

2021, 41(5): 442-446.

参酮II<sub>A</sub>、隐丹参酮、丹参酮I、二氢丹参酮I的含量[J].

[25] 李倩, 刘伟, 罗祖良, 等. 一测多评法测定丹参中丹

中国中药杂志, 2012, 37(6): 824-828.

## 山楂配方颗粒 UPLC 特征图谱建立及绿原酸含量测定

张方丽<sup>1</sup>, 刘龙婵<sup>1</sup>, 王煜<sup>1</sup>, 李林楠<sup>1,2</sup>, 杨莉<sup>1,2\*</sup>, 王峥涛<sup>1,2\*</sup>

(1. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 国家中医药管理局中药新资源与质量评价重点实验室, 上海 201203; 2. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203)

**摘要:** 目的 建立山楂配方颗粒 UPLC 特征图谱, 并测定绿原酸含量。方法 分析采用 Waters ACQUITY UPLC HSS C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相乙腈-水 (含 0.1% 甲酸), 梯度洗脱; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 35 °C; 检测波长 325 nm。结果 14 批样品特征图谱中有 6 个特征峰。绿原酸在 0.781 25~200 μg/mL 范围内线性关系良好 ( $R^2=0.999\ 8$ ), 平均加样回收率为 95.86%, RSD 为 2.36%。结论 该方法简便、重复性好, 明显优于国家药品监督管理局发布的山里红配方颗粒分析方法, 现已作为《上海市中药配方颗粒标准》发布实行。

**关键词:** 山楂; 配方颗粒; UPLC 特征图谱; 绿原酸; 含量测定

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)09-3068-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.09.036

山楂为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 或山楂 *C. pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实<sup>[1]</sup>, 始载于《新修本草》, 功效为消食健胃、行气散瘀、化浊降脂<sup>[2]</sup>, 主要含有酚酸、黄酮、三萜等成分<sup>[3-4]</sup>。山楂酚酸及黄酮类成分具有抗氧化、抗炎、降脂、抗动脉粥样硬化等作用, 并可作为质量评价指标<sup>[5-12]</sup>。中药配方颗粒是由单味中药饮片经水提、分离、浓缩、干燥、制粒而成, 供中医临床配方使用, 具有剂量准确、免煎煮、服用方便、质量稳定可控等优点<sup>[13-14]</sup>。该剂型质量与药材基原、饮片炮制、制备工艺等因素密切相关, 为确保其质量稳定可控, 亟需建立科学、先进、适用的质量标准, 特别是能够表征水溶性成分的特征图谱分析与含量测定方法, 以期实现配方颗粒整体质量控制<sup>[14-22]</sup>。

目前, 山楂配方颗粒国家标准仅有山里红 *C. pinnatifida* var. *major* (山楂基原之一), 其特征图谱分析时间长, 基线不平, 含量测定以有机酸 (枸橼酸) 为指标成分, 采用酸碱滴定法, 操作繁琐, 专属性、准确度、重复性均不理想。本实验以山楂 *C. pinnatifida* (山楂另一基原) 为对象, 建立基于同一色谱条件的 UPLC 特征图谱及以绿原酸为指标成分的含量测定方法, 并应用于不同厂家山楂配方颗粒的质量评价。

### 1 材料

Agilent 1290 Infinity II 超高效液相色谱仪 (美国 Agilent

公司); BSA124SCW、BSA323S 电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); SCQ-5201 数控超声波清洗器 (上海声彦超声波仪器有限公司); ACQUITY UPLC HSS C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) (美国 Waters 公司)。

乙腈 (色谱纯, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 甲酸 (色谱纯, 上海麦克林生化科技有限公司); 甲醇 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 水为超纯水, 由 Milli-Q 超纯水仪制备 (美国 Millipore 公司)。

绿原酸对照品 (批号 110753-202018, 纯度 96.7%) 购自中国食品药品检定研究院; 新绿原酸 (批号 3209, 纯度 ≥98%)、隐绿原酸 (批号 3208, 纯度 ≥98%)、金丝桃苷 (批号 8551, 纯度 95.4%)、异槲皮苷 (批号 5835, 纯度 95.2%) 对照品均购自上海诗丹德标准技术服务有限公司; 5-羟甲基糠醛对照品由上海中药标准化研究中心提供。山楂配方颗粒共 14 批, 信息见表 1。

