

[科研报道]

圆柏不同物种中 6 种成分含量比较

王亚倩¹, 丁 银², 张 琨², 苟晓玲¹, 王 悦¹, 刘景焯¹, 张 静², 范 刚^{2*}

(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137; 2. 成都中医药大学民族医药学院, 四川 成都 611137)

摘要: **目的** 比较祁连圆柏、香柏、滇藏方枝柏、高山柏、大果圆柏中 methylsyringin、槲皮苷、柏木双黄酮、穗花杉双黄酮、竹柏双黄酮 A、扁柏双黄酮的含量。**方法** HPLC 含量测定采用 Chromplus[®] C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水 (含 0.2% 磷酸), 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 270 nm。采用单因素方差分析和 Tukey's 多重比较考察成分差异。**结果** 6 种成分在各自范围内线性关系良好 ($r>0.9995$), 平均加样回收率 96.50%~103.23%, RSD 0.25%~1.99%。不同物种中各成分含量具有显著性差异 ($P<0.05$), 其中大果圆柏中 methylsyringin 含量更高, 祁连圆柏中槲皮苷含量更高, 滇藏方枝柏中柏木双黄酮含量更高, 高山柏中穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮含量更高, 香柏中竹柏双黄酮 A 含量更高。**结论** 该方法简便准确, 可为圆柏不同物种的质量评价与控制提供参考。

关键词: 圆柏; 物种; 化学成分; 含量测定; HPLC

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)09-3059-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.09.034

圆柏为传统常用藏药材, 始载于《四部医典》^[1], 味苦、性凉, 具有清热解毒、干“黄水”的功效, 常用于治疗关节炎、肾炎、风湿等疾病^[2-4]。圆柏为典型的多基原药材, 课题组前期通过本草考证、资源调查和标本鉴定, 发现目前圆柏常用的物种包括滇藏方枝柏 *Juniperus indica*、香柏 *J. pingii* var. *wilsonii*、高山柏 *J. squamata*、祁连圆柏 *J. przewalskii* 和大果圆柏 *J. tibetica*, 而未见圆柏 *J. chinensis* 的商品药材^[4-5]。圆柏基原物种的复杂性会影响其质量控制和临床应用^[6], 因此研究不同物种的化学成分差异具有重要意义。

课题组前期采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对圆柏的化学成分进行了全面分析, 发现其主要含有槲皮苷、柏木双黄酮、穗花杉双黄酮等黄酮类成分^[7]。目前, 已有学者建立了 HPLC 法测定圆柏中槲皮苷、芦丁和山柰酚的含量^[8-9], 但对其他含量较高的黄酮类成分尚未进行定量分析, 难以全面表征药材的内在质量。本研究在前期定性分析的基础上, 首次建立了可同时测定圆柏 6 种化学成分 (methylsyringin、槲皮苷、柏木双黄酮、穗花杉双黄酮、竹柏双黄酮 A、扁柏双黄酮) 含量的 HPLC 方法, 并比较 6 种化学成分在不同物种中含量的差异, 可为圆柏的质量评价与控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器 BP121S 电子天平 [十万分之一, 赛多利斯科

学仪器 (北京) 有限公司]; Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); SB-4200DTD 超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); ULUP-I-10T 优普超纯水机 (成都超纯科技有限公司);

1.2 试剂与药物 methylsyringin (批号 DST202020-044)、槲皮苷 (批号 DST230310-006)、扁柏双黄酮 (批号 DSTDB009901)、柏木双黄酮 (批号 DST202010-002)、竹柏双黄酮 A (批号 DST210825-053)、穗花杉双黄酮 (批号 DST211029-046) 对照品均购自成都德思特生物技术有限公司, 纯度 $\geq 98\%$ 。乙腈为色谱纯 (美国 Sigma 公司); 甲醇为分析纯, 磷酸为色谱纯 (成都市科隆化学品有限公司); 水为超纯水。

圆柏共 43 批, 经重庆市中药研究院秦松云副研究员鉴定分别为柏科植物祁连圆柏 *J. przewalskii*、香柏 *J. pingii* var. *wilsonii*、滇藏方枝柏 *J. indica*、高山柏 *J. squamata*、大果圆柏 *J. tibetica* 干燥带叶短枝, 药材信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Chromplus[®] C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A) -水 (含 0.2% 磷酸) (B), 梯度洗脱 (0~5 min, 16%~25% A; 5~15 min, 25%~30% A; 15~25 min, 30%~50% A; 25~35 min, 50%~60% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 270 nm; 进样量 10 μL。

收稿日期: 2024-04-11

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2023YFC3504403); 四川省重点研发计划项目 (2022YFS0434)

作者简介: 王亚倩 (1999—), 女, 硕士生, 从事中药及民族药质量评价研究。Tel: (028) 61656141, E-mail: wangyaqian090@163.com

* 通信作者: 范 刚 (1983—), 男, 博士, 教授, 从事民族药质量控制及药效物质基础研究。Tel: (028) 61656141, E-mail: fangang1111@163.com

