄酮葡萄糖苷0.032 7~0.060 3 mg/mL、芦丁0.041 8~0.064 4 mg/mL、金丝桃苷0.4976~0.7845 mg/mL、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷0.1124~0.209 7 mg/mL、异槲皮苷0.338 7~0.542 0 mg/mL、棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸1.033 6~1.552 4 mg/mL、毛蕊异黄酮0.009 4~0.016 3 mg/mL、芒柄花黄素0.002 5~0.004 6 mg/mL。15批基准样品的干膏率范围为27.78%~33.86%,平均干膏率为30.81%。结论:芪葵方基准样品质量评价方法科学可行且质量稳定,可作为芪葵方制剂开发工艺研究以及生产过程质量控制的依据。

[关键词] 芪葵方;基准样品;高效液相色谱;指纹图谱;多指标成分;含量测定;质量评价

[中图分类号] R286.0 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)08-0079-07

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.08.013

### Study of Qikui Formula (芪葵方) Benchmark Sample Based on HPLC Fingerprint and Multi Component Content Determination

NI Changrong, GUAN Min, SHI Min

(Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing Jinagsu 210029, China)

[Abstract] Objective: To establish an HPLC fingerprint and multi index component content determination method for the benchmark sample of Qikui formula. Methods: According to the clinical decoction standards of traditional Chinese medicine decoction, 15 batches of Qikui formula benchmark samples were prepared, and HPLC fingerprint of the benchmark samples were established. The peak attribution and similarity range in the fingerprint chromatogram were clarified, and the dry paste rate and indicator component content range were determined. A quality evaluation system for Qikui formula benchmark samples was established. Results: A total of 24 common peaks were calibrated for 15 batches of benchmark samples, and the similarity was greater than 0.96. The content of the eight indicator components in the benchmark sample were 0.032 7~0.060 3 mg/mL (calycosin-7-glucoside), 0.041 8~0.064 4 mg/mL (rytin), 0.497 6~0.784 5 mg/mL (hyperoside), 0.112 4~0.209 7 mg/mL (2,3,5,4'-tetrahydroxy-silbene-22-O- $\beta$ -D-glucoside), 0.338 7~0.542 0 mg/mL (isoquercitrin), 1.033 6~1.552 4 mg/mL (gossypetin 8-O- $\beta$ -D-glucuronide), 0.009 4~0.016 3 mg/mL (calycosin), and 0.002 5~0.004 6 mg/mL (formononetin), respectively. The range of dry paste yield for 15 batches of benchmark samples was 27.78%~33.86%, with an average dry paste yield of 30.81%. Conclusions: The quality evaluation method for the benchmark sample of Qikui formula is scientifically feasible and stable, and it can serve as a basis for the research of Qikui formula development process and quality control throughout the production process.

[Keywords] Qikui formula; benchmark sample; high performance liquid chromatography; fingerprint chromatogram; multi index components; content determination; quality evaluation

\*基金项目:江苏省中医院院级课题(Y2022ZR22)

通信作者:施敏,女,副主任中药师,研究方向为中药制剂

芪葵方是江苏省中医院中医专家余江毅教授拟定的治疗糖尿病肾脏病的中药复方,由黄芪、黄蜀葵花和制何首乌组成。黄蜀葵花,味甘辛而性凉,归肺、肾、膀胱经,可缓解小便不畅;黄芪与制何首乌配伍,既能益气滋养阴液,又能促进血液净化与利尿。全方实现了补益与疏导并举,可全面调理病因与症状<sup>[1-4]</sup>。芪葵方治疗糖尿病肾脏病具有疗效显著、副作用小、安全性高的独特优势。

开展科学、规范的工艺研究,保证大生产所得制剂能够与临床所用汤剂一致,建立综合质量评价方法,以及保障制剂的质量稳定,是临床经验方转化为医疗机构制剂或者中药新药必须关注的重点问题。“基准样品”依据中医药理论精制而成,不仅是传统中医智慧的忠实继承,还是制剂整体质量控制的标杆<sup>[5-6]</sup>。以基准样品为质量准则所生产的中药制剂,其物质组成贴近临床使用的汤剂原型,有效提升了制剂临床疗效的稳定性与可靠性<sup>[7-10]</sup>。因此,这一标准在中药制剂研发与应用中具有极高的推广价值和实践意义。故本研究制备 15 批芪葵方基准样品,并建立了芪葵方基准样品的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱及多指标成分含量测定方法,旨在为后续制剂工艺研究和质量控制奠定基础。

1 材 料

1.1 主要仪器 Agilent1260s 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);BP211D 十万分之一分析天平(德国 Sartorius 公司);KH7200E 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);色谱柱 Agilent Poroshell 120, EC-C<sub>18</sub> 色谱柱(美国安捷伦科技有限公司)。