### 2 方法与结果

#### 2.1 UPLC 特征图谱建立

2.1.1 色谱条件 ACQUITY UPLC HSS C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相乙腈 (A)-水 (含 0.1% 甲酸, B), 梯度洗脱 (0~2 min, 5% A; 2~5 min, 5%~10% A; 5~10 min, 10% A; 10~12 min, 10%~14% A; 12~15 min, 14%~18% A; 15~20 min, 18% A); 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 35 °C; 检测波长 325 nm; 进样量 3 μL。

收稿日期: 2023-09-05

基金项目: 上海市科技成果转化与产业化项目 (17DZ1920100)

作者简介: 张方丽 (1998—), 女, 硕士生, 从事中药药效物质基础及质量标准研究。E-mail: fanglizhang2020@163.com

\* 通信作者: 杨莉 (1978—), 女, 博士, 研究员, 从事中药药效物质基础及质量标准研究。E-mail: yl7@shutcm.edu.cn

王峥涛 (1956—), 男, 博士, 教授, 从事中药药效物质基础及质量标准研究。E-mail: ztwang@shutcm.edu.cn

表1 山楂配方颗粒信息

编号	批号	来源	颗粒与饮片比例
S1	YC20210223-1	厂家A	1:1.8
S2	YC20210223-2	厂家A	1:1.8
S3	YC20210223-3	厂家A	1:1.8
S4	YC20210223-4	厂家A	1:1.8
S5	YC20210223-5	厂家A	1:1.8
S6	YC20210223-6	厂家A	1:1.8
S7	YC20210223-7	厂家A	1:1.8
S8	YC20210223-8	厂家A	1:1.8
S9	YC20210223-9	厂家A	1:1.8
S10	YC20210223-10	厂家A	1:1.8
S11	20210417	厂家B	3:10
S12	20210511	厂家B	3:10
S13	20210514	厂家C	1:7
S14	20210513	厂家D	1:10

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、5-羟甲基糠醛对照品适量，置于量瓶中，50%甲醇溶解并定容至刻度，即得，4℃冷藏。

2.1.3 供试品溶液制备 精密称取配方颗粒1g，置于具塞锥形瓶中，加入25mL 50%甲醇，称定质量，超声处理15min，放冷，50%甲醇补足减失的质量，摇匀，离心5min，取上清液，即得。

2.1.4 精密度试验 取“2.1.3”项下同一供试品溶液适量，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定6次，以绿原酸为参照，测得各共有峰相对保留时间、相对峰面积RSD分别为0.03%~0.11%、0.42%~2.36%，表明仪器精密度良好。

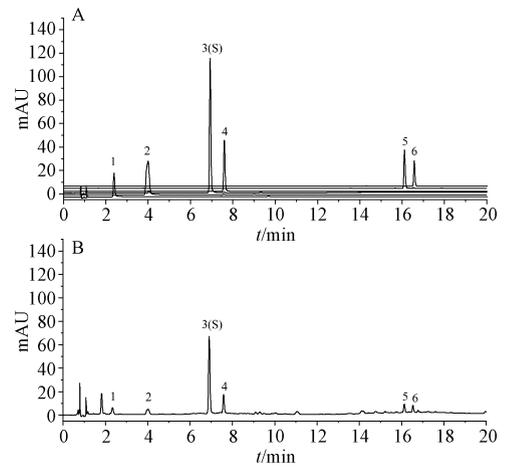
2.1.5 重复性试验 取本品6份(编号S1)，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，以绿原酸为参照，测得各共有峰相对保留时间、相对峰面积RSD分别为0.03%~0.09%、0.61%~2.19%，表明该方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 取“2.1.3”项下同一供试品溶液适量，于0、2、4、6、8、12、24、48h在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，以绿原酸为参照，测得各共有峰相对保留时间、相对峰面积RSD分别为0.08%~0.56%、0.44%~2.64%，表明溶液在48h内稳定性较好。

2.1.7 图谱生成 取14批样品，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，根据对照品溶液、色谱峰出峰时间及紫外光谱(UV)图进行特征峰指认(图1A)，采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)进行多点校正，选择中位数法实现自动匹配，生成对照特征图谱(图1B)，同时得到14批样品特征图谱(图2)，并选取6个色谱峰作为共有峰，其重复性和分离度均较好。山楂配方颗粒以水煎煮方式制备，所提取的成分以水溶性成分为主，其中绿原酸峰面积较大，基线平稳，分离度大于1.5，故选择其作为参照峰(S)，要求其5个特征峰与其相对保留时间应在规定值的±10%范围内，规定值分别为0.34(峰1)、0.58(峰2)、1.10

