

· 中药工业 ·

旋覆花-赭石药对酚酸类成分UPLC指纹图谱 及多指标成分含量测定[△]

陈巧华, 邓怡芳, 文珊, 程钰洁, 陈伟媚, 钟霞, 曾昭君*, 刘燎原
广东一方制药有限公司/广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东 佛山 528244

[摘要] 目的: 建立旋覆花-赭石药对超高效液相色谱法(UPLC)指纹图谱及多指标成分含量同时测定的方法。方法: 采用Agilent ZORBAX RRHD StableBond C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相梯度洗脱, 流速为0.3 mL·min⁻¹, 检测波长为327 nm, 柱温为35 °C, 进样量为1 μL, 建立旋覆花-赭石药对UPLC指纹图谱及同时测定新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异槲皮苷、异绿原酸B、1,5-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸C共8个指标成分含量的方法, 并结合相似度评价、聚类分析(CA)及主成分分析(PCA)等化学模式识别方法对UPLC指纹图谱进行多元统计分析。结果: 建立了旋覆花-赭石药对的UPLC指纹图谱, 确定了16个共有峰, 指认了其中8个成分。相似度评价结果表明, 10批样品的相似度均大于0.990, CA及PCA均可将10批样品聚为3类。建立的含量测定方法稳定可靠, 精密度、重复性、稳定性及加样回收率试验结果均良好。结论: 建立的UPLC指纹图谱及同时测定8个指标成分含量的方法可用于旋覆花-赭石药对的质量控制。

[关键词] 旋覆花-赭石; 药对; 指纹图谱; 化学模式识别; 质量控制

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2023)01-0157-08

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20220602005

Determination of Multiple Index Components and UPLC Fingerprint of Phenolic Acids in Inulae Flos-Haematitum Herb Pair

CHEN Qiao-hua, DENG Yi-fang, WEN Shan, CHENG Yu-jie, CHEN Wei-mei, ZHONG Xia,
ZENG Zhao-jun*, LIU Liao-yuan

Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd./Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine
Formula Granule, Foshan 528244, China

[Abstract] **Objective:** To establish a method for simultaneously determining the UPLC fingerprint and the content of multiple index components in the Inulae Flos-Haematitum herb pair. **Methods:** The gradient elution was performed in Agilent ZORBAX RRHD StableBond C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) with the mobile phase composed of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid aqueous solution at the flow rate of 0.3 mL·min⁻¹, the detection wavelength of 327 nm, the column temperature of 35 °C, and the injection volume of 1 μL. The UPLC fingerprint of the herb pair was established. Meanwhile, the content of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, isoquercetin, isochlorogenic acid B, 1,5-dicaffeoylquinic acid, and isochlorogenic acid C were determined. Further, similarity evaluation, cluster analysis, and principal component analysis were performed to analyze the UPLC fingerprint. **Results:** The UPLC fingerprint of the herb pair Inulae Flos-Haematitum was established, including 16 common peaks, among which 8 peaks were identified. The similarity of 10 batches of samples were greater than 0.990. The cluster analysis and principal component analysis divided the 10 batches of samples into three categories. The established content determination method was reliable, with good precision, repeatability, stability, and sample recovery. **Conclusion:** The established method for simultaneously determining the UPLC fingerprint and 8 index components can be used for the quality control of Inulae Flos-Haematitum herb pair.

[Keywords] Inulae Flos-Haematitum; herb pair; fingerprint; chemical pattern recognition; quality control

[△] [基金项目] 工业和信息化部2019年产业技术基础公共服务平台项目(2019-00902-1-2)

* [通信作者] 曾昭君, 执业中药师, 研究方向: 中药配方颗粒质量标准与工艺研究; E-mail: 1919639653@qq.com

旋覆花为菊科植物旋覆花 *Inula japonica* Thunb. 或欧亚旋覆花 *I. britannica* L. 的干燥头状花序, 味苦、辛、咸, 性微温, 归肺、脾、胃、大肠经, 具有降气、消痰、行水、止呕的功效^[1]。赭石又名代赭石^[2], 为氧化物类矿物刚玉族赤铁矿, 主要含三氧化二铁 (Fe_2O_3), 味苦, 性寒, 归肝、心、肺、胃经, 具有平肝潜阳、重镇降逆、凉血止血的功效^[1]。

