

三脂清中 7 种成分的含量测定及醇提工艺优化

胡玉霞^{a,b,c}, 常福厚^{a,b,c*}, 李君^{a,b,c}, 王跃武^{a,b,c}, 张梦迪^{a,b,c}, 高峰^{a,b,c}, 张谦^{a,b,c}, 白图雅^{a,b,c}, 周树宏^{a,b,d}
(内蒙古医科大学, a.新药安全评价研究中心, b.新药筛选工程研究中心, c.药学院, d.基础医学院, 呼和浩特 010110)

摘要: 目的 采用 HPLC-MS/MS 同时测定蒙药三脂清中胡椒碱、荜茇宁、柯里拉京、没食子酸、鞣花酸、槲皮素、芦丁的含量, 并优化三脂清的醇提工艺。方法 采用 Shim-pack GIST-HP C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 3 μm), 以 0.1% 甲酸水溶液-甲醇为流动相, 梯度洗脱, 流速为 0.25 mL·min⁻¹, 进样量 2 μL; 质谱采用电喷雾离子源, 正、负离子扫描切换, 多重反应监测模式进行定量分析。采用 L₉(3⁴) 正交试验设计, 以上述 7 种成分含量的综合评分为考察指标, 以料液比、乙醇浓度、提取时间、提取次数为考察因素进行三脂清醇提工艺优化。结果 三脂清中 7 种成分的峰面积和质量浓度在一定范围内均呈现良好的线性关系($r \geq 0.999$), 仪器精密度、重复性、稳定性试验的 RSD 均 < 5%; 加样回收率为 99.54%~105.32%, RSD 为 1.39%~4.33%。最佳醇提工艺条件为料液比 1:8, 乙醇浓度 40%, 提取时间 0.5 h, 提取 3 次。3 次放大试验验证结果显示, 上述 7 种成分的平均含量分别为 9.852, 0.587, 16.247, 3.657, 8.663, 0.119, 0.104 mg·g⁻¹。结论 建立的方法简便、灵敏、高效, 可用于三脂清中多种主要活性成分的含量测定; 优化所得的醇提取工艺稳定、可行。

关键词: 三脂清; 高效液相色谱-质谱联用; 多成分测定; 正交试验; 工艺优化

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)13-1685-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.13.004

引用本文: 胡玉霞, 常福厚, 李君, 等. 三脂清中 7 种成分的含量测定及醇提工艺优化[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(13): 1685-1691.

Determination of 7 Components in Sanzhiqing and Optimization of Its Ethanol Extraction Technology

HU Yuxia^{a,b,c}, CHANG Fuhou^{a,b,c*}, LI Jun^{a,b,c}, WANG Yuewu^{a,b,c}, ZHANG Mengdi^{a,b,c}, GAO Feng^{a,b,c}, ZHANG Qian^{a,b,c}, BAI Tuya^{a,b,c}, ZHOU Shuhong^{a,b,d} (Inner Mongolia Medical University, a.the Center for New Drug Safety Evaluation and Research, b.Research Center for Drug Screening, c.College of Pharmacy, d.College of Basic Medicine, Hohhot 010110, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a method for simultaneous determination of piperine, piperlonguminine, corilagin, gallic acid, ellagic acid, quercetin, rutin in Mongolian medicine Sanzhiqing by HPLC-MS/MS, and to optimize the ethanol extraction technology. **METHODS** The separation was performed on Shim-pack GIST-HP C₁₈ column(2.1 mm×100 mm, 3 μm), mobile phase consisting of water(containing 0.1 % formic acid) and methanol with gradient elution at a flow rate of 0.25 mL·min⁻¹, and the injection volume was 2 μL. Multiple-reaction monitoring was employed with switching electrospray ion source polarity in positive and negative mode. With comprehensive score of the content of 7 ingredients as the inspection index and material-liquid ratio, ethanol concentration, extraction time and extraction times as the inspection factor, the L₉(3⁴) orthogonal test design was used to optimize the ethanol extraction technology of Sanzhiqing. **RESULTS** There was a good linear relationship between the peak area and the mass concentration of the 7 components in Sanzhiqing($r \geq 0.999$). The RSD of instrument precision, repeatability and stability were all < 5%, and the average recoveries ranged from 99.54% to 105.32% and the RSD ranged from 1.39% to 4.33%. The optimal ethanol extraction technology included solid-liquid ratio of 1:8, ethanol concentration of 40%, extracting for 0.5 h and extracting for 3 times. Results of three validation tests showed that average content of the above 7 ingredients was 9.852, 0.587, 16.247, 3.657, 8.663, 0.119, 0.104 mg·g⁻¹ respectively. **CONCLUSION** The established method is simple, sensitive and efficient, and can be used for determine the content of various main active ingredients in Sanzhiqing, and the optimized ethanol extraction technology is stable and feasible.