(峰4)、2.33(峰5)、2.39(峰6)。

按照国家标准色谱条件所得的特征图谱见图3，可知本实验所建立的特征图谱可在20min内完成分析，时间缩短了1/3，特征峰数目增多，各特征峰色谱峰分离度更佳，基线更平稳，图谱更美观。



1. 5-羟甲基糠醛 2. 新绿原酸 3. 绿原酸(S) 4. 隐绿原酸  
5. 金丝桃苷 6. 异槲皮苷

图1 对照品(A)、山楂配方颗粒对照(B)特征图谱

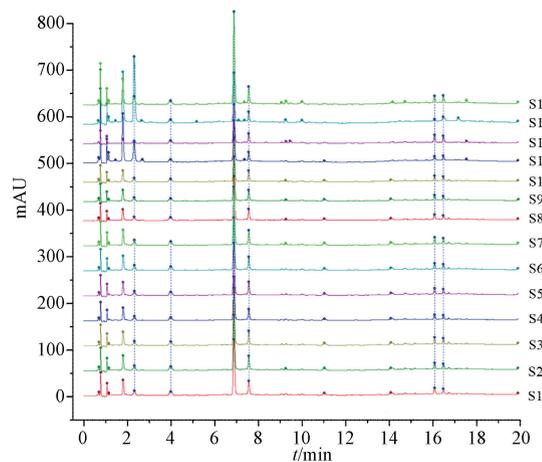
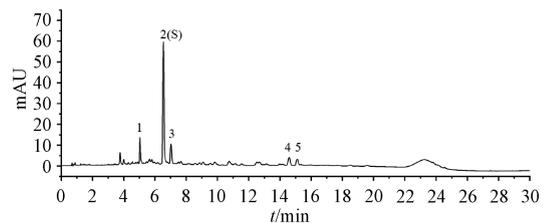


图2 14批山楂配方颗粒特征图谱



1. 新绿原酸 2. 绿原酸(S) 3. 隐绿原酸 4. 金丝桃苷 5. 异槲皮苷

图3 山楂配方颗粒特征图谱(国家标准)

2.1.8 相似度分析 表2显示，厂家A的10批样品相似度在0.990~0.993之间，厂家B的2批样品相似度在0.959~0.983之间，厂家C的1批样品相似度为0.989，厂家D的1批样品相似度为0.738，表明不同厂家样品中成

分含量存在很大差异。其中，厂家A的10批样品的成分一致性较好，表明其制备工艺稳定可控，饮片原料质量均一性有保证。不同生产厂家的样品中成分差异较大，可能是由饮片来源（基原、产地、炮制工艺等）、制备工艺中质量控制要点（特别是浓缩颗粒与辅料配比、颗粒饮片比值）等因素所致。

表2 14批山楂配方颗粒相似度

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
相似度	0.992	0.992	0.990	0.993	0.991	0.993	0.992
编号	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14
相似度	0.991	0.991	0.991	0.959	0.983	0.989	0.738

2.1.9 特征图谱比较 在中药配方颗粒生产的全过程中，原料药（包括中药材及其饮片）、中间体（标准汤剂）及制剂（中药配方颗粒）应符合质量一致性原则，各自特征图谱需具备关联性。如图4所示，饮片、标准汤剂及配方颗粒特征图谱均有6个已指认的特征峰，为山楂重要有效成分，其具有一定的相关性和一致性，也可通过三者特征图谱来反映配方颗粒加工制备工艺是否稳定可控。

另外，5-羟甲基糠醛在饮片、标准汤剂、配方颗粒之间的转化十分明显；多糖经高温提取后发生不同程度的美拉德反应。在特征图谱18~19 min处可观察到标准汤剂、配方颗粒与饮片相比少了2个色谱峰，可能是由于配方颗粒制备方式为水煎煮提取，导致饮片中的脂溶性成分未被充分提取。综上所述，不同来源饮片与制备工艺均会对配方颗粒质量产生重要影响，是配方颗粒质量控制的关键因素。

2.2.5 精密度试验 精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液（25 μg/mL）适量，在“2.1.1”项下色谱条件下进样测定6次，测得绿原酸峰面积RSD为0.39%，表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取配方颗粒（编号S1）适量，按“2.2.3”项方法平行制备6份供试品溶液，在“2.1.1”项下色谱条件下进样测定，测得绿原酸峰面积RSD为2.94%，表明该方法重复性较好。

