

基于 HPLC 指纹图谱和含量测定控制柏子仁丸质量

孙丽雪, 姜鹏*, 詹常森

(上海和黄药业有限公司, 上海中药固体制剂创新工程技术研究中心, 上海 201400)

摘要: 目的 控制柏子仁丸质量。方法 建立 HPLC 指纹图谱, 测定五味子醇甲、白术内酯 I、五味子甲素、五味子乙素、 α -亚麻酸、亚油酸的含量, 再进行主成分分析、正交偏最小二乘法-判别分析。结果 20 批样品指纹图谱中有 17 个共有峰, 相似度均大于 0.995。6 种成分在各自范围内线性关系良好 ($R^2 \geq 0.999 0$), 平均加样回收率 101.07% ~ 103.21%, RSD 0.87% ~ 2.90%。各批样品聚为 3 类, 关键药效成分为白术内酯 I、 α -亚麻酸、亚油酸和五味子甲素。结论 该方法准确可靠, 可为柏子仁丸的质量控制提供依据。

关键词: 柏子仁丸; 质量控制; HPLC 指纹图谱; 含量测定; 主成分分析; 正交偏最小二乘法-判别分析

中图分类号: R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)09-3038-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.09.032

柏子仁丸收录于《中华人民共和国卫生部药品标准》(标准号 WS3-B-0962-91), 是由炒制柏子仁、大枣(去核微炒)、半夏曲(炒)、麸炒白术、炒制五味子、党参片、麻黄根(蜜炙)、煨牡蛎和麦麸(炒黄)9 味中药细粉与炼蜜和水混合制成的水蜜丸, 具有养心安神、和胃固卫的功效, 用于治疗阴虚火旺、夜寐不安、盗汗^[1-3]。方中柏子仁为君药, 其主要成分为油脂, 包括 α -亚麻酸、亚油酸, 具有镇静安神、抗抑郁、保护神经作用, 发挥养心安神功效^[4-8]; 五味子为臣药, 木脂素是其主要成分, 包括五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素, 有镇静催眠、抗抑郁、保护神经作用, 发挥养心安神功效^[9-12]; 白术为佐药, 白术内酯是其主要成分, 其中白术内酯 I 有神经保护^[13-14]、保护胃肠道作用^[15-16], 发挥和胃固卫功效。目前, 对柏子仁丸的临床应用研究较丰富, 但尚未涉及成分分析等质量控制方面。因此, 本实验建立柏子仁丸 HPLC 指纹图谱^[17-19], 同时结合主成分分析和正交偏最小二乘法-判别分析寻找控制制剂内在质量的关键因素, 以期为其质量稳定性和临床有效性提供保障。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪, 配置 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 工作站、G1311C 四元泵系统、G1329B 标准自动进样器、G1316A 柱温箱、G4212B 二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司); AL204 万分之一电子天平、X205BDU 十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); DFY-500 高速中药粉碎机(浙江温岭市大德中药机械有限公司); TDL-40B 台式离心机(上海安亭科学仪器有限公司); DHG-9123A 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); SB-5200 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); Mill-Q Advantage A10 超纯水制备系统[密理

博(上海)贸易有限公司]。

1.2 试剂与药物 五味子醇甲(批号 110857-201815, 纯度 99.7%)、五味子甲素(批号 110764-201915, 纯度 99.5%)、白术内酯 I(批号 11975-201501, 纯度 99.9%) 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 五味子乙素(批号 8366, 纯度 94.7%)、 α -亚麻酸(批号 111631-202006)、亚油酸(批号 11622-202105) 对照品均购自上海诗丹德标准技术服务有限公司。甲醇、磷酸为色谱纯; 其余试剂均为分析纯; 水为超纯水。

先将柏子仁、五味子略炒, 大枣去核微炒, 然后与半夏曲(炒)、麸炒白术、党参片、麻黄根(蜜炙)、煨牡蛎和麦麸(炒黄)混合, 粉碎成细粉, 过筛, 混匀。以上药材均购自山东康源堂中药饮片股份有限公司, 经专家鉴定为正品。每 100 g 粉末加炼蜜 20~30 g 与适量水, 泛丸, 干燥, 即得, 共制得 20 批(批号 202201、202202、202203、202204、202205、202206、202207、202208、202209、202210、202211、202212、202213、202214、202215、202216、202217、202218、202219、202220, 编号 S1 ~ S20)。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱建立

