

## 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

李文兵<sup>1,2</sup>, 许玲<sup>3,4</sup>, 卢君蓉<sup>5</sup>, 邢冷<sup>3,4</sup>, 刘圆<sup>2,6\*</sup>, 胡昌江<sup>4,5\*</sup>

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. 四川新绿色药业科技发展有限公司, 四川 成都 611900

4. 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

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 建立枇杷叶标准汤剂 HPLC 指纹图谱, 比较蜜炙前后质量差异, 为其质量控制提供依据。方法 采用 HPLC-DAD 法, 以乙腈-0.4%磷酸水溶液为流动相梯度洗脱, 建立 20 批次枇杷叶蜜炙前后标准汤剂 HPLC 指纹图谱, 同时测定新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸的含量; 采用相似度和聚类分析对蜜炙前后枇杷叶标准汤剂进行质量评价。结果 枇杷叶蜜炙前后标准汤剂指纹图谱和 3 种绿原酸类成分含量均有显著差异。蜜炙后指纹图谱新增 2 个色谱峰, 其中 1 号峰为 5-羟甲基糠醛; 枇杷叶标准汤剂中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸平均质量分数分别为 4.300、4.306、5.432 mg/g, 蜜炙后 3 种绿原酸类成分质量分数显著降低, 分别为 3.295、3.460、4.118 mg/g, 降低率分别为 23.29%、19.06%、23.92%。结论 本法简单、耐用性好, 不仅可以对枇杷叶蜜炙前后标准汤剂进行质量控制, 还能有效辨别蜜炙前后饮片差异, 可为枇杷叶、蜜枇杷叶标准汤剂及相关制剂的质量控制提供参考。

**关键词:** HPLC; 指纹图谱; 枇杷叶; 蜜枇杷叶; 标准汤剂; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 5-羟甲基糠醛; 相似度; 聚类分析; 质量控制

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)13-3444-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.13.011

## Quality control study of standard decoction of raw and honey processed *Eriobotryae Folium* based on HPLC fingerprint

LI Wen-bing<sup>1,2</sup>, XU Ling<sup>3,4</sup>, LU Jun-rong<sup>5</sup>, XING Leng<sup>3,4</sup>, LIU Yuan<sup>2,6</sup>, HU Chang-jiang<sup>4,5</sup>

1. Institute of Qinghai-Tibetan Plateau, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

2. Sichuan Provincial Qiang-Yi Medicinal Resources Protection and Utilization Technology Engineering Laboratory, Chengdu 610225, China

3. Sichuan Neo-Green Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd, Chengdu 611900, China

4. Key Laboratory of Chinese medicine formulations particle mass and Clinical Evaluation, Chengdu 611900, China

5. Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China

6. Ethnic Medicine Institute, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

**Abstract: Objective** To establish HPLC fingerprint of *Eriobotryae Folium* standard decoction and compare quality difference between raw and honey processed *Eriobotryae Folium* standard decoction, which can provide a reference for its quality control.

**Methods** An HPLC-DAD method was utilized. The mobile phase was acetonitrile-0.4% phosphoric acid setting for gradient elution. The HPLC fingerprints of 20 batches of standard decoction of raw and honey processed *Eriobotryae Folium* were established. The

收稿日期: 2020-02-07

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1708005); 四川省科技支撑计划(2015SZ0031); 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资助(2020PTJS26001)

作者简介: 李文兵(1988—), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向为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, 博士生导师, 教授, 从事少数民族药物研究和教学。Tel: (028)85528812 E-mail: 499769896@qq.com

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

contents of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, and cryptochlorogenic acid were determined simultaneously. Similarity and cluster analysis were chosen to evaluate the quality of standard decoction of raw and honey processed *Eriobotryae Folium*. **Results** Both of the fingerprint and the contents of three kinds of chlorogenic acids of *Eriobotryae Folium* standard decoction had significant difference before and after the *Eriobotryae Folium* being processed by honey. Two chromatographic peaks were increased newly in honey processed *Eriobotryae Folium*. The No.1 peak refers to component of 5-hydroxymethylfurfural. The average contents of neochlorogenic acid, chlorogenic acid and cryptochlorogenic acid in raw *Eriobotryae Folium* standard decoction were 4.300, 4.306, and 5.432 mg/g respectively. The result of contents showed a significantly decrease in honey processed *Eriobotryae Folium* standard decoction. Their contents were 3.295, 3.460, and 4.118 mg/g respectively. The reduction rate of them were 23.29%, 19.06%, and 23.92% respectively. **Conclusion** The method is concise and durable. It could not only be utilized to evaluate the quality of standard decoction of *Eriobotryae Folium* before and after processed by honey, but also to identify the quality differences of them. The study could be used for quality control of standard decoction of raw and honey processed *Eriobotryae Folium*, identify the quality difference of them and also provide a reference for quality control of their preparations.

