

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.11.019

基于特征图谱和含量测定的乌梅丸质量标准研究*

许宗颖¹, 车晓彦², 包小红², 刘兴兰², 张冬梅³, 陈 萌^{1△}

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 四川省药品检验研究院, 四川 成都 611731; 3. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

摘要:目的 建立乌梅丸的质量控制方法。方法 采用中药色谱指纹图谱特征图谱, 结合高效液相色谱(HPLC)法测定乌梅丸(散剂)及3批药典方乌梅丸(大蜜丸)中枸橼酸、盐酸黄柏碱、党参炔苷、盐酸黄连碱、羟基- α -山椒素指标性成分的含量。色谱柱为 Waters Symmetry Shield C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为 0.8 mL/min, 检测波长为 214 nm (枸橼酸)和 285 nm (其余4种成分), 柱温为 27 $^{\circ}$ C, 进样量为 10 μ L。结果 通过乌梅丸(散剂)特征图谱确定共有峰为 22 个特征峰。枸橼酸、盐酸黄柏碱、盐酸黄连碱、党参炔苷、羟基- α -山椒素的进样量分别在 0.278~16.704 μ g、0.010~0.197 μ g、0.048~0.956 μ g、0.269~5.386 μ g、1.841~36.818 μ g 范围内与峰面积线性关系良好, r 分别为 0.999 9, 0.999 9, 0.999 8, 0.999 6, 1.000 0; 加样回收率分别为 103.90%, 95.62%, 97.23%, 96.74%, 100.24%, RSD 分别为 1.04%, 2.71%, 2.14%, 5.48%, 5.69% ($n=9$); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 3.0%。乌梅丸(散剂)中枸橼酸、盐酸黄柏碱、盐酸黄连碱、羟基- α -山椒素含量的平均值分别为 87.22, 0.43, 3.56, 1.86 mg/g, 党参炔苷的含量最低(0.09 mg/g); 乌梅丸(大蜜丸)不含党参炔苷, 枸橼酸、盐酸黄柏碱、盐酸黄连碱、羟基- α -山椒素含量的平均值分别为 142.85, 0.25, 2.54, 0.20 mg/g。结论 所建立的方法操作简便、准确、重复性好, 可用于乌梅丸的质量控制。

关键词: 乌梅丸; 高效液相色谱法; 中药色谱指纹图谱; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)11-0073-06

Quality Standard of Wumei Pills Based on Characteristic Chromatograms and Content Determination

XU Zongying¹, CHE Xiaoyan², BAO Xiaohong², LIU Xinglan², ZHANG Dongmei³, CHEN Meng¹

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, China 100029; 2. Sichuan Institute for Drug Control, Chengdu, Sichuan, China 611731;

3. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, China 100700)

Abstract: Objective To establish a quality control method of Wumei Pills. **Methods** The characteristic chromatograms of chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (TCM) and high-performance liquid chromatography (HPLC) method

*基金项目: 国家自然科学基金面上项目[8167150679]。

第一作者: 许宗颖, 女, 在读博士研究生, 研究方向为仲景学说多维实证探析, (电子信箱)xuzongying999@163.com。

[△]通信作者: 陈萌, 男, 博士, 教授, 研究方向为仲景学说多维实证探析, (电子信箱)chinmed@yeah.net。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 265.
- [2] 邱国玉, 李 运, 李晓春, 等. 前胡类药材的化学成分及质量控制方法研究[J]. 中国药事, 2019, 33(4): 446-459.
- [3] 张 村, 肖永庆, 李 丽, 等. 白花前胡化学成分研究(V)[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(23): 3573-3576.
- [4] 蒋天智, 柴东方. 贵州省施秉县野生和人工前胡中微量元素研究[J]. 凯里学院学报, 2015, 33(6): 46-48.
- [5] 俞年军, 刘守金, 梁益敏, 等. 不同产地白花前胡饮片挥发油化学成分的比较[J]. 安徽中医学院学报, 2007, 26(1): 44-45.
- [6] 张 村, 肖永庆, 谷口雅彦. 白花前胡化学成分研究 II [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(16): 1333-1335.
- [7] 张 村, 肖永庆, 谷口雅彦, 等. 白花前胡化学成分研究(I)[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(9): 675-677.
- [8] 郑 皓, 王秋娟, 潘志伟, 等. 白花前胡丙素对实验性心肌缺血损伤的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26(6): 409-412.
- [9] 张 村, 殷小杰, 李 丽, 等. 白花前胡蜜炙前后的药效学比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 146-148.
- [10] 姚 蓉, 罗疆南. 湖南市场前胡药材的含量分析[J]. 中兽医药杂志, 2019, 38(6): 64-66.
- [11] 吕晓洁, 渠 弼, 刘德旺, 等. 不同产地蒙紫草中左旋紫草素和 β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁含量测定及质量标准研究[J]. 中国药业, 2021, 30(17): 65-70.
- [12] 李筱婧, 汪 晶, 江阿古丽·艾山, 等. 不同产地五灵脂质量研究[J]. 中国药业, 2020, 29(13): 47-50.
- [13] 李 媛, 张苗苗, 张 鑫, 等. 多成分含量测定结合高效液相色谱指纹图谱评价不同产地大青叶药材质量[J]. 中国药业, 2019, 28(17): 15-18.
- [14] 王协成, 陈盛君, 陈可冀, 等. 莲子心药材含量测定标准修订建议[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(9): 5464-5468.
- [15] 王 琦, 曾志坚, 何上儿. 《中国药典》药品检验标准中2种常用树脂规范应用探讨[J]. 中国药业, 2021, 30(16): 37-39.