KEYWORDS: Sanzhiqing; HPLC-MS/MS; multi-component determination; orthogonal test; technology optimization

蒙药三脂清是由荜茇、诃子、山楂 3 味药材组成的蒙医散剂, 处方比例为 4:4:5, 此方参考现代药理学研究, 根据活血化瘀、温中散寒、下

气止痛、消食健胃的组方原则而制订, 具有抗炎、止痛、降血脂作用, 临床主要用于治疗动脉粥样硬化、高脂血症等疾病治疗, 疗效显著^[1]。现代药

基金项目: 国家自然科学基金项目(81760676); 内蒙古自治区自然科学基金项目(2019LH08017); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY21593); 内蒙古医科大学实验室开放基金项目(2021LX04)

作者简介: 胡玉霞, 女, 硕士, 助理研究员 E-mail: 15648116658@163.com *通信作者: 常福厚, 男, 博士, 教授 E-mail: changfh@163.com

理学研究表明, 葶苈具有抗炎、抗氧化、降血脂、调节体内代谢的作用^[2]。其主要活性成分为生物碱类, 其中胡椒碱、葶苈宁被证明具有降低血脂和改善动脉粥样硬化的作用^[3]; 诃子含有鞣质类、酚酸类、黄酮类等化学成分^[4-8], 研究表明诃子中的酚酸类和鞣质类化合物具有抗氧化、强心、降血糖等药理活性^[9-12]; 研究证实山楂中所含黄酮类成分(槲皮素、芦丁等)具有调血脂、降血压、降血糖等药理作用^[13-16]。有学者建立大鼠高血脂模型, 发现山楂中总黄酮具有降低模型大鼠血清中胆固醇和甘油三酯的含量, 升高高密度脂蛋白胆固醇和降低低密度脂蛋白胆固醇的作用^[17]。

蒙药复方成分复杂, 发挥治疗作用的药效成分较多, 如仅通过单一成分进行质量评价, 不足以全面、有效地评价制剂质量^[18]。同时, 选用 HPLC 进行含量测定, 耗时较长, 灵敏度较低。目前, 高效液相色谱串联质谱法(HPLC-MS/MS)越来越多地应用于蒙药复方的分析, 因质谱具有良好的专属性和灵敏度, 有利于蒙药复方的多成分质量控制, 常应用于民族药复杂体系的定量或定性研究。

基于此, 本研究采用 HPLC-MS/MS 对三脂清中 7 种成分(胡椒碱、葶苈宁、柯里拉京、没食子酸、鞣花酸、槲皮素、芦丁)进行含量测定, 同时, 本研究采用 $L_9(3^4)$ 正交试验, 以 7 种活性成分的综合评分为评价指标, 对三脂清醇提工艺进行优化, 旨在确定三脂清醇提工艺参数, 为成型工艺提供基础。

1 仪器与试剂

岛津 LC-MS8045 三重四级杆高效液相色谱-质谱联用仪、AP135W 型十万分之一电子天平均购自日本岛津公司; KH-500DV 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); DZTW 型电子调温电热套(上海力辰邦西仪器科技有限公司)。

胡椒碱对照品(批号: 110775; 纯度 $\geq 98\%$)、没食子酸对照品(批号: 110831-201906; 纯度 $\geq 91.5\%$)、鞣花酸对照品(批号: 111959-201903; 纯度 $\geq 88.8\%$)、槲皮素对照品(批号: 100081-201810; 纯度 $\geq 99.1\%$)、芦丁对照品(批号: 100080-201610; 纯度 $\geq 92.6\%$)均购自中国食品药品检定研究院; 葶苈宁对照品(北京英莱克科技发展有限公司, 批号: 20082005; 纯度 $\geq 98\%$); 柯里拉京对照品(成都乐美天医药科技有限公司, 批号: DST190113-012; 纯度 $\geq 98\%$); 甲醇、乙腈均为色谱醇; 甲酸、乙酸铵均为分析醇; 水为蒸馏水。

葶苈(批号: C790200901)、诃子(批号: 17062404)、山楂(批号: 20010502)均购自河北省安国市久旺药业有限公司, 经内蒙古医科大学药学院中药资源教研室渠弼教授鉴定, 鉴定结果为正品。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

2.1.1 供试品制备 按处方比例称取三脂清各味药材合计约 65 g, 置于圆底烧瓶中, 加入 40%乙醇溶液 390 mL, 于电热套加热至沸腾提取 30 min, 冷却至室温, 取滤液用 40%乙醇溶液定容至 500 mL 量瓶中, 得到三脂清提取液。精密量取上述提取液 10 μ L, 置于 70%甲醇溶液 3 990 μ L 中, 涡旋混匀 30 s, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 即得稀释 400 倍的供试品溶液 A, 用于测定芦丁的含量。精密量取上述溶液 A 200 μ L, 置于 70%甲醇溶液 800 μ L 中, 涡旋混匀 30 s, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 即得稀释 2 000 倍的供试品溶液 B, 用于测定其他 6 种成分的含量。

