

三叶青藤叶配方颗粒的质量标准研究及其5种有效成分的含量测定[△]

谢平*, 陈丹#, 洪丽婷, 刘秀棉, 余文静, 熊朝栋, 廖淑彬, 刘永静(福建中医药大学药学院, 福州 350122)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)08-0939-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.08.08

摘要 目的:建立三叶青藤叶配方颗粒的质量标准,并同时测定其中5种有效成分的含量。方法:采用薄层色谱法(TLC)对三叶青藤叶配方颗粒中绿原酸、异荛草苷、异荛草苷-2'-O-鼠李糖苷进行定性鉴别。采用紫外分光光度法测定3批样品中总黄酮(以异荛草苷计)含量,并对其粒度、水分、溶化性及装量差异进行检查。以异荛草苷为内参物计算其余成分的相对校正因子,采用一测多评法测定样品中新绿原酸、绿原酸、荛草苷、异荛草苷、异荛草苷-2'-O-鼠李糖苷的含量,并与外标法测定结果进行比较。结果:绿原酸、异荛草苷、异荛草苷-2'-O-鼠李糖苷TLC图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。样品中异荛草苷检测质量浓度的线性范围为7.73~61.82 μg/mL($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%;加样回收率为93.75%~97.85%(RSD=1.41%, $n=6$)。3批样品不能通过一号筛且能通过五号筛的平均百分率分别为1.51%、1.55%、1.29%($n=3$),含水量分别为4.63%、5.18%、4.03%($n=3$);颗粒均在5 min内溶化;装量差异为4.8%~5.0%,均符合2015年版《中国药典》(四部)颗粒剂的相关规定。一测多评法测定5种成分质量浓度的线性范围分别为2.325~93 μg/mL($r=0.999\ 9$)、5.125~205 μg/mL($r=0.999\ 9$)、1.150~46 μg/mL($r=0.999\ 3$)、2.625~105 μg/mL($r=0.999\ 9$)、4.725~189 μg/mL($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于3%;加样回收率分别为99.78%~106.13%(RSD=2.33%, $n=6$)、95.07%~103.32%(RSD=2.72%, $n=6$)、97.17%~105.43%(RSD=2.98%, $n=6$)、95.52%~101.33%(RSD=2.46%, $n=6$)、99.42%~105.56%(RSD=2.34%, $n=6$)。异荛草苷相对于新绿原酸、绿原酸、荛草苷、异荛草苷-2'-O-鼠李糖苷的相对校正因子分别为0.731、0.805、0.821、0.590;一测多评法测得5种成分的含量分别为0.828~1.123、2.379~3.118、0.281~0.880、1.039~1.393、2.121~3.209 mg/g,外标法测得的含量分别为0.803~1.099、2.345~3.085、0.269~0.872、1.039~1.393、2.113~3.201 mg/g;两种方法测定结果比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论:所建质量标准简便、快速,可用于三叶青藤叶配方颗粒的质量控制;所建一测多评法准确、高效,可用于同时测定三叶青藤叶配方颗粒中5种有效成分的含量。

关键词 三叶青藤叶配方颗粒;质量控制;薄层色谱法;紫外分光光度法;一测多评法;含量测定

Study on the Quality Standard of *Tetrastigma hemsleyanum* Stem and Leaves Dispensing Granules and Content Determination of 5 Active Ingredients

XIE Ping, CHEN Dan, HONG Liting, LIU Xiumian, YU Wenjing, XIONG Chaodong, LIAO Shubin, LIU Yongjing (School of Pharmacy, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of *Tetrastigma hemsleyanum* stem and leaves dispensing granules, and to determine the contents of 5 active ingredients simultaneously. METHODS: Chlorogenic acid, isoorientin and isoorientin-2'-O-rhamnoside in *T. hemsleyanum* stem and leaves dispensing granules were identified by TLC. The total flavonoids of the 3 batches granules were determined by UV spectrophotometry (by isoorientin). The granule sizes, moisture contents, dissolvability, and content uniformity were determined. Using isoorientin as internal reference, relative correction factors of other components were established. QAMS method was adopted to determine the contents of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, orientin, isoorientin and isoorientin-2'-O-rhamnoside, which were compared with the results of ESM method. RESULTS: TLC spots of chlorogenic acid, isoorientin and isoorientin-2'-O-rhamnoside were clear and well-separated, without interference from negative control. The linear range of isoorientin were 7.73-61.82 μg/mL ($r=0.999\ 9$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. The recoveries were 93.75%-97.85% (RSD=1.41%, $n=6$). The average percentages

