

中图分类号: R917; R927; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)16-0088-08
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2026.16.017



二十一味绿绒蒿浓缩丸质量标准提升研究*

肖志勇¹, 龙锦涛², 吴叶鑫², 李康³, 叶本贵^{1,2}, 黄群⁴, 聂丽娟^{1△}

(1. 西藏大学医学院, 西藏 拉萨 850030; 2. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041; 3. 西藏自治区人民医院, 西藏 拉萨 850000; 4. 成都中医药大学附属医院, 四川 成都 610041)

摘要:目的 建立二十一味绿绒蒿浓缩丸的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对草蓼、沉香、木香、丁香、肉桂、绿绒蒿进行定性鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)法测定胡椒碱、去氢木香内酯、6-姜辣素、山柰酚的含量。结果 草蓼、沉香、木香、丁香、肉桂、绿绒蒿的TLC图特征斑点清晰,分离度好,且阴性对照无干扰。胡椒碱、去氢木香内酯、6-姜辣素、山柰酚质量浓度分别在1.030~4.270 μg/mL、3.270~7.390 μg/mL、1.793~5.471 μg/mL、0.295~1.620 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.9991$, $n=6$);精密度、稳定性、重复性、耐用性试验结果的RSD均小于2.0%;平均加样回收率分别为97.33%, 98.27%, 98.32%, 97.28%, RSD分别为1.24%, 1.49%, 1.55%, 1.59% ($n=6$)。结论 该方法操作简单、结果可靠,可用于二十一味绿绒蒿浓缩丸的质量控制。

关键词:二十一味绿绒蒿浓缩丸;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准;胡椒碱;去氢木香内酯;山柰酚;6-姜辣素

Study on the Quality Standard Improvement of Ershiyiwei Lüronghao Concentrated Pills

Xiao Zhiyong¹, Long Jintao², Wu Yexin², Li Kang³, Ye Bengui^{1,2}, Huang Qun⁴, Nie Lijuan^{1△}

(1. Medical College, Xizang University, Lhasa, Xizang 850030, China; 2. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China; 3. Xizang Plateau Medical Research Institute of Xizang Autonomous Region People's Hospital, Lhasa, Xizang 850000, China; 4. Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To establish a quality standard for Ershiyiwei Lüronghao Concentrated Pills. Methods Thin-layer chromatography (TLC) method was used for the qualitative identification of Piperis Longi Fructus, Aquilariae Lignum Resinatum, Aucklandiae Radix, Caryophylli Flos, Cinnamomi Cortex and Flos Meconopsis. High-performance liquid chromatography (HPLC) method was used to determine the contents of piperine, dehydrocostus lactone, 6-gingerol and kaempferol. Results The TLC chromatograms of Piperis Longi Fructus, Aquilariae Lignum Resinatum, Aucklandiae Radix, Caryophylli Flos, Cinnamomi Cortex, and Meconopsisidis Herba showed characteristic spots with clear separation and no interference from negative controls. The linear ranges of piperine, dehydrocostus lactone, 6-gingerol and kaempferol were 1.030 - 4.270 μg/mL, 3.270 - 7.390 μg/mL, 1.793 - 5.471 μg/mL, and 0.295 - 1.620 μg/mL, respectively ($r \geq 0.9991$, $n=6$). The RSDs for precision, stability, repeatability and durability test results were all lower than 2.0%. The average recoveries were 97.33%, 98.27%, 98.32% and 97.28%, with RSDs of 1.24%, 1.49%, 1.55% and 1.59%, respectively ($n=6$). Conclusion The established method is simple, reliable, which can be used for the quality control of Ershiyiwei Lüronghao Concentrated Pills.

Key words: Ershiyiwei Lüronghao Concentrated Pills; TLC; HPLC; piperine; dehydrocostus lactone; kaempferol; 6-gingerol

二十五味绿绒蒿丸是经典的藏药复方制剂,由绿绒蒿、天竺黄、肉桂等25味药材制成,具有清肝利胆的功效,主要用于治疗肝肿大、肝硬化等肝病及肝热、中毒症状^[1-2]。在藏医理论中,该复方制剂对“木布”症及胆腑功能失调具有独特的调节作用。但其存在制备工艺落后、缺乏对有效物质的提取与纯化、服用剂量大、患者依从性差等不足。因此,本项目组前期综合文献资料,通过药味删减、改变剂型等方法,对制剂进行二次开发,减少总药味数,并由水丸改为浓缩丸(二十一味绿绒蒿浓缩丸,属2.4类创新中药,目前处于临床

