

枳术丸与枳术颗粒多成分对比分析研究

马新玲¹, 宋志前¹, 王 淳¹, 刘元艳², 宁张弛¹, 甘嘉荷¹, 梁东蕊¹, 刘振丽^{1*}

1. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘要: 目的 建立液质分析方法, 对比收载于《中国药典》2015年版的同方不同剂型的枳术丸和枳术颗粒中20个活性成分的含量。方法 按《中国药典》2015年版制备工艺, 采用3批原料制备枳术丸和枳术颗粒。建立高效液相色谱-三重四级杆-质谱(HPLC-QqQ-MS)分析2种剂型中20个活性成分含量的方法。色谱条件为Poroshell 120 SB-C₁₈色谱柱(100 mm×4.6 mm, 2.7 μm); 流动相为0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B), 梯度洗脱条件: 0~7 min, 23% B; 7~17 min, 23%~80% B; 17~20 min, 80%~100% B, 20~30 min, 100% B; 体积流量0.5 mL/min; 柱温30 ℃。结果 3批原料制备的枳术丸和枳术颗粒成品, 20个活性成分的日服用量, 丸剂是颗粒剂的1.48~13.37倍, 总量相差493.01~615.07 mg。其中热不稳定性成分白术内酯I、白术内酯II和白术内酯III相差的倍数最大, 其次为水溶性较差的川陈皮素。结论 枳术丸和枳术颗粒成品中活性成分含量有明显差异, 尤其是处方中水溶性差、热不稳定的成分。

关键词: 枳术丸; 枳术颗粒; 剂型; 高效液相色谱-三重四级杆-质谱; 芦丁; 圣草次苷; 芸香柚皮苷; 野漆树苷; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; 柚皮素; 芹菜素; 香叶木素; 橙皮素; 甜橙黄酮; 川陈皮素; 白术内酯III; 橘皮素; 5-去甲川陈皮素; 白术内酯II; 白术内酯I; 橙皮油素; 佛手柑素

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)10-2394-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.022

Comparative analysis on Zhizhu Pills and Zhizhu Granules by multiple components

MA Xin-ling¹, SONG Zhi-qian¹, WANG Chun¹, LIU Yuan-yan², NING Zhang-chi¹, GAN Jia-he¹, LIANG Dong-rui¹, LIU Zhen-li¹

1. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: Objective To comparative analyze the contents of 20 active ingredients in two dosage forms of Zhizhu Pills (ZP) and Zhizhu Granules (ZG). **Methods** Three batches of raw materials were used for the preparation of ZP and ZG according to the preparation process of China Pharmacopoeia (2015 Edition). Twenty active ingredients in the two dosage forms were detected simultaneously using high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (HPLC-QqQ-MS). The separation was performed on a Poroshell 120 SB-C₁₈ (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm) column with a flow rate of 0.5 mL/min. Mobile phase consisted of 0.1% formic acid in water (A)-0.1% formic acid in acetonitrile (B). The column temperature was set at 30 ℃. The gradient elution conditions: 0—7 min, 23% B; 7—17 min, 23%—80% B; 17—20 min, 80%—100% B, 20—30 min, 100% B; flow rate was 0.5 mL/min. **Results** The contents of 20 active ingredients in the pills were 1.48—13.37 times that of the granules, the total difference of them perday were 493.02—615.08 mg. **Conclusion** There were significant differences in the content of active components in the two dosage forms of ZP and ZG, especially those components with poor solubility in water and thermal instability.

Key words: Zhizhu Pills; Zhizhu Granules; dosage form; HPLC-QqQ-MS; rutin; eriocitrin; narirutin; rhoifolin; naringin; hesperidin; neohesperidin; naringenin; apigenin; diosmetin; hesperetin; sinensetin; nobiletin; atractylenolide III; tangeretin; 5-demethylnobiletin; atractylenolide II; atractylenolide I; auraptene; bergamottin

收稿日期: 2017-12-20

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(YZ-1655)

作者简介: 马新玲(1993—), 女, 硕士研究生, 中药化学专业。Tel: (010)64089020 E-mail: 397559423@qq.com

*通信作者 刘振丽 Tel: (010)64089020 E-mail: zhenli_liu@sina.com

中药复方存在很多同方不同剂型的情况, 它们的功能主治描述一致。同系列品种质量控制指标、限度的相对一致性, 是《中国药典》2020 年版关注的重点内容之一。相关对比研究已经引起重视, 包括成品活性成分、体内吸收成分、药效作用以及临床疗效等, 已有一些报道^[1-4]。枳术丸由枳实和白术组成, 是治疗脾胃内伤的经典的基础方, 基于李杲的《内外伤辨惑论·辨内伤饮食用药所宜所禁》, 由张仲景《金匱要略》的枳术汤演化而来。《中国药典》2015 年版中收录了枳术丸和枳术颗粒。二者同方不同剂型, 均具有健脾消食、行气化湿之功; 用于治疗脾胃虚弱、食少不化、脘腹痞满^[5]。丸剂是中药的传统剂型, 早在《黄帝内经》中就有记载^[6]。颗粒剂则属于中药新剂型, 在《中国药典》1977 年版中被首次收录, 因其具有服用携带方便、剂量准确、清洁卫生等优点, 现已成为中成药的常用剂型之一^[7]。枳术丸与枳术颗粒制备工艺不同^[8], 两者活性成分含量的一致性如何, 是否存在差异, 哪些成分差异显著, 还未见研究报道。