(收稿日期: 2021-10-27; 修回日期: 2021-12-14)

were used to determine index components such as citric acid, phellodendrine chloride, lobetyolin, coptisine hydrochloride and hydroxy- α -sanshool in Wumei Pills (Power) and three batches of Wumei Pills (Dami Pills) prepared according to the *Chinese Pharmacopoeia*. The chromatographic column was Waters Symmetry Shield C₁₈ column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), the mobile phase was acetonitrile - 0.1% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow rate was 0.8 mL/min, the detection wavelength was set at 214 nm for citric acid and 285 nm for the other four kinds of components, the column temperature was 27 $^{\circ}$ C and the injection volume was 10 μ L. **Results** Twenty-two common characteristic peaks were identified in HPLC characteristic chromatograms of Wumei Pills (Power). The linear ranges of citric acid, phellodendrine chloride, coptisine hydrochloride, lobetyolin and hydroxy- α -sanshool were 0.278 - 16.704 μ g, 0.010 - 0.197 μ g, 0.048 - 0.956 μ g, 0.269 - 5.386 μ g and 1.841 - 36.818 μ g ($r = 0.999\ 9, 0.999\ 9, 0.999\ 8, 0.999\ 6$ and $1.000\ 0$). The average recoveries of the above components were 103.90%, 95.62%, 97.23%, 96.74% and 100.24% with RSDs of 1.04%, 2.71%, 2.14%, 5.48% and 5.69% ($n = 9$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 3.0%. The average contents of citric acid, phellodendrine chloride, coptisine hydrochloride and hydroxy- α -sanshool in Wumei Pills (Power) were 87.22, 0.43, 3.56, 1.86 mg/g, and the content of lobetyolin in Wumei Pills (power) was the lowest (0.09 mg/g). There was no lobetyolin in Wumei Pills (Dami Pills), while the average contents of citric acid, phellodendrine chloride, coptisine hydrochloride and hydroxy- α -sanshool in Wumei Pills (Dami Pills) were 142.85, 0.25, 2.54 and 0.20 mg/g. **Conclusion** The established method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Wumei Pills.

Key words: Wumei Pills; HPLC; TCM chromatographic fingerprint; content determination

乌梅丸首见于《伤寒论》，由乌梅、细辛、干姜、黄连、附子、当归、蜀椒、桂枝、人参、黄柏10味中药材组方，经考证，该方中桂枝为肉桂^[1]，人参为党参^[2]。乌梅丸为酸、苦、甘、辛四味配伍，方中乌梅味酸涩，性平，长于滋阴养血，兼能敛肺涩肠；黄连、黄柏味苦，清热燥湿；细辛、干姜、附子、蜀椒、肉桂味辛、性温，温脏驱寒止痛；当归、党参味甘、性平，补养肝血，健脾益气^[3]。临床常用乌梅丸加减治疗慢性复杂性消化疾病^[4-6]。仲景方乌梅丸为生药捣粉，和以米、蜜，现代有乌梅水丸、大蜜丸、汤剂、散剂。2020年版《中国药典（一部）》收录的乌梅丸为人参方^[7]，目前缺乏经典方的质量控制标准，中药指纹图谱结合多指标成分的含量测定是控制中药质量的有效方法^[8-10]。本研究中原著处方采用饮片打粉制备乌梅丸散剂，建立其特征图谱和其中5种成分含量测定方法，同时用该方法对市售药典方乌梅丸进行含量测定，为药典方乌梅丸（大蜜丸）质量标准的提高提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相检测仪（美国沃特世科技 <上海> 有限公司），配有 Waters 2489 型紫外检测器，Waters 2998 型 PDA 检测器；Sartorius BP211D 型电子天平（德国赛多利斯公司，精度为十万分之一）；Shimadzu UW1020H 型电子天平（日本岛津公司，精度为万分之一）；HU20500D 型超声波清洗器（天津市恒奥科技发展有限公司，功率为 250 W，频率为 40 kHz）。