前研究阶段),部分药材经提取浓缩后制丸,有效成分含量明显提高,且生物利用度高,进而提升了药效。浓缩丸体积小,服用剂量小,且相比水丸更稳定,便于携带和贮存。且该浓缩丸对非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的药效显著增强,药理活性明显提升,其作用机制可能为通过过氧化物酶增殖物激活受体(PPAR)信号通路,从炎症、氧化应激和胰岛素抵抗等多途径发挥作用,进而发挥其对NAFLD的治疗作用。但该制剂尚无质量标准,为此,本研究中建立了其定性、定量检测方法,为提升该制剂的质量标准提供参考。现报道如下。

* 基金项目:国家自然科学基金[U23A20516];四川省区域创新合作项目[2023YFQ0042];西藏自治区科技计划项目[XZ202301ZY0043G, XZ202301YD0014C]。

第一作者:肖志勇,男,在读硕士研究生,研究方向为天然药物化学,(电子信箱)xzy20000829@163.com。

△通信作者:聂丽娟,女,硕士,讲师,研究方向为民族药与天然药物药效物质基础,(电子信箱)771310824@qq.com。

1 仪器与试药

1.1 仪器

UltiMate™300 型高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Agilent 1260 Infinity II 型高效液相色谱仪(德国 Agilent Technologies 公司);2500C 型多功能粉碎机(东莞市房太电器有限公司);SQP 型电子天平(德国 Sartorius 公司,精度为 0.1 mg);100 目药典筛(绍兴市上虞华丰五金仪器有限公司);JJ-1A-100W 型精密增力电动搅拌器(常州荣华仪器制造有限公司);HZZ-A+200 型电子天平[华志(福建)电子科技有限公司,精度为 0.001 mg];KQ-300E 型超声波清洗器(昆山美美超声仪器有限公司)。

1.2 试药

二十一味绿绒蒿浓缩丸(四川省药物制剂及装备工程技术研究中心,批号分别为 20241201,20241202,20241203);对照品桂皮醛(批号为 110710-202424,含量为 99.2%),去氢木香内酯(批号为 111525-202313,含量为 99.8%),木香烃内酯(批号为 111524-202312),胡椒碱(批号为 110775-202107,含量 99.2%),槲皮素(批号为 100081-202411),6-姜辣素(批号为 111833-202408,含量为 99.3%),山柰酚(批号为 110861-

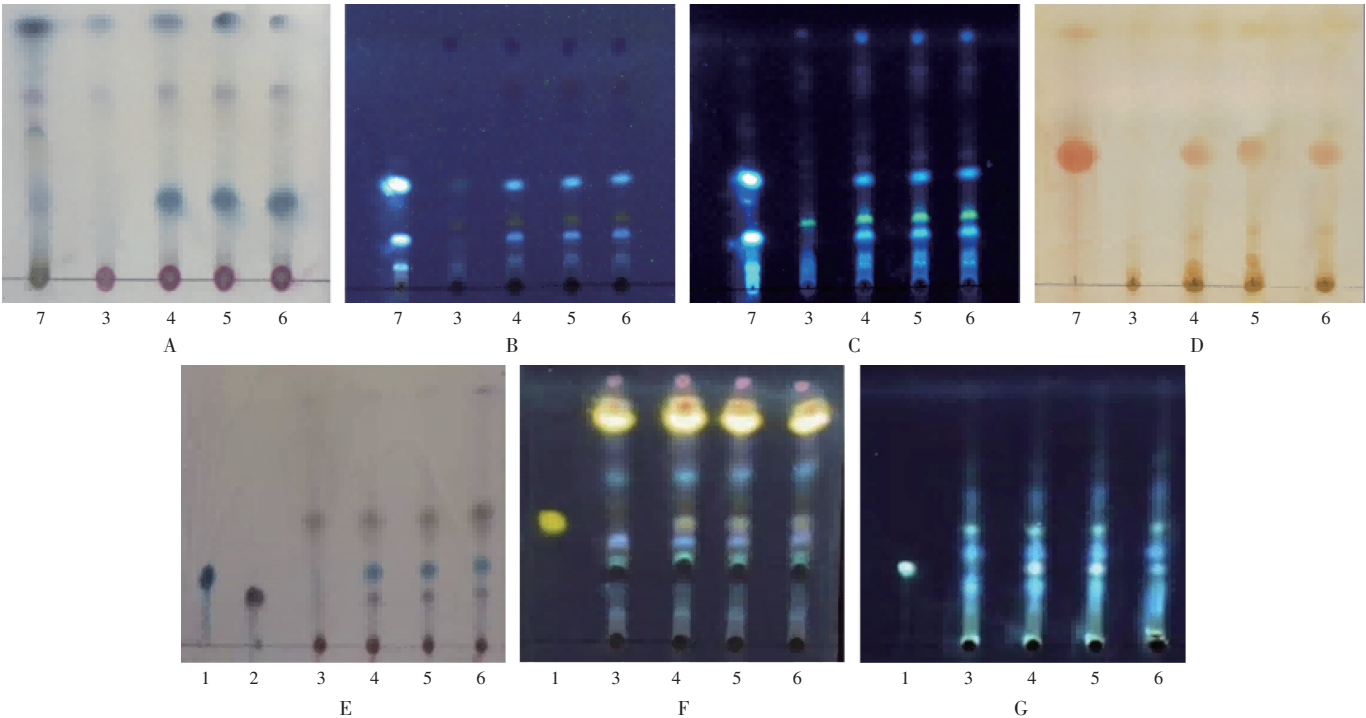
202214,含量 97.4%),以及对照药材丁香(批号为 121039-201906),沉香(批号为 121222-202104),均购自中国食品药品检定研究院;硅胶 G 板(青岛海洋化工有限公司);乙腈和甲醇均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱(TLC)鉴别