**Key words:** HPLC; fingerprint; raw *Eriobotryae Folium*; honey processed *Eriobotryae Folium*; standard decoction; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; 5-hydroxymethylfurfural; similarity; cluster analysis; quality control

枇杷叶 *Eriobotryae Folium* 为蔷薇科枇杷属植物枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. 的干燥叶, 始载于《名医别录》, 具有清肺止咳、降逆止呕之功效, 临床上用于肺热咳嗽、气逆喘急、胃热呕逆、烦热口渴等症<sup>[1-2]</sup>。

枇杷叶临床入药多以汤剂为主, 且其炮制前后临床应用有所差异, 生品长于清肺止咳, 多用于肺热咳嗽, 如治疗痰热阻肺、肺气不降、咳嗽气喘的枇杷清肺饮; 蜜炙后能增强润肺止咳作用, 常用于肺燥咳嗽, 如治疗肺燥伤阴或肺阴素亏, 干咳无痰的清燥救肺汤<sup>[3]</sup>。枇杷叶蜜炙前后临床应用不同, 说明其内在质量有所差异。然而, 目前对于枇杷叶和蜜枇杷叶的质量控制研究多集中在药材或饮片方面<sup>[4-8]</sup>, 基于临床用药习惯的标准汤剂质量控制研究尚未见报道, 难以全面反映和控制枇杷叶蜜炙前后的质量, 尤其是经过提取后失去饮片外观性状的配方颗粒及相关制剂。

本研究基于中医临床用药习惯, 根据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求(征求意见稿)》制备 20 批次枇杷叶和蜜枇杷叶标准汤剂, 建立 HPLC 指纹图谱, 从定性和定量 2 个层面对标准汤剂进行质量控制研究。在定量指标成分选择方面, 由于《中国药典》2015 年版枇杷叶质控指标熊果酸和齐墩果酸极性较小, 在标准汤剂中含量极微(总量小于万分之一), 不适合作为标准汤剂含测指标。因此, 本实验根据枇杷叶(蜜枇杷叶)标准汤剂化学成分特性, 选择其中含量较高的新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸 3 种成分作为含测指标, 并比较蜜炙前后质量差异, 在实际生产中控制和辨别枇杷叶蜜炙前后配方颗粒及相关制剂的质量有一定的现实意

义和应用价值。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1260 Infinity II 型高效液相色谱仪, 含 G7112B 二元泵, G7129A 样品瓶进样器, G7116A 大容量柱温箱, G7115A 二极管阵列检测器, 美国安捷伦科技有限公司; XP26 型电子天平、ME204E 型电子天平, Mettler Toledo 公司; 1810A 摩尔原子型超纯水器, 上海摩勒科学仪器有限公司; KQ5200DB 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; NCCO-300 型全自动切药机, 杭州金竺机械有限公司; ZQD-60 炙药机, 杭州春江制药机械有限公司; 全自动分体式陶瓷煎药壶, 美味世家永达基电器厂; LGJ-100F 型真空冷冻干燥机, 北京松源华兴科技发展有限公司。

对照品绿原酸(批号 110753-201415, 质量分数 96.2%)、5-羟甲基糠醛(批号 111626-201509, 质量分数 97.8%) 购于中国食品药品检定研究院; 对照品新绿原酸(批号 17062003, 质量分数 98.0%)、隐绿原酸(批号 17061401, 质量分数 98.0%) 购于成都普菲德生物技术有限公司; 蜂蜜(批号 020003-1804001) 由四川新绿色药业科技发展有限公司提供; 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

不同产地的枇杷叶药材通过市场及主产区实地调研, 从四川、福建、浙江等主产区收集(药材产地信息分别为四川简阳 3 批 S1~S3、四川金堂 4 批 S4~S7、四川仁寿 8 批 S8~S15、四川中江 1 批 S16、浙江绍兴 1 批 S17、浙江丽水 1 批 S18、福建南平 2 批 S19、S20), 经成都中医药大学胡昌江教授鉴定为蔷薇科枇杷属植物枇杷 *Eriobotrya japonica*