2.2.7 稳定性试验 精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液适量，于0、2、4、6、8、12、24、48 h在“2.1.1”项下色谱条件下进样测定，测得绿原酸峰面积RSD为0.63%，表明溶液在48 h内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取配方颗粒样品约0.5 g，精密称定，分别按50%、100%、150%水平精密加入对照品溶液适量，按“2.2.3”项下方法平行制备3份供试品溶液，在“2.1.1”项下色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，绿原酸平均加样回收率为95.86%，RSD为2.36%。

2.2.9 样品含量测定 取14批样品，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，计算含量，结果见表3。

表3 绿原酸含量测定结果 (n=2)

编号	含量/(mg·g <sup>-1</sup> )
S1	0.279
S2	0.278
S3	0.284
S4	0.266
S5	0.273
S6	0.275
S7	0.291
S8	0.287
S9	0.283
S10	0.289
S11	0.261
S12	0.634
S13	0.327
S14	0.222

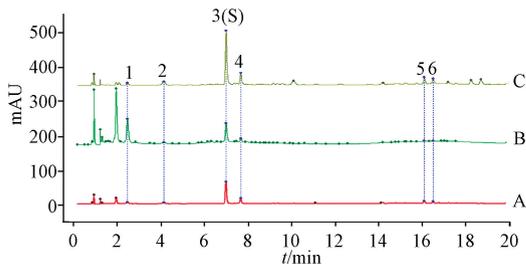


图4 山楂配方颗粒(A)、标准汤剂(B)、饮片(C) UPLC特征图谱

## 2.2 绿原酸含量测定

2.2.1 色谱条件 同“2.1.1”项。

2.2.2 对照品溶液制备 同“2.1.2”项（每1 mL含0.2 mg绿原酸）。

2.2.3 供试品溶液制备 同“2.1.3”项。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液适量，50%甲醇依次稀释至200、100、50、25、12.5、6.25、3.125 μg/mL，在“2.1.1”项下色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标(X)，峰面积为纵坐标(Y)进行回归，得方程为 $Y = 28.219X + 10.539$  ( $R^2 = 0.9998$ )，可知绿原酸在0.78125~200 μg/mL范围内线性关系良好，定量限为2.54 ng/mL，检测限为0.77 ng/mL。

## 3 讨论

3.1 指标成分选择 绿原酸具有抗炎、抗氧化、降血脂等作用，与山楂的传统功效一致。结合前期实验结果和文献报道，发现山楂饮片中绿原酸含量较高，而在山楂配方颗粒特征图谱中绿原酸的峰面积远高于其他5个成分。基于以上因素，最终选择采用与特征图谱相同的色谱条件，以绿原酸为指标成分进行含量测定。

3.2 供试品溶液制备考察 依次考察了提取溶剂（水和25%、50%、75%甲醇）、提取方式（超声处理和加热回流提取）、料液比（1:10、1:25、1:50）、提取时间（15、30、60 min）对山楂配方颗粒中化学成分提取效果的影响。从色谱图的峰数目、峰面积以及峰形3个维度评价，结果采用50%甲醇作为溶剂，料液比1:25，超声提取15 min

时, 山楂配方颗粒中酚酸类及黄酮类成分的提取效果最佳。  
3.3 色谱条件优化 选择检测波长 230、260、315、325 nm 进行分析, 以山楂颗粒特征峰的分离能力和峰容量作为主要评价参数。结果, 在 325 nm 波长处, 山楂配方颗粒特征图谱的峰容量最大, 各色谱峰峰形较好, 色谱图基线平稳, 同时指标性成分绿原酸具有最大紫外吸收。此外还完成了耐用性考察, 比较了不同类型流动相、不同品牌和填料的色谱柱、不同柱温、不同流速等, 确定了最佳色谱条件, 方法的耐用性良好。

#### 4 结论

本实验建立了山楂配方颗粒 UPLC 特征图谱, 共指认了 6 个特征峰, 利用特征图谱直观反映其配方颗粒的整体质量, 并选取指标成分进行含量测定, 为山楂 (*C. pinnatifida*) 配方颗粒质量标准的建立提供数据支撑。与国家药品监督管理局所发布的山楂 (*C. pinnatifida. var. major*) 配方颗粒质量标准相比, 本实验建立的分析方法图谱基线平稳, 仅 20 min 即可完成, 分析时间节约了三分之一。采用与特征图谱相同色谱条件对绿原酸进行含量测定, 指标成分选择更为合理, 测定方法更为精确和准确。

