

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.24.015

软坚清脉颗粒质量标准研究*

黄雨婷, 胡鹏跃, 李国文, 史秀峰, 谢 燕[△]

(上海中医药大学, 上海 201203)

摘要:目的 建立软坚清脉颗粒的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对制剂中垂盆草、蒲黄、豨莶草进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定垂盆草中3种成分及蒲黄中2种成分的含量,色谱柱为Kromasil C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(44:56, V/V;垂盆草中3种成分)和乙腈-0.05%磷酸水溶液(14:86, V/V;蒲黄中2种成分),流速为1.0 mL/min,检测波长为360 nm(垂盆草中3种成分)和254 nm(蒲黄中2种成分),柱温为30℃,进样量为10 μL。结果 垂盆草、蒲黄、豨莶草的TLC图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。垂盆草中槲皮素、山柰素、异鼠李素和蒲黄中香蒲新苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷质量浓度分别在10.0~83.2 μg/mL, 2.0~16.0 μg/mL, 5.6~44.8 μg/mL, 4.1~41.2 μg/mL, 4.2~42.4 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好(r 均大于0.999 2),定量限分别为9.40 ng, 21.36 ng, 21.08 ng, 20.24 ng, 20.48 ng,检测限分别为2.81 ng, 6.42 ng, 6.30 ng, 6.88 ng, 6.96 ng;精密度、稳定性、重复性试验结果的RSD均小于5.0%,平均加样回收率分别为97.52%, 109.10%, 107.25%, 103.56%, 103.84%, RSD分别为1.38%, 1.24%, 1.24%, 3.58%, 2.94%($n=6$)。结论 所建标准可用于软坚清脉颗粒的质量控制。

关键词:软坚清脉颗粒;槲皮素;山柰素;异鼠李素;香蒲新苷;异鼠李素-3-O-新橙皮苷;质量标准

中图分类号:R917;R927

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)24-0062-06

Quality Standard of Ruanjian Qingmai Granules

HUANG Yuting, HU Pengyue, LI Guowen, SHI Xiufeng, XIE Yan

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, China 201203)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Ruanjian Qingmai Granules. **Methods** Sedi Herba, Typhae Pollen and Siegesbeckiae Herba in the preparation were identified by the thin-layer chromatography (TLC). The content of three components in Sedi Herba and two components in Typhae Pollen were determined by the high-performance liquid chromatography (HPLC),

*基金项目:上海市科学技术委员会科研计划项目[18401932900]。

第一作者:黄雨婷,女,在读硕士研究生,研究方向为中药制剂新技术研究与应用,(电子信箱)rain20202020@163.com。

[△]通信作者:谢燕,女,博士,研究员,研究方向为中药制剂新技术研究与应用,(电子信箱)rosexie_2004@163.com。

综上所述,本研究中建立的消麻散中桂枝、红花、土鳖虫的显微鉴别方法,黄芪、羌活、秦艽、冰片的TLC鉴别方法,以及主要有效成分异欧前胡素的含量测定方法,专属性、重复性良好,能较全面地对消麻散进行质量控制。

参考文献

- [1] 宋治荣,王耀鹏,杨锡仓,等.扶正屏风合剂煎煮工艺与薄层色谱质控研究[J].中国医药科学,2021,11(15):65-68.
- [2] 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.
- [3] 卫向锋,张艳,牛春玲,等.抗痈颗粒质量标准研究[J].中国药业,2021,30(1):63-66.
- [4] 施敏,管敏.上感合剂质量标准研究[J].中国药业,2019,28(3):42-45.
- [5] 李鹏,朱龙社,尹军,等.复方黑蚂蚁胶囊质量标准研究[J].中医药导报,2020,26(3):9-11.
- [6] 罗亚玲,李冰,耿昭,等.金关片的质量标准研究[J].现代医药卫生,2018,34(6):845-848.
- [7] 陈瑾.金菊消痔栓的质量标准研究[J].医药导报,2012,31(1):79-81.
- [8] 王欢欢,白林,黄晓舞.保元抗癌口服液的质量标准研究[J].

中国现代应用药学,2021,38(15):1837-1841.