(Thunb.) Lindl. 的干燥叶；枇杷叶饮片按照《中国药典》2015 年版枇杷叶炮制项下要求，切制成 5~10 mm 宽丝，经过检测符合《中国药典》2015 年版要求。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Agilent 5 HC C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为 0.4% 磷酸水溶液-乙腈，梯度洗脱：0~5 min, 5% 乙腈；5~35 min, 5%~22% 乙腈；35~50 min, 22% 乙腈；含量测定检测波长为 327 nm, 指纹图谱检测波长为 300 nm；体积流量为 1.0 mL/min；柱温为 35 °C。在选定条件下，各待测色谱峰与样品中其他组分色谱峰达基线分离，其理论塔板数 (*N*) 均大于 5 000。

### 2.2 样品制备

**2.2.1 蜜枇杷叶饮片制备** 取炼蜜 (116~118 °C) 200 g, 按 1:1 比例加入沸水稀释, 淋入 1 000 g 枇杷叶饮片拌匀, 闷润 60 min, 置炙药机中 220 °C 炒制 15 min, 至表面深黄色, 不粘手时, 取出晾凉, 即得蜜枇杷叶饮片 (由饮片 S1~S20 制备的蜜枇杷叶饮片批号分别对应为 hS1~hS20, 平均收率为 108%)。

**2.2.2 标准汤剂的制备** 枇杷叶 (蜜枇杷叶) 饮片 100 g, 加水煎煮 2 次, 一煎加 14 倍水, 浸泡 30 min, 煮沸, 保持微沸煎煮 20 min, 二煎加 10 倍水, 煮沸, 保持微沸煎煮 15 min, 200 目筛网滤过, 合并水煎液, 立即冷却至室温, 冷冻干燥, 分装, 即得枇杷叶 (蜜枇杷叶) 标准汤剂。枇杷叶和蜜枇杷叶标准汤剂平均得率为 17.65% 和 28.53%。

**2.2.3 对照品溶液的制备** 取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸对照品适量, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶内, 用 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 得混合对照品储备液, 质量浓度分别为 0.581 5、1.077 2、0.348 1 mg/mL。精密量取上述储备液适量, 用 50% 甲醇稀释, 得新绿原酸 (232.6、93.0、37.2、14.9、6.0 μg/mL)、绿原酸 (430.9、172.4、68.9、27.6、11.0 μg/mL)、隐绿原酸 (139.2、55.7、22.3、8.9、3.6 μg/mL) 系列混合对照品溶液, 备用。另取 5-羟甲基糠醛对照品适量, 加 50% 甲醇制成 5 μg/mL 的溶液, 作为指纹图谱参照物溶液。

**2.2.4 供试品溶液的制备** 取枇杷叶 (蜜枇杷叶) 标准汤剂粉末约 0.20 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量,

超声处理 (功率 600 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

### 2.3 指纹图谱建立

**2.3.1 精密度试验** 取同一批枇杷叶标准汤剂供试品溶液 (批号 S1), 按“2.1”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 记录色谱图。以对照品易得且出峰时间适中的绿原酸作为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别为 0.04%~0.12% 和 0.06%~0.37%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.2 重复性试验** 取同一批枇杷叶标准汤剂样品 (批号 S1) 6 份, 分别按“2.2.4”项方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 进样 10 μL, 记录色谱图。以绿原酸为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别为 0.03%~0.25% 和 0.05%~0.87%, 表明该方法重复性良好。

**2.3.3 稳定性试验** 取同一批枇杷叶标准汤剂供试品溶液 (批号 S1), 分别于制备后 0、1、2、4、8、16、24 h 进样 10 μL, 记录色谱图。以绿原酸为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.10%~1.02% 和 0.27%~2.10%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.3.4 相似度评价** 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012.1 版) 分别对 20 批枇杷叶和蜜枇杷叶标准汤剂的 HPLC 图谱进行相似度分析, 以 S1 号样品的图谱作为参照图谱, 中位数法生成对照图谱 (R), 建立标准汤剂的共有模式, 计算相似度。结果表明, 20 批次枇杷叶标准汤剂指纹图谱有 7 个共有峰, 其相似度在 0.989~0.999; 蜜枇杷叶标准汤剂指纹图谱有 9 个共有峰, 其相似度在 0.965~0.996; 二者相似度均大于 0.95, 说明相似度良好。结果见图 1、2。

