

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)06-0060-07
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.06.015



荜茇配方颗粒特征图谱及含量测定研究

李英哲, 李佳东, 黄梦龙, 周明哲, 吴 弢[△]

(上海中医药大学中药研究所, 上海 201203)

摘要:目的 建立荜茇配方颗粒的超高效液相色谱(UPLC)特征图谱和含量测定方法。方法 采用超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法表征荜茇药材主要化合物。色谱柱为 Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C₁₈ 柱(100 mm×4.6 mm, 2.7 μm), 流动相为乙腈-0.1% 甲酸溶液(梯度洗脱), 流速为 0.8 mL/min, 检测波长为 336 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL; 以异牡荆素峰为参照峰, 测定 12 批颗粒样品、1 批饮片样品的 UPLC 特征图谱, 采用中药色谱特征图谱相似度评价系统(2012 版)进行相似度评价。测定异牡荆素的含量。结果 共表征 14 个化合物, 其中 10 个化合物(柠檬酸、丹参素、原儿茶酸、异荜茇苷、荜茇苷、异牡荆素、当药黄素、大波斯菊苷、木犀草素、芹菜素)经对照品验证, 柠檬酸、丹参素、原儿茶酸及荜茇苷 4 个化合物为首次从荜茇药材中检出。建立以异牡荆素、异肥皂苷、荜茇苷、木犀草素为特征峰的 UPLC 指纹图谱, 10 批颗粒样品(均来自同一公司)相似度为 0.998~1.000。异牡荆素质量浓度在 2.54~254.00 μg/mL 范围内与峰面积积分值线性关系良好($R^2=0.9996$); 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%; 平均加样回收率为 99.62%, RSD 小于 3%($n=9$)。结论 该 UPLC 特征图谱和含量测定方法稳定准确, 可为荜茇配方颗粒的评价及质量控制提供参考。

关键词: 荜茇; 配方颗粒; 超高效液相色谱串联质谱法; 特征图谱; 异牡荆素; 含量测定

Characteristic Chromatograms and Content Determination of Thlaspi Herba Formula Granules

LI Yingzhe, LI Jiadong, HUANG Menglong, ZHOU Mingzhe, WU Tao

(Institute of Chinese Materia Medicine, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai, China 201203)

Abstract: Objective To establish ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) characteristic chromatograms and content determination method for Thlaspi Herba Formula Granules. **Methods** The main compounds of Thlaspi Herba were characterized by UPLC-mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The chromatographic column was Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C₁₈ column (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% formic acid solution (gradient elution), the flow rate was

第一作者: 李英哲, 男, 在读硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础, (电子信箱)1183656978@qq.com。

[△]通信作者: 吴弢, 女, 博士, 研究员, 研究方向为中药药效物质基础, (电子信箱)laurawu2000@163.com。

- fingerprint and chemometric methods[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2022, 269(15): 120737.
- [13] 鄢海燕, 邹纯才. 《中国药典》(2010 年版~2020 年版)中药指纹(特征)图谱应用进展与展望[J]. 南方医科大学学报, 2022, 42(1): 150-155.
- [14] RAO SW, DUAN YY, PANG HQ, et al. Spectrum-Effect Relationship Analysis of Bioactive Compounds in *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. by Ultra-High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry Coupled With Comprehensive Filtering Approaches[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 794277.
- [15] LIU HY, JIN YT, MENON R, et al. Characterization of Polysorbate 80 by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry to Understand Its Susceptibility to Degradation and Its Oxidative Degradation Pathway[J]. J Pharm Sci, 2022, 111(2): 323-334.
- [16] PEREZ CE, SANCHEZ VM, GAZQUEZ ED, et al. Quantification of extra virgin olive oil in dressing and edible oil blends using the representative TMS-4, 4'-desmethylsterols gas-chromatographic-normalized fingerprint[J]. Food Chem, 2018, 239(15): 1192-1199.
- [17] POPOVIC M, JUKIC SM, VERSIC BM, et al. Essential Oil Volatile Fingerprint Differentiates Croatian cv. Oblica from Other *Olea europaea* L. Cultivars [J]. Molecules, 2021, 26(12): 3533.
- [18] PUSCHMANN J, EVERS DH, MULLER GC, et al. Development of a design of experiments optimized method for quantification of polysorbate 80 based on oleic acid using UHPLC-MS[J]. J Chromatogr A, 2019, 1599: 136-143.
- [19] 周颖, 赵恂, 胡楠, 等. 一种快速分析聚山梨酯 80 组分的方法[J]. 中国药科大学学报, 2022, 53(2): 192-199.
- [20] WANG Z, WANG YA, TIE C, et al. A fast strategy for profiling and identifying pharmaceutical excipient polysorbates by ultra-high performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2020, 1609: 460450.
- [21] WEBSTER GK, CHANG JC, HEFLIN JL. Stability Indicating Method for Polysorbate 80 in Protein Formulations [J]. J Chromatogr Sci, 2021, 17(7): 706-713.