1.2 试剂

枸橼酸对照品（批号为 100396 - 201603，纯度为 100.0%），盐酸小檗碱对照品（批号为 110713 - 201804，

纯度为 86.7%），阿魏酸对照品（批号为 110773 - 201915，纯度为 99.4%），肉桂酸对照品（批号为 110786 - 201604，纯度为 98.8%），盐酸黄柏碱对照品（批号为 111895 - 201303，纯度为 100.0%）， β -细辛醚对照品（批号为 112018 - 201601，纯度为 96.8%）， α -细辛醚对照品（批号为 100298 - 201203，纯度为 100.0%），6-姜辣素对照品（批号为 111833 - 201806，纯度为 99.9%），均购于中国食品药品检定研究院；盐酸黄连碱对照品（成都曼斯特生物科技有限公司，批号为 MUST - 1905211，纯度为 99.58%）；羟基- α -山椒素对照品（成都麦德生物科技有限公司，批号为 RP200528，纯度为 98.34%）；党参炔苷对照品（成都普思生物科技有限公司，批号为 PU0058 - 0010，纯度为 99.00%）；乌梅丸（散剂，编号为 S1，四川新荷花中药饮片股份有限公司；编号为 S2，广州至信中药饮片有限公司；编号为 S3，四川国强中药饮片有限公司），涉及药材饮片产地及批号见表 1；乌梅丸（大蜜丸，规格均为每丸 3 g，云南腾药制药股份有限公司，批号为 20210964；昆明中药厂有限公司，批号分别为 110241 和 110159）；甲醇、乙腈为色谱纯，磷酸为分析纯。

2 方法与结果

2.1 乌梅丸（散剂）特征图谱建立

2.1.1 色谱条件

色谱柱：Waters Symmetry Shield C₁₈ 柱（250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m）；流动相：乙腈（A）- 0.1% 磷酸溶液（B），梯度洗脱（0 ~ 10 min 时 1%A，10 ~ 20 min 时 1%A ~ 12%A，20 ~ 30 min 时 12%A ~ 20%A，30 ~ 40 min 时 20%A ~ 30%A，40 ~ 50 min 时 30%A ~ 40%A，50 ~ 60 min 时 40%A ~ 70%A，60 ~ 70 min 时 70%A ~ 20%A，70 ~

表1 乌梅丸(散剂)及其药材饮片产地与批号

Tab.1 Produce areas and batch numbers of Wumei Pills (Power) and their decoction pieces

药材	S1		S2		S3	
饮片	产地	批号	产地	批号	产地	批号
乌梅	四川	1910004	四川	210801	四川	211114
黄连	四川	20200101	四川	210801	四川	21110101
黄柏	四川	20191201	四川	210902	四川	21070105
党参	甘肃	2002012	甘肃	211201	甘肃	211001
干姜	云南	1911002	四川	210901	四川	21010107
当归	甘肃	D2005028	甘肃	211001	甘肃	211001
肉桂	广西	20203001	广东	210801	广西	211201
细辛	辽宁	20191201	辽宁	210901	辽宁	220107
花椒	四川	200401	四川	210701	四川	211201
黑顺片	四川	20200201	四川	210901	四川	20201201

75 min 时 20%A ~ 1%A, 75 ~ 78 min 时 1%A); 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: 214 nm; 柱温: 27 °C; 进样量: 10 μL。