**2.3.5 蜜炙前后指纹图谱对比** 对枇杷叶蜜炙前后标准汤剂 HPLC 指纹图谱共有模式进行对比发现, 蜜炙后在 7.3、9.6 min 处新增加 2 个色谱峰, 其中 1 号峰为 5-羟甲基糠醛, 结果见图 3。以绿原酸为参照峰, 计算蜜炙前后各共有峰相对峰面积, 导入 SPSS 15.0, 采用组间连接法及欧氏距离平方法进行聚类分析。结果表明, 当判别距离为 5 时, 枇杷叶标准汤剂聚为 2 类, 其中 S15~S18 为一类, 可能和新绿原酸相对峰面积差异有关; 蜜枇杷叶标准汤剂聚为 1 类, 说明 20 批次间质量差异较小。判别距离接近 25 时, 枇杷叶和蜜枇杷叶聚为 2 类, 说明炮

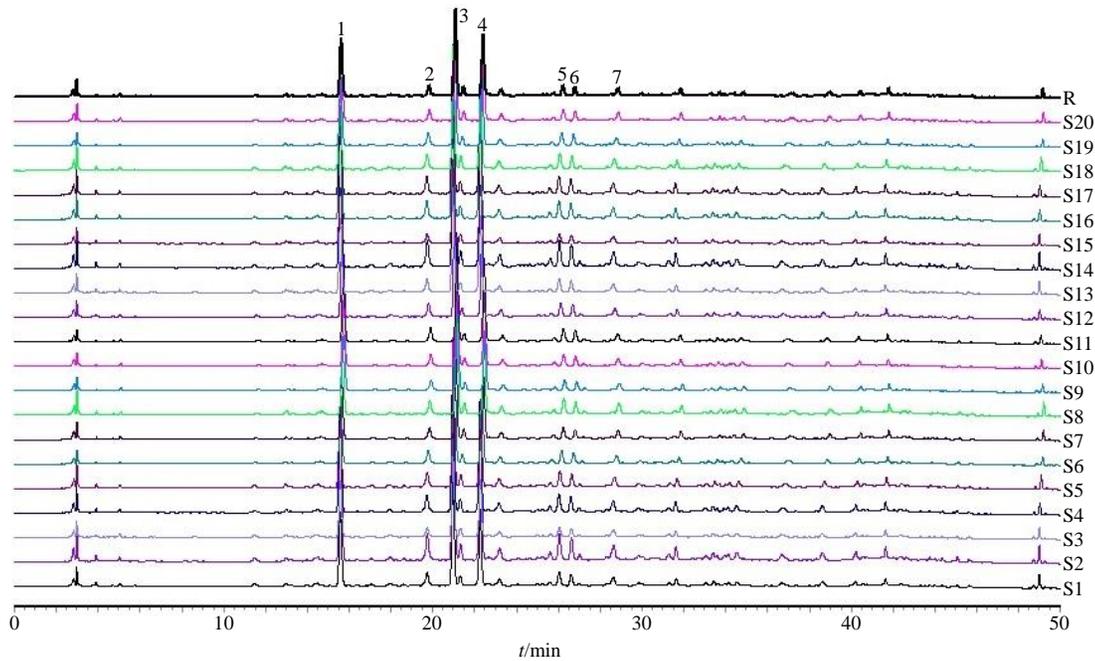


图1 20批枇杷叶(S1~S20)标准汤剂HPLC指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of 20 batches of raw *Eriobotryae Folium* (S1—S20) standard decoction