- [9] 王凌,周艳,袁伟彬.凉性经筋通贴膏的提取工艺的优化及其薄层色谱鉴别[J].中国中医药现代远程教育,2021,19(5):142-145.
- [10] 罗悦,李建利,陈梓贤,等.香蕊痔栓质量标准研究[J].中药与临床,2015,6(2):39-41.
- [11] 郑雅琴,刘聪燕,徐彤,等.消炎止痛药膏的质量标准提升研究[J].中南药学,2018,16(12):1743-1750.
- [12] 马丽梅,杨军丽.羌活药材的化学成分和药理活性研究进展[J].中草药,2021,52(19):6111-6120.
- [13] 刘洋,郭慧清,杨乐,等.3种商品规格羌活体内外抗炎作用差异与谱效关系研究[J].中草药,2019,50(24):6052-6058.
- [14] 林立五,时嘉敏,王建忠,等.羌活的化学成分研究[J].华西药理学杂志,2020,35(1):28-31.
- [15] 彭任,王君阳,杨爱萍,等.羌活薄层色谱和HPLC指纹图谱结合多成分含量测定的质量评价方法研究[J].南京中医药大学学报,2020,36(5):629-634.
- [16] 和祎.怒江州不同产地野生羌活中羌活醇与异欧前胡素的含量测定[J].中国民族民间医药,2020,29(15):33-35.
- [17] 张伟,吴孟华.天麻丸中独活虚拟投料及羌活劣药投料的检测[J].中成药,2022,44(1):160-165.

(收稿日期:2022-03-09;修回日期:2022-08-10)

the chromatographic column was Kromasil C_{18} column (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), the mobile phase was methanol - 0.1% phosphoric acid aqueous solution (44 : 56, V/V, three components in Sedi Herba) and acetonitrile - 0.05% phosphoric acid aqueous solution (14 : 86, V/V, two components in Typhae Pollen), the column temperature was 30 $^{\circ}$ C, and the injection volume was 10 μ L. **Results** The TLC spots of Sedi Herba, Typhae Pollen and Siegesbeckiae Herba were clear and well separated, and the negative control had no interference. The linear ranges of quercetin, kaempferol and isorhamnetin in Sedi Herba, and typhaneoside and isorhamnetin - 3 - O - neohesperidoside in Typhae Pollen were 10.0 - 83.2 μ g/mL, 2.0 - 16.0 μ g/mL, 5.6 - 44.8 μ g/mL, 4.1 - 41.2 μ g/mL, 4.2 - 42.4 μ g/mL ($r > 0.9992$), the limits of quantitation (LOQ) were 9.40 ng, 21.36 ng, 21.08 ng, 20.24 ng and 20.48 ng, respectively, and the limits of detection (LOD) were 2.81 ng, 6.42 ng, 6.30 ng, 6.88 ng and 6.96 ng, respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all less than 5.0%. The average recoveries of quercetin, kaempferol, isorhamnetin and isorhamnetin - 3 - O - neohesperidoside were 97.52%, 109.10%, 107.25%, 103.56% and 103.84% with RSDs of 1.38%, 1.24%, 1.24%, 3.58% and 2.94% ($n = 6$), respectively. **Conclusion** The established standard can be used for the quality control of Ruanjian Qingmai Granules.

Key words: Ruanjian Qingmai Granules; quercetin; kaempferol; isorhamnetin; typhaneoside; isorhamnetin - 3 - O - neohesperidoside; quality standard