本实验选取枳实中 17 个含量较高且具有活性的黄酮和香豆素成分(圣草次苷、芦丁、芸香柚皮苷、野漆树苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、芹菜素、香叶木素、橙皮素、甜橙黄酮、川陈皮素、橘皮素、5-去甲川陈皮素、橙皮油素、佛手柑素)及白术中具有特征性和活性的白术内酯类成分(白术内酯 I、II、III)作为检测指标^[9], 借助质谱检测器优势, 建立了多成分同时测定的液质检测方法, 对 3 批次原料制备的枳术丸和枳术颗粒成品中的活性成分进行对比分析, 以期为其质量评价提供科学依据。

1 仪器与材料

TCQ-250 型超声波清洗器, 北京医疗设备二厂; 6410AQqQ 质谱仪, 美国 Agilent 公司; Sartorius CP225D 型电子天平, 德国赛多利斯公司; Agilent 1260 系列高效液相色谱仪, 包括 G1322A 脱气机、G1311A 四元泵、G1313A 自动进样器、G1316A 恒温箱、HP 化学工作站, 美国 Agilent 公司; DZ-B 实验室自动水蜜丸机, 吉首市中诚制药机械厂; DK-98-1 型电热恒温水浴锅, 天津泰斯特仪器有限公司。

对照品圣草次苷(批号 MUST-13022313, 质量分数 $\geq 98\%$)、芸香柚皮苷(批号 MUST-13041206, 质量分数 $\geq 98\%$)、芹菜素(批号 MUST-16061301,

质量分数 98.03%)购自成都曼斯特生物科技有限公司; 对照品芦丁(批号 100080-201409, 质量分数 $\geq 98\%$)购自天津马克生物技术有限公司; 对照品柚皮苷(批号 K21M4C1, 质量分数 $\geq 98\%$)、橙皮苷(批号 K02M3C1, 质量分数 $\geq 98\%$)、甜橙黄酮(批号 P22D3R1, 质量分数 $\geq 98\%$)均购自上海源叶生物科技有限公司; 对照品新橙皮苷(批号 111857-201102, 质量分数 99.2%)、野漆树苷(批号 111919-201102, 质量分数 92.3%)、香叶木素(批号 111788-200801, 质量分数 95.7%)均购自中国食品药品检定研究院; 对照品橙皮素(批号 DST161223-054, 质量分数 $\geq 98\%$)、柚皮素(批号 DST160928-100, 质量分数 $\geq 98\%$)均购自成都德思特生物科技有限公司; 对照品橘皮素(批号 071126, 质量分数 $\geq 98\%$)购自上海融禾医药科技有限公司; 对照品川陈皮素(批号 JZ14102611, 质量分数 $\geq 98\%$)、5-去甲川陈皮素(批号 JZ15041102, 质量分数 $\geq 98\%$)、橙皮油素(批号 JZ15041110, 质量分数 $\geq 98\%$)、佛手柑素(批号 JZ14112901, 质量分数 $\geq 98\%$)均购自南京景竹生物科技有限公司; 对照品白术内酯 I(批号 130215, 质量分数 $> 98\%$)、白术内酯 II(批号 130216, 质量分数 $> 98\%$)、白术内酯 III(批号 130216, 质量分数 $> 98\%$)均购自上海田源生物技术公司; 所有对照品质量分数符合含量测定要求。

白术药材购自浙江磐安, 枳实药材购自江西省新干县, 实验室按《中国药典》2015 年版方法炮制得到麸炒白术-1 和枳实(炒)-1。麸炒白术-2、麸炒白术-3、枳实(炒)-2、枳实(炒)-3 和荷叶饮片分别购自北京同仁堂药店和中国中医科学院中医门诊部。本实验中白术指麸炒白术; 枳实指枳实(炒)。原料均经北京中医药大学刘春生教授鉴定, 白术为菊科苍术属植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎, 枳实为芸香科柑橘属植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥幼果, 荷叶为睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥叶。乙腈为美国 Fisher 色谱纯, 水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 枳术丸和枳术颗粒的制备

