

一测多评法同时测定枇杷叶标准汤剂中3种绿原酸

李文兵^{1,2}, 邢冷^{3,4}, 卢君蓉⁵, 许玲^{3,4}, 姜艳娇^{3,4}, 刘圆^{2,6*}, 胡昌江^{3,5*}

(1. 西南民族大学青藏高原研究院, 四川成都 610041; 2. 四川省羌彝药用资源保护与利用技术工程实验室, 四川成都 610225; 3. 国家中医药管理局“中药配方颗粒质量与临床疗效评价”重点研究室, 四川成都 611900; 4. 四川新绿色药业科技发展有限公司, 四川成都 611900; 5. 成都中医药大学, 四川成都 611137; 6. 西南民族大学民族医药研究院, 四川成都 610041)

摘要: 目的 建立一测多评法同时测定枇杷叶标准汤剂(枇杷叶)中3种绿原酸的含量。方法 该药物50%甲醇提取液的分析采用Agilent 5 HC C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.4%磷酸, 梯度洗脱; 体积流量1.0 mL/min; 柱温35℃; 检测波长327 nm。以绿原酸为内标, 建立新绿原酸、隐绿原酸的相对校正因子, 测定其含量。结果 绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸在各自范围内线性关系良好($r>0.999\ 6$), 平均加样回收率97.22%~97.66%, RSD 1.16%~1.85%。一测多评法所得结果与外标法接近。结论 该方法简便可靠, 耐用性好, 可用于枇杷叶标准汤剂的质量控制。

关键词: 枇杷叶标准汤剂; 绿原酸; 新绿原酸; 隐绿原酸; 一测多评

中图分类号: R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)01-0202-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.01.038

枇杷叶为蔷薇科植物枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. 的干燥叶, 是中医临床常用的一味中药, 具有清肺止咳, 降逆止呕之功效, 临床上常用于肺热咳嗽、气逆喘急、胃热呕逆、烦热口渴等症的治疗^[1]。现代研究表明, 枇杷叶有止咳^[2]、祛痰^[3]、抗炎^[4]、抗肿瘤^[5]、抗肾衰竭^[6]等药理作用, 其主要成分为三萜^[7-8]、挥发油^[9]、倍半萜^[10]、黄酮^[11]等。

枇杷叶在中医临床上多人汤剂, 而2020年版《中国药典》对其质量控制指标为三萜类(齐墩果酸和熊果酸), 由于该类成分极性较小, 在汤剂中难以溶出和检测。国家药典委员会公示第一批中药配方颗粒标准中, 基于检测成本的考虑, 枇杷叶配方颗粒仅以绿原酸单一成分作为质控指标, 导致其专属性不强, 难以全面控制产品质量。因此, 本文以绿原酸为参照物, 建立枇杷叶标准汤剂中一测多评方法, 同时测定新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸的含量, 不仅可以降低检测成本, 还能实现多成分同时检测, 增加专属性, 可为枇杷叶标准汤剂及配方颗粒标准提升和修订提供理论依据。

1 材料

收稿日期: 2020-02-24

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1708005); 中央高校基本科研业务费专项资金研究类项目(2020NGD01); 四川省科技支撑计划项目(2015SZ0031)

作者简介: 李文兵(1988—), 男, 博士, 副研究员, 从事民族药炮制工艺及质量标准研究。Tel: 13540876731, E-mail: 285892232@qq.com

* **通信作者:** 刘圆(1968—), 女, 教授, 博士生导师, 从事少数民族药物研究和教学工作。Tel: (028) 85528812, E-mail: 499769896@qq.com

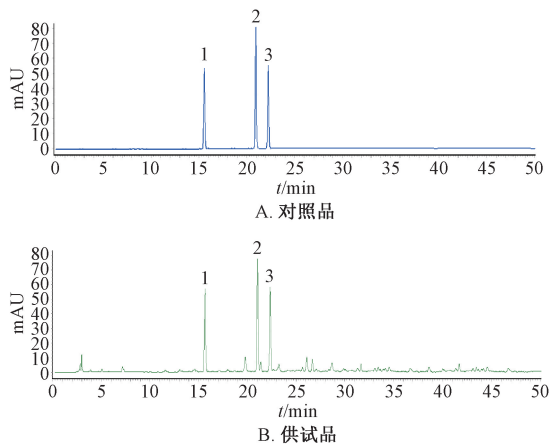
胡昌江(1952—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中药炮制原理及饮片质量标准研究。Tel: 13980980796, E-mail: hhccjj@hotmail.com