(收稿日期: 2022-05-26; 修回日期: 2022-09-30)

0.8 mL/min, the detection wavelength was 336 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 µL. With the isovitexin peak as the reference peak, the UPLC characteristic chromatograms of twelve batches of granule samples and one batch of decoction pieces were determined, and the Similarity Evaluation System for the Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Version 2012) was used for similarity evaluation. The content of isovitexin was determined. **Results** A total of 14 compounds were characterized, of which 10 compounds (citric acid, salvanic acid A, protocatechuic acid, isoorientin, orientin, isovitexin, swertisin, apigenin - 7 - O - glucoside, luteolin, and apigenin) were confirmed by the reference substances. Citric acid, salvanic acid A, protocatechuic acid, and orientin were reported for the first time from *Thlaspi Herba*. The UPLC fingerprints with isovitexin, isosaponin, isoorientin and luteolin as the characteristic peaks were established. The similarity of 10 batches of granule samples (all from the same company) was in the range of 0.998 - 1.000. The linear range of isovitexin was 2.54 - 254.00 µg/mL ($R^2 = 0.9996$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0%. The average recovery of isovitexin was 99.62%, and its RSD was less than 3% ($n = 9$). **Conclusion** The UPLC characteristic chromatograms and content determination method are stable and accurate, which can provide a reference for the evaluation and quality control of the *Thlaspi Herba* Formula Granules.

Key words: *Thlaspi Herba*; formula granules; UPLC - MS/MS; characteristic chromatograms; isovitexin; content determination

菥蓂为十字花科植物菥蓂 *Thlaspi arvense* L. 的干燥地上部分, 又名析目(陕西)、苏败酱(江苏)、南败酱(湖北)、大芥、遏蓝菜、瓜子草等, 原产地为欧洲, 现广泛分布于我国各地^[1]。菥蓂始载于《神农本草经》, 列为上品, 其味辛、性微寒, 归肝、胃、大肠经^[2], 具有清肝明目、和中利湿、解毒消肿等功效, 临床多用于目赤肿痛、脘腹胀痛、胁痛、肠痈、水肿、带下和疮疖痈肿等症的治疗^[3]。菥蓂含黄酮类、有机酸类等化学成分^[4]。目前, 关于其质量控制的报道较少, 2020年版《中国药典(一部)》仅收录其薄层色谱(TLC)鉴别等项^[3]。宋文静等^[5]采用高效液相色谱(HPLC)法测定了菥蓂子药材中异牡荆素、当药黄素、黑芥子苷的含量。过立农等^[6]、程丽媛等^[7]分别建立了菥蓂药材饮片中7种黄酮类成分的含量测定方法, 而关于菥蓂配方颗粒的指纹图谱及含量测定尚未见报道。异牡荆素具有抑菌、抗炎、抗病毒、抗肝纤维化、抗肿瘤、抗氧化及保护心血管系统和神经系统等作用^[8-11], 与该制剂中的解毒消肿等功效相关。因此, 本研究中以异牡荆素为指标成分, 建立测定其含量的超高效液相色谱(UPLC)法, 并采用超高效液相色谱串联质谱(UPLC - MS/MS)法对制剂中的化合物进行指认, 确定特征峰; 在此基础上, 建立其特征图谱, 以其质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统、Agilent 6546 液相色谱四极杆飞行时间质谱仪(美国 Agilent 公司); Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); KQ250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); BP211D 型万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司); Milli - Q Academic 型纯水系统(美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂

菥蓂配方颗粒(编号为 S1 - S10, S12 - S13, 分别购自 W 公司、S 公司、J 公司); 原儿茶酸对照品(批号为 ST04100120)、柠檬酸对照品(批号为 RS08641020)、丹参素对照品(批号为 ST78460120), 均购自上海诗丹德生物技术有限公司(含量 ≥ 98%); 当药黄素对照品(批号为 DST200817 - 084)、大波斯菊苷对照品(批号为 DSTDQ006301)、异荭草苷对照品(批号为 DST200815 - 121)、木犀草素对照品(批号为 DSTDM003201), 均购于成都德思特生物技术有限公司(含量 ≥ 98%); 异牡荆素对照品(上海源叶生物有限公司, 批号为 B21544, 含量 ≥ 98%); 荭草苷、芹菜素对照品(实验室自制, 含量 ≥ 90%); 甲醇为分析纯, 甲酸、乙腈为色谱纯, 水为超纯水; 菥蓂药材饮片(编号为 S11, 购自 W 公司), 由上海中药标准化中心吴立宏研究员鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 试验条件

色谱条件: 色谱柱为 Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB - C₁₈ 柱(100 mm × 4.6 mm, 2.7 µm); 流动相为乙腈(A) - 0.1% 甲酸溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 12 min 时 10%A → 40%A, 12 ~ 12.5 min 时 40%A → 60%A); 流速为 0.80 mL/min; 检测波长为 336 nm; 柱温为 30 °C; 进样量为 10 µL。

质谱条件: 正、负离子模式。干燥气温度 320 °C、流速 8 L/min; 雾化气压力 35 psi; 毛细管电压 ± 3 500 V; 碰撞电压 175 V。一级质谱选用 MS1 模式, 质量扫描范围 m/z 100 ~ 1 700。二级质谱分别选用 Target - MS/MS 和 Auto - MS/MS 模式, 碰撞电压 20, 30, 40 eV。采用 Agilent MassHunter 软件采集质谱数据。

2.2 溶液制备

取柠檬酸、丹参素、原儿茶酸、荭草苷、异荭草苷、异牡荆素、当药黄素、大波斯菊苷、木犀草素及芹菜素

对照品各适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含各成分0.05 mg的混合对照品溶液。取异牡荆素对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含异牡荆素2.45 mg的对照品溶液。取颗粒样品约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇25 mL,称定质量,超声(功率250 W,频率40 kHz;下同)处理30 min,放冷,用70%甲醇补足减失的质量,滤过,取续滤液,即得颗粒供试品溶液。取药材饮片样品约2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇25 mL,称定质量,超声处理30 min,放冷至室温,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得药材饮片供试品溶液。取麦芽糊精适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含糊

精1.00 mg的阴性对照品溶液。

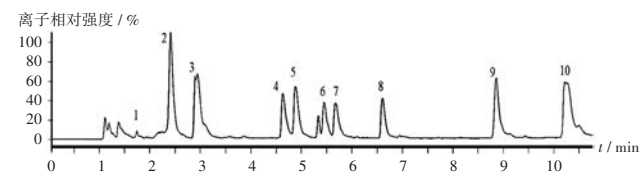
2.3 蒽萜化合物指认

取2.2项下药材饮片供试品溶液适量,按2.1项下色谱条件调整流动相梯度比例(调整为0~10 min时10%A→50%A)后进行分析。主要采用负离子模式(该模式更易识别黄酮类成分^[11-12])对蒽萜药材中的化学成分进行表征。共表征出14个化合物(见表1),为排除同分异构体对质谱表征结果的影响,对其中10个化合物(柠檬酸、丹参素、原儿茶酸、荭草苷、异荭草苷、异牡荆苷、当药黄素、大波斯菊苷、木犀草素及芹菜素)经对照品验证(见图1)。其中柠檬酸、丹参素、原儿茶酸及荭草苷为首次从蒽萜药材中检出。