2.1.2 溶液制备

混合对照品溶液: 取枸橼酸对照品适量, 精密称定, 加水溶解, 制成质量浓度为 0.69 mg/mL 的枸橼酸对照品贮备液; 分别取盐酸小檗碱、阿魏酸、肉桂酸、盐酸黄柏碱、β-细辛醚、α-细辛醚、6-姜辣素、盐酸黄连碱、羟基-α-山椒素、党参炔苷对照品各适量, 精密称定, 分别加甲醇溶解, 制成质量浓度为 0.20, 0.17, 0.15, 0.40, 0.10, 0.20, 0.14, 0.10, 1.56, 0.68 mg/mL 的对应成分对照品贮备液。取上述对照品贮备液适量, 混匀, 即得。

供试品溶液: 按仲景方用药剂量比例, 取乌梅肉 25 g, 黄连 16 g, 黑顺片 6 g, 黄柏 6 g, 细辛 6 g, 花椒 4 g, 当归 4 g, 肉桂 6 g, 干姜 10 g, 党参 6 g, 混合打粉, 过 5 号筛, 取 0.5 g, 精密称定, 精密加入 50 mL 水, 称定质量, 80 °C 加热回流 60 min, 放冷至室温, 再次称定质量, 并补足减失的质量, 摇匀, 离心, 取上清液, 即得。

2.1.3 共有峰确定

取乌梅丸(散剂)样品(编号分别为 S1, S2, S3), 依法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件进样测定, 将色谱图导入中药指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版)软件, 生成乌梅丸(散剂)高效液相色谱叠加指纹图谱(图 1)。采用 11 种混合对照品和药材分组相结合的方法对特征峰进行归属认定。10 味药材按照四味进行分组, 乌梅为酸味组, 黄连、黄柏为苦味组, 当归、党参为甘味组, 肉桂、花椒、干姜、细辛、附子为辛味组。确定共有峰为 22 个特征峰, 指认第 1, 7 号峰归属于乌梅(峰 1 为枸橼酸), 第 3, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14 号峰归属于苦味组(峰 5 为盐酸黄柏碱, 峰 12 为盐酸黄连

碱, 峰 14 为盐酸小檗碱), 第 2, 4, 15, 16 号峰归属于甘味组(峰 15 为阿魏酸, 峰 16 为党参炔苷), 第 11, 17, 18, 19, 20, 21, 22 号峰归属于辛味组(峰 17 为肉桂酸, 峰 19 为羟基-α-山椒素, 峰 20 为 6-姜辣素, 峰 21 为 β-细辛醚, 峰 22 为 α-细辛醚)。

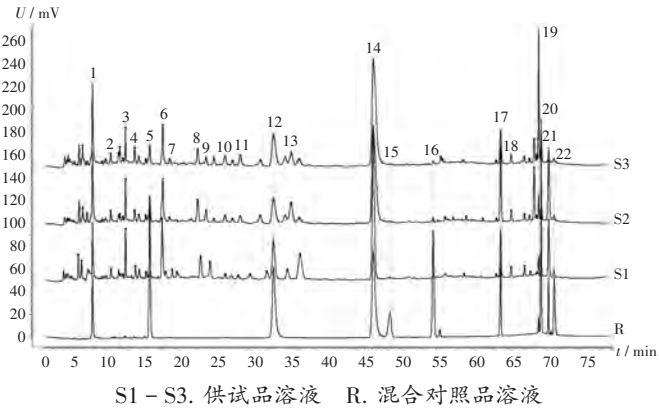


图1 乌梅丸(散剂)特征图谱

S1 - S3. Test solution R. Mixed reference solution

Fig.1 Characteristic chromatograms of Wumei Pills (Power)

2.1.4 方法学考察

精密度试验: 取样品(编号为 S1), 依法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 以盐酸小檗碱峰为参照峰, 计算其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0% (n = 6), 表明仪器精密度良好。

重复性试验: 取样品(编号为 S1) 6 份, 依法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件进样测定, 以盐酸小檗碱峰为参照峰, 计算其他共有峰的相对保留时间和峰面积。结果共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0% (n = 6), 表明方法重复性良好。

稳定性试验: 取样品(编号为 S1) 6 份, 依法制备供试品溶液, 分别于 0, 4, 8, 24, 26 h 时按 2.1.1 项下色谱条件进样测定, 以盐酸小檗碱峰为参照峰, 计算其他共有峰的相对保留时间和峰面积。结果共有峰相对保留时间和峰面积的 RSD 均小于 3.0% (n = 5), 表明供试品溶液放置 26 h 内稳定性良好。