1.2 试剂与药物 金丝桃苷(南京聚康医药化工有限公司,批号:230522);芦丁(南京聚康医药化工有限公司,批号:230201);异槲皮苷(南京聚康医药化工有限公司,批号:230317);2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(南京聚康医药化工有限公司,批号:230709);棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷(南京聚康医药化工有限公司,批号:230421);毛蕊异黄酮(南京聚康医药化工有限公司,批号:230405);毛蕊异黄酮葡萄糖苷(南京聚康医药化工有限公司,批号:230509);芒柄花黄素(南京聚康医药化工有限公司,批号:230314)。各对照品质量分数均大于 98%。乙腈(色谱级,美国 Tedia 有限公司,批号:24036026);水(杭州娃哈哈集团有限公司,批号:240301);其余试剂均为分析纯。

中药饮片信息见表 1。经江苏省中医院周琴妹主任中药师鉴定,黄蜀葵花、黄芪、制何首乌饮片均为正品。

2 方法与结果

2.1 15 批芪葵方基准样品的制备

表 1 中药饮片信息			
饮片名称	厂家1	厂家2	厂家3
黄蜀葵花	贵州同德药业股份有限公司(批号:2023050103, 2023050104, 2023050105)	马鞍山井泉中药饮片有限公司(批号:20230801, 20230802, 20230803)	贵州同德药业股份有限公司(批号:2023090103, 2023090104, 2023090105, 2023090106)
黄芪	安徽汇中州中药饮片有限公司(批号:23001201, 23001202, 23001203, 23001204, 23001205)	安徽汇中州中药饮片有限公司(批号:23001109, 23001110)	安徽汇中州中药饮片有限公司(批号:23072501, 23072502, 23072503, 23072504)
制何首乌	马鞍山井泉中药饮片有限公司(批号:20231715, 20231716, 20231717)	马鞍山井泉中药饮片有限公司(批号:20230602, 20230603, 20230604, 20230605)	安徽省万生中药饮片有限公司(批号:20231922, 20231923, 20231924)

2.1.1 饮片基原考证 依据 2020 年版《中华人民共和国药典》(一部)<sup>[11]</sup>,黄蜀葵花来源于锦葵科植物黄蜀葵的干燥花冠,制何首乌取自蓼科植物何首乌的干燥块根,黄芪的基原分别为来源于豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根。本院临床使用的黄芪饮片均为膜荚黄芪,因此芪葵方相关研究所用饮片均为豆科植物膜荚黄芪的干燥根。

2.1.2 15 批芪葵方基准样品的制备 用随机数表法将处方中的 3 味饮片组合成 15 批。(见表 2)参照《医疗机构中药煎药室管理规范》<sup>[12]</sup>,按临床用汤剂的煎煮方法制备临床用量样品。取黄芪 30 g、黄蜀葵花 30 g、制何首乌 10 g 置于煎药砂锅中,加水 1 000 mL,浸泡 30 min,随后以武火煮至沸腾,转为文火维持微沸状态继续煎煮 30 min,4 层纱布滤过,滤液备用。第二次加水 600 mL,煎煮 20 min,合并两次滤液,浓缩至总量 250 mL,即得。同法制备各单味饮片样品及对应阴性样品。

表 2 芪葵方基准样品饮片批次			
编号	黄蜀葵花	黄芪	制何首乌
1	2023090104	23001109	20231716
2	2023050104	23072501	20231922
3	2023050103	23001201	20231923
4	2023050103	23001109	20231717
5	2023090104	23001203	20230604
6	2023090103	23001110	20230605
7	2023050104	23001201	20231923
8	2023090103	23072501	20231717
9	20230803	23001204	20231923
10	2023090106	23001202	20231715
11	2023050105	23001205	20231924
12	20230802	23072501	20231923
13	2023090105	23001110	20230602
14	20230801	23072503	20231716
15	2023050105	23072502	20230603

2.2 芪葵方基准样品指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 Agilent Poroshell 120, EC-C<sub>18</sub> 色谱柱(250.0 mm×4.6 mm, 4.0 μm),以 0.1% 磷酸水(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱(0~10 min, 5%~14%B; 10~22 min, 14%~19%B; 22~28 min, 19%~24%B; 28~50 min, 24%~46%B; 50~60 min, 46%~80%B; 60~65 min, 80%~5%B; 65~70 min, 5%B)进样量为 10 μL,流速为 1.0 mL/min,柱温为 25 ℃,检测波长为 280 nm。