表1 圆柏不同物种信息

编号	基原	采集地
DZ-01	滇藏方枝柏	四川省甘孜州德格县柯洛洞乡
DZ-02	滇藏方枝柏	四川省甘孜州理塘县兔儿山
DZ-03	滇藏方枝柏	西藏国际藏中药材交易城
DZ-04	滇藏方枝柏	西藏自治区北草地药材药材开发有限公司
DZ-05	滇藏方枝柏	西藏自治区林芝市藏医院
DZ-06	滇藏方枝柏	四川省甘孜州道孚县孔色乡
DZ-07	滇藏方枝柏	四川省甘孜州得荣县中藏医院
DZ-08	滇藏方枝柏	云南省迪庆州德钦县升平镇
DZ-09	滇藏方枝柏	西藏自治区睿俊芳生物科技发展有限公司
DZ-10	滇藏方枝柏	西藏自治区林芝县鲁朗镇
DZ-11	滇藏方枝柏	西藏自治区山南雍布拉康藏药厂
XB-01	香柏	四川省甘孜州得荣县中藏医院
XB-02	香柏	云南省迪庆藏族自治州藏医院
XB-03	香柏	四川省成都市国际贸易城中药材市场(6-1-0725)
XB-04	香柏	四川省成都市国际贸易城中药材市场(6-1-1158)
XB-05	香柏	西藏自治区拉萨农产品质量监督检验测试中心
XB-06	香柏	西藏藏医药大学附属医院
XB-07	香柏	西藏自治区国际藏中药材交易城
XB-08	香柏	青海省果洛州藏医医院
XB-09	香柏	四川省甘孜藏族自治州康定市康定机场
XB-10	香柏	四川省甘孜藏族自治州康定市加呷腊
GS-01	高山柏	青海省海南州贵南县
GS-02	高山柏	青海省海东市互助土族自治县
GS-03	高山柏	青海省藏医院
GS-04	高山柏	四川省成都市国际贸易城中药材市场(6-1-1158)
GS-05	高山柏	青海省黄南州泽库县藏医院
GS-06	高山柏	青海省三智商贸有限公司药材市场
GS-07	高山柏	云南省白马雪山纳帕海景区 G214 道旁
GS-08	高山柏	四川省甘孜州理塘县
GS-09	高山柏	四川省康定市高尔寺山
QL-01	祁连圆柏	四川省阿坝州马尔康市梦笔山
QL-02	祁连圆柏	四川省阿坝州小金县达维乡
QL-03	祁连圆柏	青海省果洛州藏医医院
QL-04	祁连圆柏	青海省果洛州玛沁县拉加镇
QL-05	祁连圆柏	青海省黄南州泽库县雄让村
QL-06	祁连圆柏	青海省黄南州泽库县麦秀镇
DG-01	大果圆柏	西藏自治区那曲地区藏药厂
DG-02	大果圆柏	西藏自治区山南地区
DG-03	大果圆柏	四川省成都市国际贸易城中药材市场(6-1-0725)
DG-04	大果圆柏	青海省称多县藏医院
DG-05	大果圆柏	西藏自治区山南市雪源药材有限公司
DG-06	大果圆柏	西藏藏医学院藏药有限公司
DG-07	大果圆柏	西藏贝珠雅药业有限公司

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取各对照品适量，甲醇制成每1 mL 分别含 methylsyringin 0.182 8 mg、榲皮苷 0.172 4 mg、柏木双黄酮 0.171 2 mg、穗花杉双黄酮 0.224 4 mg、竹柏双黄酮 A 0.027 2 mg、扁柏双黄酮 0.119 6 mg 的溶液，摇匀，即得。

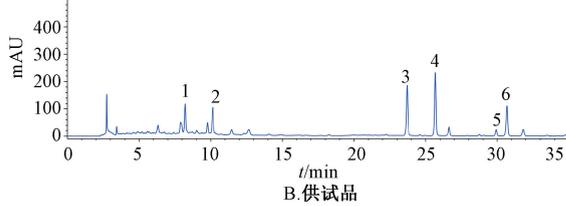
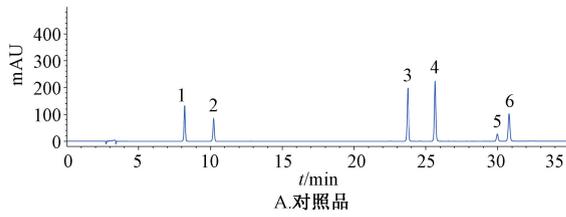
2.2.2 供试品溶液 取药材粉末（过3号筛）约1.0 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入40 mL 甲醇，称定质量，超声（功率250 W，频率40 kHz）提取30 min，冷却至室温，甲醇补足减失的质量，摇匀，过滤，取续滤

液，过0.22 μm 微孔滤膜，即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性考察 精密吸取对照品、供试品溶液适量，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图1。由此可知，各成分色谱峰保留时间一致，表明该方法专属性良好。

2.3.2 线性关系考察 取“2.2.1”项下对照品溶液适量，稀释得到系列质量浓度，在“2.1”项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，结果见表2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。



1. methylsyringin 2. 槲皮苷 3. 柏木双黄酮 4. 穗花杉双黄酮 5. 竹柏双黄酮 A 6. 扁柏双黄酮

图1 各成分HPLC色谱图

表2 各成分线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
methylsyringin	$Y=21\ 412X-103.63$	0.999 6	9.14~182.80
槲皮苷	$Y=18\ 127X-86.74$	0.999 6	8.62~172.40
柏木双黄酮	$Y=40\ 371X-248.58$	0.999 5	8.56~171.20
穗花杉双黄酮	$Y=34\ 810X-352.70$	0.999 5	11.22~224.40
竹柏双黄酮 A	$Y=40\ 161X-45.10$	0.999 5	1.36~27.20
扁柏双黄酮	$Y=36\ 944X-182.78$	0.999 5	5.98~119.60

2.3.3 精密度试验 取药材(编号XB-04)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定6次,测得methylsyningin、槲皮苷、柏木双黄酮、穗花杉双黄酮、竹柏双黄酮A、扁柏双黄酮含量RSD分别为0.36%、0.29%、0.31%、0.34%、1.79%、0.42%,表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取药材(编号XB-04)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,于0、2、4、8、12、24 h在“2.1”项色谱条件下进样测定,测得methylsyningin、槲皮苷、柏木双黄酮、穗花杉双黄酮、竹柏双黄酮A、扁柏双黄酮含量RSD分别为1.15%、0.78%、0.56%、0.44%、2.43%、0.44%,表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 取药材(编号XB-04)6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,测得methylsyningin、槲皮苷、柏木双黄酮、穗花杉双黄酮、竹柏双黄酮A、扁柏双黄酮含量RSD分别为0.27%、0.29%、0.47%、0.24%、1.84%、0.53%,表明该方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取各成分含量已知的药材(编号XB-04)6份,每份0.5 g,按100%水平加入对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,计算回收率。结果,methylsyningin、槲皮苷、柏木双黄酮、穗花杉双黄酮、竹柏双黄酮A、扁柏双黄酮平均加样回收率分别为96.50%、100.03%、103.23%、