2.2 5 种成分含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

枸橼酸: 流动相为乙腈(A) - 0.1% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱 (0 ~ 10 min 时 2%A ~ 5%A, 10 ~ 15 min 时 5%A ~ 8%A, 15 ~ 17 min 时 8%A ~ 2%A, 17 ~ 20 min 时 2%A)。其余同 2.1.1 项下色谱条件。

盐酸黄柏碱、盐酸黄连碱、党参炔苷、羟基-α-山椒素: 除检测波长为 285 nm 外, 其余同 2.1.1 项下色谱条件。

系统适用性试验: 取盐酸黄柏碱、盐酸黄连碱、党

参炔苷、羟基- α -山椒素混合对照品溶液适量,按此色谱条件进样测定,结果各成分的分离度均符合要求。

2.2.2 溶液制备

枸橼酸对照品溶液:取枸橼酸对照品 69.6 mg,置 25 mL 容量瓶中,加超纯水溶解并定容,得对照品贮备液(质量浓度为 2.784 mg/mL)。精密量取对照品贮备液,配制成质量浓度为 0.027 8, 0.055 7, 0.139, 0.278, 0.557, 1.114, 1.670 mg/mL 的系列枸橼酸对照品溶液。

混合对照品溶液:分别取盐酸黄柏碱、盐酸黄连碱、党参炔苷、羟基- α -山椒素对照品各适量,精密称定,加甲醇配成质量浓度分别为盐酸黄柏碱 9.84 μ g/mL、盐酸黄连碱 23.90 μ g/mL、党参炔苷 4.04 μ g/mL、羟基- α -山椒素 9.20 μ g/mL 的混合对照品溶液。

供试品溶液 I [乌梅丸(散剂)]:同 2.1.2 项下供试品溶液。

供试品溶液 II [乌梅丸(大蜜丸)]:取样品适量,剪碎,取 3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50 mL 水,称定质量,超声(功率为 250 W,频率为 40 kHz)30 min 使完全溶散,80 $^{\circ}$ C 加热回流 60 min,放冷至室温,称定质量,并补足减失的质量,摇匀,离心,取上清液,即得。

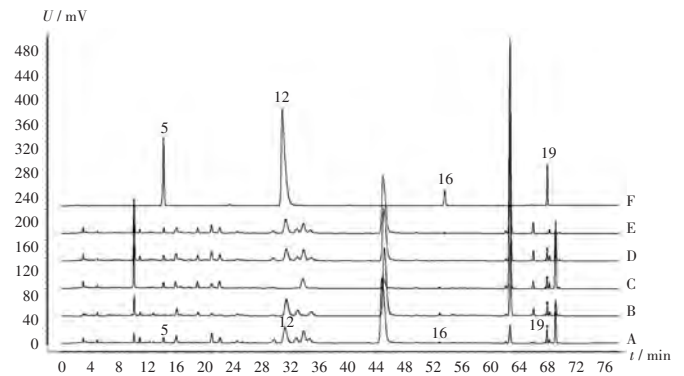
阴性对照品溶液:取除待测成分药味外的其余药味均按处方进行混合打粉,分别按 2.1.2 项下方法制备,即得。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:取 2.2.2 项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定。色谱图见图 2。可见,阴性对照品溶液无相应色谱峰,对样品中其他组分无影响。

线性关系考察、定量限与检测限确定:分别吸取 2.2.2 项下枸橼酸对照品溶液、混合对照品溶液各 10 μ L,注入液相色谱仪。以进样量为横坐标(X , μ g)、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归。分别取各对照品溶液进行稀释,分别按信噪比为 10:1 和 3:1 时的进样量计算定量限和检测限。结果见表 2。

精密度试验:分别精密吸取 2.2.2 项下枸橼酸对照品溶液、混合对照品溶液各 10 μ L,注入液相色谱仪,按 2.2.1 项下色谱条件重复进样测定 6 次,记录峰面积,并



5. 盐酸黄柏碱 12. 盐酸黄连碱 16. 党参炔苷 19. 羟基- α -山椒素

A. 供试品溶液 I B-E. 缺黄柏、黄连、党参、花椒阴性对照品溶液 F. 混合对照品溶液

图 2 4 种成分含量测定高效液相色谱图($\lambda = 285$ nm)

5. Phellodendrine chloride 12. Coptisine hydrochloride 16. Lobetyolin
19. Hydroxy- α -sanshool

A. Test solution I B-E. Negative reference solution lacking Phellodendri Chinensis Cortex, Coptidis Rhizoma, Codonopsis Radix and Zanthoxyli Pericarpium F. Mixed reference solution