表1 药材饮片样品主要化合物鉴定

Tab. 1 Identification of main compounds in *Thlaspi Herba* Formula Granules

t_R (min)	λ_{max} (nm)	$[M-H]^-$ 测定值/(m/z)	$[M-H]^-$ 理论值/(m/z)	偏差($\times 10^{-6}$)	MS^2 (m/z)	分子式	化合物名称
1.71	210	191.019 9	191.019 7	-1.05	127	$C_6H_8O_7$	柠檬酸 ^[13]
2.42	280	197.045 7	197.045 5	-1.01	135,123	$C_9H_{10}O_5$	丹参素 ^[14]
2.88	260	153.019 5	153.019 3	-1.31	109	$C_7H_6O_4$	原儿茶酸 ^[15]
3.28	272,330	755.203 0	755.204 0	-1.32	431,341,311	$C_{33}H_{40}O_{20}$	异牡荆素 7,2''-二-O- β -吡喃葡萄糖苷 ^[12]
3.30	270,330	593.150 7	593.151 2	-0.84	503,473,311,282	$C_{27}H_{30}O_{15}$	异肥皂草苷 ^[16]
4.61	348	447.092 9	447.093 3	-0.89	357,327,285	$C_{21}H_{20}O_{11}$	异荭草苷 ^[12]
4.90	228	447.093 0	447.093 3	-0.67	369,325,299,285	$C_{21}H_{20}O_{11}$	荭草苷 ^[17]
5.43	336	431.098 3	431.098 4	-0.23	341,311,283,269	$C_{21}H_{20}O_{10}$	异牡荆素 ^[11]
5.66	274,336	445.114 3	445.114 0	0.67	355,325,297,282	$C_{22}H_{22}O_{10}$	当药黄素 ^[18]
5.70	350	447.093 4	447.093 3	0.22	285,151,133	$C_{21}H_{20}O_{11}$	木犀草素-7-O- β -葡萄糖苷 ^[19]
6.60	350	431.098 3	431.098 4	-0.23	269,151,117	$C_{21}H_{20}O_{10}$	大波斯菊苷 ^[19]
8.84	350	285.040 6	285.040 5	0.35	151,133,107	$C_{15}H_{10}O_6$	木犀草素 ^[15]
10.26	268,334	269.045 7	269.045 5	0.74	151,107	$C_{15}H_{10}O_5$	芹菜素 ^[15]
10.63	330	299.056 6	299.056 1	-1.67	284,151	$C_{16}H_{12}O_6$	香叶木素 ^[12]



1. 柠檬酸 2. 丹参素 3. 原儿茶酸 4. 异荭草苷 5. 荭草苷
6. 异牡荆素 7. 当药黄素 8. 大波斯菊苷 9. 木犀草素
10. 芹菜素

图1 总离子流图

1. Citric acid 2. Salviatic acid A 3. Protocatechuic acid 4. Isoorientin
5. Orientin 6. Isovitexin 7. Swertisin 8. Apigenin-7-O-glucoside
9. Luteolin 10. Apigenin

Fig. 1 Total ion current chromatogram

2.4 UPLC 指纹图谱建立

2.4.1 方法学考察

专属性试验:取2.2项下混合对照品溶液、颗粒供试品溶液、阴性对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果阴性对照无干扰,表明

方法专属性良好。

精密度试验:取同一批颗粒供试品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。以异牡荆素峰(s)为参照峰(下同),计算得其他特征峰[异肥皂草苷峰(峰1)、异荭草苷峰(峰2)、木犀草素峰(峰4),下同]相对保留时间的RSD为0~0.15%,相对峰面积的RSD为0~1.04%,均小于3.0%(n=6),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取同一颗粒供试品溶液适量,分别于室温下放置0,2,4,8,12,18,24,36,48,72 h时,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。其他特征峰相对保留时间的RSD为0.06%~0.22%,相对峰面积的RSD为0.35%~1.38%,均小于3.0%(n=10),表明供试品溶液在室温下放置72 h内基本稳定。