1.1 **仪器** Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司); Shimadzu LC-20A型高效液相色谱仪(日本岛津公司); Waters 2695-2996高效液相色谱仪(美国Waters公司); XP26型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司); KQ5200DB型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 1810A摩尔原子型超纯水器(上海摩勒科学仪器有限公司); NCCO-300型全自动切药机(杭州金竺机械有限公司); 全自动分体式陶瓷煎药壶(潮州市永达基电器厂); LGJ-100F型真空冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司)。

1.2 **试剂与药物** 绿原酸(批号110753-201415, 纯度96.2%, 中国食品药品检定研究院); 新绿原酸(批号17062003, 纯度98%)、隐绿原酸(批号17061401, 纯度98%)对照品(成都普菲德生物技术有限公司)。枇杷叶20批, 产地四川简阳(3批)、金堂(4批)、仁寿(8批)、中江(1批)(批号BT01~BT16), 浙江绍兴、丽水(各1批)(批号BT17~BT18), 福建南平(2批)(批号BT19~BT20), 经专家鉴定为正品, 按照2020年版《中国药典》规定除去绒毛, 用水喷润, 切丝, 干燥。乙腈为色谱纯; 其余试剂均为分析纯; 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent 5 HC C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 0.4% 磷酸 (A) -乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~5 min, 95% A; 5~35 min, 95%~78% A; 35~50 min, 78% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 ℃; 检测波长 327 nm; 进样量 10 μL。在此条件下, 新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸色谱峰与样品中其他组分色谱峰达到基线分离, 理论塔板数均大于 5 000, 见图 1。



1. 新绿原酸 2. 绿原酸 3. 隐绿原酸

图 1 各绿原酸 HPLC 色谱图

2.2 对照品溶液制备 精密称取绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸对照品适量, 置于量瓶中, 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 质量浓度分别为 1.077 2、0.581 5、0.348 1 mg/mL, 精密量取适量, 置于量瓶中, 50% 甲醇稀释至刻度, 即得 (含绿原酸 0.430 9、0.172 4、0.068 9、0.027 6、0.011 0 mg/mL, 新绿原酸 0.232 6、0.093 0、0.037 2、0.014 9、0.006 0 mg/mL, 隐绿原酸 0.139 2、0.055 7、0.022 3、0.008 9、0.003 6 mg/mL)。

2.3 标准汤剂制备 取饮片适量, 按枇杷叶标准汤剂工艺制备^[12], 即得。

2.4 供试品溶液制备 取标准汤剂粉末约 0.2 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 25 mL 50% 甲醇, 密塞, 称定质量, 超声 (600 W、40 kHz) 处理 30 min, 放冷, 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.5 线性关系考察 精密吸取对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样 10 μL 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 1, 可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 各绿原酸线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
新绿原酸	Y=24.09X-103.74	0.999 9	5.95~581.50
绿原酸	Y=29.75X-45.21	0.999 9	11.03~1 077.20
隐绿原酸	Y=23.91X-137.46	0.999 6	3.56~348.10

2.6 精密度试验 精密吸取“2.2”项下对照品溶液 10 μL, 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得新绿

原酸、绿原酸、隐绿原酸峰面积 RSD 分别为 0.08%、0.12%、0.09%, 表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一批本品 (批号 BT01) 6 份, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样 10 μL 测定, 测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸含量 RSD 分别为 0.78%、0.89%、1.01%, 表明该方法重复性良好。