丁香^[3]^[4]:取样品粉末 2.5 g,加乙醚 5 mL,超声(功率 300 W,频率 40 kHz)处理 10 min,过滤,取续滤液,即为供试品溶液。取丁香对照药材 0.5 g,加乙醚 1 mL,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。按二十一味绿绒蒿浓缩丸处方和工艺制备阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。参照 2025 年版《中国药典(四部)》通则 0502 薄层色谱法,吸取上述 3 种溶液各 10 μL,点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚-乙酸乙酯(9:1,V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 香草醛硫酸溶液,105℃加热至斑点显色清晰,置日光下检视。结果供试品溶液色谱在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色斑点,且阴性对照无干扰。详见图 1 A。

沉香^[4]:取样品粉末 10 g,加无水乙醇 40 mL,超声



1-2. 对照品溶液 3. 阴性对照品溶液 4-6. 供试品溶液(批号依次为 20241201,20241202,20241203) 7. 对照药材溶液
A. 丁香 B. 沉香(254 nm) C. 沉香(365 nm) D. 肉桂 E. 木香 F. 荜茇 G. 绿绒蒿

图1 薄层色谱图

1-2. Reference solution 3. Negative reference solution 4-6. Test solution (batch No. 20241201,20241202,20241203) 7. Reference medicinal material solution
A. Caryophylli Flos B. Aquilariae Lignum Resinatum (254 nm) C. Aquilariae Lignum Resinatum (365 nm) D. Cinnamomi Cortex E. Aucklandiae Radix F. Piperis Longi Fructus G. Flos Meconopsis

Fig. 1 TLC chromatograms

(功率250 W, 频率40 kHz)处理30 min, 过滤, 70 °C水浴浓缩至约3 mL, 冷却至室温, 以无水乙醇定容至5 mL, 即得供试品溶液。取沉香对照药材0.2 g, 加无水乙醇2.5 mL, 按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。按二十一味绿绒蒿浓缩丸处方和工艺制备缺沉香的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。参照2025年版《中国药典(四部)》通则0502薄层色谱法, 吸取上述3种溶液各10 μ L, 点于同一硅胶G薄层板上, 以甲苯-丙酮-乙酸乙酯(9:1:1, V/V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以10%硫酸乙醇溶液, 分别置365 nm及245 nm紫外光灯下检视。结果供试品溶液色谱在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色斑点, 且阴性对照无干扰。详见图1 B和图1 C。

肉桂^{[3]142}: 取样品粉末10 g, 加入乙醇20 mL, 超声(功率250 W, 频率40 kHz)处理30 min, 过滤, 取续滤液, 即为供试品溶液。取桂皮醛对照品适量, 精密称定, 加乙醇制成每1 mL含1 μ g的对照品溶液。按二十一味绿绒蒿浓缩丸处方和工艺制备缺肉桂的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。参照2025年版《中国药典(四部)》通则0502薄层色谱法, 取上述3种溶液各15 μ L, 点于同一硅胶G薄层板, 以石油醚(60~90 °C)-乙酸乙酯(17:3, V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以二硝基苯肼乙醇试液显色, 置日光灯下检视。结果供试品溶液色谱在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色斑点, 且阴性对照无干扰。详见图1 D。

木香^{[3]63}: 取样品粉末10 g, 加入甲醇10 mL, 超声(功率250 W, 频率40 kHz)处理30 min, 过滤, 取续滤液, 即为供试品溶液。分别取去氢木香内酯、木香烃内酯对照品各适量, 精密称定, 加甲醇分别制成每1 mL含0.5 mg的对照品溶液。按二十一味绿绒蒿浓缩丸处方和工艺制备缺木香的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。参照2025年版《中国药典(四部)》通则0502薄层色谱法, 吸取上述3种溶液各10 μ L, 点于同一硅胶G薄层板上, 以环己烷-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1, V/V/V)的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以1%香草醛硫酸溶液, 加热至斑点显色清晰, 并置日光灯下检视。结果供试品溶液色谱在与混合对照品溶液相应位置显相同颜色的斑点, 且阴性对照无干扰。详见图1 E(1为木香烃内酯, 2为去氢木香内酯)。

