

蛇床子配方颗粒 HPLC 指纹图谱研究及 6 种香豆素类成分含量测定

张 闯^{1,2,3}, 陈世雨^{1#}, 李葆林^{1,2,3}, 王 相^{1,2,3}, 田 伟^{1,2,3}, 牛丽颖^{1,2,3*}

1. 河北中医学院, 河北 石家庄 050091

2. 河北省中药配方颗粒技术创新中心, 河北 石家庄 050091

3. 河北省高校中药配方颗粒应用技术研发中心, 河北 石家庄 050091

摘要: **目的** 建立蛇床子配方颗粒 HPLC 指纹图谱及花椒毒酚、花椒毒素、异茴芹素、佛手柑内酯、欧前胡素和蛇床子素 6 种香豆素类成分含量测定方法, 为蛇床子配方颗粒物质基准的研究提供参考。**方法** 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Waters XBridge C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 甲醇-0.1%醋酸水溶液为流动相, 梯度洗脱; 体积流量为 0.5 mL/min, 进样量为 10 μL, 柱温 40 °C。蛇床子配方颗粒 HPLC 指纹图谱及花椒毒酚、花椒毒素、异茴芹素、佛手柑内酯、欧前胡素、蛇床子素含量测定的检测波长为 320 nm。采用国家药典委员会出版的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版), 建立蛇床子配方颗粒指纹图谱, 并使用 HPLC 法同时测定 6 种香豆素成分含量。**结果** 对 18 批蛇床子配方颗粒进行了研究, 其指纹图谱相似度均≥0.992, 标定了 19 个共有峰, 各峰分离度较好。含量测定结果表明花椒毒素与蛇床子素为蛇床子配方颗粒中含量较高的香豆素类成分。经方法学考察, 方法精密度 RSD 值均小于 1.6%, 方法的重复性良好, 样品在 48 h 内稳定; 花椒毒酚、花椒毒素、欧前胡素、异茴芹素、佛手柑内酯和蛇床子素的加样回收率分别为 100.69%、101.03%、99.48%、100.88%、101.27%、100.35%, RSD 均小于 2.5%; 6 种成分在一定质量浓度内线性关系良好; 18 批蛇床子配方颗粒中花椒毒酚、花椒毒素、异茴芹素、佛手柑内酯、欧前胡素、蛇床子素的质量分数依次为 8.01~8.29、2.37~2.63、4.30~4.61、4.04~4.40、3.45~3.90、6.02~6.80 mg/g。**结论** 建立了蛇床子配方颗粒的指纹图谱及同时测定其 6 种主要香豆素类成分含量的方法, 操作简便, 结果稳定、准确, 对建立蛇床子配方颗粒的质量控制标准提供了依据, 具有重要的应用价值。

关键词: 蛇床子; 配方颗粒; HPLC; 香豆素; 蛇床子素; 花椒毒素; 花椒毒酚; 佛手柑内酯; 欧前胡素; 异茴芹素

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)06-1530-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.06.020

HPLC fingerprint of *Cnidii Fructus* formula granule and determination of six main coumarin components

ZHANG Chuang^{1,2,3}, CHEN Shi-yu¹, LI Bao-lin^{1,2,3}, WANG Xiang^{1,2,3}, TIAN Wei^{1,2,3}, NIU Li-ying^{1,2,3}

1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China

2. Hebei TCM Formula Granule Engineering & Technology Research Center, Shijiazhuang 050091, China

3. TCM Formula Granule Research Center of Hebei Province University, Shijiazhuang 050091, China

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint of *Cnidii Fructus* formula granule analysis method for simultaneous determination of six main coumarin components, including osthol, xanthotoxin, xanthotol, bergapten, imperatorin and isopimpinellin, in order to provide reference for the study of the material basis of *Cnidii Fructus* formula granule. **Methods** The method was performed by high performance liquid chromatography with a Waters XBridge C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column and methanol (A)-0.1% acetic acid (B) as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 0.5 mL/min, the injection volume was 10 μL and the column temperature was 40 °C. The detection wavelength was set at 320 nm. The chromatographic fingerprint evaluation system