2.8 稳定性试验 取同一份供试品溶液 (批号 BT01) 适量, 于 0、1、2、4、8、16、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样 10 μL 测定, 测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸含量 RSD 分别为 1.24%、1.03%、1.51%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.9 加样回收率试验 精密称取各成分含量已知的标准汤剂 (批号 BT01) 6 份, 每份 0.10 g, 加入 1 mL 对照品溶液 (含绿原酸 0.404 1 mg/mL、新绿原酸 0.352 0 mg/mL、隐绿原酸 0.503 2 mg/mL), 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样 10 μL 测定, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 各绿原酸加样回收率试验结果 (n=6)

成分	取样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收率/ (RSD/%)
新绿原酸	0.101 2	0.383 3	0.352 0	0.725 8	97.29	97.24
	0.100 5	0.380 7	0.352 0	0.723 1	97.28	(1.85)
	0.101 4	0.384 1	0.352 0	0.722 0	96.00	
	0.100 7	0.381 4	0.352 0	0.724 4	97.43	
	0.102 6	0.388 6	0.352 0	0.723 2	95.05	
绿原酸	0.102 4	0.387 9	0.352 0	0.741 2	100.38	
	0.101 2	0.417 4	0.404 1	0.816 7	98.82	97.22
	0.100 5	0.414 5	0.404 1	0.806 5	97.01	(1.16)
	0.101 4	0.418 2	0.404 1	0.804 8	95.67	
	0.100 7	0.415 3	0.404 1	0.805 4	96.53	
隐绿原酸	0.102 6	0.423 1	0.404 1	0.815 6	97.12	
	0.102 4	0.422 3	0.404 1	0.818 9	98.15	
	0.101 2	0.497 8	0.503 2	0.979 5	95.73	97.66
	0.100 5	0.494 3	0.503 2	0.992 8	99.06	(1.25)
	0.101 4	0.498 8	0.503 2	0.994 5	98.52	
	0.100 7	0.495 3	0.503 2	0.986 9	97.69	
	0.102 6	0.504 7	0.503 2	0.991 6	96.77	
	0.102 4	0.503 7	0.503 2	0.997 8	98.20	

2.10 相对校正因子、相对保留时间测定及耐用性考察

2.10.1 相对校正因子 以绿原酸为内标, 采用多点校正法^[13-15]计算新绿原酸和隐绿原酸的相对校正因子、相对保留时间, 结果见表 3。

2.10.2 不同仪器对相对校正因子的影响 考察 Agilent 1260、Shimadzu LC-20A、Waters 2695-2996 色谱仪对相对校正因子的影响, 结果见表 4, 可知均无明显影响 (RSD<3%)。

2.10.3 不同色谱柱对相对校正因子的影响 在 Agilent 1260 HPLC 色谱仪上, 考察 Agilent 5 HC、Phenomenex、

Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 对相对校正因子的影响, 结果见表 5, 可知均无明显影响 (RSD<3%)。

表 3 各绿原酸相对校正因子、相对保留时间测定结果

编号	相对校正因子		相对保留时间	
	(内标绿原酸)		(内标绿原酸)	
	新绿原酸	隐绿原酸	新绿原酸	隐绿原酸
1	0.751 0	0.581 6	0.745 1	1.062 1
2	0.753 1	0.581 8	0.744 3	1.062 3
3	0.751 8	0.581 7	0.744 2	1.062 2
4	0.754 6	0.584 2	0.744 1	1.062 0
5	0.755 6	0.582 9	0.745 2	1.062 4
平均值	0.753 2	0.582 4	0.744 6	1.062 2
RSD/%	0.25	0.19	0.07	0.01

表 4 不同仪器对相对校正因子的影响 (n=3)

仪器	相对校正因子 (内标绿原酸)	
	新绿原酸	隐绿原酸
Agilent 1260	0.751 5	0.581 8
Shimadzu LC-20A	0.758 1	0.575 4
Waters 2695-2996	0.747 5	0.590 2
平均值	0.752 4	0.582 5
RSD/%	0.71	1.27

表 6 各绿原酸含量测定结果 (n=2)