荜茇^{[3]246}: 取样品粉末10 g, 精密称定, 加入无水乙醇40 mL, 超声(功率250 W, 频率40 kHz)处理30 min, 过滤, 得滤液, 于水浴中浓缩至3 mL, 冷却至室温, 用无水乙醇定容至5 mL, 即为供试品溶液。取胡椒碱对照品适量, 精密称定, 置棕色容量瓶中, 加无水乙醇制成每1 mL含4 mg的对照品溶液。按二十一味绿绒蒿浓缩

丸处方和工艺制备缺荜茇的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。参照2025年版《中国药典(四部)》通则0502薄层色谱法, 取上述3种溶液各10 μ L, 点于同一硅胶G薄层板, 以甲苯-丙酮-乙酸乙酯(9:1:1, V/V/V)展开, 取出, 晾干, 喷以10%硫酸乙醇溶液显色, 置紫外光灯(365 nm)下观察。结果供试品溶液色谱在与对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点, 且阴性对照无干扰。详见图1 F。

绿绒蒿^[5]: 取样品粉末10 g, 加80%甲醇20 mL, 加热回流30 min, 过滤, 滤液加入盐酸2 mL, 再次加热回流1 h, 浓缩至2 mL, 加水5 mL稀释, 经乙酸乙酯萃取(每次5 mL, 共2次), 合并有机相, 挥干溶剂, 残渣加1 mL甲醇溶解, 即为供试品溶液。取槲皮素对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每1 mL含0.2 mg的对照品溶液。按二十一味绿绒蒿浓缩丸处方与工艺制备缺绿绒蒿的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。参照2025年版《中国药典(四部)》通则0502薄层色谱法, 吸取上述3种溶液各10 μ L, 点于同一硅胶G薄层板上, 以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(5:2:1, V/V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以三氯化铝试液, 105 °C加热至斑点显色清晰, 置紫外光灯(365 nm)下观察。结果供试品溶液色谱在与对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点, 且阴性对照无干扰。详见图1 G。

2.2 胡椒碱含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Ultimate® XB-C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-水(70:30, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 343 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μ L。