[△] 基金项目:福建省科技引导性项目(No.2019Y0037);福建省科技计划项目(No.2010Y2004);福建省中医药科研项目(No.2017FJZ-YZY202);福建中医药大学重点学科专项校管课题(No.X2014096-学科)

* 助理实验师,硕士研究生。研究方向:中药制剂与质量分析。电话:0591-22861135。E-mail:591850316@qq.com

通信作者:教授,博士。研究方向:中药制剂与质量分析评价。电话:0591-22861135。E-mail:13515026709@163.com

that the 3 batches granules could not pass through sieve No. 1 but No.5 were 1.51%, 1.55% and 1.29% ($n=3$). The average moisture contents were 4.63%, 5.18% and 4.03% ($n=3$). All were dissolved within 5 min, and content uniformity were 4.8%~5.0%. Which were all in line with the relevant provisions of granules in 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia* (volume IV). The linear range of 5 ingredients were 2.325-93 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 5.125-205 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 1.150-

46 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 3$), 2.625-105 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 9$), 4.725-189 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 9$), respectively. RSD of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3%. The recoveries were 99.78%-106.13% (RSD=2.33%, $n=6$), 95.07%-103.32% (RSD=2.72%, $n=6$), 97.17%-105.43% (RSD=2.98%, $n=6$), 95.52%-101.33% (RSD=2.46%, $n=6$), 99.42%-105.56% (RSD=2.34%, $n=6$). Using isoorientin as internal reference, relative correction factors of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, isoorientin and isoorientin-2'-*O*-rhamnoside were 0.731, 0.805, 0.821, 0.590, respectively. The contents were 0.828-1.123, 2.379-3.118, 0.281-0.880, 1.039-1.393, 2.121-3.209 mg/g by QAMS method, while the contents were 0.803-1.099, 2.345-3.085, 0.269-0.872, 1.309-1.393, 2.113-3.201 mg/g by ESM method, there was no significant difference in the content determination results between QAMS and ESM method ($P>0.05$). CONCLUSIONS: Established quality standard is simple and rapid, and can be used for quality control of *T. hemsleyanum* stem and leaves dispensing granules. Established QAMS method is accurate and efficient, and it can be used for simultaneous determination of 5 active ingredients of *T. hemsleyanum* stem and levels dispensing granules.

KEYWORDS *Tetrastigma hemsleyanum* stem and leaves dispensing granules; Quality control; TLC; UV; QAMS; Content determination

三叶青(*Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg)为我国特有的珍稀药用植物,为葡萄科三叶崖属爬藤植物,以块根或全株入药^[1]。《海南植物志》^[2]及《中国植物志》^[3]中记载,三叶青的叶(或全株)可供药用。该药性寒、味苦,具有清热解毒、祛风化痰、活血止痛等功效^[4]。三叶青主要分布于我国福建、浙江、江西等地,多以野生三叶青入药。该植物对生长环境的温度、湿度要求较高,产量低,加之近年来人为无节制的采挖,使得野生三叶青已濒临灭绝。因此,随着三叶青临床应用需求的日益增多,我国闽北、闽东地区开始大量栽培三叶青^[5]。本课题组前期研究证实,三叶青地上部分(藤叶)提取物具有良好的抗炎镇痛作用,其总黄酮提取物具有辅助抗肿瘤、抗炎、镇痛的作用^[6],其中异荭草苷、荭草苷、新绿原酸、绿原酸、异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷是其主要药效成分^[7-8]。

配方颗粒是一种新型的中药免煎制剂。依据中药随证配方的用药特点,本课题组以三叶青藤叶饮片为原料,制备三叶青藤叶配方颗粒,并在原料药材质量标准^[9]的基础上,建立其配方颗粒的薄层色谱鉴别(TLC),同时检查其粒度、水分、溶化性和装量差异;以异荭草苷为指标采用紫外分光光度法(UV)测定三叶青藤叶配方颗粒中有效部位总黄酮的含量;以异荭草苷为内参,采用一测多评法(QAMS)同时测定了其中新绿原酸、绿原酸等5种有效成分的含量,并将测定结果与外标法(ESM)进行比较,旨在为该药上市前的质量标准建立提供参考。