2.2.2 芪葵方基准样品供试品溶液的制备 精密量取芪葵方基准样品(编号 1)2 mL 于 10 mL 容量瓶中,加甲醇适量,超

声处理(功率400 W,频率40 kHz)30 min,冷却后甲醇定容至刻度,摇匀,过0.22 μm微孔滤膜,即得。同法制得单味饮片和阴性对照供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液的制备 取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芦丁、金丝桃苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、异槲皮苷、棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素对照品适量,精密称定,分别将其置于量瓶中,加甲醇适量,超声处理(功率400 W,频率40 kHz)30 min,冷却后甲醇定容至刻度,得8个对照品溶液,精密量取各对照品溶液适量混合,定容至刻度,制得质量浓度分别为0.354 0、0.101 6、0.404 0、0.413 0、0.401 0、0.350 0、0.411 0、0.407 0 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2.4 精密度考察 制备芪葵方基准样品供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样6次,结果指纹图谱相似度>0.95;以金丝桃苷色谱峰为参照峰,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积RSD<2%,表明仪器的精密度良好。

2.2.5 稳定性考察 制备芪葵方基准样品的供试品溶液,按“2.2.1”项下的色谱条件,分别于样品制备后的0、2、4、8、12、24 h进样分析,结果指纹图谱相似度>0.98;以金丝桃苷色谱峰为参照峰,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积RSD<2%,表明供试品在24 h内稳定性良好。

2.2.6 重复性考察 按“2.2.2”项下的方法平行制备同批芪葵方基准样品的供试品溶液6份,按“2.2.1”项下的色谱条件进样分析,结果指纹图谱相似度>0.96;以金丝桃苷色谱峰为参照峰,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积RSD<2%,表明重复性良好。

2.2.7 化学指纹图谱的建立及其相似度评价 按“2.2.1”项下色谱条件检测15批芪葵方基准样品供试品溶液,将所得色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012版)”进行分析,采用中位数法,时间窗设为0.2 min,生成HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱。(见图1)共标定了24个共有峰,计算

15批芪葵方基准样品相似度,得到其不同批次的指纹图谱相似度均>0.96。(见表3)

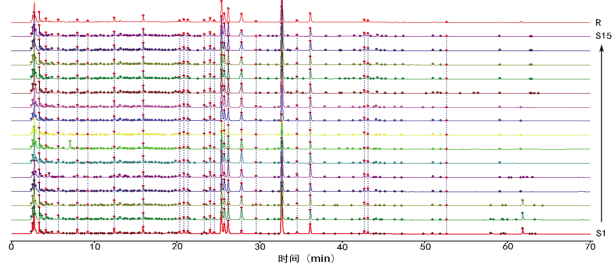


图1 15批芪葵方基准样品指纹图谱和对照图谱的HPLC图

经过与化学对照品的色谱图比较,共指认8个共有峰,分别为毛蕊异黄酮葡萄糖苷(11号)、芦丁(13号)、金丝桃苷(14号)、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(15号)、异槲皮苷(16号)、棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷(19号)、毛蕊异黄酮(23号)、芒柄花黄素(24号)。供试品溶液、对照品溶液、空白溶剂的HPLC图见图2。