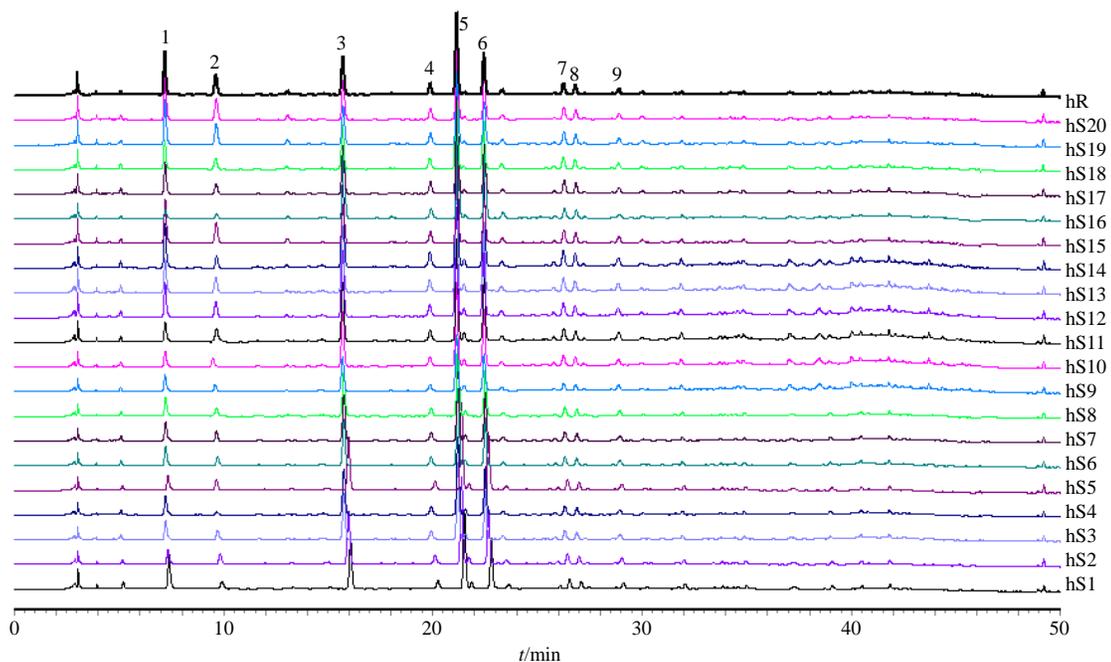


图2 20批蜜枇杷叶(hS1~hS20)标准汤剂HPLC指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of 20 batches of honey processed *Eriobotryae Folium* (hS1—hS20) standard decoction

制前后指纹图谱差异明显,新增色谱峰贡献较大,可以作为区分炮制前后饮片差异的鉴别点,见图4。

## 2.4 含量测定

**2.4.1 线性关系考察** 精密吸取“2.2.3”项混合对照品溶液,进样10 μL,测定各色谱峰峰面积。以对照品进样量为横坐标(X),色谱峰峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,计算回归方程分别为新绿

原酸  $Y=2\ 409.40 X-103.74, r=0.999\ 9$ ; 绿原酸  $Y=2\ 974.82 X-45.21, r=0.999\ 9$ ; 隐绿原酸  $Y=2\ 390.89 X-137.46, r=0.999\ 6$ ; 结果表明新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸分别在0.059 5~5.815 0 μg、0.110 3~10.772 0 μg、0.035 6~3.481 0 μg 线性关系良好。

**2.4.2 精密度试验** 精密吸取“2.2.3”项混合对照品溶液10 μL,重复进样6次,测定新绿原酸、绿

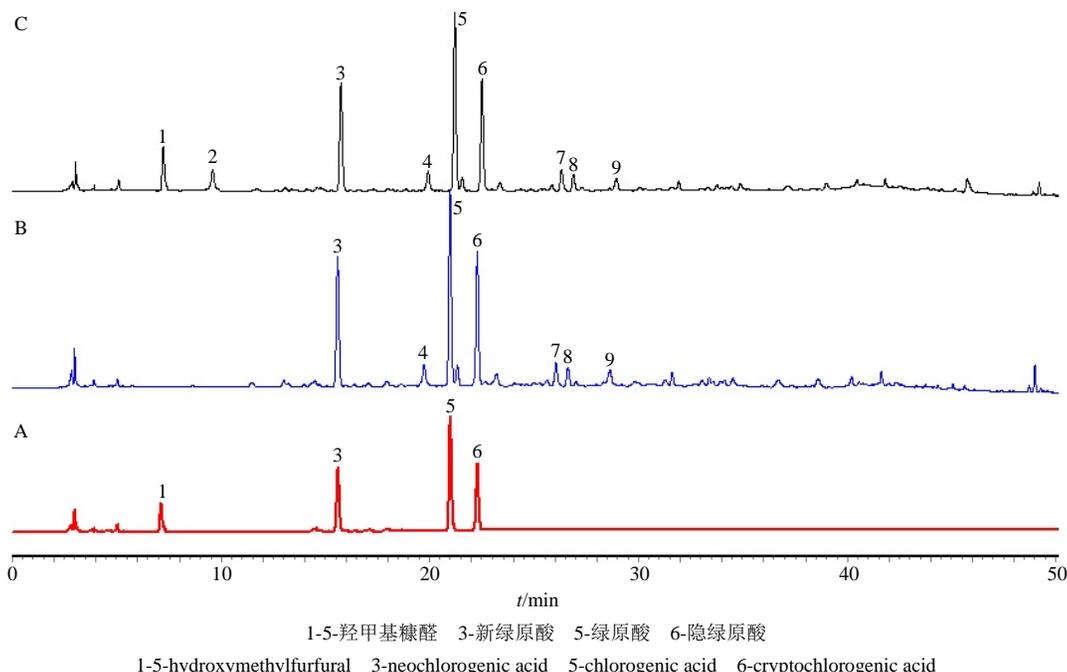


图 3 混合对照品溶液 (A)、枇杷叶标准汤剂 (B) 和蜜枇杷叶标准汤剂 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC fingerprint of mixed reference substances (A), raw *Eriobotryae Folium* standard decoction (B), and honey processed *Eriobotryae Folium* standard decoction (C)