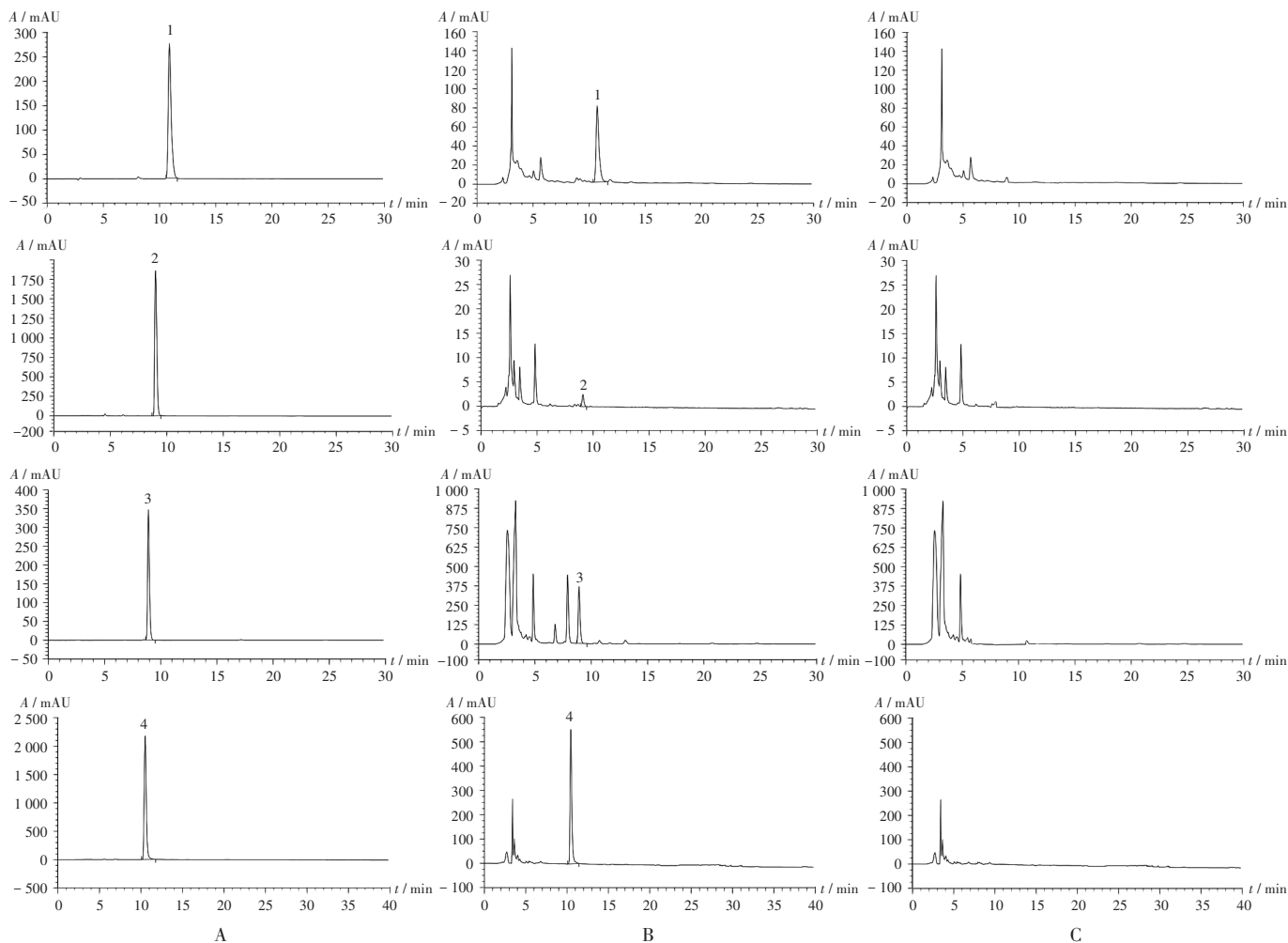
2.2.2 溶液制备

取胡椒碱对照品适量, 精密称定, 置25 mL棕色容量瓶中, 加无水乙醇制成每1 mL含4.27 μ g的对照品溶液。取样品粉末1 g, 置50 mL棕色容量瓶中, 加无水乙醇40 mL, 超声(功率250 W, 频率20 kHz)处理30 min, 冷却至室温, 加无水乙醇定容, 摇匀, 过滤; 取续滤液10 mL, 置25 mL棕色容量瓶中, 以无水乙醇定容, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 即为供试品溶液。按二十一味绿绒蒿浓缩丸处方和工艺制备缺荜茇的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性考察: 取2.2.2项下3种溶液各10 μ L, 按2.2.1项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 结果供试品溶液在与对照品溶液相同保留时间处有相应色谱峰, 分离效果良好, 且阴性对照无干扰, 专属性良好。详见图2。

线性关系考察: 精密吸取2.2.2项下对照品溶液适量, 加无水乙醇等比稀释制成质量浓度分别为1.030, 1.678, 2.326, 2.974, 3.622, 4.270 μ g/mL的系列对照



1. 胡椒碱 2. 去氢木香内酯 3. 6-姜辣素 4. 山柰酚
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图2 高效液相色谱图

1. Piperine 2. Dehydrocostus lactone 3. 6-gingerol 4. Kaempferol
A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,以胡椒碱质量浓度($X, \mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_1 = 6.1728X_1 + 73.642$ ($r = 0.9997, n = 6$)。结果表明,胡椒碱质量浓度在 $1.030 \sim 4.270 \mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取2.2.2项下对照品溶液适量,按2.2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果的 RSD 为 0.58% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液(批号为20241201)适量,分别于室温放置0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h时按2.2.1项下色谱条件进样分析,记录峰面积。结果的 RSD 为 0.06% ($n = 7$)。表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为20241201)1 g,共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

胡椒碱的平均含量为 $0.148 \text{ mg}/\text{g}$, RSD 为 1.79% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(批号为20241201)适量,共6份,置具塞锥形瓶中,精密加入一定量的胡椒碱对照品,再按2.2.2项下方法制备供试品溶液,并按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。

表1 胡椒碱加样回收试验结果($n = 6$)

Tab. 1 Results of the recovery test of the piperine ($n = 6$)						
取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.501	0.074	0.075	0.146	96.00	97.33	1.24
0.500	0.074	0.075	0.146	96.00		
0.507	0.075	0.073	0.146	97.26		
0.521	0.077	0.074	0.149	97.30		
0.532	0.079	0.076	0.154	98.68		
0.510	0.076	0.078	0.153	98.72		

耐用性试验:取2.2.2项下供试品溶液(批号为20241201)适量,分别采用不同流动相比比例[甲醇-水(64:36、66:34、68:32、70:30、72:28, V/V)],流速(0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2 mL/min),柱温(28, 30, 32 °C),色谱柱(Ultimate® XB - C₁₈柱, AmethSep™ C₁₈柱),其余色谱条件同2.2.1项,进样测定,记录峰面积,并计算不同条件下胡椒碱的含量。结果显示,小幅度改变流动相比比例、柱温、色谱柱时,胡椒碱的含量均无显著变化($RSD < 2.0\%$),表明耐用性良好。