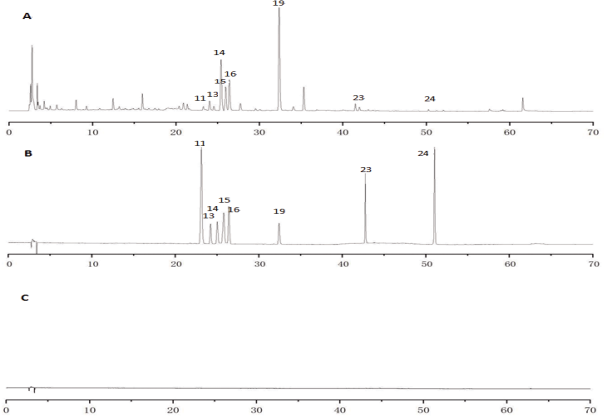


图2 芪葵方基准样品(A)、混合对照品(B)和空白溶剂(C)的HPLC图

2.2.8 指纹图谱分析 比对分析芪葵方基准样品、单味饮片的阴性样品和3种单味饮片样品的指纹图谱,对标定的24个

表3 15批芪葵方基准样品指纹图谱相似度评价结果

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	R
S1	1.000	0.964	0.984	0.980	0.975	0.975	0.968	0.975	0.987	0.988	0.984	0.986	0.990	0.988	0.990	0.988
S2	0.964	1.000	0.983	0.988	0.970	0.990	0.994	0.989	0.990	0.987	0.983	0.981	0.983	0.979	0.980	0.989
S3	0.984	0.983	1.000	0.986	0.987	0.997	0.991	0.987	0.995	0.996	0.999	0.999	0.996	0.999	0.987	0.998
S4	0.980	0.988	0.986	1.000	0.963	0.990	0.980	0.977	0.996	0.994	0.988	0.989	0.993	0.987	0.996	0.993
S5	0.975	0.970	0.987	0.963	1.000	0.980	0.986	0.986	0.979	0.980	0.981	0.983	0.976	0.984	0.963	0.985
S6	0.975	0.990	0.997	0.990	0.980	1.000	0.993	0.986	0.996	0.996	0.997	0.996	0.994	0.995	0.986	0.997
S7	0.968	0.994	0.991	0.980	0.986	0.993	1.000	0.993	0.989	0.987	0.990	0.988	0.985	0.987	0.975	0.992
S8	0.975	0.989	0.987	0.977	0.986	0.986	0.993	1.000	0.988	0.984	0.984	0.983	0.983	0.983	0.974	0.990
S9	0.987	0.990	0.995	0.996	0.979	0.996	0.989	0.988	1.000	0.999	0.995	0.995	0.997	0.994	0.995	0.998
S10	0.988	0.987	0.996	0.994	0.980	0.996	0.987	0.984	0.999	1.000	0.996	0.997	0.998	0.996	0.994	0.999
S11	0.984	0.983	0.999	0.988	0.981	0.997	0.990	0.984	0.995	0.996	1.000	0.999	0.998	0.999	0.990	0.998
S12	0.986	0.981	0.999	0.989	0.983	0.996	0.988	0.983	0.995	0.997	0.999	1.000	0.998	1.000	0.991	0.998
S13	0.990	0.983	0.996	0.993	0.976	0.994	0.985	0.983	0.997	0.998	0.998	0.998	1.000	0.998	0.997	0.998
S14	0.988	0.979	0.999	0.987	0.984	0.995	0.987	0.983	0.994	0.996	0.999	1.000	0.998	1.000	0.991	0.998
S15	0.990	0.980	0.987	0.996	0.963	0.986	0.975	0.974	0.995	0.994	0.990	0.991	0.997	0.991	1.000	0.993
R	0.988	0.989	0.998	0.993	0.985	0.997	0.992	0.990	0.998	0.999	0.998	0.998	0.998	0.998	0.993	1.000

共有峰进行归属。(见图3)峰2、峰4、峰6、峰7、峰8、峰9、峰10、峰12、峰13(芦丁)、峰14(金丝桃苷)、峰16(异槲皮苷)、峰18、峰19(棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷)、峰20、峰21来自黄蜀葵花;峰3、峰15(2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷)来自制何首乌;峰11(毛蕊异黄酮葡萄糖苷)、峰22、峰23(毛蕊异黄酮)、峰24(芒柄花黄素)来自黄芪。峰1、峰5在黄蜀葵花和黄芪中均出现;峰3在黄芪、黄蜀葵花和制何首乌中均出现;峰17在制何首乌和黄蜀葵花中均出现。制何首乌单味饮片检测到的成分未能全部转移至基准样品中,说明在合煎过程中可能出现了成分的变化,有待进一步研究。

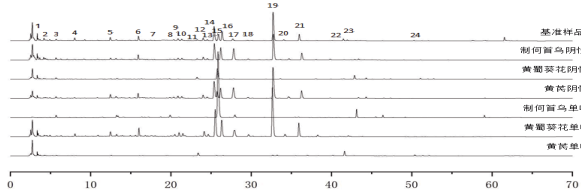


图 3 芪葵方基准样品指纹图谱中 24 各共有峰及其归属

2.3 8个成分的含量测定

2.3.1 HPLC色谱条件 色谱条件同“2.2.1”项下方法。

2.3.2 芪葵方基准样品供试品溶液制备 制备方法同“2.2.2”项下方法。

2.3.3 对照品溶液的制备 制备方法同“2.2.3”项下方法。

2.3.4 系统适用性考察 取上述基准样品、混合对照品以及空白溶剂,按“2.2.1”项下方法进样分析,供试品溶液中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芦丁、金丝桃苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、异槲皮苷、棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素的对照品溶液适量,按照供试品制备方法平行6份,进样测定。供试品中8个指标成分的平均加样回收率见表5,结果表明该方法的加样回收率良好。

2.3.5 线性关系考察 按“2.2.1”项下色谱条件测定不同质量浓度的混合对照品溶液,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。回归方程及线性范围见表4。结果表明毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芦丁、金丝桃苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、异槲皮苷、棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素在相应的浓度范围内线性关系良好。

2.3.6 精密度考察 取“2.3.2”项下供试品溶液1份,分别连续进样6次,毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芦丁、金丝桃苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、异槲皮苷、棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素峰面积RSD分别为0.75%、0.92%、0.45%、0.79%、0.62%、0.33%、0.41%、

0.61%,表明仪器的精密度良好。

2.3.7 稳定性考察 取“2.3.2”项下供试品溶液1份,分别在制备后0、2、4、8、12、24 h进样,毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芦丁、金丝桃苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、异槲皮苷、棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素峰面积RSD分别为0.62%、1.04%、0.62%、0.71%、0.92%、0.47%、0.19%、0.77%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.8 重复性考察 按“2.2.2”项下制备6份供试品溶液,分别进样分析,毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芦丁、金丝桃苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、异槲皮苷、棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素的峰面积RSD分别为1.13%、0.94%、1.04%、0.41%、0.62%、0.86%、0.23%、0.74%,表明重复性良好。