药对是指中医临床上常配伍使用的相对固定的2味药, 通常以同类相须、相辅相成、相反相成、相制为用等原则进行配对, 可相互促进增强药效, 或者相互制约、调节以减轻不良反应^[3]。旋覆花-赭石药对最早出自于张仲景《伤寒论》的旋覆代赭汤, 旋覆花味咸, 能消痰、软坚散结, 赭石质重而沉降, 可平肝镇逆, 两者配伍使用能增强镇肝和胃、降逆消痰的疗效^[4]。研究表明, 旋覆花主要含有酚酸类和黄酮类化学成分, 此类成分具有较好的离域度和大 π 键共轭体系的结构特点, 能与Fe、Cu、Al、Zn等金属元素产生较强的配位效应, 可能产生原本不具备的新活性, 或提高某成分原有活性, 同时还能减少不良反应^[5-6]。

由于赭石为矿物药, 在水中溶出率极低, 工业生产中将旋覆花与赭石共煎提取, 可有效减少赭石固形物在生产流转过程中的损失。因此, 本研究拟建立旋覆花-赭石药对超高效液相色谱法 (UPLC) 指纹图谱及新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异槲皮苷、异绿原酸B、1,5-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸C多指标含量同时测定的方法, 以期为旋覆花-赭石药对的药效物质基础及质量控制研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

H-Class 型超高效液相色谱仪 (Waters 公司); MilliQ Direct 型超纯水机 (Merck 股份有限公司); ME204E 型万分之一天平、XP26 型百万分之一天平 (梅特勒-托利多公司); JJ3000B 型百分之一天平 (常熟市双杰测试仪器厂); B-290 型喷雾干燥机 (步琪有限公司); LGS20 型干法制粒机 (南京迦南制药设备有限公司); DLSB-5L/20 型低温冷却液循环泵、YRE-501 型旋转蒸发仪 (巩义市予华仪器有限责任公司); KQ-700DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

对照品新绿原酸 (批号: DSTDX001503, 纯度: 98%)、隐绿原酸 (批号: DST210427-035, 纯度: 98%) 均购自成都乐美天医药科技有限公司; 异绿原酸C (批号: wkq21012501, 纯度: 98%)、异绿原酸B (批号: wkq21022206, 纯度: 98%) 均购自四川省维克奇生物科技有限公司; 1,5-二咖啡酰奎宁酸 (批号: P26F9F54633, 纯度: 98%) 购自上海源叶生物科技有限公司; 绿原酸 (批号: 110753-202018, 纯度: 96.1%)、异槲皮苷 (批号: 111809-201804, 纯度: 97.2%)、咖啡酸 (批号: 110885-201703, 纯度: 99.7%) 均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈、磷酸为色谱级; 其余试剂均为分析纯; 水为超纯水。

10批旋覆花分别购自天津尚药堂医药有限公司 (批号分别为YF2107002、YM2103009、YM2107005、YM2109006)、亳州市君海药业销售有限公司 (批号分别为YM1905014、YM1901002、YM1911035、YM2001007)、安徽冯了性中药材饮片有限公司 (批号分别为YF2012009、YF2009015); 10批赭石分别购自广西一方天江制药有限公司 (批号: YF2101001)、河北光明饮片有限公司 (批号分别为Y2007019、YF2009013)、广西南药药业有限公司 (批号分别为YG2102010、YG2102011、YG2102012、G1911020、Y1907014)、安国市一方中药材有限公司 (批号: Y1906033)、河北光明饮片有限公司 (批号: Y1912018), 经广东一方制药有限公司魏梅主任药师鉴定旋覆花为菊科植物旋覆花 *Inula japonica* Thunb. 的干燥头状花序, 赭石为氧化物类矿物刚玉族赤铁矿。上述10批旋覆花与赭石随机配对, 旋覆花-赭石药对样品 (编号为S1~S10) 均为广东一方制药有限公司技术中心实验室自制。

2 方法与结果

2.1 旋覆花-赭石药对样品的制备

按质量比1:1称取旋覆花、赭石饮片适量, 加水煎煮2次, 煎液滤过, 减压浓缩, 喷雾干燥, 干法制粒, 即得。

2.2 供试品溶液的制备

取旋覆花-赭石药对样品, 研细, 取约0.2g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入80%甲醇25 mL, 密

塞,称定质量,超声处理(功率300 W,频率40 kHz)30 min,放至室温,再称定质量,用80%甲醇补足减失的质量,摇匀,采用0.22 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取对照品新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异槲皮苷、异绿原酸B、1,5-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸C适量,加甲醇溶解,制成质量浓度分别为15.39、39.89、15.50、17.63、12.44、20.48、137.38、36.16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液,摇匀,即得。

2.4 色谱条件

Agilent ZORBAX RRHD StableBond C_{18} 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm);乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~6 min, 8%~13%A; 6~8 min, 13%~16%A; 8~10 min, 16%A; 10~12 min, 16%~22%A; 12~16 min, 22%A; 16~21 min, 22%~33%A; 21~25 min, 33%A);柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;流速:0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;检测波长:327 nm;进样量:1 μL 。