2.2.4 样品含量测定

取3批样品(批号分别为20241201、20241202、20241203)各适量,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3批样品中胡椒碱的含量分别为0.150 mg/g、0.152 mg/g、0.151 mg/g,平均0.151 mg/g, RSD 为0.66% ($n=3$)。

2.3 去氢木香内酯含量测定

2.3.1 色谱条件

色谱柱:AmethSep™ C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(66:34, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:225 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μL。

2.3.2 溶液制备

取去氢木香内酯对照品适量,精密称定,置50 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成每1 mL含7.39 μg的对照品溶液。取样品粉末1 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,密塞,称定质量,静置过夜,超声(功率250 W,频率40 kHz)处理30 min,冷却至室温,再次称定质量,以甲醇补足减失的质量,摇匀,过滤,取续滤液,即为供试品溶液。按二十一味绿绒蒿浓缩丸处方和工艺制备缺木香的阴性样品,再按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3.3 方法学考察

专属性考察:精密吸取2.3.2项下的3种溶液各10 μL,按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,结果供试品溶液在与对照品溶液相同保留时间处有相应色谱峰,分离效果良好,且阴性对照无干扰,专属性良好。详见图2。

线性关系考察:精密量取2.3.2项下对照品溶液适量,加甲醇等比稀释制成去氢木香内酯质量浓度分别为3.270, 4.094, 4.918, 5.742, 6.566, 7.390 μg/mL的系列对照品溶液,按2.3.1项下色谱条件进样测定,以去氢木香内酯质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_2 = 3.6286X_2 - 9.8257$ ($r = 0.9998$, $n = 6$)。结果表明,去氢木香内酯质量浓度在3.270 ~ 7.390 μg/mL范围内与峰面积线性

关系良好。

精密度试验:精密吸取2.3.2项下对照品溶液适量,按2.3.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果的 RSD 为0.49% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液(批号为20241201)适量,分别于室温放置0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h时按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 为0.36% ($n = 7$),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为20241201)1.0 g,精密称定,共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。结果去氢木香内酯的平均含量为0.289 mg/g, RSD 为1.66% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(批号为20241201)0.5 g,精密称定,共6份,置具塞锥形瓶中,精密加入一定量的去氢木香内酯对照品,按2.3.2项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,并计算加样回收率。结果见表2。

表2 去氢木香内酯加样回收试验结果($n = 6$)

Tab. 2 Results of the recovery test of dehydrocostus lactone ($n = 6$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.512	0.148	0.152	0.296	97.37	98.27	1.49
0.523	0.151	0.155	0.302	97.42		
0.539	0.156	0.149	0.302	97.99		
0.501	0.145	0.157	0.301	99.36		
0.555	0.160	0.150	0.311	100.67		
0.548	0.158	0.156	0.309	96.79		

耐用性试验:取2.3.2项下供试品溶液(批号为20241201)适量,分别采用不同流动相比比例[甲醇-水(63:37、64:36、65:35、66:34、67:33、68:32, V/V)],流速(0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2 mL/min),柱温(28, 30, 32 °C)及色谱柱(分别采用Ultimate® XB - C₁₈柱、AmethSep™ C₁₈柱),其余色谱条件同2.3.1项,进样测定,记录峰面积,并计算不同条件下去氢木香内酯的含量。结果显示,小幅改变流动相比比例、流速、柱温及色谱柱时,去氢木香内酯的含量无显著变化($RSD < 2.0\%$),表明耐用性良好。

2.3.4 样品含量测定

取3批样品(批号分别为20241201、20241202、20241203)各适量,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,并按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3批样品中去氢木香内酯的含量分别为0.289 mg/g、0.293 mg/g、0.293 mg/g,平均0.292 mg/g, RSD 为0.89% ($n = 3$)。

2.4 6-姜辣素含量测定

2.4.1 色谱条件

色谱柱: Ultimate® XB - C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相: 乙腈 - 水(50:50, V/V);流速: 1.0 mL/min;检测波长: 282 nm;柱温: 30 °C;进样量: 10 μL。

2.4.2 溶液制备

取6-姜辣素对照品适量,精密称定,置25 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成每1 mL含5.471 mg的对照品溶液。取样品粉末1 g,置具塞锥形瓶中,精密加入75%甲醇20 mL,密塞,称定质量,超声(功率100 W,频率40 kHz)处理40 min,冷却至室温,再次称定质量,用75%甲醇补足减失的质量,摇匀,过滤,取续滤液,即为供试品溶液。按二十一味绿绒蒿浓缩丸处方和工艺制备缺干姜的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液。

2.4.3 方法学考察

专属性考察:分别精密吸取2.4.2项下的3种溶液各10 μL,按2.4.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液在与对照品溶液相同保留时间处有相应色谱峰,分离效果良好,且阴性对照无干扰,专属性良好。详见图2。