2.3.9 加样回收率考察 精密量取已知各成分含量的芪葵方基准样品(编号1)1 mL于10 mL量瓶中,加入含有毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芦丁、金丝桃苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、异槲皮苷、棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素的对照品溶液适量,按照供试品制备方法平行6份,进样测定。供试品中8个指标成分的平均加样回收率见表5,结果表明该方法的加样回收率良好。

表 5 各成分加样回收率结果 (n=6)

成分	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	加样回收率/%	平均加样回收率/%	RSD/%
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.034 0	0.036 0	0.071 6	104.44	103.77	0.95
	0.034 0	0.036 0	0.071 0	102.78		
	0.034 0	0.036 0	0.071 4	103.83		
	0.034 0	0.036 0	0.071 1	103.00		
	0.034 0	0.036 0	0.071 9	105.14		
芦丁	0.034 0	0.036 0	0.071 3	103.47	104.29	1.23
	0.064 4	0.065 0	0.132 6	104.92		
	0.064 4	0.065 0	0.131 7	103.54		
	0.064 4	0.065 0	0.133 0	105.54		
	0.064 4	0.065 0	0.130 9	102.37		
	0.064 4	0.065 0	0.131 8	103.69		
	0.064 4	0.065 0	0.133 1	105.69		
金丝桃苷	0.646 1	0.634 6	1.298 0	102.73	102.11	0.57
	0.646 1	0.634 6	1.298 3	102.77		
	0.646 1	0.634 6	1.295 5	102.33		
	0.646 1	0.634 6	1.291 3	101.67		
	0.646 1	0.634 6	1.290 0	101.47		
	0.646 1	0.634 6	1.291 3	101.67		

表 4 各成分线性关系

成分	回归方程	线性范围/(μg/mL)	R <sup>2</sup>	检测限/(μg/mL)	定量限/(μg/mL)
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	Y=20.882 0X+3.518 4	3.318 8~106.200 0	1.000 0	0.103 7	0.414 9
芦丁	Y=7.642 7X+11.323 0	3.175 0~101.600 0	0.999 1	0.099 2	0.396 9
金丝桃苷	Y=9.492 8X-7.818 4	7.575 0~242.400 0	0.999 9	0.236 7	0.946 9
2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷	Y=14.075 0X-1.544 3	3.875 0~124.000 0	0.999 8	0.121 1	0.484 4
异槲皮苷	Y=8.511 5X+5.023 1	3.756 3~120.200 0	0.999 3	0.117 4	0.939 1
棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷	Y=11.536 0X-38.741 0	13.131 3~420.200 0	0.999 8	0.820 7	6.565 6
毛蕊异黄酮	Y=29.429 0X+14.179 0	0.963 3~123.300 0	0.999 2	0.060 2	0.240 8
芒柄花黄素	Y=56.502 0X+8.169 2	0.476 6~30.500 0	0.999 9	0.029 8	0.119 1

续表5:

成分	原有量/mg	加入量/mg	测的量/mg	加样回收率/%	平均加样回收率/%	RSR/%
2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷	0.185 5	0.185 7	0.375 9	102.53	101.77	0.99
β-D-葡萄糖苷	0.185 5	0.185 7	0.376 8	103.02		
	0.185 5	0.185 7	0.375 7	102.42		
	0.185 5	0.185 7	0.373 0	100.97		
	0.185 5	0.185 7	0.373 3	101.13		
	0.185 5	0.185 7	0.372 2	100.54		
异槲皮苷	0.466 7	0.463 5	0.942 2	102.59	102.87	1.04
	0.466 7	0.463 5	0.953 6	105.05		
	0.466 7	0.463 5	0.941 5	102.44		
	0.466 7	0.463 5	0.941 4	102.42		
	0.466 7	0.463 5	0.942 2	102.59		
	0.466 7	0.463 5	0.940 3	102.18		
棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷	1.456 9	1.442 5	2.947 3	103.32	103.91	0.62
	1.456 9	1.442 5	2.963 9	104.47		
	1.456 9	1.442 5	2.956 5	103.96		
	1.456 9	1.442 5	2.953 2	103.73		
	1.456 9	1.442 5	2.945 2	103.18		
	1.456 9	1.442 5	2.969 1	104.83		
毛蕊异黄酮	0.015 9	0.015 4	0.031 8	103.25	103.01	0.87
	0.015 9	0.015 4	0.032 0	104.55		
	0.015 9	0.015 4	0.031 7	102.60		
	0.015 9	0.015 4	0.031 8	103.25		
	0.015 9	0.015 4	0.031 6	101.95		
	0.015 9	0.015 4	0.031 7	102.60		
芒柄花黄素	0.004 6	0.004 7	0.009 4	102.55	102.11	1.12
	0.004 6	0.004 7	0.009 3	100.00		
	0.004 6	0.004 7	0.009 4	102.55		
	0.004 6	0.004 7	0.009 5	103.40		
	0.004 6	0.004 7	0.009 4	102.13		
	0.004 6	0.004 7	0.009 4	102.13		

