

基于 UPLC 多成分含量测定的山楂炭中试炮制工艺研究

张洪坤^{1,2}, 郭长达¹, 高贯彪¹, 黄玉瑶², 高验杰^{1*}, 蒿亭凤¹ (1.亳州市沪谯药业有限公司, 安徽 亳州 236800; 2.广州市香雪制药股份有限公司, 广州 510663)

摘要: 目的 确定山楂炭的最佳中试炮制工艺。方法 采用 UPLC 测定山楂及其炮制品中 3 种酚酸类成分(绿原酸、金丝桃苷、表儿茶素)和 2 种三萜酸(齐墩果酸、熊果酸)的含量。在中试水平上, 以山楂炭的外观性状、有机酸和上述 5 种成分的含量为评价指标, 对影响山楂炭炮制的因素进行考察。结果 山楂炭的最佳炮制工艺参数: 炒制温度为 200 °C, 炒筒转动频率为 40 Hz, 炒制时间为 33 min。结论 所建立的评价指标能有效评价山楂炭的炮制工艺, 所得工艺稳定可靠。

关键词: 山楂炭; 炮制工艺; 超高效液相色谱法

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)10-1413-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.10.011

引用本文: 张洪坤, 郭长达, 高贯彪, 等. 基于 UPLC 多成分含量测定的山楂炭中试炮制工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(10): 1413-1417.

Processing Technology Study of Crataegi Fructus Charcoal Based on Pilot-scale Level and Multi-component Quantification by UPLC

ZHANG Hongkun^{1,2}, GUO Changda¹, GAO Guanbiao¹, HUANG Yuyao², GAO Yanjie^{1*}, HAO Tingfeng¹ (1.Bozhou Huqiao Pharmaceutical Co., Ltd., Bozhou 236800, China; 2.Guangzhou Xiangxue Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510663, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the processing technology of Crataegi Fructus charcoal in the pilot-scale study. **METHODS** Two UPLC methods for determination of effective components in Crataegi Fructus and its processed products were developed, one for determination of three phenolic compounds (chlorogenic acid, hyperoside and epicatechin), and the other for determination of two triterpene acids (oleanolic acid and ursolic acid). Taking the appearance characters, the total content of organic acid and the content of each of the five compounds above as the indexes, the effects of several influential factors the processing technology of Crataegi Fructus charcoal was investigated in the pilot-scale. **RESULTS** The best processing technology of Crataegi Fructus charcoal was as follows: processing temperature 200 °C, turning frequency 40 Hz, processing time 33 min. **CONCLUSION** Evaluation indexes can effectively evaluate processing technology of Crataegi Fructus. The processing is stable and reliable, and can be used for the actual production.

KEY WORDS: Crataegi Fructus charcoal; processing technology; UPLC

山楂为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. major N. E. Br. 和山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥果实。山楂始载于《新修本草》, 其应用因朱丹溪的提倡开始扩大。山楂为药食同源植物, 性酸、甘, 味温, 归脾、胃、肝经, 临床上主要用于治疗肉食积滞、胃脘胀满、泻痢腹痛、疝气瘀痛等疾病。现代药理学研究表明, 山楂及其炮制品具有助消化^[1]、降压降脂^[2]等作用。山楂的主要成分为有机酸、酚酸类和三萜类化合物^[3]。随着技术的进步, 现代炮制技术以其方便、快捷的优势逐步取代原始的炒制加工, 其质量评价技术的快速发展, 也给中药炮制科学内涵的研究提供了强有力的支持^[4], 特别是在多指

标性成分的测定方面。而 UPLC 的出现又加快了研究的进展^[5]。本实验对山楂炭炮制工艺进行研究, 评价指标包括外观性状、有机酸如绿原酸、金丝桃苷、表儿茶素、齐墩果酸、熊果酸等有效成分的含量, 以确定最佳炒制工艺的参数, 同时阐明了山楂在炒制过程中各成分的变化。

1 材料

1.1 药物与试剂

山楂片购自安徽省亳州市坤源医药有限公司, 产地为山东, 经广州市香雪制药股份有限公司周劲松高级工程师鉴定为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. major N. E. Br. 的干燥成熟果实。