为保证 2 种剂型中成分含量的可比性, 依据《中国药典》2015 年版一部中记载的枳术丸和枳术颗粒处方及制法^[5], 采用 3 批原料自制 2 种剂型。

2.1.1 枳术丸制备 按处方比例, 分别取枳实 500 g、白术 1 000 g, 粉碎成细粉, 过筛, 混匀。另取荷叶 150 g, 加水 12 倍量煎煮, 滤过得煎液。取上述粉末, 用煎液泛丸, 干燥, 分别得到成品 1 486.3、1 469.6、1 471.8 g。

2.1.2 枳术颗粒制备 按处方比例, 分别取 500 g、白术 1 000 g 和荷叶 150 g, 加水煎煮 2 次, 每次 2 h, 滤过, 合并滤液, 浓缩至相对密度为 1.20 (60 °C) 的清膏, 加乙醇使含醇量达 70%, 静置 6 h, 滤过, 滤液浓缩至相对密度为 1.32 (60 °C) 的稠膏, 加糊精及糖粉适量, 混匀, 制粒, 干燥, 3 批次分别得到成品 1 488.5、1 463.2、1 476.1 g。

2.2 20 种活性成分的测定

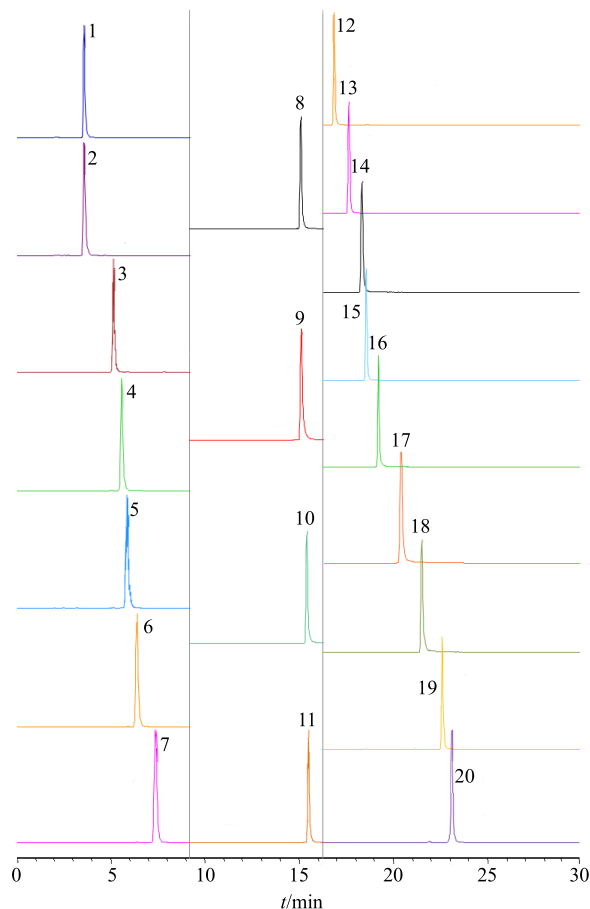
2.2.1 色谱条件 Poroshell 120 SB-C₁₈ 色谱柱 (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm); 以 0.1% 甲酸水为流动相 A, 0.1% 甲酸乙腈为流动相 B, 梯度洗脱: 0~7 min, 23% B; 7~17 min, 23%~80% B; 17~20 min, 80%~100% B; 20~30 min, 100% B; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 30 °C。

2.2.2 质谱条件 采用电喷雾电离源 (ESI), 正离子检测模式, 扫描方式为多反应离子监测模式 (MRM)。干燥气体积流量 11 L/min, 干燥气温度 300 °C, 雾化气压力 310.275 kPa (45 psi), 毛细管电压 4 000 V。液质谱图见图 1。各化合物的检测信息见表 1。

2.2.3 对照品储备液的制备 分别取各种对照品适量, 精密称定, 加甲醇分别制成含芦丁 4.060 μg/mL, 圣草次苷 17.700 μg/mL, 野漆树苷 4.050 μg/mL, 芸香柚皮苷 216.000 μg/mL, 柚皮苷 1 255.000 μg/mL, 橙皮苷 228.000 μg/mL, 新橙皮苷 563.000 μg/mL, 柚皮素 40.800 μg/mL, 芹菜素 4.600 μg/mL, 香叶木素 2.608 μg/mL, 橙皮素 63.200 μg/mL, 甜橙黄酮 2.420 μg/mL, 川陈皮素 6.160 μg/mL, 白术内酯 III 11.600 μg/mL, 橘皮素 3.880 μg/mL, 5-去甲川陈皮素 6.000 μg/mL, 白术内酯 I 3.080 μg/mL, 白术内酯 II 4.000 μg/mL, 橙皮油素 14.800 μg/mL, 佛手柑素 1.080 μg/mL 的各对照品储备液, 密闭避光保存。