重复性试验:取同一批颗粒样品(编号S3)适量,共

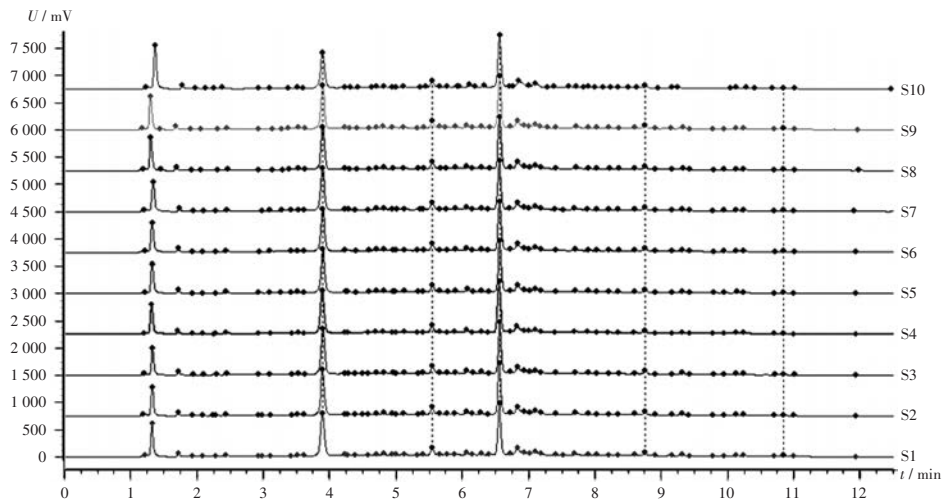


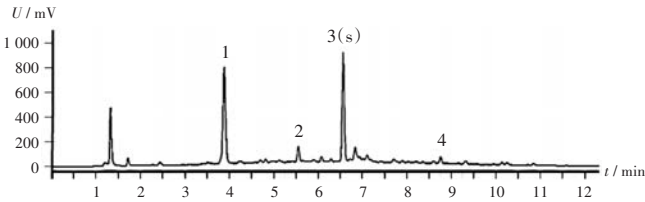
图2 10批颗粒样品超高效液相色谱叠加特征图谱

Fig. 2 HPLC superimposed characteristic chromatograms of 10 batches of granule samples

6份,按2.2项下方法制备颗粒供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。其他特征峰相对保留时间的 RSD 为0.03%~0.11%,相对峰面积的 RSD 为0.10%~1.00%,均小于3.0%($n=6$),表明方法重复性良好。

2.4.2 图谱建立及相似度评价

取10批颗粒样品(W公司)各适量,按2.2项下方法制备颗粒供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,将10批颗粒样品色谱图结果依次导入中药色谱特征图谱相似度评价系统(2012版)进行分析,记录叠加特征图谱(图2)。采用中位数法,时间宽度设定为0.1 min,进行多点校正和自动匹配,生成特征图谱共有模式(图3),峰1在336 nm波长处明显,可清晰辨别,峰2,3,4经对照品二次比对可确认。结果W公司的10批颗粒样品相似度为0.998~1.000,表明相似度良好,说明不同批次间颗粒样品差异较小,质量较稳定。



1. 异皂草苷 2. 异荭草苷 3. 异牡荆素 4. 木犀草素

图3 颗粒样品超高效液相色谱对照特征图谱

1. Isosaponin 2. Isoorientin 3. Isovitexin 4. Luteolin

Fig. 3 UPLC reference characteristic chromatograms of the granule sample

10批颗粒样品的各特征峰(峰1、峰2、峰4)与s峰(相对保留时间规定值为1.00 min)的平均相对保留时间为0.59,0.84,1.65 min,相对保留时间的 RSD 为0~0.55%。

取颗粒样品(S1-S10,S12-S13)、药材饮片样品(S11),按2.2项下方法制备颗粒供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定。结果见图4,S1-S10,S12-S13