Fig. 2 HPLC chromatograms for content determination of four kinds of components ($\lambda = 285$ nm)

计算 RSD 。结果枸橼酸、盐酸黄柏碱、盐酸黄连碱、党参炔苷、羟基- α -山椒素峰面积的 RSD 分别为 0.31%, 1.70%, 2.59%, 2.10%, 0.83% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(编号为 S1)适量,依法制备供试品溶液 6 份,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算 RSD 。结果乌梅丸中枸橼酸、盐酸黄柏碱、盐酸黄连碱、党参炔苷、羟基- α -山椒素的平均含量分别为 56.47, 0.554, 2.231, 0.054, 0.483 mg/g, RSD 分别为 2.97%, 1.98%, 1.13%, 2.23%, 2.88% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

稳定性试验:取 2.2.2 项下供试品溶液 I 适量,分别于 0, 4, 8, 24, 48 h 时按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算 RSD 。结果供试品溶液 I 中枸橼酸、盐酸黄柏碱、盐酸黄连碱、党参炔苷、羟基- α -山椒素峰面积的 RSD 分别为 1.68%, 1.98%, 2.11%, 2.72%, 2.24% ($n = 5$), 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

表 2 线性关系考察和定量限与检测限确定结果

Tab. 2 Results of the linear relation test, LOQ and LOD

成分	回归方程	r	线性范围(μ g)	定量限(μ g)	检测限(μ g)
枸橼酸	$Y = 72\ 367X - 2\ 595.4$	0.999 9	0.278 ~ 16.704	0.03	0.010
盐酸黄柏碱	$Y = 1\ 023\ 458X - 2\ 089$	0.999 9	0.010 ~ 0.197	0.01	0.003
盐酸黄连碱	$Y = 2\ 863\ 416X - 632$	0.999 8	0.048 ~ 0.956	0.01	0.003
党参炔苷	$Y = 29\ 114X + 135.57$	0.999 6	0.269 ~ 5.386	0.01	0.002
羟基- α -山椒素	$Y = 41\ 424X - 2\ 525$	1.000 0	1.841 ~ 36.818	0.18	0.060

表 3 乌梅丸(散剂)加样回收试验结果(n = 9)

Tab. 3 Results of the recovery test of Wumei Pills / Power (n = 9)

待测成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)	待测成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
枸橼酸	14.395	11.136	26.110	105.20	103.90	1.04	党参炔苄	0.563	0.597	1.145	97.49	96.74	5.48
	14.181	11.136	25.610	102.63				0.548	0.717	1.219	93.58		
	14.147	11.136	25.510	102.04				0.538	0.717	1.225	95.82		
	14.152	13.920	28.703	104.53				0.536	0.717	1.221	95.54		
	14.254	13.920	28.762	104.22				0.015	0.082	0.100	103.66		
	14.107	13.920	28.738	105.11				0.015	0.082	0.101	104.88		
	14.316	16.704	31.560	103.23				0.016	0.082	0.099	101.22		
	14.073	16.704	31.484	104.23				0.014	0.102	0.111	95.10		
	14.209	16.704	31.560	103.87				0.014	0.102	0.112	96.08		
盐酸黄柏碱	0.170	0.197	0.362	97.46	95.62	2.71	羟基- α - 山椒素	0.014	0.102	0.111	95.10	100.24	5.69
	0.170	0.197	0.361	96.95				0.013	0.122	0.126	92.62		
	0.171	0.197	0.370	101.02				0.013	0.122	0.123	90.16		
	0.150	0.246	0.380	93.50				0.013	0.122	0.125	91.80		
	0.149	0.246	0.381	94.31				0.140	0.187	0.342	108.02		
	0.151	0.246	0.388	96.34				0.140	0.187	0.337	105.35		
	0.147	0.295	0.426	94.58				0.141	0.187	0.338	105.35		
	0.144	0.295	0.418	92.88				0.124	0.234	0.359	100.43		
	0.144	0.295	0.420	93.56				0.123	0.234	0.362	102.14		
盐酸黄连碱	0.634	0.478	1.095	96.44	97.23	2.14		0.125	0.234	0.360	100.43		
	0.633	0.478	1.109	99.58			0.121	0.281	0.379	91.81			
	0.638	0.478	1.116	100.00			0.119	0.281	0.381	93.24			
	0.560	0.597	1.148	98.49			0.119	0.281	0.387	95.37			
	0.557	0.597	1.143	98.16									