2.2.4 供试品溶液制备 分别取枳术丸和枳术颗粒适量, 研细, 取约 0.2 g, 精密称定, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 经 0.2 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.5 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.3”项下



1-芦丁 2-圣草次苷 3-芸香柚皮苷 4-野漆树苷 5-柚皮苷 6-橙皮苷 7-新橙皮苷 8-柚皮素 9-芹菜素 10-香叶木素 11-橙皮素 12-甜橙黄酮 13-川陈皮素 14-白术内酯 III 15-橘皮素 16-5-去甲川陈皮素 17-白术内酯 II 18-白术内酯 I 19-橙皮油素 20-佛手柑素
1-rutin 2-eriocitrin 3-narirutin 4-rhoifolin 5-naringin 6-hesperidin 7-neohesperidin 8-naringenin 9-apigenin 10-diosmetin 11-hesperetin 12-sinensetin 13-nobiletin 14-atractylenolide III 15-tangeretin 16-5-demethylnobiletin 17-atractylenolide II 18-atractylenolide I 19-auraptene 20-bergamottin

图 1 20 种待测成分 HPLC-QqQ-MS 图谱

Fig. 1 Representative HPLC-QqQ-MS chromatograms of 20 analytes

各个对照品储备液, 分别用色谱甲醇稀释成 6 个不同质量浓度梯度的对照品溶液, 分别进样测定。以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得各成分的回归方程、线性范围、定量限 (LOQ) 和检测限 (LOD)。结果见表 2。

2.2.6 精密度试验 精密吸取枳术丸-1 制备的供试品溶液, 连续进样 6 次, 按保留时间由小到大, 待测定的 20 个成分峰面积积分值的 RSD 分别为 2.73%、1.36%、1.04%、3.59%、2.49%、1.59%、2.56%、2.89%、4.07%、3.95%、1.19%、3.56%、2.96%、4.28%、

表 1 20 种活性成分的多反应监测 (MRM) 模式信息

Table 1 MRM information of 20 active components

编号	化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	碎裂电 压/V	碰撞能 量/eV	<i>t_R</i> /min	编号	化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	碎裂电 压/V	碰撞能 量/eV	<i>t_R</i> /min
时间段: 0~9.2 min							11	橙皮素	303.1	153.1 ^a	95	30	15.774
1	圣草次苷	597.2	289.0 ^a	65	15	3.977				176.9	95	10	
			435.0	65	7		时间段: 16.3~30 min						
2	芦丁	611.2	303.1 ^a	100	20	3.995	12	甜橙黄酮	373.2	343.1 ^a	90	25	17.204
			465.0	100	5					312.1	90	25	
3	芸香柚皮苷	581.2	273.1 ^a	95	20	5.871	13	川陈皮素	403.2	327.1	155	35	17.955
			419.2	95	2					373.2 ^a	155	25	
4	野漆树苷	579.2	153.1	140	75	6.490	14	白术内酯 III	249.2	231.1 ^a	55	12	18.612
			271.1 ^a	140	20					163.2	55	12	
5	柚皮苷	581.2	272.9 ^a	65	15	6.775	15	橘皮素	373.2	297.1	110	30	18.899
			273.1	65	15					343.1 ^a	110	25	
6	橙皮苷	611.2	303.1 ^a	90	15	7.450	16	5-去甲川陈皮素	389.2	359.1 ^a	110	30	19.468
			449.2	90	5					341.1	110	30	
7	新橙皮苷	611.2	302.2	90	15	8.690	17	白术内酯 II	233.2	151.1 ^a	95	10	20.220
			449.1 ^a	90	3					215.3	95	10	
时间段: 9.2~16.3 min							18	白术内酯 I	231.1	185.0 ^a	85	16	21.697
8	柚皮素	273.1	153.2 ^a	100	20	15.405				157.1	85	16	
			147.1	100	20		19	橙皮油素	299.2	163.0 ^a	80	10	22.733
9	芹菜素	271.1	119.1	130	30	15.426				137.0	80		
			153.0 ^a	130	30		20	佛手柑素	339.2	147.1 ^a	50	40	23.281
10	香叶木素	301.1	258.6	140	30	15.712				203.0	50	2	
			286.1 ^a	140	30								