线性关系考察:精密量取2.4.2项下的对照品溶液适量,用甲醇逐级稀释,得6-姜辣素质量浓度分别为1.793, 2.529, 3.264, 4.000, 4.735, 5.471 μg/mL的系列对照品溶液,按2.4.1项下色谱条件进样测定,以6-姜辣素质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_3 = 6.0705X_3 + 63.518$ ($r = 0.9991, n = 6$)。结果表明,6-姜辣素质量浓度在1.793~5.471 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度考察:精密吸取2.4.2项下对照品溶液适量,按2.4.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果的RSD为0.66% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液(批号为20241201)适量,分别于室温放置0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h时按2.4.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的RSD为0.73% ($n = 7$),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为20241201)0.5 g,精密称定,共6份,按2.4.2项下方法制备供试品溶液,再按2.4.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果6-姜辣素的平均含量为0.0531 mg/g, RSD为1.10% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(批号为20241201)0.5 g,精密称定,共6份,置具塞锥形瓶中,分别精密加入一定量的6-姜辣素对照品,按2.4.2项

表3 6-姜辣素加样回收试验结果($n = 6$)

Tab. 3 Results of the recovery test of 6- gingerol ($n = 6$)						
取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.523	0.0278	0.0275	0.0544	96.73	98.32	1.55
0.537	0.0285	0.0281	0.0565	99.64		
0.515	0.0273	0.0279	0.0542	96.42		
0.542	0.0287	0.0284	0.0570	99.65		
0.528	0.0280	0.0280	0.0550	97.83		
0.519	0.0276	0.0282	0.0557	99.65		

下方法制备供试品溶液,按2.4.1项下色谱条件进样分析,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表3。

耐用性试验:取2.4.2项下供试品溶液(批号为20241201),分别采用不同流动相比比例[乙腈 - 水(47:53, 48:52, 49:51, 50:50, 51:49, 52:48, V/V)],流速(0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2 mL/min),柱温(28, 30, 32 °C)及色谱柱(Ultimate® XB - C₁₈柱, AmethSep™ C₁₈柱),按2.4.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算不同条件下的6-姜辣素的含量。结果显示,小幅度改变流动相比比例、流速、柱温、色谱柱时,6-姜辣素的含量无显著变化($RSD < 2.0\%$),表明方法耐用性良好。

2.4.4 样品含量测定

取3批样品(批号分别为20241201、20241202、20241203)各适量,按2.4.2项下方法制备供试品溶液,再按2.4.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量。结果3批样品中6-姜辣素的含量分别为0.0547 mg/g、0.0553 mg/g、0.0556 mg/g,平均0.0552 mg/g, RSD为0.83% ($n = 3$)。

2.5 山柰酚含量测定

2.5.1 色谱条件

色谱柱: AmethSep™ C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相: 乙腈 - 水(35:65, V/V);流速: 1.0 mL/min;检测波长: 366 nm;柱温: 30 °C;进样量: 10 μL。

2.5.2 溶液制备

取山柰酚对照品16.20 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,制成每1 mL含162.0 μg的对照品贮备液,精密量取1 mL,置100 mL容量瓶中,加甲醇稀释并定容,摇匀,制成每1 mL含1.620 μg的对照品溶液。取样品粉末1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,密塞,称定质量,加热回流提取30 min,冷却至室温,再次称定质量,以甲醇补足减失的质量,摇匀,过滤,取续滤液15 mL,置平底烧瓶中,加入5 mL盐酸(15 → 37),摇匀,水浴加热水解30 min,立即冷却,水解液置25 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,过滤,取续滤液,即为供试品溶液。按二十一味绿绒蒿浓缩丸处方和工艺制备缺红花的阴性样品,

按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.5.3 方法学考察

专属性考察:分别精密吸取2.5.2项下3种溶液各10 μL ,按2.5.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液在与对照品溶液相同保留时间处有相应色谱峰,分离效果良好,且阴性对照无干扰,专属性良好。详见图2。

线性关系考察:精密移取2.5.2项下对照品溶液适量,加甲醇逐级稀释,制成山柰酚质量浓度分别为0.295,0.560,0.825,1.090,1.355,1.620 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列对照品溶液,按2.5.1项下色谱条件进行测定,记录峰面积,以山柰酚质量浓度(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 $Y_4 = 10.687 0X_4 + 2.567 4$ ($r = 0.999 8, n = 6$)。结果表明,山柰酚质量浓度在0.295 ~ 1.620 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取2.5.2项下对照品溶液适量,按2.5.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果的 RSD 为0.61% ($n = 6$),表明仪器精密密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液(批号为20241201)适量,分别于室温放置0,2,4,6,8,12,24 h时按2.5.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 为0.19% ($n = 7$),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为20241202)约3 g,精密称定,共6份,按2.5.2项下方法制备供试品溶液,再按2.5.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量。结果山柰酚的平均含量为15.47 $\mu\text{g}/\text{g}$, RSD 为1.17% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取重复性试验项下已知含量样品0.5 g,精密称定,共6份,置具塞锥形瓶中,分别精密加入一定量的山柰酚对照品,按2.5.2项下方法制备供试品溶液,再按2.5.1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4。