产地	批号	绿原酸/ (mg·g ⁻¹)	新绿原酸/(mg·g ⁻¹)			隐绿原酸/(mg·g ⁻¹)		
			外标法	一测多评法	RSD/%	外标法	一测多评法	RSD/%
四川简阳	BT01	4.124	3.787	3.794	0.13	4.919	4.930	0.16
四川简阳	BT02	4.549	4.539	4.546	0.11	5.666	5.679	0.16
四川简阳	BT03	3.128	2.896	2.901	0.12	3.847	3.856	0.17
四川金堂	BT04	2.973	2.833	2.837	0.10	3.739	3.747	0.15
四川金堂	BT05	3.805	3.161	3.166	0.11	4.245	4.255	0.17
四川金堂	BT06	3.830	3.438	3.444	0.12	4.505	4.515	0.16
四川金堂	BT07	3.727	3.713	3.719	0.11	4.721	4.731	0.15
四川仁寿	BT08	6.173	6.156	6.166	0.11	7.823	7.841	0.16
四川仁寿	BT09	3.747	3.707	3.713	0.11	4.748	4.759	0.16
四川仁寿	BT10	4.402	3.947	3.953	0.11	5.122	5.133	0.15
四川仁寿	BT11	4.328	4.241	4.248	0.12	5.375	5.387	0.16
四川仁寿	BT12	2.935	2.755	2.759	0.10	3.652	3.661	0.17
四川仁寿	BT13	7.992	6.364	6.374	0.11	8.133	8.152	0.16
四川仁寿	BT14	5.235	5.195	5.204	0.12	6.550	6.565	0.16
四川仁寿	BT15	4.216	5.383	5.392	0.12	6.386	6.400	0.15
四川中江	BT16	3.012	4.314	4.321	0.11	5.042	5.053	0.15
浙江绍兴	BT17	3.550	4.168	4.175	0.12	4.900	4.911	0.16
浙江丽水	BT18	2.958	4.241	4.248	0.12	5.056	5.067	0.15
福建南平	BT19	5.183	5.433	5.442	0.12	6.865	6.881	0.16
福建南平	BT20	6.245	5.719	5.728	0.11	7.352	7.369	0.16

表 5 不同色谱柱对相对校正因子的影响 (n=3)

色谱柱	相对校正因子 (内标绿原酸)	
	新绿原酸	隐绿原酸
Agilent 5 HC	0.752 0	0.582 3
Phenomenex	0.751 6	0.578 7
Diamonsil	0.753 2	0.581 8
平均值	0.752 2	0.580 9
RSD/%	0.11	0.34

2.11 样品含量测定 取不同产地、批次标准汤剂冻干粉, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下分别采用外标法、一测多评法测定含量, 结果见表 6, 可知 2 种方法无明显差异, 表明一测多评法具有较高的可信度。

3 讨论

中药标准汤剂是在中医药理论指导下, 参考现代提取方法, 经标准化工艺制备而成的单味或复方中药水煎剂^[16-17], 主要用于中药新型饮片及成方制剂的工艺规范、质量控制及一致性评价等^[18]。“标准汤剂”概念最早由日本提出, 作为汉方药制剂的化学和生物学基准。国内在 1998 年魏刚^[19]首次提出中药复方的研究应建立在标准汤剂

的基础之上,但直到2016年陈士林等^[20]系统阐述中药标准汤剂的内涵和外延,才引起相关监管部门的重视,并逐渐成为评价中药配方颗粒及经典名方制剂工艺和质量标准是否合理的基准物质。

2020年版《中国药典》枇杷叶质量控制指标为熊果酸和齐墩果酸,前期对20批次枇杷叶标准汤剂中熊果酸和齐墩果酸含量进行测定,结果发现,标准汤剂中熊果酸和齐墩果酸含量极微,总量仅为0.002%~0.072%;进一步通过UPLC-Q-TOF-MS对枇杷叶标准汤剂中化学成分进行鉴定,并参照文献[21]用标准品比对,确认含有新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸等3种苯丙素类成分,且含量较高。该类成分有抗菌^[22]、抗炎^[23]等药理作用,与枇杷叶清肺止咳传统功效有一定关联性,因此,选择3种绿原酸类成分作为标准汤剂的含测指标,并建立一测多评含量测定方法,不仅可节约检测成本,还能提高质量控制专属性,可为枇杷叶标准汤剂及配方颗粒标准的修订提供参考。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 213.