子离子中带“a”的为定量离子

Which product ion with “a” is quantitative ion

表 2 线性方程、LOD 和 LOQ 结果

Table 2 Results of linear equations, LODs, and LOQs

序号	成分	标准曲线	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	圣草次苷	$Y=2\ 723.5\ X+383.29$	0.999 5	0.354~17.700	0.26	0.83
2	芦丁	$Y=7\ 928.6\ X-19.425$	0.999 6	0.081~1.624	0.11	0.37
3	芸香柚皮苷	$Y=2\ 158.7\ X+628.94$	0.999 5	4.320~216.000	0.15	0.51
4	野漆树苷	$Y=17\ 353\ X+669.91$	0.999 4	0.081~4.050	0.05	0.17
5	柚皮苷	$Y=599.52\ X-156.9$	0.999 8	25.100~502.000	1.63	5.39
6	橙皮苷	$Y=4\ 883.7\ X-212.96$	0.999 4	4.560~228.000	0.21	0.68
7	新橙皮苷	$Y=1\ 545.8\ X+391.81$	0.999 8	11.260~225.200	0.63	2.24
8	柚皮素	$Y=2\ 843.5\ X+918.6$	0.999 6	0.816~40.800	0.25	0.82
9	芹菜素	$Y=2\ 101\ X+21.074$	0.999 3	0.037~2.300	0.08	0.26
10	香叶木素	$Y=7\ 614.5\ X+29.908$	0.999 2	0.005~0.261	0.08	0.26
11	橙皮素	$Y=2\ 615.4\ X+721.8$	0.999 4	1.264~25.280	0.33	1.02
12	甜橙黄酮	$Y=8\ 229.6\ X+25.624$	0.999 4	0.097~2.420	0.12	0.39
13	川陈皮素	$Y=143\ 254\ X-5\ 951.1$	0.999 7	0.123~6.160	0.06	0.19
14	白术内酯 III	$Y=2\ 585.6\ X-36.904$	0.999 1	0.037~2.320	0.62	2.01
15	橘皮素	$Y=468\ 011\ X+9\ 463.5$	0.999 3	0.194~3.880	0.01	0.04
16	5-去甲川陈皮素	$Y=57\ 543\ X+260.4$	0.999 2	0.012~0.600	0.02	0.07
17	白术内酯 II	$Y=880.33\ X+15.267$	0.999 3	0.032~4.000	1.91	6.35
18	白术内酯 I	$Y=427.32\ X+4.495\ 7$	0.999 1	0.062~3.080	1.03	3.45
19	橙皮油素	$Y=48\ 556\ X-2\ 254.9$	0.999 3	0.296~14.800	0.02	0.08
20	佛手柑素	$Y=14\ 527\ X+15$	0.999 4	0.004~0.540	0.06	0.19

3.33%、4.89%、4.13%、2.75%、3.50%、2.92%，表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 按“2.2.4”项下方法制备枳术丸-1 供试品溶液 6 份，分别进行测定，计算各成分质量分数。按保留时间由小到大，待测定的 20 个成分质量分数的 RSD 分别为 3.62%、3.69%、2.86%、1.69%、2.29%、2.51%、1.18%、2.22%、3.87%、4.39%、0.64%、3.97%、4.40%、2.80%、3.07%、6.27%、6.14%、3.52%、3.36%、3.43%，表明实验重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 按“2.2.4”项下方法制备枳术丸-1 供试品溶液，分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样，按保留时间由小到大，待测定的 20 个成分色谱峰峰面积积分值的 RSD 分别为 3.38%、2.86%、2.02%、2.36%、2.84%、3.70%、3.87%、2.56%、4.12%、4.08%、2.34%、4.70%、4.08%、3.12%、2.73%、4.55%、5.30%、3.32%、3.75%、4.34%，表明供试品溶液在 24 h 内有较好的稳定性。

2.2.9 回收率试验 取枳术丸-1 粉末约 0.1 g，9 份，分为 3 组，精密称定，置具塞锥形瓶中，分别精密加入低、中、高 3 个质量浓度的 20 种对照品（对照品加入量与样品中待测定成分量之比分别为 0.5 : 1、

1 : 1、1.5 : 1），按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液，在上述色谱及质谱条件下进行测定，计算回收率，结果 20 种成分的平均加样回收率和 RSD 分别为圣草次苷 98.68%、4.66%，芦丁 102.87%、6.70%，芸香柚皮苷 97.27%、5.81%，野漆树苷 100.06%、5.06%，柚皮苷 100.16%、4.08%，橙皮苷 99.48%、2.41%，新橙皮苷 103.97%、2.72%，柚皮素 99.94%、3.14%，芹菜素 100.10%、5.26%，香叶木素 103.83%、4.60%，橙皮素 102.98%、3.12%，甜橙黄酮 98.50%、3.47%，川陈皮素 102.82%、2.68%，白术内酯 III 101.33%、2.85%，5-去甲川陈皮素 98.86%、6.85%，橘皮素 101.05%、5.62%，白术内酯 II 102.83%、4.67%，白术内酯 I 103.62%、3.48%，橙皮油素 98.35%、3.42%，佛手柑素 98.39%、5.54%。