2.1.2 混合对照品溶液配制 精密称取胡椒碱、葶苈宁、柯里拉京、没食子酸、鞣花酸、槲皮素、芦丁对照品分别置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 配制成质量浓度分别为 418.00, 426.00, 424.00, 436.00, 547.00, 566.00, 464.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的对照品储备液。精密量取胡椒碱、葶苈宁、没食子酸、槲皮素、芦丁对照品储备液各 50 μ L, 分别置于 5 mL 量瓶中, 用甲醇溶液定容至刻度, 配制成质量浓度为 4.18, 4.26, 4.36, 5.66, 4.64 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的对照品 A 溶液。依次精密量取上述单一对照品 A 溶液 1 000.00, 100.00, 1 000.00, 50.00, 500.00 μ L, 再精密量取柯里拉京、鞣花酸对照品储备液 100.00, 25.00 μ L 至 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶液定容至刻度, 得上述 7 种成分质量浓度分别为 836.00, 85.20, 8 480.00, 872.00, 2.74, 56.60, 4.64 ng $\cdot$ mL⁻¹ 混合对照品溶液, 于 4 $^{\circ}$ C 保存, 备用。

2.2 色谱-质谱条件

Shim-pack GIST-HP C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 3 μ m), 流动相为甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~0.1 min, 5.0%A; 0.01~0.5 min, 5.0% $\rightarrow$ 8.0%A; 0.5~3.0 min, 8.0% $\rightarrow$ 45.0%A; 3.0~5.0 min, 45.0% $\rightarrow$ 75.0%A; 5.0~5.5 min, 75.0% $\rightarrow$ 95.0%A; 5.5~7.0 min, 95.0%A;

7.0~7.01 min, 95.0%→5.0%A; 7.01~10.0 min, 5.0%A), 流速为 0.25 mL·min⁻¹, 柱温为 35 ℃, 进样量为 2 μL。

采用 ESI 离子源正/负离子电离模式, 扫描方式为多重反应监测模式, 雾化气流量为 3 L·min⁻¹, 加热气流量为 10 L·min⁻¹, 接口温度为 300 ℃。脱溶剂温度为 526 ℃, 加热块温度为 400 ℃, 7 种成分优化后质谱分析参数见表 1, 7 个成分的多重反应监测色谱图见图 1, 对照品二级质谱图见图 2。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察与定量限 分别精密吸取“2.1.2”项下系列浓度的混合对照品溶液, 按“2.2”项下方法进样测定, 以质量浓度 $X(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$ 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 计算 7 个成分的线性回归方程; 以信噪比 $S/N \geq 10$ 的对照品质量浓度为定量限, 结果见表 2, 表明各成分在相应线性范围内

呈良好的线性关系。

2.3.2 仪器精密度考察 取“2.1.2”项下对照品溶液, 按“2.2”项下方法连续进样 6 次, 记录峰面积, 结果胡椒碱、荜茇宁、柯里拉京、没食子酸、鞣花酸、槲皮素、芦丁峰面积的 RSD 分别 0.68%, 2.65%, 1.14%, 2.85%, 2.42%, 2.97%, 3.17%, 表明仪器精密度良好。

表 1 7 种成分的保留时间及 HPLC-MS/MS 分析参数

Tab. 1 Retention time and HPLC-MS/MS parameters of the 7 compounds

成分	保留时间/min	m/z	碰撞能量/eV
胡椒碱	7.426	286.0→201.0(+)	-19
荜茇宁	7.284	274.0→201.0(+)	-16
柯里拉京	4.715	632.9→300.9(-)	44
没食子酸	3.275	168.9→125.0(-)	16
鞣花酸	6.038	301.0→284.0(-)	27
槲皮素	6.538	301.0→151.0(-)	21
芦丁	5.806	609.0→301.0(-)	34