[2] 王立为, 刘新民, 余世春, 等. 枇杷叶抗炎和止咳作用研究[J]. 中草药, 2004, 35(2): 174-176.

[3] 叶广亿, 李书渊, 陈艳芬, 等. 枇杷叶不同提取物的止咳化痰平喘作用比较研究[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(2): 100-102.

[4] 鞠建华, 周亮, 林耕, 等. 枇杷叶中三萜酸类成分及其抗炎、镇咳活性研究[J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(10): 752-757.

[5] Ito H, Kobayashi E, Takamatsu Y, et al. Polyphenols from *Eriobotrya japonica* and their cytotoxicity against human oral tumor cell lines [J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 48(5): 687-693.

[6] Hossary G, Fathy M, Kassem H, et al. Cytotoxic triterpenes from the leaves of *Eriobotrya japonica* L. growing in Egypt and the effect of the leaves on renal failure [J]. *Bull Fac Pharm (Cairo Univ)*, 2000, 38(1): 87-97.

[7] 陈剑, 李维林, 吴菊兰, 等. 枇杷叶的化学成分研究(I) [J]. 中草药, 2006, 37(11): 1632-1634.

[8] De Tommasi N, De Simone F, Cirino G, et al. Hypoglycemic effects of sesquiterpene glycosides and polyhydroxylated triterpenoids of *Eriobotrya japonica* [J]. *Planta Med*, 1991, 57(5): 414-417.

[9] 台琪瑞, 徐熹, 郭伟琳. 枇杷叶挥发油的气相色谱-质谱

联用分析[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(3): 206-208.

[10] De Tommasi N, Aquino R, De Simone F, et al. Plant metabolites new sesquiterpene and ionone glycosides from *Eriobotrya japonica* [J]. *J Nat Prod*, 1992, 55(8): 1025-1032.

[11] Louati S, Simmonds M S J, Grayer R J, et al. Flavonoides from *Eriobotrya Japonica* (Rosaceae) growing in Tunisia [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2003, 31(1): 99-101.

[12] 李文兵, 许玲, 卢君蓉, 等. 基于HPLC指纹图谱的枇杷叶蜜炙前后标准汤剂质量控制研究[J]. 中草药, 2020, 51(13): 3444-3450.

[13] 李文兵, 卢君蓉, 胡麟, 等. 一测多评法测定姜黄中姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素[J]. 中草药, 2017, 48(3): 573-577.

[14] 徐赛华, 沈昱翔. 一测多评法测定重楼药材中4种皂苷类成分含量[J]. 医药导报, 2017, 36(9): 1029-1033.

[15] 谭诗涵, 伍红年, 雷雅婷, 等. 一测多评法测定竹节参中7种皂苷类成分的含量[J]. 中草药, 2019, 50(17): 4164-4169.

[16] 朱广伟, 李西文, 李琦, 等. 基于传统煎药工艺的龙胆饮片标准汤剂制备及质量评价方法研究[J]. 中草药, 2017, 48(20): 4253-4260.

[17] 马跃平, 刘晓秋, 陈发奎. 泻心汤配方颗粒与标准汤剂的HPLC指纹图谱对照研究[J]. 中成药, 2006, 28(3): 317-321.

[18] 杨立伟, 王海南, 耿莲, 等. 基于标准汤剂的中药整体质量控制模式探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(8): 1-6.

[19] 魏刚. 标准汤剂论[J]. 中国中医药信息杂志, 1998, 5(4): 6-8.

[20] 陈士林, 刘安, 李琦琦, 等. 中药饮片标准汤剂研究策略[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(8): 1367-1375.

[21] 段慧芳, 吴啟南, 朱亚莹, 等. UPLC同时测定不同产地金银花中10种成分[J]. 中草药, 2019, 50(23): 5858-5864.

[22] 李瑞国, 曹岱. 甘薯绿原酸的提取及抑菌作用[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(4): 266-268.

[23] Shan J H, Fu J, Zhao Z H, et al. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF-kappaB and JNK/AP-1 activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(9): 1042-1048.