作者简介: 张洪坤, 男, 硕士, 中级药师 Tel: (020)2221155 E-mail: hennanji@yeah.net

通信作者: 高验杰, 女, 硕士, 中级药师 Tel:

(0558)5566666 E-mail: 2192303669@qq.com

绿原酸(批号: 110753-200413, 含量以 96.2% 计)、表儿茶素(批号: 110878-200102, 含量以 94.5% 计)、金丝桃苷(批号: 111521-200303, 含量以 94.3% 计)、齐墩果酸(批号: 110709-200505, 含量以 94.9% 计)、熊果酸(批号: 110742-200517 含量以 94.7% 计)均购于中国食品药品检定研究院; 氢氧化钠(粒)(AR, 天津市大茂化学试剂厂); 甲醇(AR, 西陇化工股份有限公司); 甲酸(HPLC 级, Aladdin), 甲醇(色谱纯, Merck); 乙腈(色谱纯, Merck); 水为超纯水。

1.2 仪器

XCYDT-500 型自控温旋盖变频电热炒药机(台州博大制药机械科技有限公司); Waters Acquity UPLC H-Class 液相色谱系统; XS204 电子天平(Mettler Toledo, $d=0.1$ mg); MS603S 电子天平(Mettler Toledo, $d=1$ mg); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); EYELA N-1100 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司); DHG-9245A 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 绿原酸、金丝桃苷和表儿茶素的含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Acquity UPLC BEH C_{18} (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相 A: 0.05% 甲酸水溶液, 流动相 B: 甲醇-乙腈(23: 77), 进行梯度洗脱: 0~0.8 min, 14% B; 0.8~3.6 min, 14% $\rightarrow$ 16% B; 3.6~7.6 min, 16% B; 7.6~8.8 min, 16% $\rightarrow$ 25% B; 8.8~10.8 min, 25% B; 10.8~11.6 min, 25% $\rightarrow$ 14% B; 11.6~20 min, 14% B; 流速: 0.2 mL $\cdot$ min $^{-1}$; 检测波长: 280 nm; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 进样量: 0.8 μ L。对照品及样品色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 ①对照品储备液的制备: 取绿原酸对照品、金丝桃苷对照品、表儿茶素对照品适量, 精密称定, 加甲醇分别制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品储备液, 备用。②混合对照品溶液的制备: 分别精密量取各对照品储备液适量, 加甲醇制成每 1 mL 含绿原酸 10 μ g、金丝桃苷 50 μ g、表儿茶素 5 μ g 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取山楂样品细粉约 0.5 g, 精密称定, 置 100 mL 锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过,

取续滤液 10 mL, 减压蒸干, 残渣加 25% 甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 加 25% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

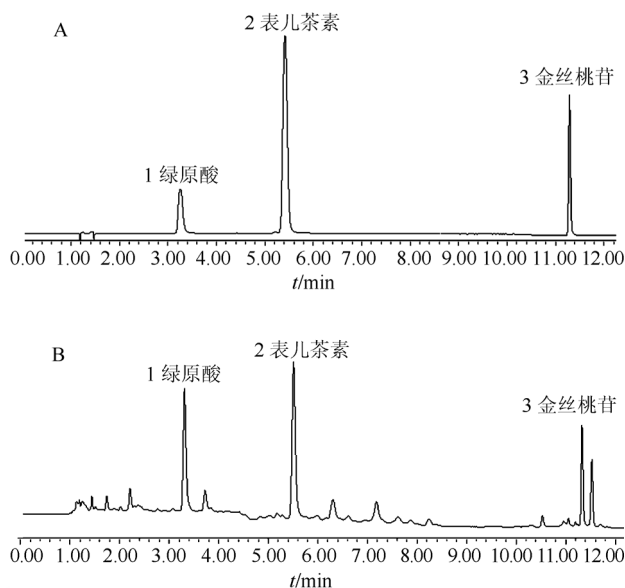


图 1 超高效液相色谱图

A-混合对照品; B-样品。

Fig. 1 UPLC chromatogram

A-mixed reference substances; B-sample.