101.99%、101.02%、101.04%,RSD分别为0.25%、1.99%、0.79%、1.21%、0.81%、1.19%。

2.4 样品含量测定 分别精密称取不同批次药材1.0 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,计算含量,结果见表3。由此可知,柏木双黄酮含量最高,其次为槲皮苷,竹柏双黄酮A最低。

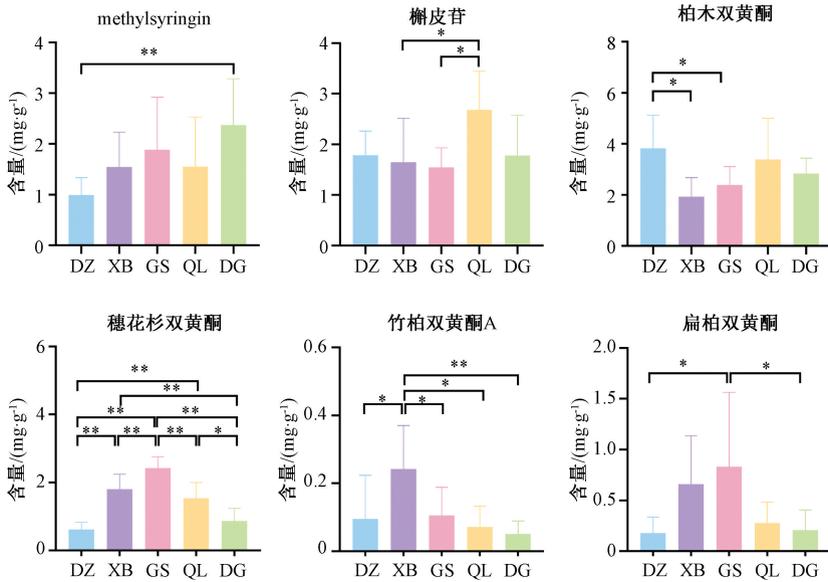
表3 各成分含量测定结果(mg/g, n=2)

编号	methylsyringin	槲皮苷	柏木双黄酮	穗花杉双黄酮	竹柏双黄酮 A	扁柏双黄酮
DZ-01	0.58	2.70	5.15	0.47	—	—
DZ-02	0.82	2.52	5.25	0.46	—	—
DZ-03	1.21	1.37	2.25	0.50	0.10	0.25
DZ-04	1.01	1.33	3.16	0.47	0.11	0.24
DZ-05	0.68	1.97	1.99	0.53	0.06	0.25
DZ-06	0.67	1.89	5.06	0.54	0.07	—
DZ-07	1.13	1.73	4.78	0.81	0.08	0.46
DZ-08	0.73	1.18	4.92	0.57	0.06	—
DZ-09	1.24	1.77	2.59	1.06	0.46	0.26
DZ-10	1.73	1.66	2.61	0.92	0.11	0.26
DZ-11	1.14	1.54	4.27	0.49	—	0.26
XB-01	1.13	0.67	1.52	1.57	0.38	0.45
XB-02	1.12	1.06	1.37	1.50	0.48	1.15
XB-03	1.22	1.37	1.17	2.00	0.29	1.25
XB-04	1.42	1.72	1.56	2.27	0.22	1.18
XB-05	0.99	0.90	2.68	1.72	0.33	0.41
XB-06	1.99	1.60	2.77	1.40	0.12	0.38
XB-07	2.15	2.04	2.92	1.27	0.22	0.35
XB-08	1.49	3.79	2.03	2.13	0.06	0.24
XB-09	0.88	1.77	0.81	1.55	0.17	1.19
XB-10	3.10	1.57	2.46	2.64	0.15	—
GS-01	3.48	1.19	2.34	2.07	—	0.35
GS-02	0.87	1.24	2.60	2.37	0.09	0.33
GS-03	1.54	1.42	2.97	2.51	0.18	0.42
GS-04	1.18	1.23	2.73	2.25	0.10	0.32
GS-05	1.44	1.56	3.47	3.01	0.10	0.38
GS-06	1.20	1.28	2.78	2.38	0.11	0.33
GS-07	1.28	2.32	1.36	2.01	0.27	1.42
GS-08	2.38	1.96	1.37	2.80	0.10	1.91
GS-09	3.63	1.69	1.89	2.46	—	2.02
QL-01	0.58	3.95	5.70	1.97	—	—
QL-02	0.42	2.81	1.50	0.85	0.13	0.64
QL-03	2.85	1.98	2.62	1.31	0.14	0.27
QL-04	1.43	1.99	5.03	2.12	—	0.24
QL-05	2.45	3.10	2.73	1.57	0.09	0.27
QL-06	1.60	2.26	2.77	1.40	0.07	0.24
DG-01	3.58	1.68	3.07	1.30	0.09	—
DG-02	2.11	1.37	3.20	0.86	0.06	0.36
DG-03	3.53	3.01	1.63	1.38	0.09	0.35
DG-04	1.22	1.15	3.19	0.46	—	—
DG-05	2.16	1.75	3.26	0.74	0.06	0.29
DG-06	2.49	2.67	2.47	0.89	0.06	0.45
DG-07	1.52	0.84	3.06	0.45	—	—
平均值	1.61	1.83	2.86	1.44	0.15	0.56

2.5 统计学分析 采用GraphPad Prism 8.0软件对各成分含量进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和Tukey's多

重比较,结果见图2。由此可知,各成分含量有显著性差异($P < 0.05$),其中大果圆柏中 methylsyringin 含量更高,祁连圆柏中槲皮苷含量更高,滇藏方枝柏中柏木双黄酮含量更

高,高山柏中穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮含量更高,香柏中竹柏双黄酮 A 含量更高。



注: DZ 为滇藏方枝柏, XB 为香柏, GS 为高山柏, QL 为祁连圆柏, DG 为大果圆柏; 组间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图2 各成分含量比较

3 讨论

本研究对3种提取方式(冷浸、回流、超声)、不同比例的2种溶剂(30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、甲醇、乙醇)、3种料液比(1:20、1:40、1:60)和4个提取时间(15、30、45、60 min)进行考察,最终确定提取条件为溶剂甲醇、料液比1:40、超声30 min。本研究还对流动相、检测波长、柱温等条件进行考察,结果发现流动相乙腈-水(含0.2%磷酸)、检测波长270 nm、柱温30℃时色谱峰分离效果最佳。