软坚清脉颗粒由垂盆草、蒲黄、豨莶草、海藻、煅牡蛎5味药材配伍,具有软坚散结、祛瘀消肿功效,临床用于治疗肢体动脉粥样硬化斑块形成引起的肢体血管狭窄、闭塞导致下肢慢性缺血的外周动脉疾病等^[1]。该制剂现行制备工艺规范性欠佳,且质量标准较低,不能满足临床需求。槲皮素、山柰素、异鼠李素为垂盆草主要成分,香蒲新苷和异鼠李素 - 3 - O - 新橙皮苷为蒲黄主要成分,均具有多种药理学活性^[2-6]。本研究中采用薄层色谱(TLC)法鉴别该制剂中垂盆草、蒲黄、豨莶草,并建立了同时测定垂盆草中槲皮素、山柰素、异鼠李素及蒲黄中香蒲新苷、异鼠李素 - 3 - O - 新橙皮苷含量的高效液相色谱(HPLC)法,以期对软坚清脉颗粒的质量控制提供依据。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司); CP225D型十万分之一分析天平(赛多利斯科学仪器<北京>有限公司);ATS4型薄层点样仪、Visalient型薄层成像仪(瑞士CAMAG公司);SK7200LHC型超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 试药

软坚清脉颗粒(上海练塘药业有限公司,批号分别为210112, 211001, 211002, 211003)。槲皮素对照品(批号为100081 - 201610,含量98%)、山柰素对照品(批号为110861 - 201611,含量98%)、异鼠李素对照品(批号为110860 - 201611,含量98%)、香蒲新苷对照品(批号为111573 - 201405,含量98%)、异鼠李素 - 3 - O - 新橙皮苷对照品(批号为111571 - 201205,含量98%)、垂盆草对照药材(批号为121434 - 201203)、蒲黄对照药材(批号为121225 - 201804)、豨莶草对照药材(批号为121572 - 201202),均购自中国食品药品检定研究院;奇壬醇对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号为

MUST - 18051504,含量98%);硅胶G薄层板(烟台市化学工业研究所,批号为20201107);磷酸、乙腈、甲醇均为色谱纯;三氯甲烷、乙酸乙酯、甲苯、甲酸、正丁醇、环己烷、乙醚均为分析纯;水为超纯水。

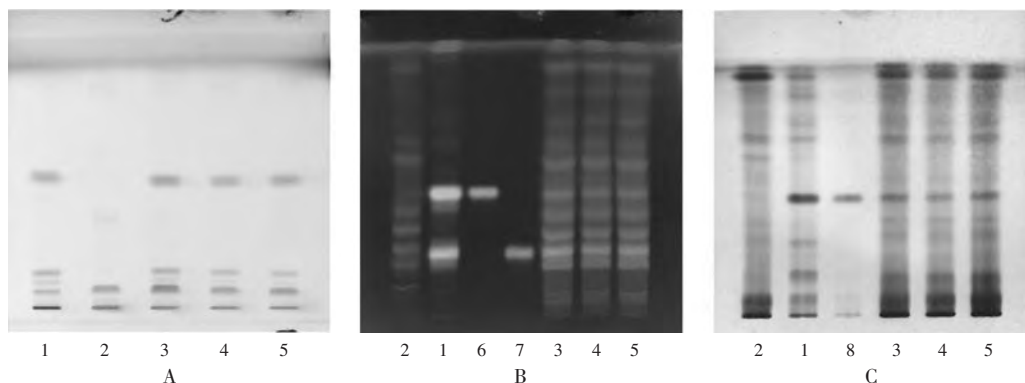
2 方法与结果

2.1 TLC鉴别

垂盆草:取样品粉末10g,加甲醇20mL,超声(功率250W,频率40kHz;下同)处理30min,滤过,蒸干,残渣加2mL甲醇溶解,即得供试品溶液;取垂盆草对照药材1g,同法制得对照药材溶液;按软坚清脉颗粒处方及工艺制备缺垂盆草的阴性样品,同法制得阴性对照品溶液。取上述溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板,以环己烷 - 乙酸乙酯(15:1, V/V)为展开剂,喷以5%磷钼酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置日光灯下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同斑点,且阴性对照无干扰。详见图1A。