收稿日期: 2019-10-10

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(H2019423050); 河北省中医药管理局资助项目(2017017); 河北省中医药管理局资助项目(2020139); 河北中医学院青年基金项目(700201601201420)

作者简介: 张 闯(1989—), 男, 实验师, 博士在读, 研究方向为中药分析及药效物质基础研究。

Tel: (0311)89926533 E-mail: zhangchuang0707@sina.com

*通信作者 牛丽颖(1968—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药分析及药效物质基础研究。

Tel: (0311)8992671 E-mail: niuliygy@163.com

#并列第一作者 陈世雨(1993—), 男, 硕士在读, 研究方向为心脑血管病的中医治疗研究。Tel: (0311)89926533 E-mail: 1038883665@qq.com

published by the State Pharmacopoeia Commission (2012 Edition) was used to establish the fingerprint of *Cnidii Fructus* formula granule, and the content of six main coumarin components was simultaneously determined. **Results** The research on the 18 batches of *Cnidii Fructus* formula granule showed that the fingerprint similarity was greater than 0.992 and 19 common peaks were calibrated with satisfied peak resolution. The content determination results showed that the content of both xanthotoxin and osthol were the main coumarin components in *Cnidii Fructus* formula granule. According to the methodological investigation, the precision RSD values were all less than 1.6%. The sample was stable within 48 h and this method had good repeatability. The average recovery rates of xanthotol, xanthotoxin, imperatorin, isopimpinellin, bergapten and osthol were 100.69%, 101.03%, 99.48%, 100.88%, 101.27% and 100.35%, respectively. All of these coumarin components' RSD were less than 2.5%. The six components showed a good linear relationship within a certain concentration range. The results of the content determination of xanthotol, xanthotoxin, isopimpinellin, bergapten, imperatorin and osthol respectively were 8.01—8.29, 2.37—2.63, 4.30—4.61, 4.04—4.40, 3.45—3.90 and 6.02—6.80 mg/g among the 18 batches of the *Cnidii Fructus* formula granule. **Conclusion** The fingerprint method and the determination method of six main coumarin components in the *Cnidii Fructus* formula granule established in this study are simple, stable, accurate and reliable. This method can be used for the quality control of the *Cnidii Fructus* formula granule.

Key words: *Cnidii Fructus*; formula granule; HPLC; coumarin; osthol; xanthotoxin; xanthotol; bergapten; imperatorin; isopimpinellin

蛇床子 *Cnidii Fructus* 为伞形科植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss 的成熟果实, 经过自然风干后制得的药物, 具有温肾壮阳、杀虫止痒以及燥湿祛风的功效。根据中医古籍记载, 蛇床子临床上可用于肾虚阳痿、湿痹腰痛、阴痒带下、湿疹瘙痒、宫冷不孕等症的治疗^[1]。现代药理学研究表明, 蛇床子主要药效成分为香豆素类成分, 主要包括蛇床子素、花椒毒酚、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、异茴芹素^[2-3]等。香豆素类化合物对多种疾病有治疗作用, 蛇床子素作为蛇床子中最主要的药效成分, 具有抗肿瘤、抗骨质疏松、镇静、保护心血管、抗炎、保护肾脏等作用^[4-7]; 花椒毒酚具有抗肿瘤、保护心血管、抗炎等药理作用^[8-9]; 佛手柑内酯能够抑制鼻咽癌肿瘤干细胞特性^[10]; 欧前胡素对部分中枢神经系统疾病表现出镇静、镇痛、抗癫痫的作用^[11-12]。

中药配方颗粒是由单味中药饮片经水提、浓缩、干燥、制粒而成, 经中医临床配方后, 供患者即冲即服的颗粒, 中药配方颗粒是中药饮片的补充。中药配方颗粒采用现代化中药制药技术, 对传统的中药饮片中的有效成分进行提取与浓缩, 随后干燥、制粒并进行包装等处理工序, 制成粉末状或者颗粒状制剂^[13-14]。与传统的中药饮片相比, 中药配方颗粒服用方式简单, 患者用药顺应性增加, 并有安全性与卫生性的优势^[15]。