2.1.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m); 流动相甲醇(A)-0.1% 甲酸, 梯度洗脱, 程序见表 1; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 检测波长见表 1; 进样量 10 μ L。

2.1.2 溶液制备

2.1.2.1 对照品溶液 分别称取五味子醇甲、白术内酯 I、五味子甲素、五味子乙素、 α -亚麻酸、亚油酸对照品适量, 加甲醇超声溶解, 制成质量浓度分别为 61.20、

收稿日期: 2024-11-27

作者简介: 孙丽雪(1994—), 女, 硕士, 工程师, 从事中药质量标准研究。E-mail: 1027768836@qq.com

* 通信作者: 姜鹏(1981—), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向为中药全产业链质量标准建设。E-mail: pjiang@shpl.com.cn

表1 梯度洗脱程序和检测波长

时间/min	A 甲醇/%	B 0.1%甲酸/%	检测波长/nm
0~5	70	30	254
5~15	70~83	30~17	254
15~23	83	17	275
23~25	83~90	17~10	205
25~45	90	10	205

2.30、16.60、32.64、196.95、245.33 μg/mL的溶液，即得。

2.1.2.2 供试品溶液 取本品(批号202201)适量，打粉(过4号筛)，取粉末约1.0 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入10 mL甲醇，密塞，称定质量，超声(功率100 W，频率40 kHz)处理30 min，冷却至室温，甲醇补足减失的质量，0.45 μm微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

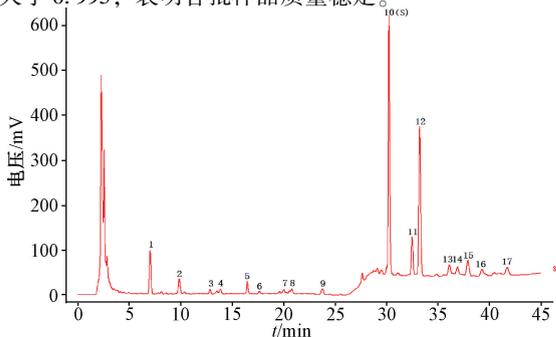
2.1.3 方法学考察

2.1.3.1 精密密度试验 取本品(批号202201)适量，按“2.1.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定6次，以10号峰α-亚麻酸为参照，测得各共有峰相对保留时间RSD均小于2.5%，相对峰面积RSD均小于3.0%，表明仪器精密密度良好。

2.1.3.2 稳定性试验 取本品(批号202201)适量，按“2.1.2.2”项下方法制备供试品溶液，于0、2、4、8、12、24 h在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，以10号峰α-亚麻酸为参照，测得各共有峰相对保留时间RSD均小于1.0%，相对峰面积RSD均小于3.0%，表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.1.3.3 重复性试验 取本品(批号202201)适量，按“2.1.2.2”项下方法制备供试品溶液6份，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，以10号峰α-亚麻酸为参照，测得各共有峰相对保留时间RSD均小于1.0%，相对峰面积RSD均小于3.0%，表明该方法重复性良好。

2.1.4 图谱生成及相似度分析 将20批样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)，对照指纹图谱见图1，HPLC指纹图谱见图2。以峰10(α-亚麻酸)为参照，确定17个共有峰，测得各共有峰的相对保留时间RSD为0.02%~1.20%。相似度评价结果见表2，可知均大于0.995，表明各批样品质量稳定。



1. 五味子醇甲 5. 白术内酯I 6. 五味子甲素 8. 五味子乙素 10. α-亚麻酸 12. 亚油酸

图1 柏子仁丸对照指纹图谱

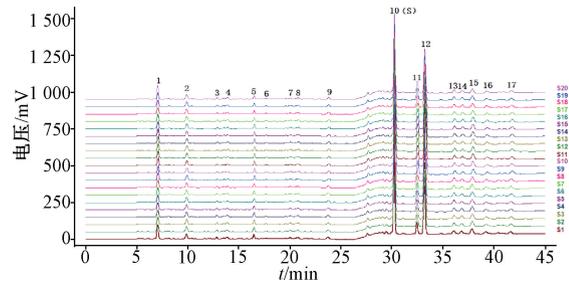


图2 20批柏子仁丸HPLC指纹图谱

2.1.5 共有峰归属 与组方中各单味药材色谱峰及对照品逐一比对，确认1、5、6、8、10、12号峰分别为五味子醇甲、白术内酯I、五味子甲素、五味子乙素、α-亚麻酸、亚油酸(峰面积占比约71%)。除煅牡蛎和麻黄根外，其他7味药材的特征峰均得到归属，其中1、2、6、8、14号峰均来自于五味子，3、4、5号峰均来自于白术，7、15号峰均来自于半夏，9号峰来自于五味子和大枣，10号峰来自于柏子仁、五味子、半夏、白术、党参，11、13号峰均来自于柏子仁，12号峰来自于柏子仁、五味子、半夏、白术、党参、麦麸，见图3。