本研究首次建立了藏药圆柏中6种化学成分的HPLC含量测定方法,不仅操作简便,而且准确性和重现性较好,可为圆柏的质量评价与控制提供参考^[10]。结果表明,圆柏中 methylsyringin、槲皮苷、柏木双黄酮、穗花杉双黄酮、竹柏双黄酮 A、扁柏双黄酮的平均含量分别为 1.61、1.83、2.86、1.44、0.15、0.56 mg/g。现代药理学研究表明,槲皮苷具有抗炎、改善非酒精性脂肪肝大鼠肝纤维化、改善白内障活性^[11-12];穗花杉双黄酮具有消炎、抗纤维化、抗菌、抑制癌细胞增殖等活性^[13-14];柏木双黄酮对肝、肾具有保护作用^[15];methylsyringin 具有好的抗炎活性^[16];竹柏双黄酮 A 可改善肾纤维化^[17];扁柏双黄酮具有抗炎、抑制癌细胞增殖活性^[18-19]。这些药理活性与圆柏的功能主治基本一致,因此这6种成分可作为圆柏质量评价的指标。

藏药“一药多基原”现象十分突出,基原的复杂性严重影响药材质量的稳定性和可控性^[20]。因此,采用现代科学技术研究藏药不同物种的质量差异,对于藏药的质量控制和合理用药意义重大^[21]。课题组前期调查发现,目前圆柏的主流物种为滇藏方枝柏、香柏、高山柏、祁连圆柏和

大果圆柏。本研究采用 HPLC 法同时测定了5个物种中6种化学成分的含量,并比较了不同物种之间的差异,结果发现这5个物种的6种成分含量均存在明显差异。其中,穗花杉双黄酮在各物种之间的差异最显著,可作为种间差异标志物。此外,从含量测定结果来看,圆柏不同物种来源药材的质量可能存在一定的差异,因此在临床使用时要注意这5个物种的疗效等同性。今后应结合功能主治进一步评价不同物种的药效差异,可为圆柏的质量评价、控制和临床合理使用提供参考。

参考文献:

- [1] 宇妥·元丹贡布. 四部医典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1989:298.
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准:藏药第一册[S]. 北京:中华人民共和国卫生部,1995:341.
- [3] 四川省药品监督管理局. 四川省藏药材标准[S]. 成都:四川科学技术出版社,2020:178.
- [4] 赵程成,武鑫玥,彭芳,等. 圆柏本草考证及使用现状调查[J]. 中成药,2022,44(5):1680-1684.
- [5] 赵紫薇,赵程成,徐鑫梅,等. 藏药圆柏 HPLC 指纹图谱的建立及不同品种模式识别研究[J]. 中草药,2023,54(2):663-669.
- [6] 孙雪倩,杨彬,李遇伯. 多基原中药质量评价研究进展[J]. 中草药,2024,55(12):4214-4224.
- [7] 赵紫薇,彭芳,张琨,等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 代谢组学技术筛选不同基原圆柏品种鉴别的化学标志物[J]. 药学学报,2023,58(7):1880-1893.
- [8] 袁红群. 圆柏中槲皮苷的测定含量[J]. 抗感染药学,2015,

- 12(6): 818-820.
- [9] 徐旭坤, 武雪, 宋平顺, 等. HPLC同时测定藏族药圆柏和刺柏中3种黄酮类成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(13): 74-76.
- [10] 徐僮, 杜欢, 李琪, 等. HPLC法同时测定六味木香丸中4种成分[J]. 中成药, 2019, 41(10): 2315-2319.
- [11] 李芳, 陈华伟, 钟军华, 等. 槲皮苷对非酒精性脂肪肝大鼠肝纤维化和炎症作用研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(12): 1753-1757.
- [12] 黄国华, 杜倩, 韩道新, 等. 槲皮苷通过增强 Nrf2/HO-1 信号通路改善亚硒酸盐所致的大鼠白内障[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(3): 352-357.
- [13] 严海平, 余莲英, 陈小华, 等. 穗花杉双黄酮通过 NF- κ B 通路在放射性肠炎中的消炎、抗纤维化和抗菌作用[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2023, 32(4): 367-373; 378.
- [14] 祝萍萍, 苑伟, 王鹏珍. 穗花杉双黄酮对小鼠神经母细胞瘤细胞增殖及增殖相关蛋白表达的影响[J]. 中国医药导报, 2023, 20(36): 16-20.
- [15] Al-Sayed E, Abdel-Daim M M. Protective role of cupressuflavone from *Cupressus macrocarpa* against carbon tetrachloride-induced hepato- and nephrotoxicity in mice [J]. *Planta Med*, 2014, 80(18): 1665-1671.
- [16] Dong H B, Wu M, Wang Y Y, et al. Total syntheses and anti-inflammatory activities of syringin and its natural analogues [J]. *J Nat Prod*, 2021, 84(11): 2866-2874.
- [17] Zhu B W, Han R Y, Ni Y F, et al. Podocarpusflavone alleviated renal fibrosis in obstructive nephropathy by inhibiting Fyn/Stat3 signaling pathway [J]. *J Nat Med*, 2023, 77(3): 464-475.
- [18] Shim S Y, Lee S G, Lee M. Biflavonoids isolated from *Selaginella tamariscina* and their anti-inflammatory activities via ERK 1/2 signaling [J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 926.
- [19] 穆婉, 程学芳, 张雪, 等. 扁柏双黄酮对肝细胞癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中南药学, 2019, 17(3): 399-404.
- [20] 范刚, 贾敏如, 刘悦, 等. 藏药鉴定及质量控制研究现状 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(4): 559-561.
- [21] 陈静, 支张, 索朗次仁. 现代分析技术对藏药质量标准化重要性 [J]. 中国民族医药杂志, 2015, 21(6): 36-37.