2.5 UPLC指纹图谱研究

2.5.1 专属性试验 取旋覆花-赭石药对样品1份,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取供试品溶液、2.3项下混合对照品溶液及空白溶剂,按2.4项下色谱条件进样检测,记录色谱图。结果显示,供试品在与混合对照品相应的保留时间处显示相同的色谱峰,且空白溶剂无干扰,表明该方法专属性良好。

2.5.2 精密度试验 取旋覆花-赭石药对样品1份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.4项下色谱条件连续进样6次,以11号峰(1,5-二咖啡酰奎宁酸)为参照峰S,计算各色谱峰相对保留时间的RSD为0.01%~0.19%,相对峰面积的RSD为0.02%~0.65%,表明仪器精密度良好。

2.5.3 重复性试验 取旋覆花-赭石药对样品6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.4项下色谱条件进样检测,以11号峰(1,5-二咖啡酰奎宁酸)为参照峰S,计算各色谱峰相对保留时间的RSD为0.01%~0.42%,相对峰面积的RSD为0.09%~0.81%,表明该方法重复性良好。

2.5.4 稳定性试验 取旋覆花-赭石药对样品1份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.4项下色谱条

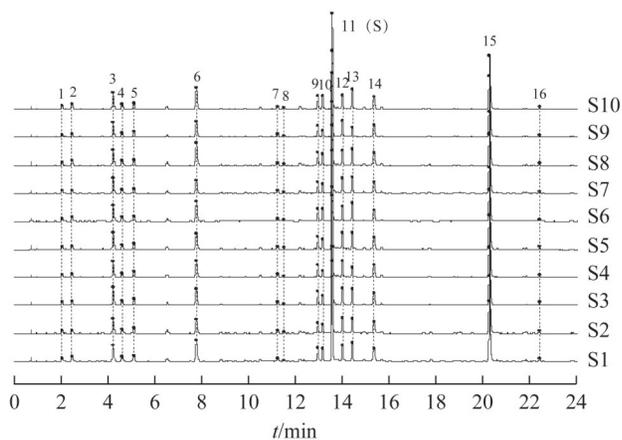
件分别于室温下放置0、2、4、8、12、16、20 h进样检测,以11号峰(1,5-二咖啡酰奎宁酸)为参照峰S,计算各色谱峰相对保留时间的RSD为0.02%~0.72%,相对峰面积的RSD为0.08%~0.96%,表明供试品溶液在20 h内稳定性良好。

2.5.5 耐用性试验 取旋覆花-赭石药对样品1份,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别采用Agilent ZORBAX RRHD StableBond C_{18} (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm)和ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm)2种色谱柱,按2.4项下色谱条件进样检测,以11号峰(1,5-二咖啡酰奎宁酸)为参照峰S,计算各色谱峰相对保留时间的RSD为0.01%~1.90%,相对峰面积的RSD为0.01%~2.62%,表明该方法对不同品牌的色谱柱耐用性良好。

2.5.6 UPLC指纹图谱的建立 取10批旋覆花-赭石药对样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.4项下色谱条件进样检测,并采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)对10批样品的色谱图进行处理,生成对照指纹图谱,10批样品共标定了16个共有峰(图1),指认了峰2~5、峰8、峰10、峰11、峰13分别为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异槲皮苷、异绿原酸B、1,5-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸C(图2)。以11号峰(1,5-二咖啡酰奎宁酸)为参照峰S,分别计算各共有峰相对保留时间与相对峰面积,结果见表1、表2。结果显示,10批旋覆花-赭石药对各共有峰的相对保留时间的RSD为0.02%~0.69%,表明建立的指纹图谱各共有峰出峰时间较为稳定;相对峰面积的RSD为1.96%~21.40%,表明旋覆花-赭石药对批间化学成分含量有差异。

2.5.7 相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版),以对照指纹图谱为参照,对10批旋覆花-赭石药对的UPLC指纹图谱进行相似度评价,10批样品的相似度分别为0.999、0.998、0.997、0.997、1.000、0.998、0.998、0.998、0.996、0.997,均大于0.990,表明10批旋覆花-赭石药对的UPLC指纹图谱具有较好的相似性,质量稳定。