蒲黄:取样品粉末10g,加水30mL,超声处理30min,滤过,用乙醚萃取,弃去乙醚液,水浴挥去残留乙醚,加水饱和的正丁醇萃取,取正丁醇层蒸干,残渣加2mL甲醇溶解,即得供试品溶液。取香蒲新苷、异鼠李素 - 3 - O - 新橙皮苷对照品适量,精密称定,分别加甲醇溶解制成质量浓度均为1mg/mL的单一对照品溶液;取蒲黄对照药材1g,同法制得对照药材溶液;按软坚清脉颗粒处方及工艺制备缺蒲黄的阴性样品,同法制得阴性对照品溶液。取上述溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板,以乙酸乙酯 - 丁酮 - 甲酸 - 水(4:3:1:1, V/V/V/V)为展开剂,喷以10%硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(365nm)下检视。供试品溶液色谱中,与对照药材溶液、对照品溶液色谱相应位置上显相同斑点,且阴性对照无干扰。详见图1B。

豨莶草:取样品粉末10g,加70%甲醇20mL,超声处理30min,滤过,蒸干,残渣加2mL甲醇溶解,即得供



1. 对照药材溶液 2. 阴性对照品溶液 3 - 5. 供试品溶液 6. 香蒲新苷对照品溶液 7. 异鼠李素-3-O-新橙皮苷对照品溶液
8. 奇壬醇对照品溶液
A. 垂盆草 B. 蒲黄 C. 豨莶草

图1 薄层色谱图

1. Reference medicinal materials solution 2. Negative reference solution 3 - 5. Test solution 6. Typhaneoside reference solution 7. Isorhamnetin - 3 - O - neohesperidoside reference solution 8. Kirenol reference solution
A. Sedi Herba B. Typhae Pollen C. Siegesbeckiae Herba

Fig. 1 TLC chromatograms

试品溶液。取奇壬醇对照品适量,精密称定,加甲醇溶解制成质量浓度为1 mg/mL的对照品溶液;取豨莶草对照药材1 g,同法制得对照药材溶液;按软坚清脉颗粒处方及工艺制备缺豨莶草的阴性样品,同法制得阴性对照品溶液。取上述溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板,以三氯甲烷-甲醇(4:1, V/V)为展开剂,喷以5%香草醛硫酸溶液,105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置日光下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液、对照品溶液色谱相应位置上显相同斑点,且阴性对照无干扰。详见图1 C。

2.2 垂盆草有效成分含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-0.1%磷酸K溶液(44:56, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:360 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L^[7]。

2.2.2 溶液制备

取槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品各适量,分别加甲醇制成单一对照品溶液;另取3种对照品各适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为15, 5, 5 μ g/mL的混合对照品溶液。取样品粉末4 g,精密称定,分别精密加入甲醇20 mL及20%盐酸5 mL,精密称定质量,80 $^{\circ}$ C回流45 min,冷却至室温,加甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.22 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:分别吸取2.2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液及2.1项下缺垂盆草的阴性对照品溶液各适量,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液与混合对照品溶液色谱分别于28, 55,

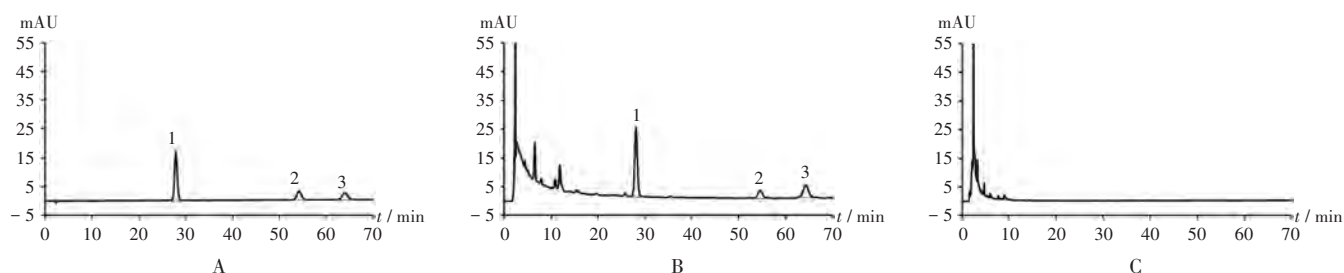
64 min时出现相应色谱峰,且阴性对照无干扰;二极管阵列检测器纯度分析显示,主峰的纯度因子分别为989, 998, 999,均大于980,分离度均大于1.5,表明专属性良好。详见图2。