表2 相似度测定结果

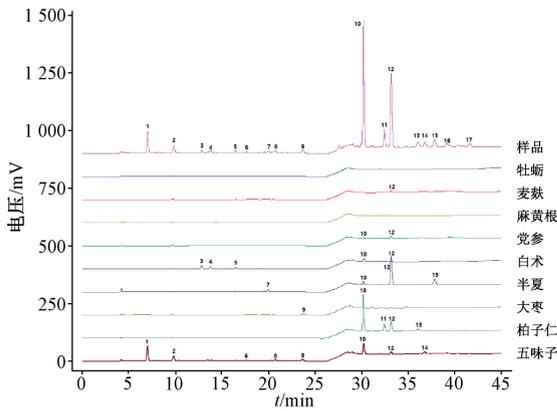
编号	批号	相似度
S1	202201	0.996
S2	202202	0.996
S3	202203	0.996
S4	202204	0.996
S5	202205	0.997
S6	202206	0.997
S7	202207	0.997
S8	202208	0.997
S9	202209	0.996
S10	202210	0.996
S11	202211	0.996
S12	202212	0.997
S13	202213	0.995
S14	202214	0.995
S15	202215	0.995
S16	202216	0.995
S17	202217	1.000
S18	202218	1.000
S19	202219	1.000
S20	202220	1.000

2.2 各成分含量测定

2.2.1 色谱条件 同“2.1.1”项。

2.2.2 溶液制备

2.2.2.1 对照品溶液 同“2.1.2.1”项。



1. 五味子醇甲 5. 白术内酯 I 6. 五味子甲素 8. 五味子乙素 10. α -亚麻酸 12. 亚油酸

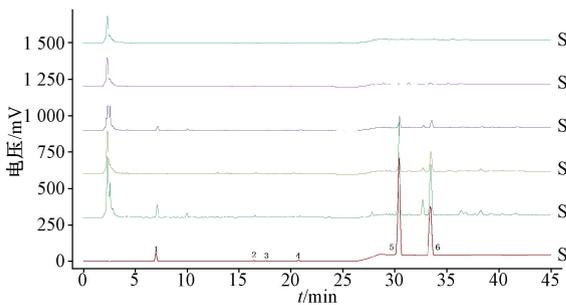
图3 各成分色谱峰归属

2.2.2.2 供试品溶液 同“2.1.2.2”项。

2.2.2.3 阴性样品溶液 根据处方比例，分别制备缺制五味子（五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素来源），缺白术（白术内酯 I 来源），缺柏子仁、五味子、半夏、白术和党参（ α -亚麻酸来源），缺柏子仁、五味子、半夏、白术、党参和麦麸（亚油酸来源）的阴性样品，按“2.1.2.2”项下方法制备，即得。

2.2.3 方法学考察

2.2.3.1 专属性试验 取“2.2.2”项下对照品、供试品、阴性样品溶液适量，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，结果阴性无干扰，见图4。



1. 五味子醇甲 2. 白术内酯 I 3. 五味子甲素 4. 五味子乙素 5. α -亚麻酸 6. 亚油酸

注：S1 为对照品，S2 为供试品，S3 为缺五味子阴性样品，S4 为缺白术阴性样品，S5 为缺柏子仁、五味子、半夏、白术、党参阴性样品，S6 为缺柏子仁、五味子、半夏、白术、党参、麦麸阴性样品。

图4 柏子仁丸阴性图谱

2.2.3.2 线性关系考察 取五味子醇甲、白术内酯 I、五味子甲素、五味子乙素、 α -亚麻酸、亚油酸对照品适量，置于 20 mL 量瓶中，甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，稀释，制成各成分质量浓度分别为 253.00、15.81、256.00、242.91、393.90、490.65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的母液，取适量，甲醇稀释成系列质量浓度，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归，结果见表 3，可知各成分在各自范围内线性关