2.1.4 线性关系 将混合对照品溶液, 分别进样不同体积, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 以绿原酸、表儿茶素、金丝桃苷质量为横坐标(X , ng), 相应的色谱峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归, 得回归方程分别为 $Y=5 \times 10^6 X - 1\,972.7$ ($r^2=0.999\,2$); $Y=4 \times 10^6 X - 4\,738.1$ ($r^2=0.999\,9$); $Y=1 \times 10^7 X - 955.18$ ($r^2=0.999\,8$); 表明绿原酸在 0.872~13.08 ng, 表儿茶素在 5.07~50.7 ng, 金丝桃苷在 0.501~20.02 ng 线性关系良好。

2.1.5 精密度 取同一混合对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 分别在同一天连续进样 6 次进行日内精密度试验和连续 5 d 每天 6 次测定进行日间精密度试验, 计算各成分的 RSD, 结果绿原酸、表儿茶素和金丝桃苷的日内精密度分别为 0.56%, 1.15%, 1.04%, 日间精密度分别为 0.64%, 1.41%, 1.28%。

2.1.6 重复性 精密称取同一批山楂炭样品粉末 0.5 g, 共 6 份, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 计算含量, 测得绿原酸、表儿茶素和金丝桃苷的平均含量分别为 0.072%, 0.12%, 0.013%, RSD 分别为 1.04%, 1.91%, 1.58%, 表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性 取同一供试品溶液, 分别于制备后 0, 4, 8, 12, 24, 48 h 注入液相色谱仪, 按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 计算含量, 结果绿原酸、表儿茶素和金丝桃苷的 $RSD(n=6)$ 分别为 0.86%, 1.51%, 1.34%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.1.8 加样回收率 精密称取山楂炭粉末 9 份, 每份 0.5 g, 分成 3 组, 每组 3 份, 分别精密添加含绿原酸 $0.25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、表儿茶素 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、金丝桃苷 $0.05\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 混合对照品溶液 0.4, 0.5, 0.6 mL, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 计算加样回收率, 结果绿原酸、表儿茶素和金丝桃苷的平均回收率分别为 99.6%, 99.4%, 99.1%, RSD 分别为 1.0%, 1.2%, 1.6%。

2.2 齐墩果酸、熊果酸的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Acquity UPLC BEH C_{18} (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 0.05% 甲酸水溶液(流动相 A)-甲醇(流动相 B)(13:87); 流速: $0.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长: 210 nm; 柱温: 20 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 0.8 μL 。见图 2。

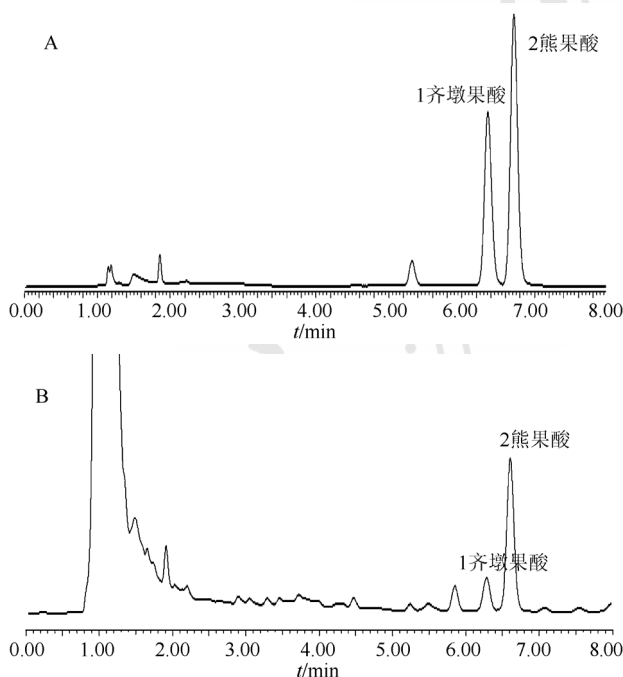


图 2 超高效液相色谱图

A-混合对照品; B-样品。

Fig. 2 UPLC chromatogram

A-mixed reference substances; B-sample.