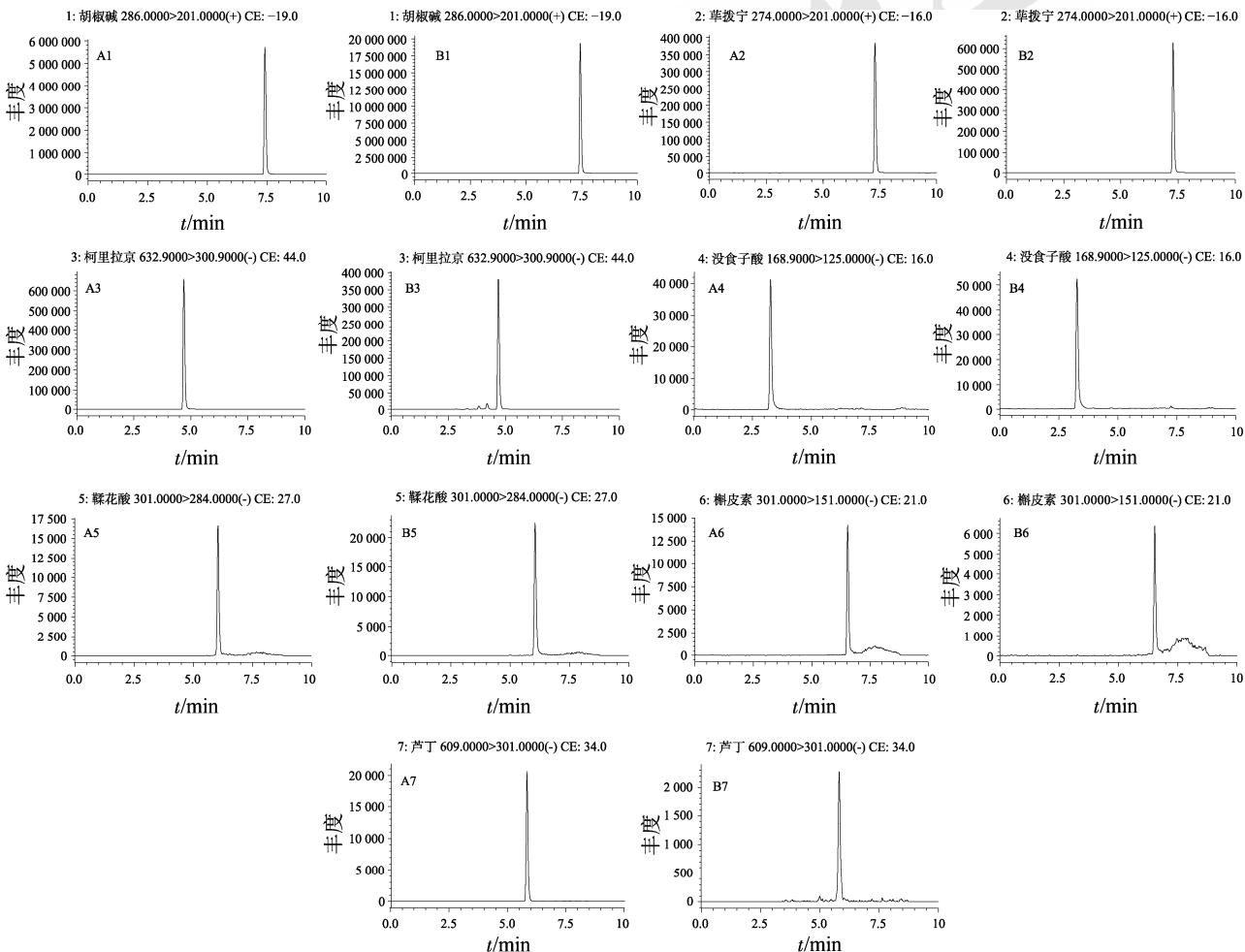


图 1 7 种成分的多重反应监测色谱图

A-对照品; B-供试品; 1-胡椒碱; 2-荜茇宁; 3-柯里拉京; 4-没食子酸; 5-鞣花酸; 6-槲皮素; 7-芦丁。

Fig. 1 Multiple reaction monitoring chromatograms of 7 components

A-reference substance; B-test substance; 1-piperine; 2-piperlonguminin; 3-corilagin; 4-gallic acid; 5-ellagic acid; 6-quercetin; 7-rutin.