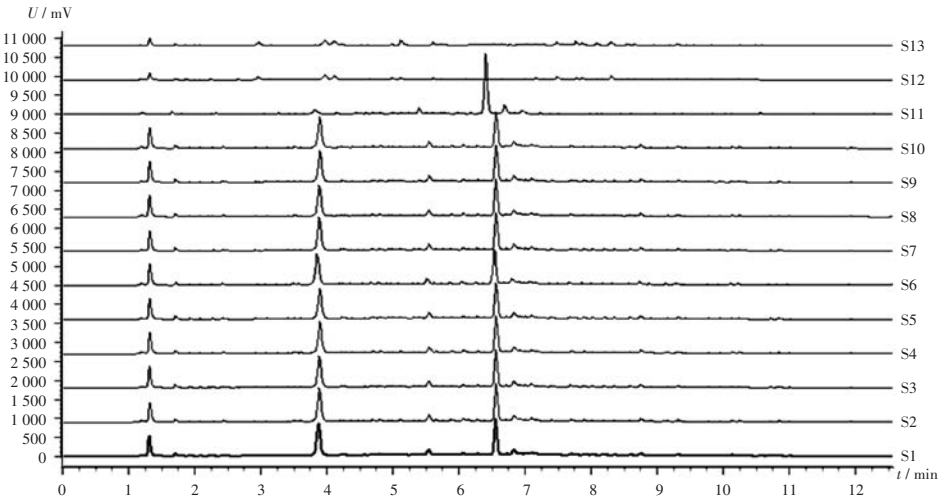
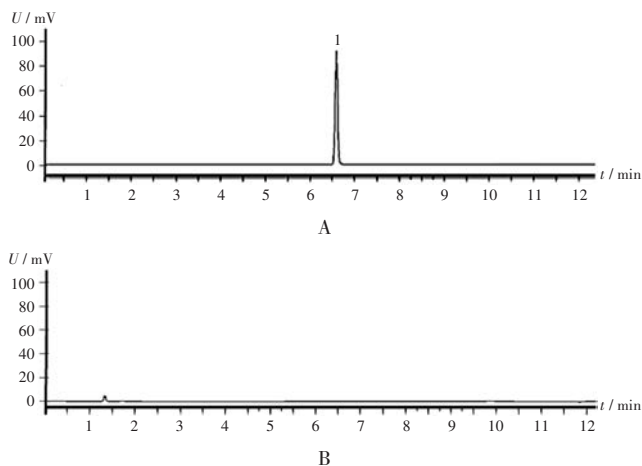


图4 颗粒样品、饮片样品指纹图谱比对

Fig. 4 Comparison of characteristic chromatograms of granule samples and decoction piece samples



1. 异牡荆素
A. 对照品溶液 B. 阴性对照品溶液

图5 超高效液相色谱图

1. Isovitexin
A. Reference solution B. Negative reference solution
Fig. 5 UPLC chromatograms

的色谱图差异明显, W公司颗粒样品色谱图与饮片(S11)相似度高。

2.5 异牡荆素含量测定

2.5.1 方法学考察

专属性试验:取2.2项下异牡荆素对照品溶液、阴性对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。详见图5。

线性关系考察:取2.2项下异牡荆素对照品溶液适量,倍比稀释,制成系列对照品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以异牡荆素质量浓度(X , $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标,峰面积积分值(Y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程 $Y = 28.79X + 7.722$ ($R^2 = 0.9996$),结果表明,异牡荆素质量浓度在 $2.54 \sim 254.00 \mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积积分值线性关系良好。

精密度试验:取高、中、低质量浓度的异牡荆素对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样分析,每个质量浓度连续进样测定3次,连续测定3 d。结果日内精密度的 RSD 为 $0.31\% \sim 1.00\%$ ($n = 3$),日间精密度的 RSD 为 $0.94\% \sim 1.38\%$ ($n = 3$), RSD 均小于 2% ,表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批颗粒供试品溶液适量,按2.1项下色谱条件进样测定,分别于室温下放置0, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 h时进样测定,记录峰面积。结果异牡荆素峰面积的 RSD 小于 2% ($n = 9$),表明供试品溶液室温下放置72 h内稳定性良好。

重复性试验:取颗粒样品(编号为S3),按2.2项下

方法制备颗粒供试品溶液,共6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算异牡荆素含量。结果异牡荆素含量的 RSD 小于 2% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取颗粒样品(编号为S3)0.25 g,精密称定,分别加入150%, 100%, 50% 3个质量浓度的异牡荆素对照品溶液,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率。结果加样回收率为 $96.24\% \sim 104.22\%$,平均加样回收率为 99.62% , RSD 为 $0.11\% \sim 2.61\%$ ($n = 9$)。