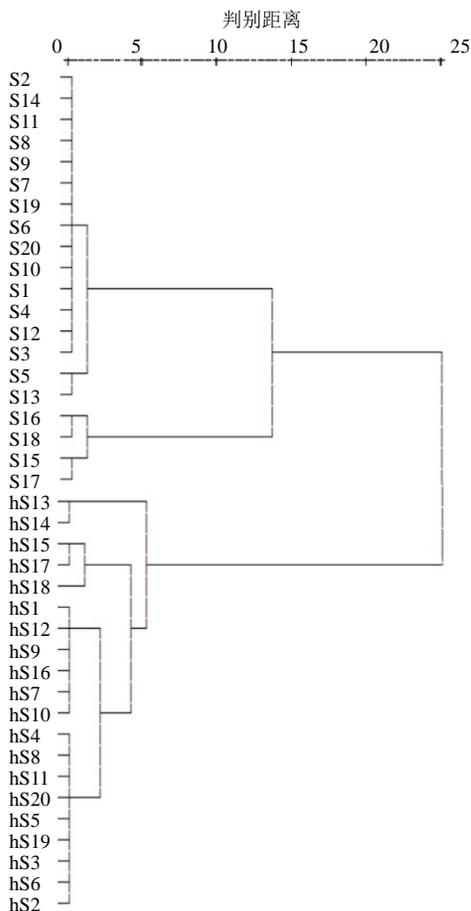


图 4 枇杷叶蜜炙前后标准汤剂聚类树状图

Fig. 4 Cluster tree diagram of standard decoction of raw and honey processed *Eriobotryae Folium*

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

**2.4.3 重复性试验** 取同一批枇杷叶标准汤剂样品 (批号 S1) 6 份，分别按“2.2.4”项方法制备供试品溶液，进样 10  $\mu$ L，测定峰面积，计算指标成分含量。结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸质量分数的 RSD 分别为 0.78%、0.89%、1.01%，表明该方法重复性良好。

**2.4.4 稳定性试验** 取同一批枇杷叶标准汤剂供试品溶液 (批号 S1)，分别于制备后 0、1、2、4、8、16、24 h 进样 10  $\mu$ L，测定峰面积，结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸峰面积的 RSD 分别为 1.24%、1.03%、1.51%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.4.5 加样回收率试验** 取 6 份已测定的枇杷叶标准汤剂样品 (批号 S1) 0.10 g，精密称定，分别加入混合对照品溶液 (新绿原酸 352.0  $\mu$ g/mL、绿原酸 404.1  $\mu$ g/mL、隐绿原酸 503.2  $\mu$ g/mL) 1 mL，分别按“2.2.4”项方法制备供试品溶液，各进样 10  $\mu$ L，测定峰面积，计算指标成分回收率。结果表明 3 种绿原酸类成分新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸平均加样回收率分别为 97.24%、97.22%、97.66%，RSD 分别为 1.85%、1.16%、1.25%，说明该方法准确度良好。

**2.4.6 样品含量测定** 取 20 批次枇杷叶、蜜枇杷叶

标准汤剂,按“2.2.4”项方法制备供试品溶液,进样 10  $\mu\text{L}$ ,测定峰面积,计算新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸的含量。结果见表 1。由表 1 结果可知,20 批次枇杷叶标准汤剂中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸的平均质量分数分别为 4.300、4.306、5.432  $\text{mg/g}$ ,蜜炙后 3 种绿原酸类成分质量分数分别为 3.295、3.460、4.118  $\text{mg/g}$ ,枇杷叶蜜炙后标准汤剂

中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸显著降低,降低率分别为 23.29%、19.06%、23.92%。根据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求(征求意见稿)》,以有效(或指标)成分含量均值 70%~130% 计算含量限度及范围,确定枇杷叶和蜜枇杷叶标准汤剂 3 种绿原酸类成分总量范围分别为 9.8~18.2、7.6~14.1  $\text{mg/g}$ 。