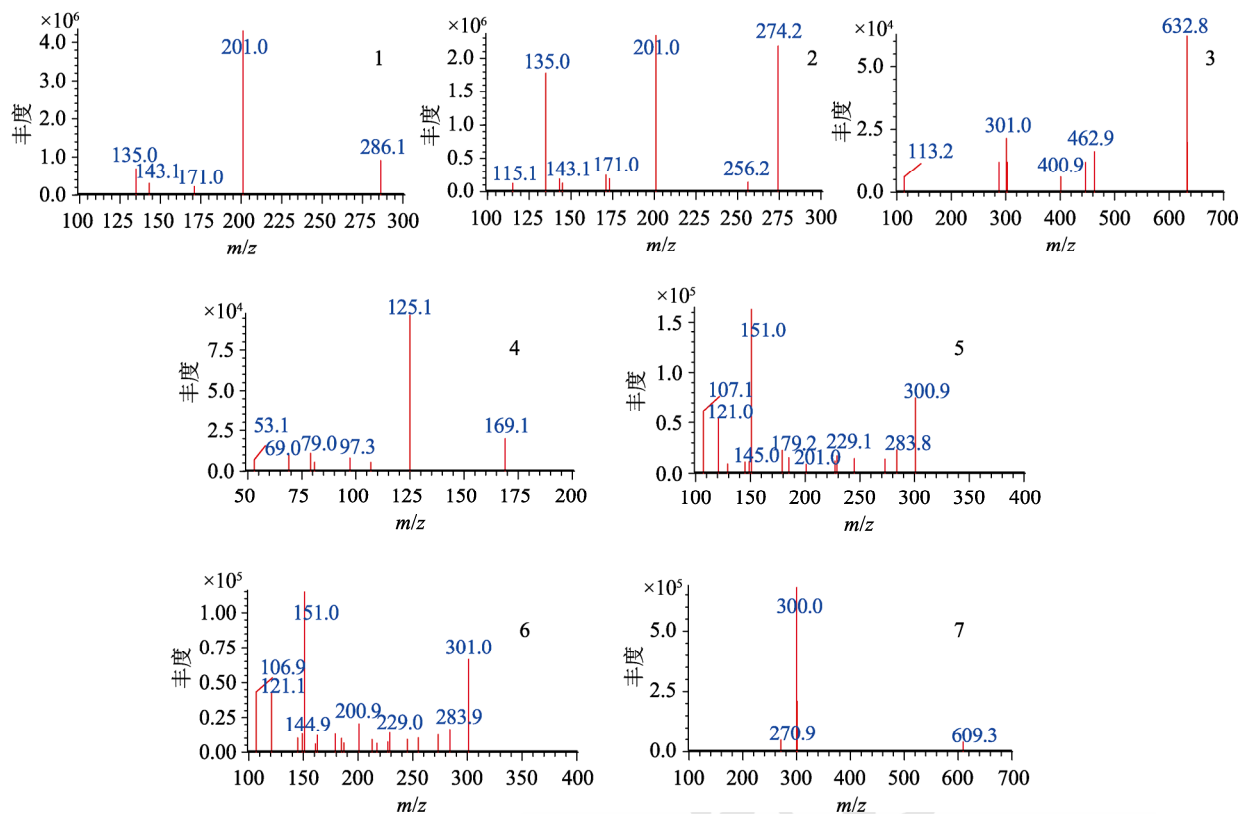


图2 对照品二级质谱图

1-胡椒碱; 2-萆薢宁; 3-柯里拉京; 4-没食子酸; 5-鞣花酸; 6-槲皮素; 7-芦丁。

Fig. 2 Second mass spectra of reference substances

1-piperine; 2-piperlonguminin; 3-corilagin; 4-gallic acid; 5-ellagic acid; 6-quercetin; 7-rutin.

表2 三脂清中7个成分的回归方程与线性范围

Tab. 2 Regression equations and linear ranges of 7 components in Sanzhiqing

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/ng·mL ⁻¹	定量限/ng·mL ⁻¹	检测限/ng·mL ⁻¹
胡椒碱	$Y=195\,383.0X-344\,597.0$	0.999 6	4.18~334.40	0.041 5	0.132 5
萆薢宁	$Y=116\,773.0X+18\,757.4$	0.999 1	0.43~34.08	0.092 6	0.030 6
柯里拉京	$Y=2\,110.1X-132\,938.0$	0.999 2	42.40~43\,392.00	1.497 7	0.494 2
没食子酸	$Y=1\,511.1X-520.5$	0.999 9	4.36~348.80	2.170 4	0.723 5
鞣花酸	$Y=153.9X+1\,891.6$	0.999 1	13.68~1\,094.00	1.569 9	0.523 3
槲皮素	$Y=5\,581.4X+10\,434.5$	0.999 4	0.28~22.64	0.073 0	0.024 3
芦丁	$Y=1\,126.1X+1\,162.3$	0.999 9	2.32~185.60	0.136 5	0.045 5

2.3.3 稳定性考察 取“2.1.1”项下供试品溶液,按“2.2”项下方法,在室温条件下分别于0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h进行进样分析测定,每份连续进样3次,记录峰面积。结果胡椒碱、萆薢宁、柯里拉京、没食子酸、鞣花酸、槲皮素、芦丁峰面积的RSD分别为3.90%,2.02%,1.53%,1.72%,3.25%,4.85%,3.46%,表明供试品溶液室温放置24 h内稳定性良好。

2.3.4 重复性考察 按“2.1.1”项下供试品溶液制备方法,平行制备6份供试品溶液,按“2.2”项下方法,记录峰面积并根据标准曲线计算含量。结果胡椒碱、萆薢宁、柯里拉京、没食子酸、鞣

花酸、槲皮素、芦丁的平均含量RSD分别为4.66%,3.49%,2.28%,3.11%,4.24%,3.60%,3.95%,结果表明重复性良好。

2.3.5 加样回收率考察 取已知含量的三脂清药材粉末共6份,按近似1:1比例加入胡椒碱、萆薢宁、柯里拉京、没食子酸、鞣花酸、槲皮素、芦丁混合对照品溶液,按“2.2”项下方法进样分析,记录峰面积计算加样回收率,结果见表3,表明本法加样回收率良好。