1 材料

1.1 仪器

2695型高效液相色谱仪,包括2998二极管阵列紫外检测器、Empower 3色谱工作站(美国Waters公司);UV-4802型双光束UV计[尤尼柯(上海)仪器有限公司];XS205型十万分之一电子天平、AR2140型万分之一电

子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];KQ5200E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

三叶青藤叶配方颗粒(福建中医药大学药学院自制,批号:20170726、20170727、20170728,规格:5 g/袋);三叶青藤叶喷雾干燥中间体(福建中医药大学药学院自制,批号:20170510、20170511、20170512);三叶青藤叶喷雾干燥中间体阴性样品(福建中医药大学药学院自制,批号:20170615、20170616、20170617);新绿原酸对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号: MUST-16021806,纯度:≥98%);绿原酸对照品(批号: 110753-201612,纯度:≥98%);荭草苷对照品(批号: 111777-201508,纯度:≥98%);异荭草苷对照品(批号: 111974-201602,纯度:≥98%)均由中国食品药品检定研究院提供;异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷对照品(福建中医药大学药学院自制,纯度:≥98%);聚酰胺薄膜(浙江台州路桥四甲生化塑料厂);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

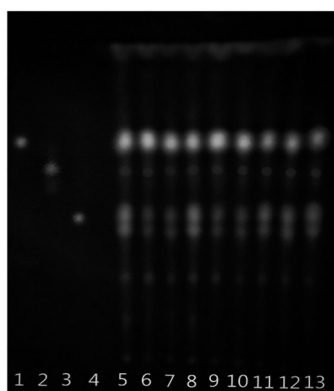
三叶青藤叶饮片(福州集珍园生物科技有限公司,批号:20160507、20160701、20160708)经福建中医药大学药学院范世明高级实验师鉴定为葡萄科植物三叶青(*T. hemsleyanum* Diels et Gilg)的干燥藤叶。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 TLC鉴别 取三叶青藤叶配方颗粒0.5 g,加甲醇25 mL,超声(功率:200 W,频率:40 kHz,下同)使溶解,作为供试品溶液。取三叶青藤叶喷雾干燥中间体0.25 g,按供试品溶液的制备方法制成中间体样品溶液。取三叶青藤叶饮片粉末1 g,加水适量,提取1 h,滤过,滤液蒸干,按供试品溶液的制备方法制成对照饮片样品溶液。取三叶青藤叶喷雾干燥中间体阴性样品0.5 g,按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。精密称取绿

原酸、异荭草苷、异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷对照品适量,分别加甲醇溶解并制成上述3种成分质量浓度分别为0.50、0.25、0.50 mg/mL的单一对照品溶液。按2015年版《中国药典》(四部)通则“0502薄层色谱法”^[10],分别吸取上述各单一对照品溶液、供试品溶液、中间体样品溶液、对照饮片样品溶液及阴性对照溶液各2 μL,点于同一聚酰胺薄膜上,以36%乙酸溶液为展开剂,饱和20 min后展开,取出,晾干,喷以3%三氯化铝乙醇溶液显色,于105 ℃加热5 min,置于365 nm波长紫外灯下检视,记录斑点位置。结果,供试品TLC图中,在与各对照品及对照饮片样品相应位置上显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无干扰,详见图1。



注:1.异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷对照品;2.绿原酸对照品;3.异荭草苷对照品;4.阴性对照;5~7.供试品;8~10.中间体样品;11~13.对照饮片样品

Note: 1. isoorientin-2'-*O*-rhamnoside control; 2. chlorogenic acid control; 3. isoorientin control; 4. negative control; 5-7. test sample; 8-10. intermediate sample; 11-13. reference decoction piece sample

图1 薄层色谱图

Fig 1 TLC chromatogram

2.1.2 粒度检查 取3批三叶青藤叶配方颗粒,每批5袋,称定总质量,按2015年版《中国药典》(四部)通则“0982粒度测定法”的第二法双筛分法^[10]测定粒度,平行测定3次。结果,3批样品粒度不能通过一号筛且能通过五号筛的平均百分率分别为1.51%、1.55%、1.29% ($n=3$),符合2015年版《中国药典》(四部)颗粒剂项下规定限度($\leq 15\%$)^[10]。