2.5.2 含量测定

取各颗粒样品适量,按2.2项下方法制备颗粒供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,结果见表2(其中-为未测出)。W公司10批颗粒样品中异牡荆素含量在 $5.40 \sim 5.54 \text{ mg}/\text{g}$,平均 $5.49 \text{ mg}/\text{g}$ 。故规定以异牡荆素含量的70%为下限设定含量限,即每1 g 荜蕈配方颗粒中异牡荆素含量不得少于3.85 mg。

表2 样品中异牡荆素含量测定结果($n = 3$)

Tab. 2 Results of the content determination of isovitexin in samples ($n = 3$)

编号	含量($\bar{X} \pm s, \text{mg}/\text{g}$)	$RSD(\%)$	编号	含量($\bar{X} \pm s, \text{mg}/\text{g}$)	$RSD(\%)$
S1	5.51 ± 0.057	1.04	S8	5.43 ± 0.011	0.20
S2	5.41 ± 0.051	0.94	S9	5.40 ± 0.012	0.23
S3	5.49 ± 0.032	0.59	S10	5.44 ± 0.073	1.34
S4	5.49 ± 0.077	1.40	S11	1.40 ± 0.021	1.52
S5	5.54 ± 0.018	0.33	S12	-	
S6	5.48 ± 0.026	0.47	S13	-	
S7	5.48 ± 0.004	0.07			

3 讨论

3.1 液相色谱条件

本研究中首先采用全波长扫描,通过色谱峰数目和响应值大小筛选检测波长。发现在336 nm波长条件下,荜蕈配方颗粒的特征图谱基线较平稳,峰容量较大且具有较高响应值,故选择336 nm为检测波长;以峰容量、各峰间的分离度、峰对称性为指标,考察流动相的组成(乙腈-水、乙腈-0.1%醋酸溶液、乙腈-0.1%甲酸溶液),最终确定乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相,并对洗脱时间、比例进行优化;以特征峰保留时间、色谱峰分离度及对称性为指标,考察了柱温(25, 30, 35 $^{\circ}\text{C}$)、流速(0.75 $\sim$ 0.85 mL/min)对特征峰分离效果的影响,结果表明,流速对分离度及色谱峰峰形影响较大,当柱温为30 $^{\circ}\text{C}$ 、流速为0.80 mL/min 时特征峰分离良好。

比较使用相同规格(100 mm $\times$ 4.6 mm, 2.7 μm)不同厂家的色谱柱(Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB -

C₁₈柱,月旭 Boltimate LP-C₁₈柱,迪马 Navigatorsil C₁₈柱),结果表明,迪马和月旭色谱柱在同一色谱条件下,除色谱峰峰对称性稍劣于安捷伦色谱柱外,其他色谱行为均与后者相同。在不同的超高效液相仪器(Waters 和 Agilent)上进行考察,该色谱条件在两个厂家的仪器上均能得到一致的色谱图,表明本研究所建立的色谱条件耐用性良好。

3.2 质谱解析

目前已有文献报道通过化学成分分离、质谱鉴定等方法对蒺藜所含化合物进行鉴定,结果表明其主要含有黄酮苷类^[11]成分。本研究在已有研究的基础上,采用 UPLC-MS/MS 技术分析药材样品中的化学成分,共表征了 14 个化合物,其中柠檬酸、丹参素、原儿茶酸及蒺藜苷 4 个化合物为首次从蒺藜药材中检出。

3.3 提取条件优化

在供试品溶液制备过程中,分别考察了提取方法(超声、加热回流、冷浸),5 种不同提取溶剂(甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇、70% 乙醇、水),提取时间(15,30,45 min),液料比(1:25,1:50,1:100)对颗粒样品有效成分提取率的影响。考虑到配方颗粒在实际应用中主要以热水冲服,本研究中对水和有机溶剂的提取结果进行了比较,发现二者在提取化合物的数量上无明显差异,但峰面积有差异,其中水提物的特征峰平均单位峰面积为 3 352.766 ± 56.95,而 70% 甲醇提取物为 4 073.72 ± 65.87。因此综合峰容量、总峰面积/称样量、实验操作简便易行等因素,选择液料比 1:50,70% 甲醇超声提取 30 min 作为颗粒样品供试品溶液的制备方法。