表 1 枇杷叶蜜炙前后标准汤剂中 3 种绿原酸类成分测定结果 ( $n = 2$ )

Table 1 Content of three chlorogenic acids in standard decoction of raw and honey processed *Eriobotryae Folium* ( $n = 2$ )

药材	枇杷叶标准汤剂/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$			总量/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	蜜枇杷叶标准汤剂/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$			总量/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	蜜炙后降低率/%		
	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸		新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸		新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸
S1	3.787	4.124	4.919	12.830	2.998	3.352	3.889	10.239	20.84	18.72	20.93
S2	4.539	4.549	5.666	14.754	3.239	3.754	4.231	11.224	28.64	17.47	25.32
S3	2.896	3.128	3.847	9.871	2.349	2.791	3.067	8.207	18.87	10.78	20.26
S4	2.833	2.973	3.739	9.545	2.127	2.365	2.746	7.238	24.89	20.46	26.54
S5	3.161	3.805	4.245	11.211	2.766	3.443	3.647	9.856	12.49	9.50	14.10
S6	3.438	3.830	4.505	11.773	2.102	2.585	2.797	7.484	38.86	32.52	37.91
S7	3.713	3.727	4.721	12.161	3.135	2.922	3.825	9.882	15.58	21.59	18.97
S8	6.156	6.173	7.823	20.152	4.356	4.639	5.334	14.329	29.24	24.85	31.81
S9	3.707	3.747	4.748	12.202	2.988	2.811	3.597	9.396	19.38	24.99	24.25
S10	3.947	4.402	5.122	13.471	3.051	3.663	3.966	10.680	22.69	16.80	22.56
S11	4.241	4.328	5.375	13.944	2.910	3.084	3.728	9.722	31.38	28.73	30.65
S12	2.755	2.935	3.652	9.342	2.082	2.445	2.750	7.277	24.42	16.69	24.71
S13	6.364	7.992	8.133	22.489	4.927	6.110	6.151	17.188	22.58	23.55	24.37
S14	5.195	5.235	6.550	16.980	4.382	4.577	4.976	13.935	15.66	12.58	24.04
S15	5.383	4.216	6.386	15.985	4.287	3.882	5.288	13.457	20.35	7.91	17.18
S16	4.314	3.012	5.042	12.368	3.207	2.325	3.958	9.490	25.65	22.80	21.49
S17	4.168	3.550	4.900	12.618	3.688	3.300	4.398	11.386	11.51	7.04	10.24
S18	4.241	2.958	5.056	12.255	2.650	2.572	3.560	8.782	37.51	13.03	29.59
S19	5.433	5.183	6.865	17.481	3.847	3.535	4.716	12.098	29.19	31.81	31.30
S20	5.719	6.245	7.352	19.316	4.805	5.039	5.728	15.572	15.97	19.32	22.08
平均值	4.300	4.306	5.432	14.037	3.295	3.460	4.118	10.872	23.29	19.06	23.92

### 3 讨论

#### 3.1 色谱条件筛选

在建立枇杷叶标准汤剂 HPLC 指纹图谱过程中,系统考察了不同流动相系统、柱温、体积流量等,结果表明,流动相为乙腈-0.4%磷酸水溶液梯度洗脱,体积流量为 1.0  $\text{mg/mL}$ ,柱温为 35  $^{\circ}\text{C}$ 时,蜜炙前后标准汤剂色谱峰数量最多,且 3 个绿原酸类成分分离度最佳;在检测波长选择方面,采用 DAD 从 190~400  $\text{nm}$  进行了全波段扫描,结果在 327  $\text{nm}$  处,新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸有最大吸收,故

选择该波长为含量测定波长;同时为了比较蜜炙前后指纹图谱差异,并兼顾色谱峰的数量,选择 300  $\text{nm}$  作为指纹图谱检测波长。

#### 3.2 含量测定成分选择

《中国药典》2015 年版枇杷叶质量控制指标为熊果酸和齐墩果酸,但由于该类三萜酸成分极性较小,难溶于水,在标准汤剂中总量仅在 0.002%~0.072%,且其 HPLC 检测波长为 210  $\text{nm}$ ,属于末端吸收,在含量极低情况下检测干扰较大,不适合作为标准汤剂的含量测定指标。故本研究前期采用