2.1.3 水分检查 取3批三叶青藤叶配方颗粒,每批精密称取2 g,平铺于干燥至恒定质量的扁形称量瓶中,厚度不超过5 mm,按2015年版《中国药典》(四部)通则“0832水分测定法”的第二法烘干法^[10]测定水分,平行测定3次。结果,3批样品的平均含水量分别为4.63%、5.18%、4.03% ($n=3$),符合2015年版《中国药典》(四部)颗粒剂项下规定限度($\leq 8\%$)^[10]。

2.1.4 溶化性检查 取3批三叶青藤叶配方颗粒,每批3袋,分别加热水200 mL,搅拌5 min,立即观察其溶化情况,按2015年版《中国药典》(四部)通则“0104颗粒

剂”^[10]项下方法测定溶化性。结果,3批样品均在5 min内全部溶化,无肉眼可见杂质与异物,无焦屑,符合2015年版《中国药典》(四部)颗粒剂项下规定^[10]。

2.1.5 装量差异检查 取3批三叶青藤叶配方颗粒,每批10袋,按2015年版《中国药典》(四部)通则“0104颗粒剂”^[10]项下方法测定装量差异。结果,3批样品的装量差异为4.8%~5.0%,符合2015年版《中国药典》(四部)颗粒剂项下规定限度要求^[10]。

2.2 三叶青藤叶配方颗粒中总黄酮的含量测定

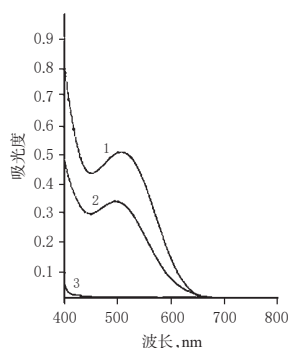
基于化学成分分析及已建立的三叶青藤叶饮片及汤剂中总黄酮含量的测定方法,选取三叶青藤叶配方颗粒中含量较高且较易获得的成分异荭草苷为对照,采用UV法测定其含量^[7,9]。

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取异荭草苷对照品适量,加甲醇制成质量浓度为0.193 2 mg/mL的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取三叶青藤叶配方颗粒约0.2 g,置于25 mL量瓶中,加30%甲醇超声使溶解,冷却至室温后,用30%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 精密称取缺三叶青藤叶的阴性配方颗粒(由福建中医药大学药学院自制),按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.2.4 显色方法及检测波长的选择 取上述对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各0.5 mL,分别置于25 mL量瓶中,加甲醇补足至6 mL,精密加入5%亚硝酸钠溶液1 mL,摇匀,放置6 min;加入10%硝酸铝溶液1 mL,摇匀,放置6 min;加入4%氢氧化钠溶液10 mL,加水稀释至刻度,摇匀,放置15 min;于200~800 nm波长范围内扫描。结果,对照品溶液及供试品溶液显色后均在500 nm波长处有最大吸收,阴性对照无干扰,故确定检测波长为500 nm,详见图2。



注:1.对照品;2.供试品;3.阴性对照

Note: 1. substance control sample; 2. test sample; 3. negative control

图2 紫外吸收光谱图

Fig 2 UV absorption scanning spectrum

2.2.5 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.1”项下对照

品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,置于 25 mL 量瓶中,按“2.2.4”项下方法显色后,以空白溶剂显色体系为参比,于 500 nm 波长处测定吸光度。以质量浓度(c , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标、吸光度(A)为纵坐标进行线性回归。结果,异荛草苷的回归方程为 $A=1.41 \times 10^{-2}c - 4.30 \times 10^{-3}$ ($r=0.9999$),异荛草苷检测质量浓度的线性范围为 7.73~61.82 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.6 精密度试验 取“2.2.1”项下对照品溶液 3.0 mL,按“2.2.4”项下方法显色后,于 500 nm 波长处重复测定 6 次。结果,吸光度的 RSD 为 0.09% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20170726)适量,按“2.2.4”项下方法显色后,分别于室温下放置 0、5、10、15、20、25、30 min 时,于 500 nm 波长处测定吸光度。结果,吸光度的 RSD 为 0.44% ($n=7$),表明供试品溶液在室温下显色后 30 min 内稳定性良好。