加样回收试验:取样品(编号为S1)9份,每份0.25 g,精密称定,每组3份,置具塞锥形瓶中,精密加入高、中、低浓度的对照品溶液,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定。结果见表3。

耐用性试验:选用2台液相色谱仪,选用不同色谱柱[Waters SymmetryShield C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)2根、XBridge C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)]进行含量测定。结果含量测定结果的RSD均低于5%,表明耐用性良好。

2.2.4 样品含量测定

取3批乌梅丸(散剂,编号分别为S1,S2,S3)和乌梅丸(大蜜丸,批号分别为20210964,110241,110159),依法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定含量。结果见表4。

3 讨论

3.1 检测波长选择

分别采用紫外检测器对每个对照品进行全波长扫描,分别比较了214,240,265,285,318 nm波长下色谱图的峰数、峰形等变化。结果显示,以214 nm检测波长所得色谱峰数目相对较多、峰面积相对较大,

表 4 样品含量测定结果(大蜜丸扣除辅料,mg / g)

Tab. 4 Results of content determination of index components in samples (the amount of excipients is not calculated in the Dami Pills,mg / g)

剂型	编号 / 批号	枸橼酸	盐酸黄柏碱	盐酸黄连碱	党参炔苄	羟基- α - 山椒素
散剂	S1	56.47	0.55	2.23	0.05	0.48
	S2	96.73	0.47	3.68	0.07	0.81
	S3	108.47	0.28	4.77	0.14	4.29
	$\bar{X}$	87.22	0.43	3.56	0.09	1.86
大蜜丸	20210964	134.76	0.25	1.92	0	0.31
	110241	147.80	0.29	2.98	0	0.15
	110159	145.99	0.22	2.71	0	0.14
	$\bar{X}$	142.85	0.25	2.54	0	0.20

故选择214 nm为特征图谱检测波长。枸橼酸、盐酸黄柏碱、党参、盐酸黄连碱、羟基- α -山椒素的最大吸收波长分别为214,285,284,266,270 nm。故选择214 nm为枸橼酸含量测定波长,285 nm为另外4种成分含量测定波长。在特征图谱色谱条件下,枸橼酸与相邻峰的分度不好,对流动相的梯度比例进行了调整,检测波长和流动相梯度与另外4种成分不同,故单独测定。

3.2 指标性成分选择

乌梅含有丰富的有机酸,如枸橼酸、苹果酸等^[11],小檗碱和黄连碱是黄连的重要活性成分^[12],黄柏碱是黄柏的主要活性成分^[13]。黄连和黄柏均含盐酸小檗碱,故选择黄连碱作为黄连的特征物质,黄柏碱作为黄柏的特征物质。干姜含有大量挥发油,6-姜辣素是干姜的活性物质,能抑制氧化应激和炎症反应^[14]。挥发油是细辛的主要活性物质, α -细辛醚和 β -细辛醚在治疗神经系统疾病中具有开发价值^[15]。羟基- α -山椒素是花椒指纹图谱中的特征峰^[16]。肉桂酸可用于肉桂的质量评价^[17]。阿魏酸是当归质量控制的检测物质,具有抗炎、调脂、保肝功效^[18]。党参炔苷是党参的标志性成分,具有胃黏膜保护作用^[19]。故选择枸橼酸、盐酸小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸黄柏碱、6-姜辣素、 α -细辛醚、 β -细辛醚、羟基- α -山椒素、肉桂酸、阿魏酸、党参炔苷11种对照品对特征图谱的保留时间和紫外光谱图进行确认,乌梅丸(散剂)含共有峰22个,确定了11个成分。因附子中乌头碱类生物碱所需流动相与样品中其他成分所需流动相差较大,故进行复方各类成分的分析时未能体现该类成分。

3.3 提取条件选择

以甲醇和水为提取溶剂,甲醇采用超声30 min和60 min,与水浴回流60 min进行比较,结果采用回流水提的方法,枸橼酸的含量最高,检出的特征峰较多,故选择水提的方法制备供试品溶液。方中有4味挥发性药材,比较了100, 80, 60℃温度条件,挥发性成分羟基- α -山椒素随温度升高含量下降,分别为0.35, 0.54, 0.56 mg/g,故选择80℃水浴回流。