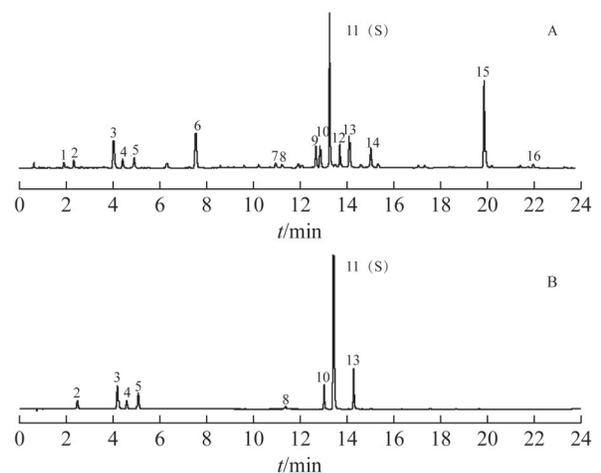
2.5.8 单煎合用与合煎样品指纹图谱测定 另取旋覆花-赭石药对单煎合用与合煎样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.4项下色谱条件进样检测,记录共有峰的峰面积。将单煎合用与合煎样品指纹图



注：2. 新绿原酸；3. 绿原酸；4. 隐绿原酸；5. 咖啡酸；8. 异槲皮苷；10. 异绿原酸B；11 (S). 1,5-二咖啡酰奎宁酸；13. 异绿原酸C；图2同。

图1 10批旋覆花-赭石药对共有峰UPLC图

谱的16个共有峰的峰面积相对于称样量量化处理后导入SPSS 20.0软件，进行独立样本t检验，结果见表3。结果表明，与单煎合用相比，合煎样品中峰1、峰2、峰4~6、峰9、峰10、峰12、峰13、峰15、峰16共有11个



注：A. 供试品；B. 混合对照品。

图2 旋覆花-赭石药对供试品和混合对照品UPLC图

色谱峰的峰面积/称样量值差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，其中合煎中峰2、峰4、峰6、峰9、峰10、峰12、峰13、峰15、峰16的峰面积/称样量比值明显增大，表明旋覆花与赭石共煎后可有效促进部分化学成分的溶出。

表1 10批旋覆花-赭石药对16个共有峰的相对保留时间

编号	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10	峰11 (S)	峰12	峰13	峰14	峰15	峰16
S1	0.153	0.185	0.314	0.343	0.379	0.577	0.832	0.853	0.957	0.971	1.000	1.032	1.064	1.134	1.496	1.650
S2	0.153	0.184	0.314	0.343	0.379	0.577	0.833	0.854	0.957	0.971	1.000	1.032	1.063	1.133	1.494	1.649
S3	0.153	0.184	0.313	0.342	0.378	0.573	0.828	0.848	0.956	0.970	1.000	1.032	1.064	1.132	1.498	1.653
S4	0.151	0.182	0.310	0.339	0.375	0.572	0.827	0.847	0.956	0.970	1.000	1.032	1.063	1.132	1.495	1.651
S5	0.151	0.183	0.311	0.340	0.376	0.572	0.827	0.848	0.956	0.970	1.000	1.032	1.064	1.132	1.497	1.654
S6	0.153	0.184	0.315	0.344	0.380	0.579	0.832	0.852	0.957	0.970	1.000	1.032	1.064	1.133	1.496	1.652
S7	0.153	0.185	0.315	0.343	0.379	0.576	0.830	0.851	0.957	0.970	1.000	1.032	1.064	1.133	1.496	1.652
S8	0.152	0.184	0.314	0.343	0.379	0.578	0.831	0.852	0.957	0.970	1.000	1.032	1.064	1.133	1.496	1.651
S9	0.152	0.184	0.313	0.342	0.378	0.576	0.833	0.854	0.957	0.971	1.000	1.032	1.063	1.132	1.494	1.649
S10	0.151	0.182	0.310	0.338	0.375	0.572	0.827	0.848	0.956	0.970	1.000	1.032	1.063	1.132	1.494	1.651
均值	0.152	0.184	0.313	0.342	0.378	0.575	0.830	0.851	0.956	0.970	1.000	1.032	1.064	1.133	1.496	1.651
RSD/%	0.62	0.69	0.62	0.62	0.45	0.49	0.31	0.33	0.06	0.03	0	0.02	0.03	0.06	0.09	0.09