2.2.10 样品测定 分别称取 3 批次的枳术丸和枳术颗粒各 0.2 g，按“2.2.4”项下方法制备，取各供试品溶液和对照品溶液 1~10 μL ，注入液相色谱仪，测定峰面积，计算各成分含量。为更好地比较 2 种剂型，采用每日服用成品中各成分的量作为评价指标。结果见表 3。2 种剂型进行对比，丸剂中 20 个活性成分的量都显著高于颗粒剂。由于原料差

表 3 每日服用枳术丸和枳术颗粒中 20 种活性成分量及对比结果

Table 3 Comparative analysis on daily intake of 20 active components in Zhizhu Pills and Zhizhu Granules

成分	日服用量/(mg·d ⁻¹)						日服用量比值 (倍数)			日服用量差值/(mg·d ⁻¹)		
	丸 1	丸 2	丸 3	颗粒 1	颗粒 2	颗粒 3	丸 1/颗粒 1	丸 2/颗粒 2	丸 3/颗粒 3	丸 1—颗粒 1	丸 1—颗粒 1	丸 1—颗粒 1
圣草次苷	26.35	18.65	16.02	11.38	8.60	6.82	2.32	2.17	2.35	14.97	10.05	9.21
芦丁	1.39	1.27	0.90	0.79	0.79	0.53	1.75	1.61	1.69	0.60	0.48	0.37
芸香柚皮苷	80.18	62.04	43.29	38.88	29.58	21.26	2.06	2.10	2.04	41.30	32.45	22.03
野漆树苷	5.77	5.00	3.87	2.10	1.89	1.44	2.74	2.64	2.68	3.66	3.11	2.43
柚皮苷	640.79	430.22	555.58	282.46	194.40	259.18	2.27	2.21	2.14	358.33	235.82	296.40
橙皮苷	83.32	97.28	84.50	24.79	28.59	26.21	3.36	3.40	3.22	58.53	68.69	58.29
新橙皮苷	190.48	216.92	204.58	98.84	113.80	109.27	1.93	1.91	1.87	91.64	103.11	95.31
柚皮素	19.56	18.04	7.56	9.80	9.32	3.72	2.00	1.94	2.03	9.77	8.72	3.84
芹菜素	0.29	0.57	0.14	0.13	0.26	0.07	2.13	2.16	1.97	0.15	0.30	0.07
香叶木素	0.27	0.15	0.13	0.16	0.09	0.08	1.72	1.63	1.68	0.11	0.06	0.05
橙皮素	18.83	17.06	12.27	11.01	9.70	7.18	1.71	1.76	1.71	7.82	7.35	5.09
甜橙黄酮	4.12	3.61	4.31	1.23	1.12	1.32	3.36	3.21	3.26	2.89	2.49	2.99
川陈皮素	6.22	3.06	2.73	0.97	0.50	0.44	6.41	6.17	6.14	5.25	2.57	2.29
橘皮素	4.42	4.24	1.95	2.26	2.14	0.95	1.96	1.98	2.05	2.16	2.10	1.00
5-去甲川陈皮素	1.05	0.85	0.50	0.33	0.28	0.16	3.22	2.99	3.14	0.73	0.56	0.34
橙皮油素	3.14	1.20	0.72	2.04	0.77	0.49	1.54	1.55	1.48	1.10	0.43	0.23
佛手柑素	0.19	0.15	0.08	0.08	0.06	0.04	2.35	2.53	2.30	0.11	0.09	0.05
白术内酯 I	6.27	5.59	5.91	1.05	0.95	0.90	6.00	5.87	6.57	5.23	4.64	5.01
白术内酯 II	8.87	8.52	7.93	2.20	2.33	2.03	4.03	3.65	3.91	6.67	6.19	5.90
白术内酯 III	4.39	4.12	3.99	0.34	0.32	0.30	13.04	12.87	13.37	4.05	3.80	3.69
总和	1 105.90	898.54	956.96	490.84	405.49	442.39				615.07	493.01	514.59

异,同一剂型的 3 批次成品所测定的成分也存在一定差异,丸剂日服用成品 20 个成分的总量是 898.54~1 105.90 mg,颗粒剂为 405.49~490.84 mg。3 批次丸剂和颗粒剂中含量最高的成分都是枳实中的黄酮苷类成分,主要包括柚皮苷、新橙皮苷、橙皮苷和芸香柚皮苷,每日服用成药中的量都在 20 mg 以上。其中柚皮苷最高,丸剂每日 430 mg 以上,颗粒剂 194 mg 以上,几乎占测定的 20 个成分的总量一半;黄酮苷元橙皮素和柚皮素也明显高于其他同类成分如芹菜素、川陈皮素。2 种香豆素类成分橙皮油素和佛手柑素含量较低。