表4 山柰酚加样回收试验结果 ($n = 6$)

Tab. 4 Results of the recovery test of kaempferol ($n = 6$)

取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.512	7.921	7.815	15.370	95.32	97.28	1.59
0.525	8.122	7.945	15.747	95.97		
0.503	7.781	8.076	15.585	96.63		
0.518	8.013	8.207	16.050	97.93		
0.537	8.307	8.289	16.479	98.59		
0.529	8.184	8.301	16.422	99.24		

耐用性试验:取2.5.2项下供试品溶液(批号为20241201)适量,分别采用不同流动相比比例[乙腈-水(32:68,33:67,34:66,35:65,36:64,37:63, V/V)],流速(0.8,0.9,1.0,1.1,1.2 mL/min),柱温(28,30,32 $^{\circ}\text{C}$)

及色谱柱(Ultimate[®] XB - C_{18} 柱、AmethSep[™] C_{18} 柱),其余色谱条件同2.5.1项,进样测定,记录峰面积,并计算不同条件下山柰酚的含量。结果显示,小幅度改变流动相比比例、流速、柱温及色谱柱时,山柰酚的含量无显著变化($RSD < 2.0\%$),表明方法耐用性良好。

2.5.4 样品含量测定

取3批样品(批号为20241201、20241202、20241203)各适量,按2.5.2项下方法制备供试品溶液,按2.5.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量。结果显示,3批样品中山柰酚的含量分别为15.90 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、16.10 $\mu\text{g}/\text{g}$ 和16.09 $\mu\text{g}/\text{g}$,平均含量为16.03 $\mu\text{g}/\text{g}$, RSD 为0.70% ($n = 3$)。

3 讨论

3.1 指标性成分选择

本研究中基于浓缩丸方中药味的提取工艺(分为“浸膏”与“生粉”两部分)及各成分的处方占比,最终确定胡椒碱、山柰酚、6-姜辣素(归属于浸膏部分)及去氢木香内酯(归属于生粉部分)作为含量测定指标。TLC法鉴别则选取了处方中比重较高的丁香、木香、沉香(生粉部分)及肉桂、荜茇、绿绒蒿(浸膏部分)6味药材。上述成分的选定与其明确的肝病治疗方面的药理活性相关,如山柰酚具有多途径的抗氧化机制^[6],能保护肝实质细胞并通过调节自噬减轻肝损伤;其广泛的信号通路调节作用也显示出抗肿瘤潜力^[7]。胡椒碱作为黑胡椒的主要生物碱,可通过抑制核因子 κB ($\text{NF}-\kappa\text{B}$)通路发挥保护作用^[8]。在脂多糖(LPS)诱导的小鼠肝细胞模型中,其能改善肝脏脂肪变性、炎症与纤维化,并下调焦亡相关蛋白(如NLRP3、ASC、Caspase-1 p20等)的表达^[9]。去氢木香内酯可显著改善NAFLD模型大鼠的脂代谢紊乱^[10],其机制与抑制SREBP2和PCSK9表达有关,为治疗提供了新思路^[11]。6-姜辣素能促进胰岛素受体底物1(IRS1)-磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)-蛋白激酶(AKT)-糖原合成酶激酶3 β (GSK3 β)信号转导^[12],从而改善高龄大鼠由高果糖饮食引发的糖脂代谢紊乱^[13]。研究显示,其可能通过直接结合PRKAC α 蛋白调控PKA活性^[14],可能是其改善NAFLD的潜在分子机制^[15]。此外,由于该浓缩丸组方药材较多,成分复杂,且绿绒蒿用量仅占8.8%,其特征生物碱易受干扰,而实际应用的2种绿绒蒿虽在特征生物碱上存在差异,但药效差异较小,因此未将绿绒蒿特征生物碱选为指标性成分。

3.2 色谱条件选择

前期曾尝试建立同时测定4种指标成分的统一HPLC条件。然而,由于该复方组成复杂,使用常规的甲醇-水或乙腈-水流动相体系时,待测峰周围出现大量杂质峰干扰,导致分离度不佳,目标峰与溶剂峰(或杂质峰)难以有效分离。经综合评估,为确保分析方法的专属性与准确性,最终决定对4种成分采用独立的色