表2 10批旋覆花-赭石药对16个共有峰的相对峰面积

编号	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10	峰11 (S)	峰12	峰13	峰14	峰15	峰16
S1	0.037	0.059	0.226	0.075	0.093	0.310	0.051	0.028	0.161	0.133	1.000	0.175	0.191	0.171	0.804	0.030
S2	0.039	0.053	0.233	0.069	0.100	0.239	0.061	0.024	0.148	0.106	1.000	0.190	0.183	0.175	0.921	0.028
S3	0.034	0.048	0.226	0.064	0.094	0.224	0.051	0.022	0.148	0.097	1.000	0.171	0.151	0.144	0.716	0.031
S4	0.038	0.054	0.237	0.072	0.107	0.272	0.059	0.031	0.162	0.081	1.000	0.199	0.117	0.173	0.938	0.033
S5	0.036	0.054	0.231	0.068	0.093	0.239	0.048	0.026	0.149	0.113	1.000	0.178	0.177	0.158	0.827	0.028
S6	0.036	0.060	0.229	0.077	0.091	0.299	0.048	0.031	0.163	0.131	1.000	0.163	0.200	0.154	0.757	0.025
S7	0.036	0.050	0.228	0.065	0.091	0.213	0.055	0.025	0.143	0.102	1.000	0.174	0.184	0.153	0.871	0.027
S8	0.040	0.065	0.231	0.080	0.104	0.345	0.051	0.028	0.166	0.125	1.000	0.170	0.185	0.178	0.789	0.031
S9	0.036	0.053	0.229	0.071	0.108	0.269	0.061	0.030	0.163	0.075	1.000	0.203	0.119	0.177	0.956	0.034
S10	0.039	0.067	0.240	0.083	0.099	0.336	0.047	0.031	0.166	0.150	1.000	0.159	0.209	0.167	0.759	0.026
均值	0.037	0.056	0.231	0.072	0.098	0.275	0.053	0.028	0.157	0.111	1.000	0.178	0.172	0.165	0.834	0.029
RSD/%	5.13	11.28	1.96	8.72	6.71	16.98	10.00	11.87	5.63	21.40	0	8.18	18.77	7.13	10.04	10.44

表3 旋覆花-赭石药对单煎合用与合煎样品16个共有峰的峰面积/称样量值 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

处理方式	峰1	峰2	峰3	峰4
单煎合用	529 705±9927	542 005±25 222	2 482 852±71 800	715 276±30 808
合煎	454 956±9940**	703 107±39 185**	2 526 129±56 614	871 997±34 732**
处理方式	峰5	峰6	峰7	峰8
单煎合用	1 355 126±38 797	2 350 672±220 628	616 697±14 321	252 210±9234
合煎	1 189 087±15 490**	3 699 531±222 470**	606 794±13 230	272 755±18 308
处理方式	峰9	峰10	峰11 (S)	峰12
单煎合用	1 577 524±42 072	869 332±33 088	10 124 022±423 308	1 680 428±35 988
合煎	1 775 167±39 727**	1 304 356±43 344**	10 779 471±419 501	1 945 972±43 817**
处理方式	峰13	峰14	峰15	峰16
单煎合用	1 521 155±27 552	1 908 864±273 103	7 093 183±29 402	353 028±12 113
合煎	1 792 773±48 231**	2 067 072±46 120	8 930 655±139 502**	403 512±24 271*

注:与单煎合用相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;表7同。

2.5.9 聚类分析 (CA) 将10批旋覆花-赭石药对指纹图谱的16个共有峰的峰面积相对于称样量量化处理后导入SPSS 20.0软件,CA采用组间联接法,以平方欧氏距离为测量区间,对样品进行CA,结果见图3。当平方欧氏距离 >20 时,10批样品可聚为2类,S2、S4、S5、S7、S9聚为一类,S1、S3、S6、S8、S10聚为一类;当平方欧氏距离为15时,样品可聚为3类,S2、S4、S5、S7、S9聚为一类,S1、S6、S8、S10聚为一类,S3单独聚为一类。

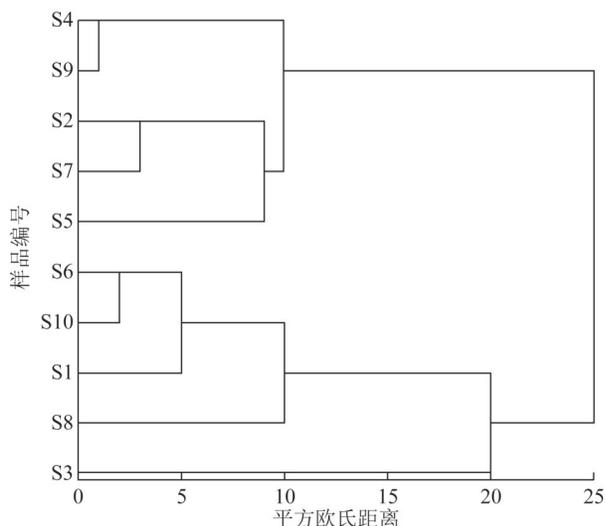


图3 10批旋覆花-赭石药对CA树状图

2.5.10 主成分分析 (PCA) 将10批旋覆花-赭石药对指纹图谱的16个共有峰的峰面积相对于称样量量化处理后导入SPSS 20.0软件,进行PCA,得到特征值、方差贡献率及累积方差贡献率,以特征值 >1 为标准,共提取到3个主成分,结果见表4,可知提取到的3个主成分可代表旋覆花-赭石药对16个共