线性关系考察:分别取3种对照品各适量,精密称定,加甲醇稀释,制成槲皮素质量浓度分别为83.2, 62.4, 41.6, 20.8, 10.0 μ g/mL,山柰素分别为16.0, 12.0, 8.0, 4.0, 2.0 μ g/mL,异鼠李素分别为44.8, 33.6, 22.4, 11.2, 5.6 μ g/mL的系列单一对照品溶液。取10 μ L,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。分别以待测成分质量浓度(X, μ g/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_1 = 4292.4X_1 - 40.81$ ($r = 0.9996$)、 $Y_2 = 3835.6X_2 - 11.34$ ($r = 0.9993$)、 $Y_3 = 4269.1X_3 - 46.36$ ($r = 0.9996$)。结果表明,槲皮素、山柰素、异鼠李素质量浓度分别在10.0~83.2 μ g/mL、2.0~16.0 μ g/mL、5.6~44.8 μ g/mL范围内与峰面积线性关系良好。

定量限和检测限考察:取2.2.2项下混合对照品溶液适量,用甲醇倍比稀释,以信噪比(S/N)为10:1和3:1时的质量浓度分别记为定量限和检测限。结果槲皮素、山柰素、异鼠李素的定量限分别为9.40, 21.36, 21.08 ng,检测限分别为2.81, 6.41, 6.30 ng。

精密度试验:取2.2.2项下混合对照品溶液适量,按2.2.1项下色谱条件连续进样测定6次。结果槲皮素、山柰素、异鼠李素峰面积的RSD分别为0.74%, 0.57%, 0.88% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2.2项下供试品溶液(批号为210112)适量,分别于室温下放置0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h



1. 槲皮素 2. 山柰素 3. 异鼠李素
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图2 垂盆草高效液相色谱图

1. Quercetin 2. Kaempferol 3. Isorhamnetin

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 2 HPLC chromatograms of Sedi Herba

时按2.2.1项下色谱条件进样测定。结果槲皮素、山柰素、异鼠李素峰面积的RSD分别为3.29%,4.56%,3.94% ($n=8$),表明供试品溶液在室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:精密称取样品粉末(批号为210112)适量,各6份,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果槲皮素、山柰素、异鼠李素的平均含量分别为269.40,55.48,112.60 $\mu\text{g}/\text{g}$,RSD分别为2.59%,1.21%,3.35% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品粉末(批号为210112)2 g,精密称定,各6份,分别加入2.2.2项下一定质量浓度的单一对照品溶液,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,记录峰面积并计算加样回收率。结果见表1。

2.2.4 样品含量测定

取各批样品适量,分别按2.2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量,结果见表2。

2.3 蒲黄有效成分含量测定

2.3.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.05%磷酸水溶液(14:86, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μL [2]。

2.3.2 溶液制备

取香蒲新苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷对照品各适量,加甲醇制成质量浓度均为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液。取样品粉末4 g,加75%甲醇50 mL,精密称定,超声处理45 min,冷却至室温,加75%甲醇补足缺失的质量,滤过,经0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3.3 方法学考察

专属性试验:分别吸取2.3.2项下混合对照品溶

液、供试品溶液及2.1项下缺蒲黄的阴性对照品溶液各适量,按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液与混合对照品溶液色谱在28 min及42 min时

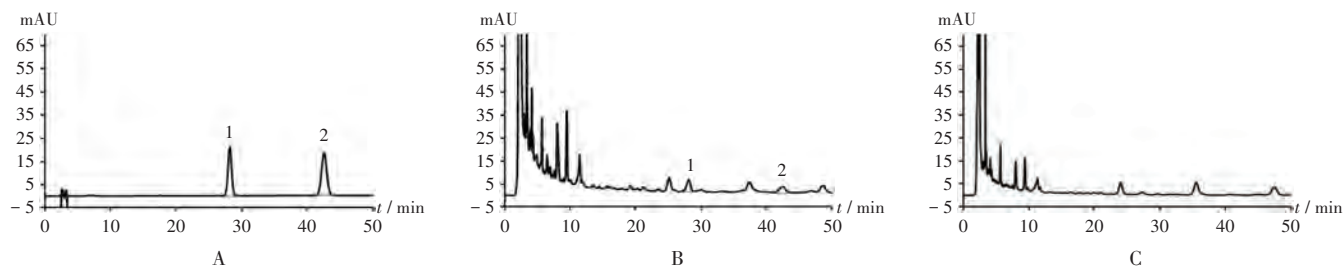
表1 槲皮素、山柰素、异鼠李素的加样回收试验结果($n=6$)
Tab. 1 Results of the recovery test of quercetin, kaempferol and isorhamnetin ($n=6$)