应用所建立的方法完成了 14 批不同生产厂家样品的分析, 其特征图谱相似度分析结果和含量测定结果表明来自不同生产厂家的山楂配方颗粒样品存在较大差异, 可将该方法用于评估山楂配方颗粒的质量。此外, 为确保配方颗粒来源可控、溯源清楚、质量稳定可靠, 建议生产厂家固定药材饮片的基原、产地, 以加强对中药材、中药饮片质量的控制, 并重视配方颗粒生产加工工艺中各关键要点的管控与把握, 以保证配方颗粒质量均一、疗效稳定。

#### 参考文献:

[ 1 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 33.  
[ 2 ] 程铭恩, 彭华胜. 古今山楂品种来源与应用沿革[J]. 中华医史杂志, 2011(6): 336-338.  
[ 3 ] 董嘉琪, 陈金鹏, 龚苏晓, 等. 山楂的化学成分、药理作用及质量标志物 (Q-Marker) 预测[J]. 中草药, 2021, 52(9): 2801-2818.  
[ 4 ] 张祺嘉钰, 赵佩媛, 孙 静, 等. 山楂的化学成分及药理作用研究进展[J]. 西北药学杂志, 2021, 36(3): 521-523.  
[ 5 ] 贾银芝, 吴 琦, 杨绪芳, 等. 基于灰色关联-TOPSIS 法评价不同产地山楂质量[J]. 中草药, 2021, 52(23): 7317-7322.

[ 6 ] 封若雨, 朱新宇, 张苗苗. 近五年山楂药理作用研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(5): 715-718.  
[ 7 ] 王庆华, 杜婷婷, 张智慧, 等. 绿原酸的药理作用及机制研究进展[J]. 药学学报, 2020, 55(10): 2273-2280.  
[ 8 ] 谢伟华, 孙 超, 刘淑敏. 山楂黄酮对高脂血模型小鼠血脂及生脂基因转录表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(2): 224-229.  
[ 9 ] 胡慧明, 吴茂兰, 翁家俊, 等. 山楂及其方药抗动脉粥样硬化作用及机制研究进展[J]. 江西中医药大学学报, 2023, 35(1): 119-124.  
[ 10 ] 王紫馨, 李怡然, 姜瑞文, 等. 山楂饮片及炮制品的 HPLC 特征图谱研究[J]. 中药与临床, 2020, 11(2): 22-26; 39.  
[ 11 ] 赵 博, 田恒康, 孙道涵, 等. 基于酚类特征图谱的山楂质量表征关联分析研究[J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(8): 684-692.  
[ 12 ] 段丽颖, 任欠欠, 杜义龙, 等. 山楂叶质量评价研究[J]. 中成药, 2023, 45(2): 393-398.  
[ 13 ] 温雅心, 董 玲, 杨 丽, 等. 中药配方颗粒的发展现状及国际化对策探讨[J]. 中国现代中药, 2021, 23(8): 1319-1325.  
[ 14 ] 董力嘉, 傅 舒. 中药配方颗粒现状研究[J]. 中药与临床, 2021, 12(4): 85-89.  
[ 15 ] 李 婵, 安 毅, 崔 波, 等. 鸡骨草配方颗粒 HPLC 特征图谱建立及相思子碱测定[J]. 中成药, 2022, 44(12): 3968-3972.  
[ 16 ] 李远辉, 李慧婷, 李延年, 等. 高品质中药配方颗粒与关键制造要素[J]. 中草药, 2017, 48(16): 3259-3266.  
[ 17 ] 路 露, 施钧瀚, 张 迪, 等. 196 种中药配方颗粒国家药品标准的主要特点分析及实践探讨[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(16): 4536-4544.  
[ 18 ] 郭东晓, 于姗姗, 郭衍珩, 等. 中药配方颗粒标准制定技术问题和对策分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(17): 188-194.  
[ 19 ] 郝 磊, 孙福仁, 高 晗, 等. 山楂标准汤剂的 HPLC 特征图谱研究[J]. 河北工业科技, 2019, 36(6): 422-428.  
[ 20 ] 王子怡, 李艳荣, 杜义龙, 等. 山楂叶标准汤剂 HPLC 指纹图谱建立及 5 种成分测定[J]. 中成药, 2020, 42(8): 2079-2083.  
[ 21 ] 白 婧, 石燕红, 杨 莉, 等. 制半夏配方颗粒质量评价[J]. 中成药, 2023, 45(3): 729-733.  
[ 22 ] 王 煜, 鞠政财, 张 婷, 等. 超高效液相色谱双内参法同时测定白茅根配方颗粒中六种有效成分[J]. 药学学报, 2022, 57(2): 467-473.