3.4 特征图谱研究

本研究中在生成对照图谱时采用中位数法,可避免用平均数法易受个别超常样本影响的缺点,使图谱更具代表性^[13]。对来源于不同公司的颗粒样品图谱的相似度进行评估,来源于 W 公司的 10 批样品相似度为 0.998~1.000,结果表明 W 公司的配方颗粒生产工艺稳定,批次间差异较小;S12 和 S13 样品的谱图相似度较高,但与 W 公司差距较大,这可能与不同厂家所使用饮片来源不同或制剂工艺不同有关。有文献报道,蒺藜药材地上部分与来源于白花败酱的败酱草相似,导致二者常出现混用的情况^[20-21],因此不排除药材基源不同的可能。W 公司蒺藜配方颗粒的原料饮片经鉴定为十字花科植物蒺藜的干燥地上部分,且发现在同一试验条件下,蒺藜药材饮片液相色谱图与 W 公司生产的配方颗粒色谱图相似性较高。由于配方颗粒丧失药材性状特征及显微特征鉴定,研究出准确且具有代表性的特征图谱对配方颗粒鉴定尤为重要,因此收集市面上

常见厂家所生产的蒺藜配方颗粒相比较,结果发现不同厂家产品的色谱图差异较大。

综上所述,本研究首次通过高分辨质谱检出蒺藜药材中柠檬酸、丹参素、原儿茶酸及蒺藜苷 4 个化合物,同时建立了以异肥皂草苷、异蒺藜苷、异牡荆素、木犀草素 4 个黄酮类成分为特征峰的 UPLC 特征图谱和异牡荆素含量测定质量标准,为蒺藜配方颗粒质量控制提供了参考。

参考文献

- [1] 周 坤. 蒺藜质量标准及指纹图谱研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2016.
- [2] 孙星衍. 神农本草经[M]. 北京:中医古籍出版社,1982:188.
- [3] 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,2020:348.
- [4] 刘静果,张宝山,张玉红,等. 中草药蒺藜的研究现状及展望[J]. 江苏农业科学,2020,48(22):15-21.
- [5] 宋文静,张 炜,骆桂法,等. 藏药蒺藜子的定性、定量方法研究[J]. 中国药房,2019,30(13):1816-1821.
- [6] 过立农,郑凤雅,刘 杰,等. 蒺藜 HPLC 指纹图谱的建立和 2 种碳苷成分的含量测定[J]. 中国药事,2017,31(9):1032-1038.
- [7] 程丽媛,梁 勇,罗 轩,等. RP-HPLC 法同时测定蒺藜药材中 7 种黄酮苷的含量[J]. 广西大学学报(自然科学版),2016,41(6):2053-2059.
- [8] ZHANG YW, QI ZP, WANG WJ, et al. Isoviteixin inhibits ginkgolic Acids-Induced Inflammation Through Downregulating SHP2 Activation[J]. Front Pharmacol,2021,12:630320.
- [9] HU XF, LI RJ, SUN M, et al. Isoviteixin depresses osteoarthritis progression via the Nrf2/NF- κ B pathway: An *in vitro* study[J]. J Inflamm Res,2021,14:1403-1414.
- [10] CHENG J, WANG G, ZHANG N, et al. Isoviteixin modulates autophagy in Alzheimer's disease via miR-107 signalling[J]. Transl Neurosci,2020,11(1):391-401.
- [11] 袁 静,袁永兵,周 铭,等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 指纹图谱和多成分定量的不同产地辣木叶及其黄酮部位质量研究[J]. 中草药,2022,53(24):7897-7904.
- [12] 于金英,王云红,刘国强,等. HPLC-ESI-MS/MS 分析鉴定蒺藜中黄酮类成分[J]. 中成药,2015,37(3):556-561.
- [13] 肖 岩,马博稷,李冰涛,等. 青钱柳醇提物中化学成分的分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(16):196-204.
- [14] 赵文燕,向 茜,王 蝉,等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 和模式识别技术阐释樟帮特色黄连水炒吴茱萸的炮制科学内涵[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(23):147-155.
- [15] 董世奇,赵 鹿,张东旭,等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的扎冲十三味丸化学成分分析[J]. 中国中药杂志,2022,47(6):1546-1557.
- [16] LI S, WAN CX, HE LK, et al. Rapid identification and