2.2.2 对照品溶液的制备 取齐墩果酸对照品、熊果酸对照品适量, 精密称定, 分别加甲醇制成

每 1 mL 含齐墩果酸 0.25 mg、熊果酸 0.5 mg 的混合溶液, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取山楂样品细粉约 0.5 g, 精密称定, 置 100 mL 锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 即得。

2.2.4 线性关系 将“2.2.2”项下的混合对照品溶液, 分别进样不同体积, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 以齐墩果酸、熊果酸质量为横坐标(X, ng), 相应的色谱峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归, 得回归方程分别为 $Y=2.7\times 10^6X-65\ 889$ ($r^2=0.999\ 9$); $Y=2.4\times 10^6X-20\ 138$ ($r^2=1$); 表明齐墩果酸在 25~381 ng、熊果酸在 40.2~603.6 ng 线性关系良好。

2.2.5 精密度 取同一混合对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 分别在同一天连续进样 6 次进行日内精密度试验和连续 5 d 每天 6 次测定进行日间精密度试验, 计算各成分的 RSD , 结果齐墩果酸、熊果酸的日内精密度分别为 1.56%, 1.05%, 日间精密度分别为 1.74%, 1.21%。表明精密度良好。

2.2.6 重复性 精密称取同一批山楂炭样品粉末 0.5 g, 共 6 份, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 计算含量, 测得齐墩果酸、熊果酸平均含量分别为 0.258%, 0.452%, RSD 分别为 1.67%, 1.53%, 表明该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性 取同一供试品溶液, 分别于制备后 0, 4, 8, 12, 24, 48 h 注入液相色谱仪, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 计算含量, 结果齐墩果酸、熊果酸的 $RSD(n=6)$ 分别为 1.74%, 1.59%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.2.8 加样回收率 精密称取山楂炭粉末 9 份, 每份 0.25 g, 分成 3 组, 每组 3 份, 分别精密添加含齐墩果酸 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、熊果酸 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 混合对照品溶液 0.9, 1.1, 1.3 mL, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 计算加样回收率, 结果齐墩果酸、熊果酸的平均回收率分别为 99.2%, 99.7%, RSD 分别为 1.8%, 1.5%。

2.3 有机酸含量测定

采用中国药典 2015 年版一部山楂项下有机酸

的测定方法^[6]。

2.4 炮制工艺研究

2.4.1 山楂炭炮制方法 参考中国药典 2015 年版、全国中药炮制规范(1988 年版)、浙江省中药炮制规范(2015 年版)、上海市中药饮片炮制规范(2008 年版)等山楂炭相关法定依据,进行炮制工艺研究。采用 XCYDT-500 型自控温旋盖变频电热炒药机,设定炒药机温度和转速,待炒药达到设定值后,投入山楂片 25 kg(机器最大炒药量),炒制,炒至表面焦褐色至黑褐色,果肉及断面焦褐色,有焦香气时出锅,放凉,筛去碎屑。除去残留果核,粉碎,过筛,备用。

2.4.2 炒制温度考察 以有机酸、绿原酸、表儿茶素、金丝桃苷等化学成分含量及炮制品的性状为指标,按“2.4.1”项下方法炒制,考察山楂炭在 160, 180, 200, 220, 240 °C 下的炒制情况。适时取样,记录各取样点性状并进行测定。研究结果表明 200 °C 为最佳炮制温度,见表 1、图 3。