2.4 芪葵方中8种成分在基准样品中的含量测定结果 按“2.2.1”项下方法测定15批基准样品中8种成分的含量,结果见表6。15批基准样品中各成分的质量浓度分别为毛蕊异黄酮葡萄糖苷0.032 7~0.060 3 mg/mL、芦丁0.041 8~0.064 4 mg/mL、金丝桃苷0.497 6~0.784 5 mg/mL、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷0.112 4~0.209 7 mg/mL、异槲皮苷0.338 7~0.542 0 mg/mL、棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷1.033 6~1.552 4 mg/mL、毛蕊异黄酮0.009 4~0.016 3 mg/mL、芒柄花黄素0.002 5~0.004 6mg/mL。

根据《古代经典名方目录管理的中药复方制剂药学研究技术指导原则(试行)》<sup>[13]</sup>要求,其指标成分的波动范围一般不超过均值的±30%。毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芦丁、金丝桃苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、异槲皮苷、棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素均未出现离散数据(均值±30%)。说明各批次黄蜀葵花、黄芪、制何首乌饮片的质量相对稳定,15批基准样品的制备工艺稳定,各指标成分的含量范围可作为后续工艺研究和质量控制的参照。

2.5 芪葵方基准样品干膏率的测定 精密量取芪葵方基准样品各10 mL于干燥恒重的蒸发皿中,蒸干,再置于105 ℃烘箱中干燥3 h,干燥器中冷却30 min,称量质量,计算干浸膏得率。干浸膏得率=(干膏质量/饮片质量)×25×100%。根据《古代经典名方目录管理的中药复方制剂药学研究技术指导原则(试行)》<sup>[13]</sup>,其基准物质的干膏率的波动范围一般不超过均值的±10%。15批芪葵方基准样品的平均干膏率为30.81%,干膏率的范围为27.78%~33.86%。(见表7)该15批基准样品的制备工艺稳定,干浸膏得率的范围可作为后续工艺研究与质量控制的参照。

表 6 基准样品中各指标成分含量 (mg/mL)

编号	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	芦丁	金丝桃苷	2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷	异槲皮苷	棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷	毛蕊异黄酮	芒柄花黄素
1	0.034 0	0.064 4	0.646 1	0.185 5	0.467 7	1.456 9	0.015 9	0.004 6
2	0.052 8	0.056 9	0.701 6	0.207 5	0.513 9	1.227 1	0.015 1	0.003 3
3	0.033 3	0.057 4	0.609 6	0.113 5	0.437 1	1.467 1	0.013 1	0.002 5
4	0.037 2	0.046 9	0.588 2	0.208 0	0.392 9	1.357 6	0.013 8	0.004 3
5	0.040 3	0.059 8	0.668 0	0.119 0	0.421 4	1.398 8	0.009 6	0.002 7
6	0.060 3	0.063 1	0.735 5	0.168 7	0.425 3	1.505 9	0.009 4	0.004 5
7	0.039 4	0.045 6	0.642 4	0.112 3	0.431 9	1.033 6	0.009 4	0.002 5
8	0.050 5	0.061 3	0.684 2	0.202 4	0.394 6	1.413 9	0.011 3	0.004 2
9	0.057 1	0.060 2	0.784 5	0.117 3	0.430 2	1.552 4	0.015 9	0.002 8
10	0.042 1	0.047 6	0.653 2	0.165 6	0.542 0	1.247 7	0.016 3	0.003 2
11	0.032 7	0.041 8	0.521 7	0.137 6	0.461 2	1.325 5	0.015 7	0.002 6
12	0.051 2	0.048 9	0.497 6	0.112 4	0.387 6	1.158 8	0.013 2	0.003 4
13	0.059 5	0.062 8	0.554 3	0.186 5	0.365 2	1.166 7	0.009 9	0.004 6
14	0.052 0	0.042 6	0.732 8	0.209 7	0.338 7	1.306 5	0.009 8	0.003 8
15	0.059 8	0.045 2	0.542 1	0.194 3	0.491 0	1.402 8	0.015 4	0.004 1
均值	0.046 8	0.053 6	0.637 5	0.162 7	0.433 4	1.334 7	0.012 9	0.003 5

表 7 基准样品干浸膏得率

序号	得率/%
1	31.43
2	27.78
3	30.45
4	31.86
5	33.86
6	33.41
7	28.63
8	33.26
9	33.14
10	29.03
11	30.15
12	32.75
13	28.11
14	28.96
15	29.30
均值	30.81