2.2.8 重复性试验 精密称取样品(批号:20170726),约 0.2 g,共 6 份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.4”项下方法显色后,于 500 nm 波长处测定吸光度并按标准曲线法计算样品含量。结果,总黄酮的平均含量为 66.20 mg/g, RSD 为 1.07% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品(批号:20170726),约 0.1 g,共 6 份,分别精密加入异荛草苷对照品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.4”项下方法显色后,于 500 nm 波长处测定吸光度并计算加样回收率,结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果 ($n=6$)
Tab 1 Results of recovery tests ($n=6$)

称样量, g	已知含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.1044	6.96	5.12	11.84	95.31	95.87	1.41
0.1020	6.80	5.12	11.70	95.70		
0.1042	6.94	5.12	11.95	97.85		
0.1004	6.69	5.12	11.49	93.75		
0.1020	6.80	5.12	11.73	96.29		
0.1042	6.94	5.12	11.87	96.29		

2.2.10 样品含量测定 取 3 批样品,约 0.2 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,取上述供试品溶液 0.5 mL,按“2.2.4”项下方法显色后,于 500 nm 波长处测定吸光度。每批样品平行测定 3 次,按标准曲线法计算样品中总黄酮的含量,结果见表 2。

2.3 QAMS 法同时测定三叶青藤叶配方颗粒中 5 种成分的含量

2.3.1 混合对照品溶液的制备 精密称取新绿原酸、绿原酸、荛草苷、异荛草苷、异荛草苷-2'-*O*-鼠李糖苷对照品适量,加甲醇超声使溶解,冷却至室温后,用甲醇制成上述 5 种成分质量浓度分别为 0.093、0.205、0.046、0.105、0.189 mg/mL 的混合对照品溶液。

表 2 样品中总黄酮的含量测定结果 ($n=3$)

Tab 2 Results of content determination of total flavonoids in samples ($n=3$)

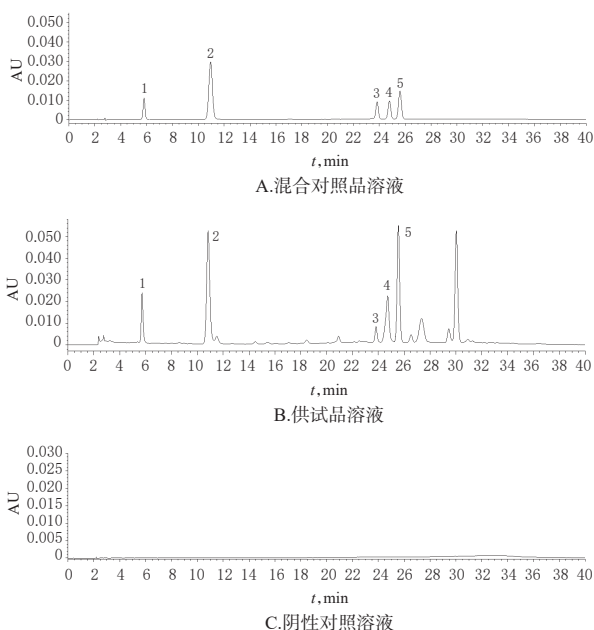
批号	含量, mg/g	平均含量, mg/g	RSD, %
20170726	67.30	66.65	1.54
	67.19		
	65.47		
20170727	66.11	65.10	1.84
	63.78		
	65.41		
20170728	65.34	66.01	1.29
	66.97		
	65.73		

2.3.2 供试品溶液的制备 同“2.2.2”项。

2.3.3 阴性对照溶液的制备 同“2.2.3”项。

2.3.4 色谱条件 色谱柱:250-4 Lichrocart C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.5%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min, 20% A; 10~15 min, 20% A → 25% A; 15~20 min, 25% A → 33.5% A; 20~23 min, 33.5% A; 23~30 min, 33.5% A → 40% A; 30~40 min, 40% A → 20% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:340 nm;柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μL 。

2.3.5 专属性试验 分别精密吸取上述混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各 10 μL ,按“2.3.4”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,各色谱峰分离度良好,均大于 1.5;理论板数按绿原酸峰计不低于 3 000;阴性对照无干扰,详见图 3。