六味能消丸 TLC 鉴别及 3 种蒽醌类成分的含量测定

马静¹, 楚亮¹, 宋毅², 徐晓霞¹, 兰婉玲^{1*}

[1. 四川省药品检验研究院 (四川省医疗器械检测中心), 四川成都 611731; 2. 四川大学华西医院, 四川成都 610041]

摘要: **目的** 建立六味能消丸的 TLC 鉴别方法, 并采用一测多评法同时测定其中大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量。**方法** 采用 TLC 鉴别干姜、大黄药材。分析采用 Phenomenex C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相甲醇-0.2% H₃PO₄ 溶液 (85:15); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 检测波长 254 nm。以大黄酚为内标, 计算其他 2 种成分的相对校正因子, 测定其含量。**结果** TLC 斑点清晰, 分离度良好。3 种成分在各自范围内线性关系良好 ($r \geq 0.9998$), 平均加样回收率 98.89%~101.11%, RSD 1.31%~1.69%。一测多评法所得结果与外标法接近。**结论** 该方法准确稳定, 重复性好, 可用于六味能消丸的质量控制。

关键词: 六味能消丸; 蒽醌; TLC; 含量测定; 一测多评

中图分类号: R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)09-3063-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.09.035

六味能消丸在藏医临床应用已有近三百年的历史, 也是治疗肠胃病的经典藏药方剂, 由大黄、藏木香、诃子、干姜等 6 味药材组成, 收载于《中华人民共和国卫生部药品标准: 藏药 第一册》^[1], 由原生药材粉碎后加水直接泛丸制成, 具有助消化、消肿、理风和胃的功能, 用于治疗积食引起的消化不良、胸腹胀疼痛、胃部中腕胀痛、大

便干燥等^[2]。大黄为方中君药, 具有泻下功积、清热泻火、解毒逐瘀等功效, 主要含有蒽醌类成分, 其药理活性反映了该制剂在临床中的治疗作用, 且有效成分含量较高, 性质稳定, 故作为含量测定的指标成分。

目前六味能消丸的相关报道主要为化学成分的测定^[3-5]和临床功能应用^[6-8], 而一测多评法是通过测定其中

收稿日期: 2023-10-01

作者简介: 马静 (1984—), 女, 硕士, 副高级工程师, 从事中药的质量控制和新药开发研究。Tel: 13402813761, E-mail: mandy23@163.com

* **通信作者:** 兰婉玲 (1972—), 女, 副主任中药师, 从事药品及医疗器械分析研究。Tel: 13689029612, E-mail: 894064256@qq.com

一种指标成分的含量,并研究其与相邻指标成分之间的相对校正因子,最后得到其他指标成分的含量^[9-14],适用于多组分的含量测定,以减少对照品使用种类,降低检测的成本。本实验建立一测多评法同时测定六味能消丸中大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量,以期为该制剂质量评价提供参考。

1 材料

紫外分析仪(上海市安亭电子仪器厂,型号ZF-2);电热鼓风干燥箱(上海爱斯佩克环境设备有限公司,型号LC-223);超声波清洗器(天津市恒奥科技发展有限公司,型号HS-20500D);水浴锅(上海一恒科技有限公司,型号HWS24);十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司,型号XPR205DU);高效液相色谱仪(日本岛津公司,型号LC-20AD、LC-15C、LC-10AT);Phenomenex C₁₈色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)(美国菲罗门公司);Inertsil C₁₈色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)(日本岛津公司);Diamonsil C₁₈色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)(美国迪马公司);Ultimate-Prime C₁₈色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)[月旭科技(上海)股份有限公司]。薄层板为实验室自制,取硅胶G(青岛海浪硅胶干燥剂有限公司,型号HG/T2354-92)适量,加入3倍量的0.3% CMC-Na溶液混合均匀,用自动铺板器铺板,制成大小为10 cm×20 cm的硅胶G板,晾干后,在110℃下烘烤30 min,干燥器中保存备用。

大黄对照药材、干姜对照药材、大黄酚、大黄素、大黄素甲醚对照品(中国食品药品检定研究院,批号120984-201202、120942-201911、110796-201922、110756-201913、110758-201817)。六味能消丸(西藏金哈达药业有限公司,批号191201、191202、191203)。乙醇、乙酸乙酯、石油醚(30~60℃)、甲酸、磷酸、盐酸(分析纯,广东光华化学厂有限公司);甲醇、乙醚、三氯甲烷(分析纯,成都市科龙化工试剂厂);甲酸乙酯(分析纯,天津市大茂化学试剂厂);乙睛(色谱纯,美国J. T. Baker公司);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);香草醛(上海德茂化工有限公司)。

2 方法与结果

2.1 TLC定性鉴别

2.1.1 大黄

2.1.1.1 供试品溶液制备 取研细的六味能消丸3 g,加入20 mL甲醇,浸泡1 h后过滤,取5 mL滤液,蒸干后残渣加10 mL水至全部溶解,再加入1 mL盐酸,加热回流30 min,冷却后用乙醚振摇2次,每次20 mL,合并乙醚液,蒸干,残渣加入1 mL三氯甲烷溶解^[15],即得。

2.1.1.2 对照药材溶液制备 取大黄对照药材0.1 g,按“2.1.1.1”项下方法制备对照药材溶液^[15]。

2.1.1.3 阴性对照溶液制备 按六味能消丸的处方比例,去除大黄以外的药材混匀,按本品的工艺流程同法制成六味能消丸的阴性样品,取约3 g,按“2.1.1.1”项下方法

制备阴性对照溶液。

2.1.1.4 结果 展开条件参照2020年版《中国药典》一部“通则0502”项下方法,精密吸取上述溶液各10 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1)为展开剂,展开约15 min后取出并晾干,在日光下检视,结果见图1。由此可知,供试品溶液色谱图在对照药材溶液色谱图相应位置上显示相同颜色斑点^[15],R_f值在0.3~0.7之间,放置于氨蒸气中,斑点由橙黄色变为红色,斑点分离度良好,阴性对照溶液无干扰。