有峰89.686%的信息。同时采用SIMCA 14.1软件建立坐标系,得到PCA得分图(图4)。结果显示,PCA得分图可大致将10批样品分为3类,S2、S4、S5、S7、S9为一类,S1、S6、S8、S10为一类,S3单独为一类,与CA结果基本一致。

表4 旋覆花-赭石药对3个主成分的特征值、方差贡献率及累积方差贡献率

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	8.632	53.951	53.951
2	4.125	25.783	79.734
3	1.592	9.952	89.686

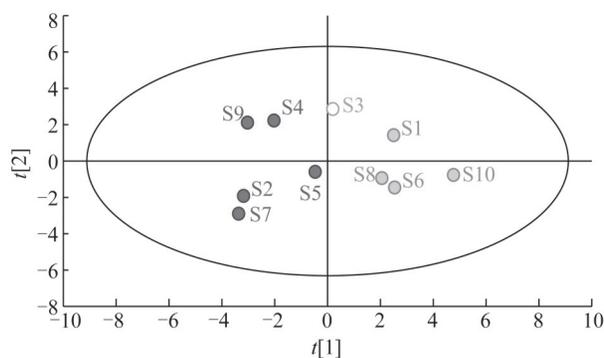


图4 10批旋覆花-赭石药对PCA得分图

2.6 指标成分含量测定

2.6.1 专属性试验 取旋覆花-赭石药对样品1份,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取供试品溶液、2.3项下混合对照品溶液及空白溶剂,按2.4项下色谱条件进样检测,记录色谱图。结果显示,供试品在与混合对照品相应的保留时间处显示相同的色谱峰,且空白溶剂无干扰,表明该方法

专属性良好。

2.6.2 线性关系考察 分别取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异槲皮苷、异绿原酸B、1,5-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸C对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并定容至20 mL棕色量瓶中,配制成质量浓度分别为115.39、285.61、132.40、90.18、66.39、142.49、604.86、186.51 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。分别依次精密吸取上述对照品0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mL至10 mL棕色量瓶中,加入甲醇稀释至刻度,摇匀,按2.4项下色谱条件进行测定,记录色谱峰峰面积。以峰面积为纵坐标(Y),以对照品溶液质量浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,结果见表5。结果显示, r 均 ≥ 0.999 ,表明各指标成分在各质量浓度范围内的线性关系良好。

2.6.3 精密度试验 精密吸取2.3项下混合对照品溶液1份,按2.4项下色谱条件连续进样检测6次,记录色谱峰峰面积。计算各指标成分的峰面积的RSD分别为0.48%、0.40%、0.71%、0.26%、0.58%、0.74%、0.54%、0.44%,表明精密度良好。

2.6.4 稳定性试验 取旋覆花-赭石药对样品1份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.4项下色谱条件分别于室温放置0、2、4、8、12、16、20 h进样检测,计算各指标成分的峰面积的RSD分别为0.74%、0.59%、0.51%、0.87%、0.74%、0.53%、0.70%、0.86%,表明供试品溶液在20 h内稳定性良好。

2.6.5 重复性试验 取旋覆花-赭石药对样品6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.4项下色谱条件进样检测,计算各指标成分含量的RSD分别为0.30%、0.35%、0.58%、0.59%、0.83%、0.34%、0.34%、0.31%,表明重复性良好。

2.6.6 加样回收率试验 精密称取已知含量的旋覆花-赭石药对样品9份,每份约0.1 g,按对照品加入量与供试品中待测定成分量之比0.5:1、1:1、1.5:1分别精密加入各对照品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.4项下色谱条件进样检测,计算各指标成分的平均加样回收率分别为95.93%、101.10%、100.70%、95.00%、95.47%、95.44%、97.10%、95.88%,RSD分别为1.98%、0.99%、1.20%、1.90%、2.24%、1.31%、2.09%、1.33%,表明该方法准确性良好。

2.6.7 耐用性试验 取旋覆花-赭石药对样品2份,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别采用Agilent ZORBAX RRHD StableBond C_{18} (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm)和ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm)2种色谱柱,按2.4项下色谱条件进样检测,计算各指标成分含量的RSD分别为0.18%、0.59%、1.11%、0.92%、1.56%、2.00%、1.20%、1.10%,表明该方法对不同品牌的色谱柱耐用性良好。

2.6.8 样品测定 分别取10批旋覆花-赭石药对样品(S1~S10),按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.4项下色谱条件进样检测,计算各批次旋覆花-赭石药对样品中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异槲皮苷、异绿原酸B、1,5-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸C的含量,结果见表6。10批旋覆花-赭石药对各指标成分含量的RSD为5.64%~23.87%,表明不同批次旋覆花-赭石药对的质量存在一定差异。