系良好。

表3 各成分线性关系

成分	回归方程	R^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
五味子醇甲	$Y=21.482X+24.64$	1.000 0	7.91~253.00
白术内酯 I	$Y=55.222X+11.589$	0.999 9	0.49~15.81
五味子甲素	$Y=4.4704X+5.3928$	1.000 0	8.00~256.00
五味子乙素	$Y=5.5874X+6.9607$	1.000 0	7.59~242.91
α -亚麻酸	$Y=29.129X+284.52$	0.999 8	12.31~393.90
亚油酸	$Y=14.485X+44.9$	0.999 0	15.33~490.65

2.2.3.3 精密度的试验 取“2.1.2.1”项下对照品溶液适量，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得五味子醇甲、白术内酯 I、五味子甲素、五味子乙素、 α -亚麻酸、亚油酸峰面积 RSD 分别为 0.20%、0.17%、0.40%、0.32%、0.37%、1.32%，表明仪器精密度良好。

2.2.3.4 重复性试验 取本品（批号 202201）适量，按“2.1.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得五味子醇甲、白术内酯 I、五味子甲素、五味子乙素、 α -亚麻酸、亚油酸峰面积 RSD 分别为 1.20%、1.29%、2.01%、0.61%、0.44%、1.00%、0.44%，表明该方法重复性良好。

2.2.3.5 稳定性试验 取本品（批号 202201）适量，按“2.1.2.2”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得五味子醇甲、白术内酯 I、五味子甲素、五味子乙素、 α -亚麻酸、亚油酸峰面积 RSD 分别为 0.19%、2.17%、0.41%、0.21%、1.23%、2.32%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.3.6 加样回收率试验 精密称取各成分含量已知的本品（批号 202201）9 份，每份约 0.5 g，精密称定，分别按照减半称样量 80%、100%、120% 水平加入对照品（质量浓度分别为 0.200 0、0.020 0、0.060 0、0.082 5、0.730 8、1.100 mg/mL ），按“2.1.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，五味子醇甲、白术内酯 I、五味子甲素、五味子乙素、 α -亚麻酸和亚油酸的平均加样回收率分别为 102.31%、101.07%、102.74%、101.76%、103.21%、101.46%，RSD 分别为 1.36%、2.90%、0.68%、1.95%、0.87%、2.02%。

2.2.4 样品检测 取 20 批样品，按“2.1.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，结果见表 4。

2.3 化学模式识别研究

2.3.1 主成分分析 (PCA) 以 20 批样品中各有效成分含量为变量，导入 SIMCA 18.0 软件，UV 数据归一化处理自动拟合 PCA-X 模型，提取 3 个主成分，累积模型解释率 $R^2X=0.979$ ，累积模型预测能力 $Q^2=0.887$ ，表明模型可靠，得分图见图 5。由此可知，20 批样品归为 3 类，第 1 类 S1~S4，第 2 类 S5~S16，第 3 类 S17~S20。

表4 各成分含量测定结果 (mg/g)

编号	成分					
	五味子醇甲	白术内酯 I	五味子甲素	五味子乙素	α -亚麻酸	亚油酸
S1	0.487	0.058	0.153	0.212	1.688	2.799
S2	0.483	0.058	0.152	0.211	1.675	2.772
S3	0.483	0.058	0.152	0.211	1.673	2.781
S4	0.482	0.058	0.152	0.211	1.669	2.781
S5	0.494	0.048	0.154	0.208	1.870	2.845
S6	0.492	0.048	0.154	0.207	1.866	2.865
S7	0.489	0.048	0.154	0.205	1.855	2.846
S8	0.489	0.048	0.153	0.206	1.850	2.844
S9	0.494	0.052	0.156	0.208	1.883	2.922
S10	0.493	0.052	0.155	0.208	1.882	2.917
S11	0.491	0.052	0.154	0.207	1.878	2.903
S12	0.493	0.052	0.153	0.208	1.883	2.912
S13	0.495	0.053	0.153	0.209	1.884	2.920
S14	0.493	0.053	0.150	0.208	1.875	2.905
S15	0.490	0.053	0.145	0.206	1.864	2.889
S16	0.493	0.053	0.150	0.208	1.874	2.906
S17	0.494	0.043	0.137	0.213	1.685	2.536
S18	0.489	0.042	0.132	0.211	1.674	2.504
S19	0.488	0.042	0.131	0.210	1.670	2.501
S20	0.489	0.042	0.132	0.210	1.672	2.509
平均值	0.490	0.051	0.149	0.209	1.794	2.793
RSD/%	0.801	0.157	0.494	0.285	1.450	2.219