待测成分	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
槲皮素	538.93	515.00	1040.10	97.31	97.52	1.38
	538.88	515.00	1052.74	99.78		
	539.12	515.00	1039.63	97.19		
	538.96	515.00	1042.84	97.84		
	538.85	515.00	1031.07	95.58		
	538.93	515.00	1040.56	97.40		
山柰素	110.99	108.00	229.46	109.69	109.10	1.24
	110.98	108.00	230.50	110.67		
	111.03	108.00	229.59	109.78		
	110.99	108.00	229.26	109.51		
	110.97	108.00	226.52	106.99		
	110.99	108.00	227.57	107.94		
异鼠李素	225.25	236.00	478.71	107.40	107.25	1.24
	225.23	236.00	482.28	108.92		
	225.33	236.00	477.24	106.74		
	225.26	236.00	480.46	108.14		
	225.22	236.00	473.08	105.03		
	225.25	236.00	478.41	107.27		

表2 样品含量测定结果($\bar{X} \pm s, \mu\text{g}/\text{g}, n=3$)

Tab. 2 Results of content determination of five components in the samples ($\bar{X} \pm s, \mu\text{g}/\text{g}, n=3$)

批号	槲皮素	山柰素	异鼠李素	香蒲新苷	异鼠李素-3-O-新橙皮苷
210112	269.40 \pm 2.49	55.48 \pm 0.54	112.60 \pm 0.95	140.89 \pm 4.60	82.82 \pm 4.18
211001	430.36 \pm 1.59	87.48 \pm 0.68	159.31 \pm 0.41	179.92 \pm 2.03	120.53 \pm 5.00
211002	419.37 \pm 2.36	85.70 \pm 0.37	155.61 \pm 0.36	178.73 \pm 2.49	121.62 \pm 4.80
211003	437.72 \pm 15.02	88.10 \pm 3.39	167.59 \pm 8.20	181.91 \pm 1.84	126.55 \pm 3.08



1. 香蒲新苷 2. 异鼠李素-3-O-新橙皮苷
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图3 蒲黄高效液相色谱图

1. Typhaneoside 2. Isorhamnetin-3-O-neohesperidoside

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig.3 HPLC chromatograms of Typhae Pollen

出现相应色谱峰,且阴性对照无干扰;二极管阵列检测器纯度分析显示,主峰的纯度因子分别为989,992,均大于980,分离度均大于1.5,表明专属性良好。详见图3。

线性关系考察:取2种对照品各适量,精密称定,分别用甲醇稀释,制成香蒲新苷质量浓度分别为41.2, 33.0, 24.7, 16.5, 8.2, 4.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 异鼠李素-3-O-新橙皮苷分别为42.4, 33.9, 25.4, 17.0, 8.5, 4.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列单一对照品溶液,取适量,按2.3.1项下色谱条件进样测定。以待测成分质量浓度(X , $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_4 = 1455.1X_4 + 16.16$ ($r = 0.9998$)、 $Y_5 = 1992.0X_5 + 18.85$ ($r = 0.9998$)。结果表明,香蒲新苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷质量浓度分别在4.1~41.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.2~42.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

定量限和检测限考察:取2.3.2项下混合对照品溶液适量,用75%甲醇倍比稀释,以 S/N 为10:1, 3:1时的质量浓度分别记为定量限和检测限。结果香蒲新苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷的定量限分别为20.24 ng, 20.48 ng, 检测限分别为6.88 ng, 6.96 ng。