3 讨 论

3.1 指标成分的选择 芪葵方基准样品作为后续制剂工艺研究、大生产及质量控制的参照,是整个研究的核心部分。因此,指标成分应该具有一定的代表性,且与临床疗效相关。同时指标成分能全面反映芪葵方质量,且检测方法应尽可能简便快捷。本研究初始阶段,拟选择毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芦丁、金丝桃苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、异槲皮苷、棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素、大黄素、大黄素甲醚、表儿茶素、白藜芦醇、芒柄花苷13个成分作为指标成分,结果发现大黄素、大黄素甲醚、表儿茶素、白藜芦醇、芒柄花苷在3个波长(220 nm、250 nm、280 nm)下均未能检出或峰面积太小,未达到含量测定的要求。在测定黄芪甲苷过程中,样品处理时需正丁醇萃取,氨试液洗,且需采用蒸发光散射检测器检测,不能与其他成分同时处理与分析,因此本研究暂未将其作为指标成分。

毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素为黄芪中的重要成分,具有抗氧化、抗衰老、抗糖尿病、免疫调节等作用<sup>[14-16]</sup>。芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷来自黄蜀葵花,对肾炎、心肌损伤、脑缺血损伤等具有较好的治疗效果<sup>[17-20]</sup>。二苯乙烯苷类为制何首乌中主要成分,具有良好的抗氧化特性<sup>[21-24]</sup>。以上各成分的作用均与芪葵方的临床疗效一致,且可用HPLC法同时测定,因此本研究确定毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芦丁、金丝桃苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、异槲皮苷、棉花皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素作为芪葵方基准样品的指标成分。

3.2 HPLC分析方法的建立 指纹图谱建立时,本研究通过全波长扫描观察各成分的整体分离情况,最终选择280 nm作为检测波长。该波长下信号峰较多,基线稳定性强,且各组分分离度良好。流动相为乙腈-0.1%磷酸系统。该系统可抑制黄酮类酚羟基的电离,改善拖尾,使其峰形更对称<sup>[25-26]</sup>。本研

究采用Agilent Poroshell 120,EC-C<sub>18</sub>色谱柱(250.0 mm×4.6 mm, 4.0  $\mu$ m),填料粒径为4  $\mu$ m,柱效高,分离效果好,可实现金丝桃苷、二苯乙烯苷、异槲皮苷3个极性相似成分的有效分离。

3.3 基准样品的质量评价 本研究制备了15批芪葵方基准样品,并构建指纹图谱,结果标定了24个共有峰(相似度良好),指认了8个指标性成分。15批基准样品的干浸膏得率未出现离散数据,8个指标性成分也未出现离散数据。该基准样品的制备工艺稳定可行,干浸膏得率及指标成分含量的范围可作为后续制剂工艺研究的参照。

4 结 论

芪葵方基准样品质量稳定性、可靠性和一致性良好,且质量评价方法科学、稳定,可重复。课题组后续将以其为依据进行制剂工艺优选及全过程质量控制研究。以临床用基准样品为参照开发医疗机构制剂,可确保制剂与临床所用汤剂的一致性,进一步提升医疗机构制剂临床疗效的稳定性与安全性。

参考文献

[1] 严倩华,盛梅笑,余江毅,等.芪葵颗粒对早期糖尿病肾病患者微量白蛋白尿及病情进展的影响[J].中国中西医结合杂志,2018,38(4):430-434.

[2] 贾佳.芪葵颗粒调节1型糖尿病Th17/Treg平衡的实验研究及T1DM临床证型的横断面分析[D].南京:南京中医药大学,2021.

[3] 张舒.芪葵颗粒对糖尿病肾病足细胞相关蛋白影响的临床观察及实验研究[D].南京:南京中医药大学,2017.

[4] 张子祺,陶慧桦,谭莹,等.芪葵颗粒联合代谢控制治疗气阴两虚、湿瘀阻络型糖尿病肾病有效性及安全性Meta分析[J].实用中医内科杂志,2022,36(12):5-8,161-163.

[5] 熊晓妹,吴欢欢,黄怡,等.古代经典名方中药复方制剂概述与开发初探[J].亚太传统医药,2024,20(12):6-11.

[6] 马兴艳,石慧,杨周洁,等.经典名方薏苡附子败酱散的基准样品量值传递研究[J].中草药,2025,56(1):108-120.

[7] 但济修,李淞明,詹常森.百合地黄汤基准样品HPLC特征图谱建立及其指标成分含量测定[J].中成药,2024,46(4):1279-1283.

[8] 国家中医药管理局.国家中医药管理局关于发布《古代经典名方目录(第一批)》的通知[EB/OL].(2018-04-16)[2025-02-08].<http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.

[9] 马启凤,张淼,王艺霏,等.经典方剂大青龙汤物质基准量值传递分析[J].药物分析杂志,2024,44(11):1863-1874.

[10] 王龙,闫子轩,杨应莲,等.半夏厚朴汤基准样品量值传递研究[J].分析测试学报,2024,43(11):1774-1783.