3.4 样品含量测定结果分析

含量测定的指标是兼顾中医方解乌梅丸的四味制定,酸味组乌梅的枸橼酸;苦味组黄柏的盐酸黄柏碱,黄连的盐酸黄连碱;甘味组党参的党参炔苷;辛味组花椒的羟基- α -山椒素。3批乌梅丸(散剂)5种含量测定结果差异均较大,表明药材质量差异较大。其中,党参炔苷的含量太低,不建议作为指标性成分控制。乌梅丸(大蜜丸)含量测定结果显示,不同厂家样品之间羟基- α -山椒素相差较大,提示《中国药典(一部)》收录的乌梅丸仅规定了黄柏和黄连的含量测定,对于乌梅丸的整体质量控制较弱。挥发性成分乌梅丸(散剂)高于大蜜丸,提示在大蜜丸生产工艺中应注意防止挥发性物质的损失。

3.5 方法评价

本研究建立了乌梅丸(散剂)特征图谱和5种成分含量测定的高效液相色谱法,对乌梅丸2种剂型进行

测定,能有效定性、定量控制乌梅丸的活性成分,方法专属性强、重复性好、准确度高,可为药典方乌梅丸质量标准的提高提供了参考,也为开发传统经方乌梅丸系列提供了参考。

参考文献

- [1] 李进业.《伤寒论》中桂枝应为肉桂[J]. 河南中医,2020,40(2): 171-173.
- [2] 陈丽平,丁吉善,张璠方,等.试析《伤寒论》所用“人参”多为“党参”[J]. 南阳理工学院学报,2018,10(6):95-98.
- [3] 许宗颖,张迪,陈萌,等.基于四味合法和经方血缘论乌梅丸组方与主治特点[J]. 中华中医药杂志,2020,35(10): 4945-4947.
- [4] 谢志明. 乌梅丸治疗寒热错杂型慢性腹泻的临床观察[D]. 武汉:湖北中医药大学,2017.
- [5] 刘欢. 乌梅丸治疗肺病临床运用举隅[J]. 四川中医, 2015,33(9):81-82.
- [6] 崔国宁,刘喜平. 乌梅丸治疗溃疡性结肠炎研究进展[J]. 山东中医杂志,2018,37(2):170-173.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2020:736-737.
- [8] 苏汝彬,李月婷,马兆臣,等. 芪参颗粒的HPLC指纹图谱与多成分定量测定研究[J]. 中草药,2019,50(18):4329-4337.
- [9] 刘敏,余乐,陈张金,等. 麦味地黄口服液特征图谱的建立[J]. 中国药师,2021,24(2):359-362.
- [10] 舒婷,黄湘杰. 补肺活血胶囊高效液相色谱特征指纹图谱研究及多成分含量测定[J]. 中国药业,2019,28(23):19-23.
- [11] 群培,翟雪,金乾,等. UPLC法测定不同海拔及不同采收期乌梅中枸橼酸和苹果酸[J]. 中成药,2019,41(6): 1338-1343.
- [12] 周瑞,项昌培,张晶晶,等. 黄连化学成分及小檗碱药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2020,45(19):4561-4573.
- [13] 宿莹,侯晓琳,刘战,等. 基于色差原理分析黄柏有效成分含量与颜色的相关性[J]. 中药材,2019,42(8):1766-1770.
- [14] 覃秋语,吕祥威,武琦,等. 6-姜酚预处理对缺氧/复氧诱导的H9C2心肌细胞损伤的保护作用[J]. 四川大学学报(医学版),2020,51(5):658-663.
- [15] 袁斯远,刘金民. α -细辛醚药理学研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2020,18(8):1247-1249.
- [16] 马青琳,刘晓美,李亚男,等. 花椒水提取物HPLC指纹图谱研究[J]. 山东中医杂志,2019,38(9):876-882.
- [17] 杨亚玲,罗碧,张红,等. 肉桂质量研究进展[J]. 中国中药杂志,2020,45(12):2792-2799.
- [18] 李修刚,张玲钰. 阿魏酸的合成与应用研究进展[J]. 山东化工,2020,49(17):81-82.
- [19] 宋丹,王峰涛,李隆云,等. 党参炔苷对胃溃疡模型大鼠胃黏膜损伤保护作用的研究[J]. 中国中医急症,2008, 17(7):963-964.

(收稿日期:2021-09-27;修回日期:2022-03-07)