注:1.新绿原酸;2.绿原酸;3.荛草苷;4.异荛草苷;5.异荛草苷-2'-*O*-鼠李糖苷

Note: 1. neochlorogenic acid; 2. chlorogenic acid; 3. orientin; 4. isoorientin; 5. isoorientin-2'-*O*-rhamnoside

图 3 高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms

2.3.6 线性关系考察 精密量取“2.3.1”项下混合对照品溶液 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、10 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加 30% 甲醇稀释至刻度,摇匀,得系列混合对照品溶液,按“2.3.4”项下色谱条件进样测定,以质量浓度($x, \mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,结果见表 3。

表 3 回归方程与线性范围

Tab 3 Regression equation and linear range

待测成分	回归方程	r	线性范围, $\mu\text{g/mL}$
新绿原酸	$y=2.0176 \times 10^4 x + 5.1472 \times 10^5$	0.999 9	2.325~93
绿原酸	$y=2.2214 \times 10^4 x + 9.6010 \times 10^5$	0.999 9	5.125~205
荭草苷	$y=2.2644 \times 10^4 x + 2.5663 \times 10^5$	0.999 3	1.150~46
异荭草苷	$y=2.7597 \times 10^4 x + 1.9052 \times 10^5$	0.999 9	2.625~105
异荭草苷-2'- <i>O</i> -鼠李糖苷	$y=1.6289 \times 10^4 x + 3.7324 \times 10^5$	0.999 9	4.725~189

2.3.7 精密度试验 取“2.3.1”项下混合对照品溶液 1.0 mL,置于 10 mL 量瓶中,加 30% 甲醇稀释至刻度,摇匀,按“2.3.4”项下色谱条件连续测定 6 次,记录峰面积。结果,新绿原酸、绿原酸、荭草苷、异荭草苷、异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷峰面积的 RSD 分别为 2.27%、0.39%、0.42%、0.59%、0.35% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.8 稳定性试验 取“2.3.2”项下供试品溶液(批号:20170726)适量,分别于室温下放置 0、2、4、6、8、12 h 时,按“2.3.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,新绿原酸、绿原酸、荭草苷、异荭草苷、异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷峰面积的 RSD 分别为 2.99%、0.31%、0.91%、0.26%、0.27% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置 12 h 内稳定性良好。

2.3.9 重复性试验 精密称取样品(批号:20170726)约 0.2 g,共 6 份,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按 ESM 法计算样品中 5 种成分的含量。结果,新绿原酸、绿原酸、荭草苷、异荭草苷、异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷的平均含量分别为 1.073、2.628、0.830、1.397、2.118 mg/g, RSD 分别为 1.45%、2.59%、2.65%、2.77%、2.63% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.3.10 加样回收率试验 取已知含量的样品(批号:20170726)约 0.1 g,共 6 份,分别精密加入“2.3.1”项下混合对照品溶液 1 mL,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.4”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。

2.3.11 QAMS 设计与内参物的选择 选择含量相对较高且对照品较易得到的活性成分异荭草苷为内参物,根据标准曲线斜率的比值计算相对校正因子^[11-12],并通过线性回归拟合排除偏差,建立同时测定样品中 5 种成分含量的 QAMS 法。在一定线性范围内,成分的质量或浓度(W)与检测器响应值(A)成正比,即 $W=f \cdot A$ (f 表示相

表 4 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 4 Results of recovery tests($n=6$)