表 1 炮制过程中性状的变化

Tab. 1 The Changes of character in the processing

炒制温度/°C	炒制时间/min	性状
160	20	表面红棕色,果肉黄棕色至黄褐色,偶见焦斑,气清香。
	33	表面棕褐色至焦褐色,果肉黄褐色至棕褐色,气微香。
	40	表面焦褐色至黑褐色,果肉焦褐色,有焦香气。
	60	表面黑褐色,果肉黑褐色,断面焦黑,部分炭化。
	70	表面完全炭化,断面绝大部分炭化。
180	15	表面暗红棕色,果肉黄棕色至黄褐色,偶见焦斑,气清香。
	25	表面棕褐色至焦褐色,果肉黄褐色,有微焦香味。
	35	表面焦褐色至黑褐色,果肉焦褐色,断面焦褐色,微焦香味。
	45	表面黑褐色,果肉及断面黑褐色,焦味浓郁。
	50	表面黑色,果肉及断面黑褐色至黑色,部分炭化。
200	20	表面暗红色,果肉黄褐色,气清香。
	23	表面棕褐色至焦褐色,果肉黄褐色至棕褐色。
	30	表面黑褐色,果肉焦褐色,焦香味。
	40	表面焦黑色至黑色,炭化,断面部分炭化。
	45	表面黑色,断面大部分炭化,焦味浓郁。
220	15	表面红棕色至棕褐色,果肉黄褐色,气香。
	20	表面棕褐色至焦褐色,果肉黄褐色至棕褐色,气微香。
	25	表面焦黑色至黑褐色,果肉焦褐色至焦黑色,有焦香味。
	30	表面黑褐色至黑色,断面炭化,焦味较浓。
	40	表面黑色,断面炭化。
240	15	表面棕褐色,果肉浅黄褐色至棕褐色,气微香。
	20	表面深棕褐色,果肉黄褐色,气微香。
	25	表面焦褐色至黑褐色,果肉及断面焦褐色,具焦香气。
	30	表面黑褐色至黑色,果肉焦褐色,部分炭化,具焦炭味。
	35	表面炭黑色,断面大部分炭化,焦炭味浓郁。

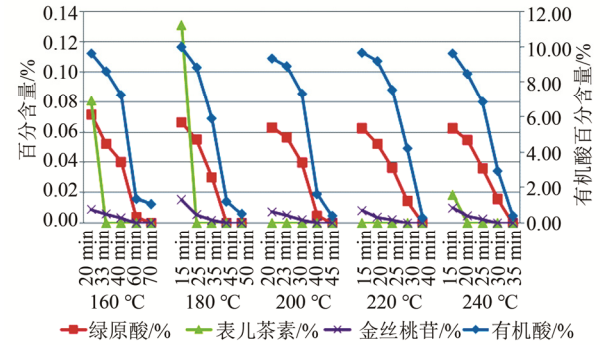


图 3 含量变化的折线图

Fig. 3 The line chart of changes in content

2.4.3 炒筒转动频率考察 以有机酸、绿原酸、金丝桃苷等化学成分含量及炮制品的性状为指标,按“2.4.1”项下方法炒制,考察山楂炭在 200 °C 下炒筒不同转动频率的炒制情况。至炮制终点取样,记录样品性状并进行测定。综合炒制均匀度、成分变化、机器参数等,确定 40 Hz 为最佳转速。结果见表 2、图 4。

表 2 翻转频率考察结果

Tab. 2 The inspection results of flip frequency

翻转频率	性状
30 Hz-33 min	表面黑褐色,果肉及断面焦褐色,气微焦。
40 Hz-33 min	表面灰褐色至黑褐色,果肉及断面焦褐色,气微焦。
50 Hz-32 min	表面灰褐色至黑褐色,果肉及断面焦褐色,气微焦。

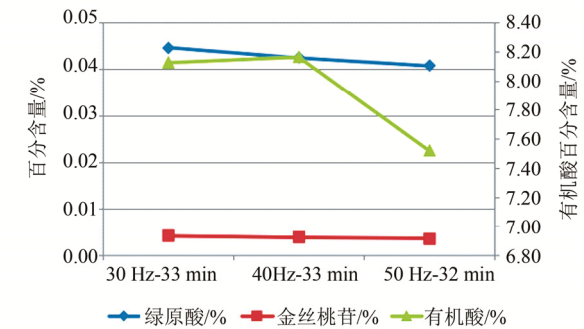


图 4 含量变化的折线图

Fig. 4 The line chart of changes in content

2.5 工艺验证

山楂炭工艺验证,共 3 批,按前期实验确定的最佳炮制工艺参数进行炮制,3 批验证结果与前期实验结果基本一致,工艺稳定可靠,重复性较佳,可作为山楂炭的生产工艺。结果见表 3。