含量变化, 见图7。

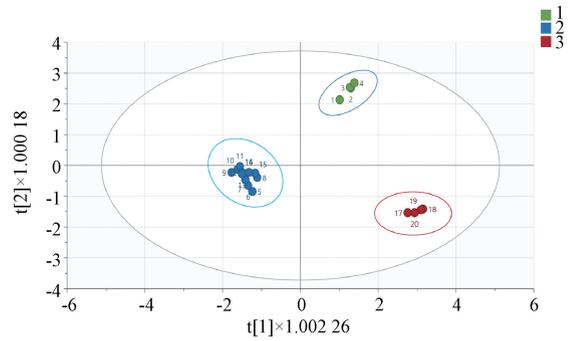


图6 20批柏子仁丸 OPLS-DA 得分图

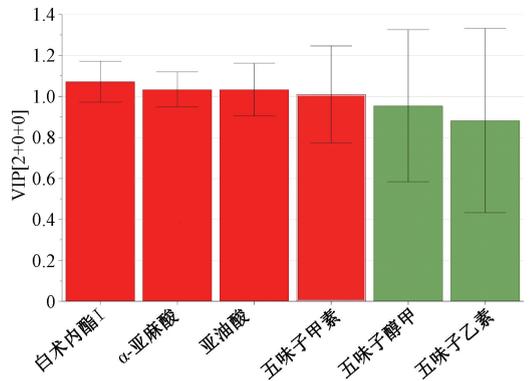
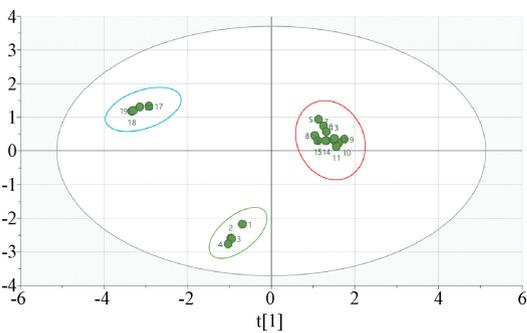


图7 各成分 VIP 值

图5 20批柏子仁 PCA 得分图



2.3.2 正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 在PCA的基础上, 以20批样品中各成分含量为变量, 采用SIMCA 18.0软件进一步分析差异性标志物, 测得拟合参数 $R^2X=0.889$, $R^2Y=0.986$, 预测参数 $Q^2=0.978$, 表明模型预测能力较好, 与PCA分析一致, 得分图见图6。为进一步确认对聚类贡献度较大的成分, 采用变量重要性投影值 (VIP 值) 筛选差异性质量标志物, 以VIP值>1为阈值, 筛选出了4种成分, 分别为白术内酯 I、 α -亚麻酸、亚油酸和五味子甲素, 提示在质量控制过程中可重点关注四者

3 讨论

3.1 指标成分选择 本实验对20批柏子仁丸建立对照指纹图谱, 共发现17个共有峰, 来源于7味中药, 其中被鉴定出的6种成分 (五味子醇甲、白术内酯 I、五味子甲素、五味子乙素、 α -亚麻酸和亚油酸) 共有峰占比约71%, 而且均为制剂主要药效物质。

3.2 化学模式识别研究 来源于白术的白术内酯 I、柏子仁的 α -亚麻酸和亚油酸、五味子的五味子甲素含量差异是20批柏子仁丸聚为3类的主要原因, 提示需对上述主要活性成分进行质量控制。研究表明, 白术主要分布在浙江、安徽、湖南、江西、河北等地^[20], 不同产地药材中化学成分差异较大^[21], 而且采收期和加工方式会影响白术内酯含量^[22-23]; 柏子仁经蒸制和炒制后, 脂肪油含量有所不同^[24]; 不同产地气候、采收期对五味子甲素含量均有影响^[25-26]。由此提示, 可从源头对白术、柏子仁、五味子进行质量控制, 规范药材产地种植和采收时间, 建立统一的加工工艺操作标准和标准化研究, 从而进一步提高柏子仁丸的质量和稳定性。

4 结论

本实验首次建立柏子仁丸 HPLC 指纹图谱及五味子醇甲、白术内酯 I、五味子甲素、五味子乙素、 α -亚麻酸、亚油酸的含量测定方法, 其中白术中的白术内酯 I、柏子仁中的 α -亚麻酸、亚油酸和五味子中的五味子甲素是保证制剂质量稳定均一的关键药效成分, 提示要加强对上述3种药材的控制。上述方法准确可靠, 可更全面地对柏子仁丸进行质量控制。