2.4 正交优化提取工艺

根据相关参考文献^[19],选取不同的料液比(A)、乙醇浓度(B)、提取时间(C)、提取次数(D)4

个因素为考察因素,每个因素设置 3 个水平;三脂清组方中萆薢、诃子、山楂分别占比 30.77%, 30.77%, 38.46%, 故综合评分=(萆薢中成分含量)×30.77%+(诃子中成分含量)×30.77%+(山楂中成分含量)×38.46%,以综合评分为考察指标评价提取工艺,评分越高表明提取效果越好。以正交设计优化提取工艺, $L_9(3^4)$ 正交因素水平表、不同提取条件下 7 种成分含量、试验设计与结果见表 4~6,方差分析见表 7。

表 3 三脂清中 7 个成分的加样回收率($n=6$)

Tab. 3 Sample recoveries of 7 components in Sanzhiqing($n=6$)						
成分	原始量/ ng·mL ⁻¹	加入量/ ng·mL ⁻¹	测得量/ ng·mL ⁻¹	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
胡椒碱	58.24	62.70	122.35	102.25	99.54	2.09
	58.24		121.67	101.16		
	58.24		120.16	98.76		
	58.24		121.03	100.14		
	58.24		119.98	98.47		
	58.24		118.72	96.46		
萆薢宁	3.28	3.20	6.51	101.10	101.98	2.95
	3.28		6.45	99.22		
	3.28		6.67	106.10		
	3.28		6.57	102.97		
	3.28		6.42	98.28		
	3.28		6.61	104.23		
柯里拉京	151.50	190.80	352.33	105.26	103.02	3.75
	151.50		348.08	103.03		
	151.50		352.87	105.54		
	151.50		355.85	107.10		
	151.50		343.27	100.51		
	151.50		335.96	96.68		
没食子酸	29.62	32.70	64.05	105.29	105.32	1.39
	29.62		63.67	104.13		
	29.62		64.88	107.83		
	29.62		63.83	104.62		
	29.62		63.61	103.94		
	29.62		64.31	106.09		
鞣花酸	105.55	109.40	219.96	104.58	103.65	2.99
	105.55		214.08	99.20		
	105.55		221.16	105.68		
	105.55		223.71	108.01		
	105.55		217.04	101.91		
	105.55		217.70	102.51		
槲皮素	0.53	0.85	1.41	104.24	102.87	3.92
	0.53		1.36	98.35		
	0.53		1.45	108.95		
	0.53		1.38	100.71		
	0.53		1.42	105.42		
	0.53		1.37	99.53		
芦丁	1.27	1.74	3.09	104.60	101.15	4.33
	1.27		2.98	98.28		
	1.27		3.13	106.90		
	1.27		3.07	103.45		
	1.27		2.95	96.55		
	1.27		2.96	97.13		

表 4 正交试验因素与水平表

Tab. 4 Factors and level table of orthogonal test

水平	因素			
	料液比/g·mL ⁻¹	乙醇浓度/%	提取时间/h	提取次数/次
	(A)	(B)	(C)	(D)
1	1 : 6	40	0.5	1
2	1 : 8	50	1.0	2
3	1 : 10	60	1.5	3

表 5 正交试验中 7 个成分含量($n=3$)

Tab. 5 Contents of the 7 components in orthogonal test ($n=3$)
mg·g⁻¹

序号	胡椒碱	萆薢宁	柯里拉京	没食子酸	鞣花酸	槲皮素	芦丁
1	1.968	0.110	7.018	0.987	3.252	0.116	0.025
2	6.944	0.473	11.950	2.803	6.862	0.099	0.095
3	6.387	0.355	11.549	2.127	5.653	0.053	0.094
4	9.756	0.596	14.780	3.430	8.086	0.114	0.097
5	6.308	0.379	10.120	2.357	4.938	0.067	0.077
6	2.624	0.174	8.395	1.648	3.437	0.059	0.051
7	7.463	0.508	10.389	2.331	5.042	0.055	0.078
8	6.520	0.353	8.791	1.463	3.914	0.074	0.062
9	2.859	0.148	10.076	2.331	4.465	0.035	0.055

表 6 正交试验设计与结果

Tab. 6 Design and results of orthogonal tests

因素	A	B	C	D	综合评分
1	1	1	1	1	4.16
2	1	2	2	2	9.01
3	1	3	3	3	8.08
4	2	1	2	3	11.36
5	2	2	3	1	7.47
6	2	3	1	2	5.05
7	3	1	3	2	7.97
8	3	2	1	3	6.53
9	3	3	2	1	6.15
K_1	21.25	23.49	15.74	17.78	
K_2	23.88	23.01	26.52	22.03	
K_3	20.65	19.28	23.52	25.97	
R_j	3.23	4.21	10.78	8.19	

表 7 正交试验的方差分析结果

Tab. 7 Results of variance analysis of orthogonal test

方差来源	偏差平方和	自由度	方差	F 比值	P 值
A(误差)	1.97	2	0.98	1.00	>0.05
B	3.54	2	1.77	1.80	>0.05
C	20.64	2	10.32	10.49	>0.05
D	11.18	2	5.59	5.68	>0.05