精密度试验:取2.3.2项下混合对照品溶液适量,按2.3.1项下色谱条件连续进样测定6次。结果香蒲新苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷峰面积的 RSD 分别为0.41%, 0.36%($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.3.2项下供试品溶液(批号为210112)适量,分别于室温下放置0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h时按2.3.1项下色谱条件进样测定。结果香蒲新苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷峰面积的 RSD 分别为2.11%, 4.36%($n = 8$),表明供试品溶液在室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:精密称取样品粉末(批号为210112)适量,各6份,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,再按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含

量。结果香蒲新苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷的平均含量分别为140.89 $\mu\text{g}/\text{g}$, 82.82 $\mu\text{g}/\text{g}$, RSD 分别为1.44%, 3.16%($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品粉末(批号为210112)2 g,各6份,分别加入一定质量浓度的单一对照品溶液,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果见表3。

表3 香蒲新苷和异鼠李素-3-O-新橙皮苷的加样回收试验结果($n = 6$)

Tab.3 Results of the recovery test of typhaneoside and isorhamnetin-3-O-neohesperidin ($n = 6$)

待测成分	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD (%)
香蒲新苷	281.95	309.00	590.80	99.95	103.56	3.58
	281.93	309.00	590.80	99.96		
	281.99	309.00	610.73	106.39		
	281.88	309.00	619.67	109.32		
	281.81	309.00	601.46	103.45		
	281.92	309.00	598.02	102.30		
异鼠李素-3-O-新橙皮苷	163.78	172.00	345.26	105.51	103.84	2.94
	163.78	172.00	347.26	106.67		
	163.81	172.00	339.48	102.13		
	163.74	172.00	338.48	101.59		
	163.71	172.00	335.47	99.86		
	163.77	172.00	348.27	107.27		

2.3.4 样品含量测定

取样品适量,分别按2.3.2项下方法制备供试品溶液,再按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果见表2。

3 讨论

垂盆草TLC鉴别法建立初期将槲皮素、山柰素、异鼠李素作为鉴别指标,但试验结果显示相似条带较多,且多为假阳性,故最终选用垂盆草对照药材进行鉴别,

其特征条带明显且无干扰、方法稳定。蒲黄TLC鉴别方法条件严苛,需多次进行纯化处理。且由于药材中黄酮类物质较多,条带模糊难辨,尝试多种展开体系后仍效果欠佳,故对显色剂进行筛选,最终采用10%硫酸乙醇溶液显色,色谱图清晰美观。豨莶草TLC鉴别方法对样品提取溶剂进行了考察,最终选用70%甲醇为提取溶剂,甲醇复溶处理过程样品中析出大量多糖,避免了展开时的多糖拖尾现象。除上述3味草本药材外,煅牡蛎、海藻两味药材主要成分为碳酸钙和多糖^[8-9],鉴于药材特殊性,未建立相关TLC研究内容。

以软坚清脉颗粒方为基础,前期曾选取豨莶草中奇壬醇进行含量测定,但其中奇壬醇含量极低,难以满足质控要求,故舍弃;煅牡蛎作为矿物类药材,其中的钙离子含量可作为质量控制因素^[10],但由于颗粒颜色较深导致显色反应中颜色变化不明显,难以确定是否存在阴性干扰,故舍弃;海藻主要成分为多糖,现有检测方法暂无法对其进行准确定量分析。因此,本研究中选用了垂盆草及蒲黄药材中指标成分进行定量分析,且研究发现槲皮素、山柰素、异鼠李素均可通过不同路径降低动脉硬化程度^[11-19],香蒲新苷和异鼠李素-3-O-新橙皮苷等黄酮苷类成分有抑制凝血、活血化瘀功效^[6]。故本研究中以垂盆草、蒲黄的指标成分作为定量分析成分具有一定的合理性。

与已有研究^[20]相比,本研究中确定蒲黄提取时间为45 min,提取方式为超声提取;垂盆草回流水解时间为45 min,盐酸体积分数为20%。本研究中皆选取了提取时间较短,操作简便的提取方式,不仅最大限度地保留了有效成分,还提高了工作效率;将蒲黄、垂盆草的指标成分含量分开测定,分析时间较短,分离度良好,专属性强,符合产业化生产对中药制剂质量分析快速准确的需求。