注:1~3为供试品溶液(批号191201、191202、191203),4为对照药材溶液,5为阴性对照溶液。

图1 大黄TLC色谱图

2.1.2 干姜

2.1.2.1 供试品溶液制备 取研细的六味能消丸2 g,加入20 mL乙酸乙酯,超声提取15 min,过滤,滤液水浴蒸干,残渣用1 mL甲醇溶解,即得^[16]。

2.1.2.2 对照药材溶液制备 取干姜对照药材1 g,按“2.1.2.1”项下方法制备对照药材溶液。

2.1.2.3 阴性对照溶液制备 按六味能消丸处方比例,去除干姜以外的药材混匀,按本品的工艺流程同法制成六味能消丸的阴性样品,取约1 g,按“2.1.2.1”项下方法制备阴性对照溶液。

2.1.2.4 结果 展开条件参考2020年版《中国药典》一部“通则0502”项下方法,精密吸取上述溶液各10 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚-三氯甲烷-乙酸乙酯(2:1:1)为展开剂,展开15 min后取出晾干,喷5%香草醛硫酸溶液,105℃加热至斑点显色清晰^[15],结果见图2。由此可知,供试品在对照药材色谱图相应位置上显示相同颜色斑点,R_f值在0.3~0.7之间,斑点分离度良好,阴性对照溶液无干扰。

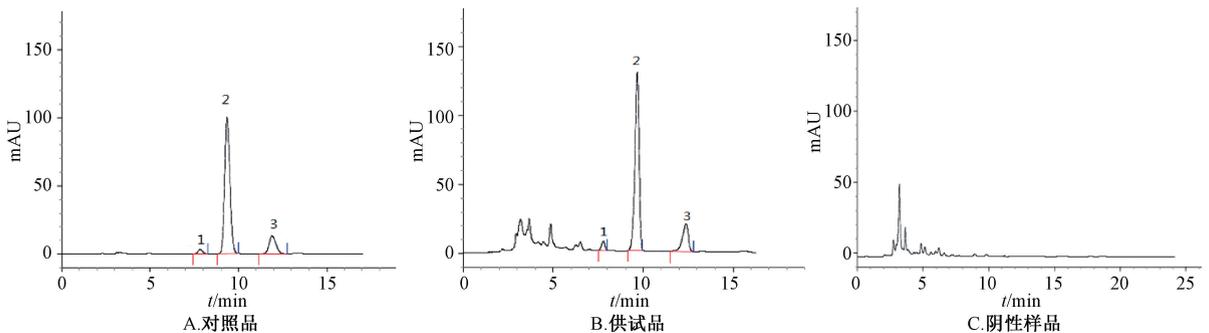


注：1~3 为供试品溶液（批号 191201、191202、191203），4 为对照药材溶液，5 为阴性对照溶液。

图2 干姜 TLC 色谱图

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 Phenomenex C₁₈ 色谱柱（150 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相甲醇-水（含 0.2% H₃PO₄）（85 : 15）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 254 nm；进样量 10 μL；理论塔板数按大黄酚峰计，不低于 3 000^[17]。



1. 大黄素 2. 大黄酚 3. 大黄素甲醚

图3 各成分 HPLC 色谱图

2.2.6 线性关系考察 精密吸取 0.435 mg/mL 大黄素甲醚对照品溶液 1 mL 至 5 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，得质量浓度为 87 μg/mL 的溶液^[19]；分别精密吸取 1.014 mg/mL 大黄酚对照品溶液 1 mL，43.2 μg/mL 大黄素对照品溶液 1.5 mL、87 μg/mL 大黄素甲醚对照品溶液 2 mL 置于适当容器中，加甲醇至 6 mL，摇匀，即得大黄素 10.8 μg/mL、大黄酚 0.169 mg/mL、大黄素甲醚 29 μg/mL 的对照品溶液^[18-19]，逐级稀释成系列质量浓度，在“2.2.1”项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，结果见表 1，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

2.2.7 精密度试验 精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液

2.2.2 对照品溶液制备 分别精密称取对照品适量，置于 10 mL 量瓶中，甲醇制成相应溶液，逐级稀释，即得^[17-18]（各成分质量浓度分别为大黄素 4.32 μg/mL、大黄酚 81.12 μg/mL、大黄素甲醚 17.4 μg/mL）。

2.2.3 供试品溶液制备 取本品约 1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 50 mL 甲醇，密塞，称定质量，加热回流 1 h，放冷，再称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，过滤^[19]。精密量取续滤液 20 mL，置烧瓶中，挥去溶剂，加 10 mL 8% 盐酸，超声提取 5 min，再加入 20 mL 三氯甲烷，加热回流 1 h，放冷，置分液漏斗中，用少量三氯甲烷洗涤容器，并入分液漏斗中，取三氯甲烷层，酸液再用三氯甲烷提取 3 次，每次 10 mL，合并三氯甲烷液，减压回收溶剂至干。残渣加甲醇溶解，并转移至 10 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，摇匀，0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液^[19]，即得。

2.2.4 缺大黄阴性样品溶液制备 按六味能消丸处方比例，取除大黄以外的药材混匀，按本品工艺流程同法制成六味能消丸阴性样品^[20]。精密称取阴性样品 1 g，按“2.2.3”项下方法制备阴性样品溶液。

2.2.5 专属性试验 取“2.2.2”“2.2.3”“2.2.4”项下的对照品、供试品、阴性样品溶液各 10 μL，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 3。由此可知，阴性样品在各成分色谱峰出峰位置均无干扰，表明该方法专属性良好。

表 1 各成分线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
大黄素	Y=1 337 085X-5 182	0.999 8	2.16~21.6
大黄酚	Y=2 430 728X-71 471	0.999 7	40.56~338
大黄素甲醚	Y=2 029 687X-27 364	0.999 8	8.7~58

适量，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积 RSD 分别为 0.76%、0.44%、0.76%，表明仪器精密度良好^[21]。

2.2.8 重复性试验 取本品（批号 191203）适量，按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，测得大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量 RSD 分别为 0.84%、1.98%、1.82%，表明该方法

重复性良好^[22]。

2.2.9 稳定性试验 取同一份供试品溶液，于0、2、4、6、8、10 h在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，测得大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积RSD分别为1.26%、1.28%、1.44%，表明溶液在10 h内稳定性良好^[20]。