根据极差(R)大小,确定 C 因素对提取工艺影响最大,各因素对综合评分影响的主次顺序为 C(提取时间)>D(提取次数)>B(乙醇浓度)>A(料液比),通过 4 因素 3 水平 K 值分析比较可知,料液

比 $A_2>A_1>A_3$, 乙醇浓度 $B_1>B_2>B_3$, 提取时间 $C_2>C_3>C_1$, 提取次数 $D_3>D_2>D_1$, 结果见表 5~6; A、B、C、D 因素对其均无显著性影响, 可以确定三脂清最优提取工艺为 $A_2B_1C_2D_3$, 即料液比为 1:8, 乙醇浓度为 40%, 提取时间为 0.5 h, 提取次数 3 次, 结果见表 7。

2.5 最优提取条件放大验证试验

按处方比例称取三脂清各味药材约 650.00 g, 共 3 份, 置于圆底烧瓶中, 按最佳提取工艺, 分别加入 40%乙醇溶液 5 200.00 mL, 用电热套加热提取 60 min, 提取 3 次, 冷却至室温, 所得滤液浓缩至 500 mL。精密量取提取液 10 μ L, 置于 70% 甲醇溶液 3 990 μ L 中, 涡旋混匀 30 s, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 即得稀释 400 倍的供试品溶液 A, 用于测定芦丁的含量。精密量取上述供试品溶液 A 200 μ L, 置于 70%甲醇溶液 800 μ L 中, 涡旋混匀 30 s, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 即得稀释 2 000 倍的供试品溶液, 用于测定其他 6 种成分的含量。结果胡椒碱、荜茇宁、柯里拉京、没食子酸、鞣花酸、槲皮素、芦丁 7 种成分含量分别为 9.852, 0.587, 16.247, 3.657, 8.663, 0.119, 0.104 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 为 2.59%~4.82%, 综合评分为 12.09, 结果见表 8。

表 8 放大验证试验结果($n=3$)
Tab. 8 Results of verification tests($n=3$)

序号	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$							综合 评分
	胡椒碱	荜茇宁	柯里 拉京	没食 子酸	鞣花酸	槲皮素	芦丁	
1	9.463	0.615	15.784	3.762	8.962	0.125	0.105	11.96
2	9.875	0.563	16.379	3.526	8.573	0.117	0.109	12.06
3	10.218	0.582	16.597	3.684	8.455	0.115	0.099	12.25
均值	9.852	0.587	16.247	3.657	8.663	0.119	0.104	12.09
RSD/%	3.84	4.49	2.59	3.34	3.06	4.47	4.82	

3 讨论

本实验对常用的流动相体系进行考察: 甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液进行了考察。最初采用乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相, 以 10%乙腈初始梯度进行洗脱, 结果显示胡椒碱和荜茇宁的多重反应监测色谱图出现驼峰, 后将有机相更换为甲醇, 其初始浓度为 10%, 胡椒碱和荜茇宁的峰呈现单峰, 且峰型较好。但是没食子酸的峰形较宽, 故将甲醇的初始梯度调整为 5%, 没食子酸峰型有所改善, 且其他目标成分的峰响应值均高于乙腈。但出现离子

化不完全现象, 又对不同复溶液(水、30%甲醇水溶液、50%甲醇水溶液、70%甲醇水溶液、甲醇溶液)进行考察, 结果以 70%甲醇水溶液对样品及对照品进行稀释后, 色谱峰峰形对称, 灵敏度提高。

本实验对离子化模式进行了确认, 采用正、负离子模式对 7 种化合物进行扫描, 结果胡椒碱和荜茇宁均捕获 1 个质子, 形成 $[M+H]^+$ 的准离子峰; 柯里拉京、没食子酸、鞣花酸、槲皮素、芦丁均失去 1 个质子, 形成 $[M-H]^-$ 准分子离子峰。确定正、负离子模式后, 分别在不同碰撞能量(CE: 60, 50, 40, 30, 20, 10 eV)条件下对母离子进行产物离子扫描, 选取响应强度较高的 2 对碎片离子作为定性离子对, 选取响应强度最高的离子对作为定量离子对, 在此基础上, 通过电压优化确定最终碰撞能量和离子对。

根据中国药典 2020 年版^[20]及文献^[21], 所测定的 7 种成分在乙醇中均有较好的溶解性, 故本研究采用乙醇为溶剂进行提取工艺研究, 并以 7 种活性成分综合评分为指标, 运用正交试验方法, 确定了最佳提取工艺为以 1:8 料液比, 40%乙醇提取 3 次, 每次 0.5 h; 验证试验结果显示, 7 种成分平均含量分别为 9.852, 0.587, 16.247, 3.657, 8.663, 0.119, 0.104 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (RSD 为 2.59%~4.82%)。