日服用量比值(倍数)=丸剂日服用量中单体成分量/颗粒剂日服用量中相应单体成分量

日服用量差值=丸剂日服用量中单体成分量-颗粒剂日服用量中相应单体成分

3 讨论

3.1 待测成分的选择

随着基础研究的深入和检测技术水平的提高,各版药典收载中药材、成方制剂等含量测定项下的检测成分,从无到有,从检测一个成分到检测几个成分。究竟哪些成分是影响质量的关键成分,应在“深入研究”的基础上,“浅出标准”^[10]。通过体内吸收成分、药效学、网络药理学等深入系统的研究,发现质量控制的质量标志物(Q-marker)^[11-13]。在基础研究中,应通过多成分的深入对比分析,发现共性和差异性的成分,为建立完善的质量评价指标和标准提供科学依据。

枳实中含有多种黄酮类成分和香豆素类成分,能够调节不同模型动物胃肠运动、胃肠激素分泌水平,具有抗氧化、抗胃溃疡等多方面调节胃肠功能的作用^[14-17]。白术中的内酯类成分如白术内酯 I、II、III,具有显著药理活性,是白术调节、保护胃肠道系统的主要有效成分^[18-22]。由于中药复方为多成分整体作用,课题组前期曾采用 HPLC 双波长法建立了同时测定枳术丸中 8 种有效成分芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、白术内酯 I、II、III 和苍术酮含量的方法,对比了酸橙枳实和甜橙枳实制备的两种枳术丸成分差异^[23]。本实验在此基础上,进一步借鉴质谱检测器分析优势,以枳术丸和枳术颗粒中黄酮、香豆素和内酯类成分为指标,建立了 20 个活性成分的液相色谱-质谱联用含量测定方法,为更全面地对比和分析枳术丸和枳术颗粒质量提供了有效途径。

3.2 HPLC-QqQ-MS 条件的优化

研究比较了甲醇-水、乙腈-水和 0.1%甲酸乙腈-0.1%甲酸水溶液的流动相体系;乙腈流动相系统分离效率优于甲醇系统,且由于黄酮类成分具有弱酸性,加入 0.1%甲酸后有效改善了色谱峰的拖尾现象,提高了分离度,因此选择 0.1%甲酸乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相。在质谱条件优化中,发现待测成分在正离子模式下响应值较高,故选用正离子模式;在 MRM 下对所有待测成分进行参数优化,选出合适的定量离子和定性离子。由于同时测定的成分较多,成分含量差异较大,其中几个含量较低且离子化程度不强的成分,如芹菜素、香叶木素、5-去甲川陈皮素、橙皮油素、佛手柑素在方法学实验中出现 RSD 大于 3% 的现象。预试验中对供试品溶液的制备方法进行了考察,包括提取溶剂(甲醇、50%甲醇、甲醇-氯仿)、溶剂倍量(125、250、500 倍)、提取方式(回流和超声)、提取时间(10、30、50 min)进行了优选,最终确定了 250 倍甲醇、超声提取 30 min 的最佳方法。

3.3 枳术丸与枳术颗粒多成分含量对比

《中国药典》2015 年版枳术丸项下无含量测定方法,枳术颗粒项下建立了柚皮苷和新橙皮苷的含量测定方法,并规定了最低限量标准。本实验依据建立的方法,测定了 3 批次原料制备的丸剂和颗粒剂中成分的含量。结果显示(表 3),颗粒剂中柚皮苷和新橙皮苷的含量符合《中国药典》2015 年版规定。如以成人每日服用成品中各成分量为指标,将 2 种剂型进行对比,丸剂中 20 个活性成分的量都显著高于颗粒剂,3 批次丸剂是颗粒剂的 1.48~13.37 倍,其中枳实中苷类成分量的倍数范围为 1.61~3.40 倍,枳实中苷元类成分为 1.48~6.41 倍,白术中白术内酯类成分为 3.64~13.37 倍。显示热不稳定性成分白术内酯 I、II、III 相差的倍数最大,其次为水溶性较差的川陈皮素。3 批次丸剂和颗粒剂日服用量 20 个成分总量相差 493.01、514.59、615.07 mg。由于枳实中黄酮苷类成分柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷含量较高,因此这 3 种成分的日服用量差值较大。结果表明,丸剂活性成分含量方面呈现明显优势。

2 种剂型中成分差异与制备工艺、各活性成分的溶解性和热稳定性等密切相关。枳术丸的制备工艺为饮片粉碎后直接采用荷叶水泛丸,步骤简单,所以其中成分的损失较小。而枳术颗粒的制备工艺为水煎煮,浓缩,乙醇沉淀,回收溶剂,加辅料成