2.2.10 加样回收率试验 精密称取各成分含量已知的本品(批号191201) 0.5 g，共6份，分别精密加入含大黄素84.8 μg/mL、大黄酚1.06 mg/mL、大黄素甲醚0.268 mg/mL的对照品溶液1 mL，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，大黄素、大黄酚、大黄素甲醚平均加样回收率分别为99.10%、101.11%、98.89%，RSD分别为1.58%、1.31%、1.69%^[23]。

2.3 一测多评法建立

2.3.1 相对校正因子(*f*)计算 精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液A和“2.2.6”项下对照品溶液B各5、10、20 μL，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，以大黄酚为内标，计算其他2种成分相对校正因子 f_{is} ，公式为 $f_{is} = f_s / f_i = (C_s \times A_i) / (C_i \times A_s)$ ，其中 C_s 为其他成分含量， A_s 为其他成分峰面积， C_i 为内标含量， A_i 为内标法峰面积^[19]，结果见表2。

表2 各成分相对校正因子

溶液	进样量/μL	相对校正因子(内标大黄酚)	
		大黄素	大黄素甲醚
对照品溶液A	5	0.52	0.779
	10	0.518	0.795
	20	0.519	0.794
对照品溶液B	5	0.538	0.795
	10	0.54	0.817
	20	0.547	0.826
	平均值	0.531	0.801
	RSD/%	2.41	2.15

表5 不同色谱柱对相对保留时间的影响

色谱柱	规格	相对保留时间(内标大黄酚)		保留时间差(内标大黄酚)	
		大黄素	大黄素甲醚	大黄素	大黄素甲醚
Inertsil	150 mm×4.6 mm, 5 μm	0.723	1.31	2.97	3.03
Diamonsil	250 mm×4.6 mm, 5 μm	0.738	1.38	2.54	3.66
Ultimate-Prime	250 mm×4.6 mm, 5 μm	0.739	1.37	2.36	3.34
	平均值	0.730	1.35	2.62	3.35
	RSD/%	1.22	2.80	11.95	9.42

表6 不同仪器对相对保留时间的影响

色谱仪型号	相对校正因子		保留时间差	
	(内标大黄酚)		(内标大黄酚)	
	大黄素	大黄素甲醚	大黄素	大黄素甲醚
LC-20AD	0.741	1.42	3.10	3.05
LC-15C	0.733	1.33	2.51	3.87
LC-10AT	0.711	1.29	2.33	3.42
	平均值	1.35	2.65	3.45
	RSD/%	4.94	15.22	11.91

2.3.6 样品含量测定 取3批样品，按“2.2.3”项下方3066

2.3.2 色谱柱对相对校正因子的影响 分别考察Inertsil、Diamonsil、Ultimate-Prime色谱柱(均为C₁₈型)对相对校正因子的影响^[24]，结果见表3，可知均无明显影响(RSD≤1.02%)。

表3 不同色谱柱对相对校正因子的影响

色谱柱	规格	相对校正因子(内标大黄酚)	
		大黄素	大黄素甲醚
Inertsil	150 mm×4.6 mm, 5 μm	0.533	0.806
Diamonsil	250 mm×4.6 mm, 5 μm	0.534	0.795
Ultimate-Prime	250 mm×4.6 mm, 5 μm	0.535	0.811
	平均值	0.534	0.804
	RSD/%	0.19	1.02

2.3.3 仪器对相对校正因子的影响 分别考察岛津LC-20AD、LC-15C、LC-10A色谱仪对相对校正因子的影响^[24]，结果见表4，可知均无明显影响(RSD≤2.78%)。

表4 不同仪器对相对校正因子的影响

色谱仪型号	相对校正因子(内标大黄酚)	
	大黄素	大黄素甲醚
LC-20AD	0.535	0.822
LC-15C	0.543	0.838
LC-10AT	0.526	0.796
	平均值	0.819
	RSD/%	2.78

2.3.4 相对校正因子的确定 大黄素、大黄素甲醚与指标成分(大黄酚)之间的相对校正因子分别为0.531、0.812^[17]。

2.3.5 色谱峰的定位 精密吸取对照品溶液适量，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，分别考察“2.3.2”“2.3.3”项下仪器、色谱柱对相对保留时间和保留时间差的影响^[25]，结果见表5~6，可知均无明显影响(相对保留时间RSD≤5%，保留时间差RSD≥5%)。

法平行制备6份供试品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，分别采用外标法、一测多评法计算含量，结果见表7，可知2种方法所得结果接近，RSD≤5%。

3 讨论

本方由6味药材加工制成的水丸，其中大黄药材仅占整个处方的12%，由于本研究的这3批在六味能消丸中入药的大黄药材中大黄酸的含量较低，在通过加工制成藏药制剂后，大黄酸成分整体被稀释，对其进行定量较为困难，故本研究仅以大黄酚的峰面积为指标成分，通过相对校正因子分别计算大黄素和大黄素甲醚的含量。

表7 各成分含量测定结果 (mg/丸)

批号	大黄素			大黄素甲醚			大黄酚	总含量	总含量
	外标法	一测多评法	RSD/%	外标法	一测多评法	RSD/%	外标法	(外标法)	(一测多评法)
191201	0.100 3	0.100 1	0.141	0.337 3	0.339 2	0.397	1.204 5	1.642 1	1.643 8
	0.100 4	0.100 2	0.140	0.335 4	0.337 3	0.399	1.191 0	1.626 8	1.628 5
191202	0.088 6	0.088 5	0.080	0.308 0	0.309 8	0.412	1.107 7	1.504 3	1.506 0
	0.089 1	0.088 9	0.159	0.309 9	0.311 6	0.387	1.095 9	1.494 9	1.496 4
191203	0.093 1	0.092 9	0.152	0.316 9	0.318 7	0.401	1.144 5	1.554 5	1.556 1
	0.092 4	0.092 2	0.153	0.315 8	0.317 6	0.402	1.148 5	1.556 7	1.558 3