综上所述, 本研究所建含量测定方法快速灵敏, 准确可靠, 优化所得醇提取工艺稳定、可行, 并且能较全面地评估制剂质量, 同时大大缩短了分析时间, 提高了分析效率, 拓宽了该制剂含量测定领域, 可为三脂清多组分的定量分析和提取工艺评价提供一定的参考, 并为后期剂型改革提供可靠的参考依据。

REFERENCES

- [1] 仓都古仁. 实用蒙药学[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1987.
- [2] LI Z J, HAN J X. Research progress in pharmacological action of alkaloid in anesthetic BIBA[J]. Inn Mong Petrochem Ind(内蒙古石油化工), 2018, 44(6): 4-6.
- [3] WANG R M, YANG H G. Research progress of Fructus Piperis Longi and its active ingredient piperine[J]. China Pharm Aff(中国药事), 2021, 35(3): 350-356.
- [4] CHEN W J, LIANG W Y, LI S, et al. Quality evaluation of *Terminalia bellerica* based on HPLC fingerprint and multi-components simultaneous determination[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48(6): 1210-1215.
- [5] ZHOU K, JIAN P, LIANG W Y, et al. Analysis on chemical constituents from *Terminalia chebula* Retz. and *Terminalia bellerica* (Gaertn.) Roxb. by UPLC-Q-exactive quadrupole-

- orbitrap mass spectrometry[J]. J Chin Mass Spectrom Soc(质谱学报), 2020, 41(3): 254-267.
- [6] ZHANG Y Y, QIAN K, GAO S T, et al. Simultaneous determination of contents of seven tannins active ingredients in *Chebulae Fructus Retz* from different areas by HPLC[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2017, 52(12): 1073-1082.
- [7] ZHANG Q N, CHANG Z H, YE T, et al. Chemical composition identification and mechanism study of triphala based on UPLC-Q-orbitrap-MS and network pharmacology[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med-World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化), 2021, 23(6): 1850-1866.
- [8] DHANANI T, SHAH S, KUMAR S. A validated high-performance liquid chromatography method for determination of tannin-related marker constituents Gallic acid, corilagin, chebulagic acid, ellagic acid and chebulinic Acid in four *Terminalia* species from India[J]. J Chromatogr Sci, 2015, 53(4): 625-632.
- [9] HAZRA B, SARKAR R, BISWAS S, et al. Comparative study of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging properties in the extracts of the fruits of *Terminalia chebula*, *Terminalia belerica* and *Emblica officinalis*[J]. BMC Complement Altern Med, 2010(10): 20. Doi: 10.1186/1472-6882-10-20
- [10] ZHAO L, LIAO C P, YANG X J, et al. Research progress in *Terminalia chebula* and its predictive analysis on Q-marker[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2020, 51(10): 2732-2744.
- [11] ZHOU J Y, DU X H, ZHANG Z, et al. Trigonelline inhibits inflammation and protects β cells to prevent fetal growth restriction during pregnancy in a mouse model of diabetes[J]. Pharmacology, 2017, 100(5/6): 209-217.
- [12] YANG S Q, CHEN Y D, LI H, et al. Geniposide and gentiopicroside suppress hepatic gluconeogenesis via regulation of AKT-FOXO1 pathway[J]. Arch Med Res, 2018, 49(5): 314-322.
- [13] 赵帅, 郝二伟, 杜正彩, 等. 广山楂的化学成分、药理作用与质量控制研究进展[J]. 中成药, 2020, 42(1): 169-175.
- [14] FENG Y L, LI H, LIU J, et al. Research progress on therapeutic potential of quercetin[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2021, 46(20): 5185-5193.
- [15] SVEDSTRÖM U, VUORELA H, KOSTIAINEN R, et al. Isolation and identification of oligomeric procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers[J]. Phytochemistry, 2002, 60(8): 821-825.
- [16] SHAO F, GU L F, CHEN H J, et al. Evaluation of hypolipidemic and antioxidant effects in phenolrich fraction of *Crataegus pinnatifida* fruit in hyperlipidemia rats and identification of chemical composition by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Pharmacogn Mag, 2017, 13(52): 725-731.
- [17] YU B B, YAN X S, SUN D D. Research progress in pharmacological activities and mechanism of hawthorn[J]. Central South Pharmacy(中南药学), 2015, 13(7): 745-748.
- [18] ZHANG T, LIU Q H, WANG W T. Simultaneous determination of 6 components in compound Jingchuan tablets by UHPLC-ESI-MS/MS[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(11): 1627-1631.
- [19] LIN X, YANG H, PAN X D, et al. Optimization for extraction technology of Qinhuang gel by multicriteria comprehensive assessment[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(12): 1502-1507.
- [20] 中国药典. 一部[S]. 2020: 194, 246, 248.
- [21] HU Q Q, ZENG R, YANG X, et al. Preliminary study on Q-markers of anti-tumor activity extracts of *Polygonum orientale*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2020, 51(10): 2642-2650.

收稿日期: 2021-07-10
(本文责编: 沈倩)