表 3 工艺验证结果

Tab. 3 The results of process validation

序号	性状	有机酸	绿原酸	表儿茶素	金丝桃苷	齐墩果酸	熊果酸	收率 %
原药材	表面鲜红色至深红色，果肉黄白色，清香浓郁。	9.39	0.071 3	0.374	0.015 3	0.259	0.398	—
验证 1	表面灰褐色至黑褐色，果肉及断面焦褐色，有焦香气。	8.40	0.046 7	—	0.003 62	0.229	0.375	84.0
验证 2	表面灰褐色至黑褐色，果肉及断面焦褐色，有焦香气。	8.33	0.045 3	—	0.003 55	0.223	0.358	84.4
验证 3	表面灰褐色至黑褐色，果肉及断面焦褐色，有焦香气。	8.38	0.046 4	—	0.003 58	0.228	0.371	85.6

3 讨论

山楂炭的性状在炒制过程的颜色变化有以下规律。表面：鲜红色→深红色→暗红色→红棕色→暗红棕色→棕褐色→焦褐色→黑褐色→黑色。果肉：黄白色→浅黄色→浅黄棕色→黄棕色→黄褐色→浅棕褐色→棕褐色→焦褐色→焦黑色→黑色。断面：黄白色→浅黄色→浅黄棕色→黄棕色→黄褐色→浅棕褐色→棕褐色→焦褐色→焦黑色→黑色。气味：气微清香→气清香→焦香气→焦香味→焦味→焦炭味。结合中国药典、各炮制规范和相关炮制书籍确定，本实验条件下山楂炭的终点性状为表面焦褐色至黑褐色，果肉及断面焦褐色，有焦香气。

炮制温度考察中，综合考虑性状、含量、时间、经济，200℃比较合适作为炮制的温度点。各温度下的炒制过程化学成分的变化规律基本一致，即随着炒制时间的延长，4种成分的含量均逐渐下降，其中有机酸(以枸橼酸计)的含量先升后降。在山楂炭性状终点处，有机酸、绿原酸、表儿茶素和金丝桃苷均呈不同程度的下降，在过了山楂炭的性状终点后有机酸含量明显下降，表儿茶素降至无法测定。在山楂炭的炮制终点时各有机酸的含量较原药材含量有所下降，但大部分被保留下来了，故符合“炒炭存性”的原理，而过了炮制终点后山楂部分已经炭化，去性留炭了。

炒筒转动频率对山楂炭的性状和炒制时间影响较小，各含量指标变化差异不大，考虑实际生产情况，30 Hz 的转速带料不均，50 Hz 的转速能耗较高，综合选定中速 40 Hz 作为最佳转速。

从本研究的数据也可以看出，其实每个温度都会有一个炮制终点，不同的温度炮制终点的时间也不一致，而多数炮制终点又是化学成分突变点，很多文献将时间作为一个因素取不同的水平的时间来进行正交或均匀设计考察，而这些水平很可能只在一个温度合适，而在其他温度要么是未到炮制终点或是已经过了炮制终点，如此比较缺乏科学性，所以单一因数的考察在炒制炮制工艺考察较均匀正交设计更为实用。

由于齐墩果酸和熊果酸的专属性不强，且极性较小，故开发了 2 个含量测定方法，考虑到时间及研发成本，仅关注工艺验证时其含量的变化。本次建立 UPLC 的评价方法能够快速、较好的评价山楂及山楂炭的质量，对于山楂的质量控制也有一定的参考价值。

REFERENCES

[1] 张三印, 周艳霞, 孙改侠, 等. 山楂不同炮制品对胃肠平滑肌收缩的影响研究[J]. 中药材, 2009, 32(10): 1519-1522.
[2] 王现春, 潘丽辉, 林辉. 山楂不同炮制方法治疗高血脂症的临床观察[J]. 中医临床研究, 2012, 4(19): 46-47.
[3] SUN J Y, YANG S B, XIE H X, et al. Studies on chemical constituents from fruit of *Crataegus pinnatifida* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2002, 33(6): 483-486.
[4] XIAO Y Q, ZHANG C, LI L. Developmental prospect of subject of Chinese materia medica processing [J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2009, 24(10): 1253-1257.
[5] CHEN B, CAI T, JIA X B. Simultaneous determination of ten active ginsenosides in steamed notoginseng by UPLC [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2014, 39(9): 1614-1619.
[6] 中国药典. 一部[S]. 2015: 31.

收稿日期: 2017-04-01
(本文责编: 曹粤锋)