型制粒干燥。其工艺较枳术丸复杂。所测的 20 种有效成分有的脂溶性较强,如橘皮素、3 个白术内酯等,它们在水中溶解度较小,制备过程中采用水提取难以提取完全。而含量较高的柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷采用水提取的提取率也很低^[24-25]。工艺中乙醇沉淀步骤,也会造成成分损失。并且在整个工艺过程中,煎煮、浓缩、干燥等热处理过程,都会造成热不稳定的成分如白术内酯类的含量降低^[26]。因此,处方中水溶性差、热不稳定的成分是 2 种剂型成品中差异最显著的成分。

吸收进入体内的成分才是发挥作用的成分,复方体外成分含量差异并不能说明体内吸收情况。因此,尽管本实验结果显示丸剂中活性成分含量高于颗粒剂,今后应在本研究基础上,进一步开展 2 种剂型体内吸收等方面的深入研究,以确定 2 种剂型的作用特点。

参考文献

- [1] Zhou W, Song J, Fu W, *et al.* Chemical comparison of two dosage forms of Hemp Seed Pills by UHPLC-Q-ToF-MS/MS and multivariate statistical techniques [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 84(10): 59-68.
- [2] 李雪梅,周建平,胡宇驰. 清音丸改剂型前后对免疫低下模型小鼠作用的比较研究 [J]. 首都医药, 2013, 20(6): 61-63.
- [3] 李永祝,唐伟其. 灵视乐 3 种剂型的临床疗效比较 [J]. 湖南中医药导报, 2003, 10(5): 56-69.
- [4] Wang Y, Li G, Zhou Y, *et al.* The difference between blood-associated and water-associated herbs of Danggui-Shaoyao San in theory of TCM, based on serum pharmacochimistry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(4): 579-587.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [6] 林燕. 从历年《中华人民共和国药典》看中药剂型发展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(7): 6-7.
- [7] 徐青青. 中药颗粒剂优点与不足 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(22): 141-142.
- [8] 李杲. 内外伤辨惑论 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2005.
- [9] 杨娥,钟艳梅,冯毅凡. 白术化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 广东药学院学报, 2012, 28(2): 218-221.
- [10] 吴婉莹,果德安. 中药整体质量控制标准体系构建的思路与方法 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(3): 351-356.
- [11] 张铁军,许浚,韩彦琪,等. 中药质量标志物 (Q-marker) 研究: 延胡索质量评价及质量标准研究 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1458-1467.
- [12] 张铁军,白钢,陈常青,等. 基于“五原则”的复方中药质量标志物 (Q-marker) 研究路径 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 1-13.
- [13] 侯小涛,郝二伟,秦健峰,等. 肉桂的化学成分、药理作用及质量标志物 (Q-marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 20-34.
- [14] 黄爱华,迟玉广,曾元儿,等. 枳实黄酮对功能性消化不良大鼠胃肠动力的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(6): 612-615.
- [15] Lee J H, Lee S H, Kim Y S, *et al.* Protective effects of neohesperidin and poncirin isolated from the fruits of *Poncirus trifoliata* on potential gastric disease [J]. *Phytother Res*, 2009, 23(12): 1748-1753.
- [16] Takase H, Yamamoto K, Hirano H, *et al.* Pharmacological profile of gastric mucosal protection by marmin and nobiletin from a traditional herbal medicine, *Aurantii Fructus Immaturus* [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1994, 66(1): 139-147.
- [17] 陈彦,王晋艳,贾晓斌,等. 枳实中主要二氢黄酮类成分肠道吸收代谢及与药物相互作用的研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1564-1566.
- [18] 李滢,陶海燕,杨秀伟. 生白术和炒白术挥发油成分的 GC-MS 分析 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(7): 1210-1217.
- [19] 张奕强,许实波,林永成. 白术内酯系列物的胃肠抑制作用 [J]. 中药材, 1999, 22(12): 636-640.
- [20] Wang K T, Chen L G, Wu C H, *et al.* Gastroprotective activity of atractylenolide III from *Atractylodes ovata* on ethanol-induced gastric ulcer *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 62(3): 381-388.
- [21] Song H, Li R, Chen X, *et al.* *Atractylodes macrocephala* Koidz promotes intestinal epithelial restitution via the polyamine-voltage-gated K^+ channel pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 152(1): 163-172.
- [22] 田子钰,刘素香,陈常青. 中药治疗小儿功能性消化不良的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 803-807.
- [23] 宋志前,董运茁,张婷. HPLC 双波长法同时测定 2 种枳术丸中 8 种有效成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(10): 1715-1721.
- [24] 刘学仁. 柚皮苷、橙皮苷与新橙皮苷的提取与分析研究 [D]. 黄石: 湖北师范学院, 2011.
- [25] 李玉山. 橙皮苷研究新进展 [J]. 科技导报, 2009, 22(27): 108-115.
- [26] 李伟,文红梅,崔小兵,等. 白术的炮制机理及其倍半萜成分转化的研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(19): 1600-1603.