2.6.9 单煎合用与合煎样品含量测定 另取旋覆花-赭石药对单煎合用与合煎样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.4项下色谱条件进样检测,计算单煎合用与合煎样品中各指标成分的含量。将含量结果导入SPSS 20.0软件,进行独立样本 t 检验,结果见表7。与单煎合用相比,合煎样品中新

表5 旋覆花-赭石药对8个指标成分线性关系考察结果

指标成分	回归方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
新绿原酸	$Y=10\ 144.00X+440.40$	1.000 0	2.308~115.387
绿原酸	$Y=10\ 534.00X+445.56$	1.000 0	5.712~285.609
隐绿原酸	$Y=9\ 241.80X+346.94$	1.000 0	2.648~132.398
咖啡酸	$Y=18\ 209.00X+743.93$	1.000 0	1.804~90.179
异槲皮苷	$Y=5\ 299.70X-309.41$	1.000 0	1.328~66.388
异绿原酸B	$Y=12\ 150.00X+155.18$	1.000 0	2.850~142.486
1,5-二咖啡酰奎宁酸	$Y=12\ 137.00X+67\ 629.00$	0.999 0	12.097~604.856
异绿原酸C	$Y=12\ 406.00X+511.69$	1.000 0	3.730~186.513

表6 10批旋覆花-赭石药对8个指标成分质量分数测定结果

编号	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	异槲皮苷	异绿原酸B	1,5-二咖啡酰奎宁酸	异绿原酸C
S1	1.96	6.85	2.66	1.66	1.66	3.41	24.28	4.71
S2	1.60	6.22	2.14	1.56	1.30	2.49	21.26	3.95
S3	1.74	7.41	2.46	1.80	1.43	2.69	26.29	4.01
S4	1.61	6.64	2.36	1.75	1.71	1.91	22.26	2.63
S5	1.75	7.08	2.42	1.65	1.55	2.90	24.23	4.35
S6	2.03	7.28	2.79	1.67	1.96	3.71	25.36	5.14
S7	1.52	6.48	2.12	1.50	1.37	2.61	22.53	4.21
S8	2.06	6.61	2.65	1.72	1.56	3.19	22.65	4.23
S9	1.56	6.32	2.25	1.73	1.64	1.87	21.87	2.63
S10	2.26	7.22	2.91	1.77	1.88	3.84	24.20	5.12
均值	1.81	6.81	2.48	1.68	1.61	2.86	23.49	4.10
RSD/%	14.02	6.16	10.96	5.64	13.19	23.87	6.92	21.44

表7 旋覆花-赭石药对单煎合用与合煎样品中8个指标成分含量测定结果 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

处理方式	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	异槲皮苷	异绿原酸B	1,5-二咖啡酰奎宁酸	异绿原酸C
单煎合用	1.41±0.06	5.91±0.23	2.05±0.06	1.90±0.06	1.22±0.05	1.76±0.05	19.13±0.92	2.93±0.08
合煎	1.76±0.09**	6.02±0.16	2.40±0.08**	1.63±0.02**	1.30±0.09	2.61±0.08**	20.30±0.89	3.41±0.08**

绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸B、异绿原酸C的含量差异有统计学意义 ($P<0.01$), 且合煎样品中新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸C的含量均高于单煎合用样品, 与指纹图谱分析结果一致, 表明合煎后部分有效成分含量明显提高。

3 讨论

3.1 旋覆花-赭石药对提取工艺考察

根据2021年国家药品监督管理局发布的《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》中的建议, 并结合《医疗机构中药煎药室管理规范》中的煎煮要求, 饮片一般需煎煮2次, 由于不同种类中药饮片的质地和吸水率差异较大, 应根据饮片的特性确定加水量和煎煮时间^[7]。煎煮时加水量以浸过药面2~5 cm为宜, 花类品种质地蓬松, 吸水率大, 一煎一般需加入饮片量12倍的水, 二煎加入饮片量10倍的水。该药对中旋覆花为花类药材, 体积相对蓬松, 故一煎加入饮片量12倍的水, 二煎加入饮片量10倍的水, 以保证饮片能被充分浸润。对于煎煮时间, 视药物的质地和功效而定, 一煎一般是煮沸后再煎煮30 min, 质地较坚硬的中药饮片可适当延长煎煮时间, 以保证成分的溶出率, 二煎时间可适当缩短。

旋覆花属化痰止咳平喘药, 主要含倍半萜内酯类、黄酮类、酚酸类、萜类等不稳定的化学成分^[8-11], 不宜久煎, 赭石属矿物类中药, 质地坚硬, 临床使用需先煎, 故一煎赭石先煎煮15 min, 后下旋覆花共煎煮30 min, 二煎共煎煮25 min。