参考文献:

- [1] 吕选民, 常钰曼. 柴草瓜果篇第五十一讲柏子仁[J]. 中国乡村医药, 2019, 26(17): 46-47.
- [2] 刘震营, 王玲娜, 张永清. 柏子仁本草考证[J]. 中成药, 2020, 42(8): 2133-2136.
- [3] 甘瑞功, 黄清杰, 张中华. 柏子仁炮制沿革与临床合理应用[J]. 甘肃医药, 2024, 43(1): 33-36.
- [4] 王爱梅. 柏子仁水提物抗抑郁作用的实验研究[J]. 光明中医, 2016, 31(11): 1559-1560.
- [5] 周静, 许一凡. 柏子仁化学成分与药理活性研究进展[J]. 化学研究, 2019, 30(4): 429-433.
- [6] 申枢, 纪思宇, 李瑞海, 等. 不同产地柏子仁中氨基酸成分比较分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(9): 125-128.
- [7] 郭婧潭, 刘文艳. 柏子仁中脂肪油的提取工艺研究[J]. 辽宁化工, 2023, 52(6): 801-804.
- [8] 田玥, 杨琦, 高琛, 等. 柏子仁贮存现状及质控研究[J]. 中国医院用药评价与分析, 2022, 22(6): 765-768.
- [9] 魏雪苗, 侯建成, 刘洋, 等. 五味子木脂素研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2018, 39(2): 115-118.
- [10] 刘航, 柳春霞. 蒙药五味子有效成分及药理作用的研究进展[J]. 北方药学, 2014, 11(11): 98-99.
- [11] 杜昕昕, 王寅鹏, 肖伟, 等. 基质固相分散萃取-高效液相色谱法同时测定五味子中5种木脂素类化合物[J]. 色谱, 2023, 41(3): 257-264.
- [12] 吴亚楠, 问思华, 武旭, 等. 五味子果实和叶中7种成分的比较[J]. 西北药学杂志, 2022, 37(4): 15-19.
- [13] 谢泳超. 双白术内酯对谷氨酸神经损伤的保护作用及其机制研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2017.
- [14] 杜航, 何文生, 胡红兰, 等. 白术活性成分药理作用研究进展[J]. 江苏中医药, 2022, 54(5): 76-80.
- [15] 王文革, 次苗苗, 张俊红, 等. 生白术对慢传输型便秘大鼠 c-kit mRNA 表达的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2016, 11(8): 1098-1102.
- [16] 余平, 费莹, 李洪玉, 等. 以离体肠肌抑制作用评价麸炒炮制工艺对白术药效的影响[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(5): 1091-1093.
- [17] 卢国扬, 梁健徽, 吴锐华, 等. 莲须的 UPLC 指纹图谱及异槲皮苷含量分析[J]. 海峡药学, 2023, 35(2): 30-33.
- [18] 彭新航, 肖凌, 费毅琴, 等. 基于指纹图谱及多成分含量测定快速筛查苍术混伪品[J]. 医药导报, 2022, 41(10): 1497-1502.
- [19] 姚杭琦, 张美玲, 蒋春亮, 等. 蓼大青叶标准汤剂鸟苷含量测定及指纹图谱研究[J]. 海峡药学, 2023, 35(4): 26-30.
- [20] 张国亮, 余欢欢, 陈栋杰, 等. 基于一测多评法的不同产地白术药材质量评价[J]. 现代中药研究与实践, 2023, 37(2): 57-62.
- [21] 余欢欢, 张国亮, 史月姣, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 和多元统计分析的白术道地性研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(4): 471-476.
- [22] 白岩, 陈磊, 王晓妮, 等. 白术不同采收期内酯 I、II 和 III 量的动态变化研究[J]. 中草药, 2010, 41(1): 129-131.
- [23] 周海艳, 高云佳, 王敏, 等. UPLC 同时测定不同产地白术中3种白术内酯成分的含量[J]. 中国药品标准, 2023, 24(1): 5-14.
- [24] 李瑞海, 冯琳, 马欣悦, 等. 脂肪油和总二萜含量与柏子仁质量的相关性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(12): 9-11.
- [25] 李旭, 刘莹, 孙文松, 等. 不同产地五味子品质与气候因子的相关性分析[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(5): 1194-1197.
- [26] 范三鹏, 陈巍, 齐壮博, 等. 多指标综合评价不同采收期对北五味子质量影响[J]. 中国林副特产, 2022(5): 1-5.