参考文献

[1] 尹凌峰. 软坚清脉颗粒治疗肢体动脉硬化闭塞症的临床疗效研究[D]. 上海:上海中医药大学,2019.
[2] 张梦,李文婧,杜芬,等. 槲皮素对载脂蛋白E基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块的消退作用[J]. 中国药师,2019,22(5):800-804.
[3] LU XL, ZHAO CH, YAO XL, et al. Quercetin attenuates high fructose feeding - induced atherosclerosis by suppressing inflammation and apoptosis via ROS - regulated PI3K / AKT signaling pathway[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 85: 658 - 671.
[4] KONG L, LUO C, LI X, et al. The anti - inflammatory effect of kaempferol on early atherosclerosis in high cholesterol fed rabbits[J]. Lipids in Health and Disease, 2013, 12(1): 115.

[5] 闫 珊,南晓东,马世杰,等. 异鼠李素抗动脉粥样硬化作用的研究进展[J]. 中国现代应用药学,2020,37(14):1771-1777.
[6] 陈佩东,孔祥鹏,李 芳,等. 蒲黄炒炭前后化学组分的变化及谱效相关性研究[J]. 中药材,2012,35(8):1221-1224.
[7] 刘 峰,马久太,王浩仁,等. 一测多评法测定沙棘鲜果中槲皮素、山柰素和异鼠李素含量[J]. 中国药业,2017,26(13):24-27.
[8] 李文华,金 玲,居明秋. 中和法测定牡蛎中和胃酸酸量的实验[J]. 基层中药杂志,1999(4):10.
[9] 司晓喜,袁智泉,邱贺媛,等. 海藻有效成分的提取分离研究进展[J]. 延边大学学报(自然科学版),2011,37(2):103-110.
[10] 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,2020:180.
[11] 曾 瑜,查克岚,奚雪梅,等. 槲皮素通过 HMGB1 / TLR4 途径抗动脉粥样硬化的作用机制[J]. 检验医学与临床,2017,14(17):2511-2514.
[12] 查克岚,李家富,曾 瑜. SDF - 1 / CXCR 4 在槲皮素抗 Apo E - / - 小鼠动脉粥样硬化形成过程中的作用[J]. 重庆医科大学学报,2014,39(10):1373-1379.
[13] 刘 亮,高超,姚 平,等. 槲皮素对动脉粥样硬化小鼠自噬蛋白表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2016,36(3):539-542.
[14] SOUCEK P, KONDROVA E, HERMANEK J, et al. New model system for testing effects of flavonoids on doxorubicin - related formation of hydroxyl radicals[J]. Anticancer Drugs, 2011, 22(2):176-184.
[15] RAJENDRAN P, RENGARAJAN T, NANDAKUMAR N, et al. Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2014, 86:103-112.
[16] AL - BRAKATI A, ALBARAKATI A, LOKMAN MS, et al. Possible Role of Kaempferol in Reversing Oxidative Damage, Inflammation, and Apoptosis - Mediated Cortical Injury Following Cadmium Exposure[J]. Neurotoxicity Research, 2021, 39(2):198-209.
[17] 张 放,程嘉艺,苑 博. 异鼠李素对H₂O₂损伤内皮细胞的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(14):169-172.
[18] ALEXANDER RS, PARVATHY S, ALEXANDER PB, et al. The Metabolites of the Dietary Flavonoid Quercetin Possess Potent Antithrombotic Activity, and Interact with Aspirin to Enhance Antiplatelet Effects[J]. TH Open, 2019, 3(3):e244-e258.
[19] LUO Y, SUN G, DONG X, et al. Isorhamnetin attenuates atherosclerosis by inhibiting macrophage apoptosis via PI3K / AKT activation and HO - 1 induction[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e120259.
[20] 董文敏,安 毅,宋舒雨,等. 软坚清脉颗粒中5种主要成分的含量测定[J]. 中药新药与临床药理,2021,32(10):1519-1524.

(收稿日期:2022-03-21;修回日期:2022-06-12)