待测成分	称样量, g	已知含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
新绿原酸	0.100 6	0.110 6	0.093 0	0.205 4	101.94	103.30	2.33
	0.100 6	0.110 6	0.093 0	0.203 4	99.78		
	0.100 7	0.110 7	0.093 0	0.205 7	102.15		
	0.100 8	0.110 8	0.093 0	0.208 7	105.27		
	0.100 4	0.110 3	0.093 0	0.207 5	104.52		
	0.100 1	0.110 0	0.093 0	0.208 7	106.13		
绿原酸	0.100 6	0.270 3	0.205 0	0.471 2	98.00	99.02	2.72
	0.100 6	0.270 3	0.205 0	0.465 2	95.07		
	0.100 7	0.270 6	0.205 0	0.475 7	100.05		
	0.100 8	0.270 8	0.205 0	0.473 4	98.83		
	0.100 4	0.269 8	0.205 0	0.472 4	98.83		
	0.100 1	0.269 0	0.205 0	0.480 8	103.32		
荭草苷	0.100 6	0.087 7	0.046 0	0.133 7	100.00	100.69	2.98
	0.100 6	0.087 7	0.046 0	0.134 9	102.61		
	0.100 7	0.087 8	0.046 0	0.132 5	97.17		
	0.100 8	0.087 9	0.046 0	0.136 4	105.43		
	0.100 4	0.087 5	0.046 0	0.132 7	98.26		
	0.100 1	0.087 3	0.046 0	0.133 6	100.65		
异荭草苷	0.100 6	0.154 0	0.105 0	0.258 6	99.62	98.40	2.46
	0.100 6	0.154 0	0.105 0	0.254 3	95.52		
	0.100 7	0.154 2	0.105 0	0.259 4	100.19		
	0.100 8	0.154 3	0.105 0	0.254 7	95.62		
	0.100 4	0.153 7	0.105 0	0.256 7	98.09		
	0.100 1	0.153 3	0.105 0	0.259 7	101.33		
异荭草苷-2'- <i>O</i> -鼠李糖苷	0.100 6	0.279 2	0.189 0	0.469 0	100.42	102.02	2.34
	0.100 6	0.279 2	0.189 0	0.467 1	99.42		
	0.100 7	0.279 4	0.189 0	0.476 6	104.34		
	0.100 8	0.279 7	0.189 0	0.479 2	105.56		
	0.100 4	0.278 6	0.189 0	0.469 9	101.22		
	0.100 1	0.277 8	0.189 0	0.469 0	101.16		

对校正因子)^[11-12]。按上述公式计算内参物异荭草苷与其余成分的相对校正因子,再通过校正因子计算含量。 $C_m = A_m / (a_k \cdot f_{mk})$ (式中, C_m 为其余成分质量浓度, A_m 为其余成分峰面积, a_k 为内参物异荭草苷标准曲线斜率, f_{mk} 为相对校正因子); $f_{mk} = a_m$ (式中, a_m 为其余成分标准曲线斜率)。

2.3.12 相对校正因子的计算 以异荭草苷为内参物,按“2.3.11”项下公式计算新绿原酸、绿原酸、荭草苷、异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷对内参物异荭草苷的相对校正因子。结果,上述 4 种成分的相对校正因子分别为 0.731、0.805、0.821、0.590。

2.1.13 QAMS 法与 ESM 法测定结果比较 取 3 批样品,分别按 QAMS 法、ESM 法测定其中 5 种成分的含量,采用 SPSS 20.0 软件以 Pearson 相关系数评价两种方法测得结果的相关性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。结果, QAMS 法与 ESM 法的测定结果呈正相关,结果组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),提示所建的 QAMS 法结果准确、可靠,可用于配方颗粒中 5 种有效成分的含量测定,详见表 5。

表5 QAMS法与ESM法测定结果比较($n=3, \text{mg/g}$)Tab 5 Comparison of determination results by QAMS and ESM method($n=3, \text{mg/g}$)

批号	异荛草苷		新绿原酸		绿原酸		荛草苷		异荛草苷-2'-O-鼠李糖苷	
	QAMS法/ESM法	QAMS法	ESM法	QAMS法	ESM法	QAMS法	ESM法	QAMS法	ESM法	
20170726	1.393	1.123	1.099	2.723	2.687	0.880	0.872	2.121	2.113	
20170727	1.039	0.828	0.803	2.379	2.345	0.281	0.269	2.720	2.714	
20170728	1.382	0.934	0.909	3.118	3.085	0.477	0.466	3.209	3.201	

3 讨论

本研究参考相关文献^[9],采用聚酰胺薄膜以三叶青藤叶中含量较高的有效成分绿原酸、异荛草苷、异荛草苷-2'-O-鼠李糖苷为对照进行TLC鉴别。笔者分别比较了正丁醇-乙醇-水(6:35:59, V/V/V)、三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(5:5:4:0.6, V/V/V/V)、三氯甲烷-丙酮-无水乙醇-水(4:3:3.6:0.4, V/V/V/V)、乙酸乙酯-乙醇-水-冰醋酸(6:2:0.5:0.2, V/V/V/V)、三氯甲烷-丙酮-冰乙酸-无水乙醇(4:1:3:2, V/V/V/V)、三氯甲烷-丙酮-冰乙酸-无水乙醇(4:1:3:2, V/V/V/V)、36%乙酸溶液等为展开剂系统的分离效果。结果显示,当以36%乙酸溶液为展开剂时,各成分斑点分离效果最佳,阴性对照无干扰。同时,本研究对三叶青藤叶配方颗粒的粒度、水分、溶化性和装量差异等方面进行了检查。结果显示,其粒度、含水量、溶化性及装量差异均符合2015年版《中国药典》(四部)颗粒剂项下的相关规定^[10]。