本研究还对六味能消丸中的大黄和干姜进行了 TLC 方法学考察,对两者的薄层色谱条件进行了筛选,包括不同的展开剂、点样量(2、5、10、20 μL)、薄层板(市售板、自制板)、温度(15、25、35 ℃)、相对湿度(45%、65%、85%),结果筛选出来的条件重复性和专属性良好,操作简便,耐用性好。

本研究考察了大黄蒽醌类成分的前处理方法,即固定其中一个因素,其他因素不变,包括提取溶剂、提取方法、提取时间,大黄蒽醌类成分测定含量最高时,即为本研究的前处理方法(甲醇为溶剂、加热回流提取 60 min)。

4 结论

本研究基于 2020 年版《中国药典》一部“大黄”项下含量测定方法进行制样,以大黄酚为指标成分,运用一测多评法建立该成分与大黄素和大黄素甲醚的相对校正因子,用校正因子来计算本品中大黄素和大黄素甲醚的含量,初步确定了色谱条件,并进行方法学考察。通过方法准确性评价结果,可知一测多评法与外标法所测值无显著性差异。本品只采用大黄酚对照品可同时测定其他 2 种成分含量,满足中药的多指标评价模式的要求,能够控制制剂的质量,反映中药复方制剂的科学性、合理性^[13]。

参考文献:

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·藏药:第1册[S]. 北京:中国医药科技出版社, 1995: 292.

[2] 张青, 王国庆, 安加华. 六味能消丸在小切口胆囊切除术后的应用[J]. 中国社区医师, 2014, 30(18): 96-97.

[3] 焦国莲. GC 测定藏药六味能消丸中土木香内脂和异土木香内酯的含量[J]. 甘肃科技, 2019, 35(18): 60-63; 41.

[4] 德吉, 兰钧, 巴桑央宗, 等. 藏药六味能消丸质量标准的建立与优化[J]. 四川大学学报(医学版), 2024, 55(2): 425-432.

[5] 康慧, 刘亚蓉. HPLC 法同时测定六味能消丸中 8 种成分的含量[J]. 中国药房, 2017, 28(24): 3433-3436.

[6] 蒋莉, 吴长亮, 蒙华莹. 六味能消丸治疗功能性消化不良效果及其对患者血清 NPSR1、CGRP、SP 水平的影响[J]. 山东医药, 2018, 58(2): 54-56.

[7] 蒙华莹. 六味能消丸在幽门螺杆菌阳性功能性消化不良临床效果观察[J]. 人人健康, 2018(4): 230.

[8] 卓玛措, 扎西卓玛, 赛悟杰, 等. 六味能消丸之方源, 方解, 临床应用考证[J]. 西南民族大学学报(自然科学

版), 2022, 48(5): 525-529.

[9] 闫艳, 杜晨晖. 一测多评法在中药质量控制中的应用及研究进展[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2022, 24(6): 2378-2387.

[10] 冯亚茹, 周荣荣, 耿佳乐, 等. 一测多评法同时测定大黄药材中 8 个结合型蒽醌含量的系统研究[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(11): 1884-1894.

[11] 王敏, 王晶, 杨娜, 等. 一测多评法同时测定虎杖中 6 种酚类成分的含量[J]. 安徽医药, 2022, 26(8): 1520-1525.

[12] 毛艳, 蔡晓翠, 古丽白热木·玉素因, 等. 一测多评法同时测定新疆软紫草中 6 种蒽醌类成分[J]. 中草药, 2019, 50(17): 4170-4175.

[13] 张敏, 王芳, 刘惠娟, 等. 一测多评法在中药质量控制中的应用[J]. 中国民族民间医药, 2021, 30(14): 51-55.

[14] 张淑婷, 吴红燕, 李慎立, 等. 基于多指标成分定量的复方蛭甲软肝颗粒质量标准研究[J]. 中国药师, 2022, 25(11): 2011-2014; 2042.

[15] 饶伟源, 王丽, 兰保强, 等. 三通骨痛膏质量控制方法研究[J]. 中医药导报, 2016, 22(4): 47-48; 52.

[16] 涂金兰, 蔡绚, 尹航, 等. 复方四季青软膏的制备及质量控制[J]. 中国医药科学, 2014, 4(18): 29-33.

[17] 罗定强, 赵珊珊, 吴芳, 等. 一测多评法测定肾康栓中的大黄蒽醌类成分[J]. 西北药学杂志, 2019, 34(6): 751-754.

[18] 吴春, 覃燕, 杨慧丽, 等. 一测多评法同时测定胆清胶囊中 5 种成分[J]. 中成药, 2022, 44(11): 3445-3449.

[19] 苏瑞, 于如海. 一测多评法测定疏风清热胶囊中五种蒽醌类成分的含量[J]. 中国医院用药评价与分析, 2019, 19(1): 66-68; 71.

[20] 刘嘉乐, 马彧, 程焱, 等. HPLC 法测定何首乌(黑豆炙灸)饮片中游离蒽醌的含量[J]. 中国药品标准, 2020, 21(5): 472-476.

[21] 周红艳, 徐建东. 一测多评法测定清热明目茶中大黄素、大黄酚与大黄素甲醚含量[J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(3): 180-183.

[22] 廖娟, 王雅文, 黄月纯, 等. 复方黄槐灌肠剂质量标准[J]. 医药导报, 2020, 39(7): 995-999.

[23] 袁振海, 王芳, 梁大连, 等. 不同基原大黄药材的 HPLC 指纹图谱及含量差异研究[J]. 食品与药品, 2021, 23(2): 147-152.

[24] 许波, 袁凤娟, 杨爱华, 等. 一测多评法同时测定九制大黄丸中 5 种蒽醌类成分[J]. 南通大学学报(医学版),

2021, 41(5): 442-446.

参酮II_A、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¹, 刘龙婵¹, 王煜¹, 李林楠^{1,2}, 杨莉^{1,2*}, 王峥涛^{1,2*}

(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 C₁₈ 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^[1], 始载于《新修本草》, 功效为消食健胃、行气散瘀、化浊降脂^[2], 主要含有酚酸、黄酮、三萜等成分^[3-4]。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^[5-12]。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^[13-14]。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^[14-22]。

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 C₁₈ 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 C₁₈ 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