[11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2020.

[12] 国家中医药管理局、卫生部关于印发医疗机构中药煎药室管理规范的通知(国中医药发〔2009〕3号)[J].中华人民共和国卫生部公报,2009(6):29-31.

[13] 国家药监局药审中心.关于发布《按古代经典名方目录管

- 理的中药复方制剂药学研究技术指导原则(试行)》的公告[EB/OL].(2021-08-27)[2025-02-08].<https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/1c18dd163e7c9221786e5469889367d0>.
- [14] 王祯,张俊令,焦宏基,等.黄芪有效成分的药理作用与质量控制研究进展[J].药物评价研究,2023,46(4):917-924.
- [15] 陈翔,丘余良.浅析黄芪在糖尿病肾脏病治疗中的作用[J].江西中医药,2024,55(11):77-80.
- [16] 王丹阳,冯毅晖,潘加豪,等.黄芪的主要化学成分及药理作用[J].新农人,2024(24):126-128.
- [17] 孙增红,张莎,王丽娃,等.黄蜀葵花提取物中总黄酮与总多酚含量测定及体外抑菌与抗氧化活性研究[J].化学与生物工程,2024,41(2):26-32.
- [18] 钟菲菲,李静,雷德卿,等.HPLC法同时测定湘莲中芦丁、金丝桃苷及槲皮素含量[J].食品与机械,2023,39(9):57-64.
- [19] 余淑惠,费文婷,梁唯灿,等.高效液相色谱法测定臻源胶囊中金丝桃苷和五味子醇甲含量[J].吉林中医药,2023,43(8):957-960.
- [20] 关诗涵,刘畅,颜晓桐,等.黄蜀葵花化学成分、药理活性研究进展及质量标志物的预测分析[J].中国中药杂志,2025,50(4):908-921.
- [21] 王卓,钟凌云,解杨,等.基于“生熟异用”何首乌的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J].中草药,2022,53(3):882-897.
- [22] 张鹏,许煜迪,周萍,等.基于血浆代谢组学研究何首乌改善小鼠肾虚的作用机制[J].药学学报,2023,58(6):1464-1474.
- [23] 苑天彤,姜雪,李雪,等.何首乌提取物二苯乙烯苷对糖尿病肾病模型大鼠肾组织血管内皮生长因子干预研究[J].中华中医药学刊,2023,41(4):218-220,296-298.
- [24] 苑天彤,李雪,王宏杨.何首乌提取物二苯乙烯苷延缓糖尿病大鼠肾小球滤过率下降的实验研究[J].中国中西医结合肾病杂志,2023,24(1):17-20+96-97.
- [25] 刘洋,王睿,陈淑静,等.莲须HPLC指纹图谱建立及12种黄酮类成分的含量测定[J].中药材,2024,47(12):3060-3064.
- [26] 刘燕,张清华,郭小藤,等.HPLC法测定黄蜀葵花中7种黄酮类成分的含量[J].中国药师,2021,24(7):373-376.
- (收稿日期:2025-02-18 编辑:蒋凯彪)

- (上接第65页)Signaling pathway mediating myeloma cell growth and survival[J]. Cancers, 2021,13(2):216.
- [49] MARIE P J, HAÏ E, MODROWSKI D, et al. Cadherin-mediated cell-cell adhesion and signaling in the skeleton[J]. Calcif Tissue Int,2014,94(1):46-54.
- [50] ARAI F, OHNEDA O, MIYAMOTO T, et al. Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation[J]. J Exp Med,2002,195(12):1549-1563.
- [51] JIANG Z, QIAN J, DONG H Y, et al. The traditional Chinese medicine *Achyranthes bidentata* and our de novo conception of its metastatic chemoprevention: From phytochemistry to pharmacology[J]. Sci Rep,2017,7(1):3888.
- [52] TANG X, CHEN Y R, GU X S, et al. *Achyranthes bidentata* Blume extract promotes neuronal growth in

- cultured embryonic rat hippocampal neurons[J]. Prog Nat Sci, 2009,19(5):549-555.
- [53] LV M Y, CUI C L, CHEN P, et al. Identification of osteoporosis markers through bioinformatic functional analysis of serum proteome[J]. Medicine,2020,99(39):e22172.
- [54] TENG Z W, XIE X G, ZHU Y, et al. miR-142-5p in bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes osteoporosis involving targeting adhesion molecule VCAM-1 and inhibiting cell migration[J]. BioMed Res Int, 2018,2018(1):3274641.
- [55] SHEN X J, GUO Y H, YU J J, et al. miRNA-202 in bone marrow stromal cells affects the growth and adhesion of multiple myeloma cells by regulating B cell-activating factor[J]. Clin Exp Med,2016,16(3):307-316.

(收稿日期:2024-12-24 编辑:罗英姣)