三叶青藤叶中含有的异荛草苷、异荛草苷-2'-O-鼠李糖苷等黄酮类成分是其主要药效成分^[7-8]。本研究采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法,以含量较高、峰面积较大且稳定的活性成分异荛草苷为对照,经显色后于500 nm波长处进行检测。结果显示,供试品和对照品于500 nm波长处均有最大吸收。测得3批三叶青藤叶配方颗粒中总黄酮含量为63.78~67.30 mg/g。

在前期预试验中,笔者通过比较二极管阵列紫外检测器在200~600 nm波长扫描下的色谱图发现,当检测波长为340 nm时,样品中5种待测成分色谱峰的分离良好、峰面积较大,故选择340 nm为QAMS法的检测波长。同时,笔者又比较了甲醇-0.1%甲酸水溶液、甲醇-0.5%甲酸水溶液、甲醇-0.1%乙酸水溶液、甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液等流动相系统在等度洗脱及梯度洗脱条件下的分离效果。结果显示,以甲醇-0.5%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱时,各成分色谱峰分离良好且基线平稳。

采用ESM法同时测定样品中5种成分的含量时需

要5种对照品,而异荛草苷-2'-O-鼠李糖苷、荛草苷等对照品较难获得且成本较高,采用QAMS法可以避免这些不足;同时,由于绿原酸有异构体,其稳定性相对较差,故本研究以含量较高的活性代表成分异荛草苷为内参物,采用QAMS法同时测定了三叶青藤叶配方颗粒中5种成分的含量,并与ESM法进行比较。结果显示,QAMS法与ESM法的测定结果比较差异无统计学意义,可达到同时测定配方颗粒复杂体系中多指标含量的目的。

综上所述,本研究所建的质量标准简便、快速,可用于三叶青藤叶配方颗粒的质量控制;所建含量测定方法准确、高效,可用于同时测定三叶青藤叶配方颗粒中5种成分的含量。

参考文献

- [1] 范世明,徐惠龙,谢心月,等.三叶青叶指纹图谱研究及8种酚类成分含量测定[J].中国中药杂志,2016,41(21):3975-3981.
- [2] 广东省植物研究所.海南植物志:第3卷[M].北京:科学出版社,1974:3-23.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:第2册[M].北京:科学出版社,1998:48,122-123.
- [4] 蔡伟炜,陈丹,范世明,等.中药三叶青化学成分及药理作用研究进展[J].天津药学,2014,26(1):38-41.
- [5] 钱丽华,戴丹丽,姜慧燕,等.濒危药用植物三叶青研究进展[J].浙江农业学报,2015,27(7):1301-1308.
- [6] 余纳,吴晓尉,汪芳裕.三叶青总黄酮抗肿瘤作用的研究进展[J].中国中西医结合消化杂志,2015,23(9):670-672.
- [7] 蔡伟炜,陈丹,范世明,等.三叶青地上部分化学成分分析[J].福建中医药大学学报,2013,23(5):34-35.
- [8] 廖淑彬,蔡伟炜,陈丹,等.闽产三叶青地上部分提取物体内抗炎镇痛作用研究[J].中国现代应用药学,2017,34(3):319-324.
- [9] 谢平,陈丹,黄娇,等.三叶青藤茎叶药材饮片质量控制研究[J].福建医科大学学报,2017,51(5):291-297,302.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:8,57,103-104.
- [11] 连赟芳,陈丹,蔡伟炜.一测多评法同时测定玳玳果黄酮滴丸中4个活性成分的含量[J].药物分析杂志,2015,35(6):974-978.
- [12] 周园,董秋菊,冯薇,等.一测多评法测定南方菟丝子中7种活性成分的含量[J].中草药,2018,49(1):227-232.

(收稿日期:2019-08-27 修回日期:2020-01-29)

(编辑:陈宏)