UPLC-Q-TOF-MS 对标准汤剂中化学成分进行了定性鉴别, 结果表明枇杷叶标准汤剂中主要含有新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸等 3 种绿原酸类成分; 虽然该类成分在金银花<sup>[9]</sup>、菊花<sup>[10]</sup>等药物中普遍存在, 但不同品种中绿原酸类成分的种类和含量差异较大<sup>[11-12]</sup>, 选择新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸 3 种成分并结合指纹图谱整体控制具有一定的辨识度, 且现代药理研究也表明新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸具有良好抗菌<sup>[13-14]</sup>、抗炎<sup>[15-16]</sup>等作用, 与枇杷叶止咳功效关联性较强, 因此, 选择 3 种绿原酸类成分作为枇杷叶和蜜枇杷叶标准汤剂的含量测定指标具有一定理论依据和现实意义。

### 3.3 枇杷叶及其炮制品质量评价

本研究建立的指纹图谱, 可在同一色谱条件下实现指纹图谱整体模式和多指标成分定量两个层面对枇杷叶蜜炙前后标准汤剂进行质量控制。实验结果表明, 枇杷叶蜜炙后标准汤剂中 3 种绿原酸类成分含量降低 19.06%~23.92%, 与枇杷叶蜜炙过程中添加 20% 辅料蜂蜜, 从而增加蜜炙后标准汤剂出膏率(蜜炙前后标准汤剂平均出膏率分别为 17.65% 和 28.53%), 使 3 种绿原酸类成分相对含量降低有关; 炮制过程中加热对枇杷叶绿原酸类成分含量是否有影响, 还有待后续进一步研究。蜜炙后指纹图谱新增 2 个色谱峰, 其中 1 个色谱峰为 5-羟甲基糠醛, 为辅料蜂蜜中单糖在炮制过程脱水产生的醛类化合物<sup>[17-18]</sup>, 可作为枇杷叶和蜜枇杷叶标准汤剂的鉴别点, 同时也为枇杷叶蜜炙前后的饮片及配方颗粒的质量控制提供参考。

#### 参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.  
 [2] 谭冰心, 黄仪有, 彭光天, 等. 不同产地枇杷叶粗提物抑制磷酸二酯酶 4 活性研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(6): 769-772.  
 [3] 胡昌江. 临床中药炮制学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.  
 [4] 蔡雪萍, 李振华, 华俊磊, 等. 一测多评法测定枇杷叶有效部位中 6 种三萜酸成分的量 [J]. 中草药, 2013, 44(21): 3057-3062.

[5] 孟文静, 苑青艳, 吴金梅, 等. HPLC 法测定枇杷叶中齐墩果酸和熊果酸含量 [J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(10): 36-39.  
 [6] 顾生玖, 李鹤, 周艳林, 等. 枇杷叶 HPLC 特征图谱研究及主要成分含量测定 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(11): 1519-1523.  
 [7] 戚雁飞, 李鲲. 不同采收期枇杷叶的质量评价及其药材稳定性研究 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1217-1220.  
 [8] 周玉波, 高晓忠, 吴毅斌. 枇杷叶及其炮制品中总黄酮和多糖的含量分析 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(9): 270-272.  
 [9] 段慧芳, 吴南, 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.  
 [10] 周衡朴, 任敏霞, 管家齐, 等. 菊花化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4785-4795.  
 [11] 宁二娟, 李自红, 陈玲, 等. 一测多评法同时测定金银花标准汤剂中 7 种成分的含量 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(17): 2154-2159.  
 [12] 刘慧妍, 沈国滨. 一测多评法同时测定野菊花中 7 种成分 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2012-2017.  
 [13] 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.  
 [14] 胡仲秋, 洪小迪, 岳田利. 光皮木瓜绿原酸的提取及抗菌活性测定 [J]. 食品科学, 2010, 31(24): 8-13.  
 [15] Shan J, Fu J, Zhao Z, et al. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF- $\kappa$ B and JNK/AP-1 activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(9): 1042-1048.  
 [16] Lee J H, Park J H, Kim Y S, et al. Chlorogenic acid, apolyphenolic compound, treats mice with septic arthritis caused by *Candida albicans* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(12): 1681-1685.  
 [17] 宋艺君, 郭涛, 周晓程. 不同产地黄精经不同方法炮制后多糖、5-羟甲基糠醛的含量变化 [J]. 中国药房, 2017, 28(16): 2556-2558.  
 [18] 黄洪新, 徐道华, 刘俊臣, 等. 地黄炮制前后 5-羟甲基糠醛含量的研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(4): 938-939.