3.2 色谱条件优化

分别考察了检测波长205、230、327 nm下色谱峰的数目、响应值、分离度等情况, 结果表明327 nm下的杂质峰干扰少、基线平稳、各色谱峰响应较高、分离度较好; 比较了乙腈-0.2%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液、甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%冰醋酸、乙腈-0.1%甲酸、乙腈-水6种流动相体系的色谱图, 结果表明流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液时色谱峰信息和分离度均优于其他流动相; 同时比较了流速(0.25、0.28、0.30 mL·min⁻¹)和柱温(30、35、40 °C)对色谱峰分离度的影响, 结果表明流速为0.30 mL·min⁻¹、柱温为35 °C时峰9和峰10分离度较好, 故确定流速为0.30 mL·min⁻¹, 柱温为35 °C。此外, 本研究还考察了Waters H-Class、Thermo Vanquish和Agilent 1290 3种不同厂家仪器对色谱峰分离效果的影响, 结果发现Waters H-Class下的色谱峰分离度较好, 而仪器Thermo Vanquish和

Agilent 1290下部分色谱峰分离度较差。

3.3 供试品溶液制备方法考察

本研究分别考察了提取方式(超声、回流)、提取溶剂(50%甲醇、80%甲醇、甲醇、50%乙醇、80%乙醇、乙醇)、提取时间(30、45、60 min)及提取溶剂用量(25、50、100 mL)对旋覆花-赭石药对中化学成分提取效率的影响。结果表明,按提取溶剂用量25 mL加入80%甲醇超声处理30 min,各化学成分的提取效果较好。

研究表明,酚酸类、黄酮类成分是旋覆花发挥抑菌、消炎、抗氧化、抗肿瘤药理作用的主要活性成分^[12-13],且基于经典名方旋覆代赭汤中旋覆花为君药,赭石为臣药,因此,所建立的旋覆花-赭石药对UPLC指纹图谱主要表征旋覆花中的化学成分,同时对主要酚酸类成分新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸B、1,5-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸C和主要黄酮类成分异槲皮苷进行了指认和定量分析。在此基础上,本研究还对该药对单煎合用与合煎样品的指纹图谱及指标成分含量进行了对比研究,结果表明,单煎合用与合煎样品中化学成分组成基本一致,但各成分的含量存在差异,合煎后大部分成分含量明显提高。化学成分是产生药效的物质基础,药对的配伍作用除了体现在共煎时化学成分的变化上之外,还可能发生在体内药动学过程的相互影响或者药效学方面的增强药效或减轻不良反应上,因此,后续可对该药对的药物动力学和药效学进行研究,形成化学-药动-药效的系统研究数据,为该药对的临床应用提供参考。

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,2020:339,388.
- [2] 夏荣双,张芯,胡霖霖. 赭石的效用演变探析[J]. 上海中医药杂志,2020,54(8):49-52.
- [3] 龚健,王胜鹏,陈美婉,等. 中药药对的系统研究(Ⅲ):药剂学理论和新制剂开发[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2012,14(2):1329-1333.
- [4] 许俊博. 旋覆代赭汤质量控制方法研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2002.
- [5] 张馨予,王喆星,单俊杰. 旋覆花属植物化学成分及生物活性的研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2008,35(6):433-440.
- [6] 钱俊臻,王伯初,谭君,等. 黄酮类化合物的金属配合物及其药理作用[J]. 中国药理学通报,2012,28(8):1058-1062.
- [7] 徐杰,陈丹燕,黄梦婷,等. 麻黄-桂枝药对配方颗粒指纹图谱建立及指标成分含量测定研究[J]. 中药材,2021,44(8):1930-1934.
- [8] 覃江江. 四种旋覆花属药用植物中新型倍半萜的发现及生物活性研究[D]. 上海:上海交通大学,2011.
- [9] 朱虹,唐生安,秦楠,等. 旋覆花中化学成分及其活性研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(1):83-88.
- [10] 吴一兵,王云志,查建蓬,等. 欧亚旋覆花中三萜和甾体化合物的分离和结构鉴定[J]. 中草药,2006,37(5):666-668.
- [11] 张婷,杜冠华,陈若芸. 旋覆花属植物中倍半萜类成分及生物活性的研究进展[J]. 中国药学杂志,2010,45(24):1889-1894.
- [12] 吕渭升,位翠杰,潘晓君,等. UPLC-MS/MS法分析旋覆花蜜炙后化学成分的变化[J]. 中国药房,2021,32(20):2478-2484.
- [13] 王静,丁海燕. 酚酸类化合物抑菌作用研究进展[J]. 中成药,2022,44(6):1906-1911.

(收稿日期:2022-06-02 编辑:王笑辉)