随着中药配方颗粒的治疗效果越来越好, 在临床上应用越来越广泛, 人们对其药理学效果越来越肯定。因此, 中药配方颗粒的质量控制逐渐成为现阶段人们关注中药现代化的重点问题^[16-18]。目前, 中药指纹图谱技术是中药质量控制最为有效的手

段, 采用中药指纹图谱技术开展质量控制对于推进我国中药产业现代化、加快我国中药及其产品进入国际市场、提高我国中药产品治疗和竞争力, 都具有重要意义^[19-24]。

本实验通过对蛇床子配方颗粒进行 HPLC 指纹图谱研究, 并同时测定蛇床子配方颗粒中蛇床子素、花椒毒素、花椒毒酚、佛手柑内酯、欧前胡素、异茴芹素 6 种香豆素类成分的含量, 以期为全面评价蛇床子配方颗粒的质量提供借鉴与帮助。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪、Waters 2489 型紫外检测器、色谱软件为 Empower 3, 美国 Waters 公司; ME204E/02 型电子分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; Milli-Q 超纯水机, 美国 Millipore 公司; KQ-250E 型超声波清洗仪, 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试药

甲醇为色谱纯, Fisher 公司; 水为 Milli-Q 制超纯水; 醋酸为分析纯, 天津市致远化学试剂有限公司; 对照品蛇床子素 (批号 110822-201308) 购自中国食品药品检定研究院; 对照品花椒毒素 (批号 151019)、花椒毒酚 (批号 16090904)、佛手柑内酯 (批号 16101807)、欧前胡素 (批号 160511)、异茴芹素 (批号 16081803) 购自成都普菲德生物技术有限公司; 所有对照品质量分数不低于 98%。蛇床子配方颗粒由石家庄神威药业集团有限公司提供, 1 g 配方颗粒相当于 14.3 g 饮片, 配方颗粒批号分别为 15022711、15031411、15032811、15023611、15026311、15042711、15029711、15031611、

15021311、15042911、15020211、15028611、15017211、15032411、15029311、15086811、15093611、15047811，分别编号为 S1~S18。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 XBridge C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1%醋酸水溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 5%~35%甲醇; 10~20 min, 35%~45%甲醇; 20~35 min, 45%甲醇; 35~40 min, 45%~85%甲醇; 40~50 min, 85%~90%甲醇; 体积流量 0.5 mL/min; 进样体积 10 μL; 检测波长 320 nm; 柱温为 40 °C。理论塔板数按蛇床子素峰计算不低于 5 000。

2.2 指纹图谱研究

2.2.1 供试品溶液的制备 取蛇床子配方颗粒适量, 精密称取 0.10 g, 倒入 100 mL 的具塞锥形瓶中, 加入甲醇溶剂 100 mL, 称定质量, 超声提取 30 min, 室温冷却至常温, 称定质量, 用甲醇补足减少的质量, 摇匀, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取花椒毒酚 1.6 mg、花椒毒素 1.5 mg、异茴芹素 1.3 mg、佛手柑内酯 1.3 mg、欧前胡素 4.9 mg、蛇床子素 1.9 mg, 分别加入 5 mL 量瓶中, 用甲醇分别配成含花椒毒酚 0.32 mg/mL 对照品溶液、花椒毒素 0.30 mg/mL 对照品溶液、异茴芹素 0.26 mg/mL 对照品溶液、佛手柑内酯 0.26 mg/mL 对照品溶液、欧前胡素 0.98 mg/mL 对照品溶液、蛇床子素 0.38 mg/mL 对照品溶液, 并取等体积各对照品溶液, 配成含花椒毒酚 53.33 μg/mL、花椒毒素 50.00 μg/mL、异茴芹素 43.33 μg/mL、佛手柑内酯 43.33 μg/mL、欧前胡素 163.33 μg/mL 和蛇床子素 63.33 μg/mL 混合对照品溶液, 摇匀, 放于 4 °C 冰箱中保存, 以备使用。

2.2.3 精密度试验 精密称取同一批蛇床子配方颗粒样品 (S1), 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图, 以分离度较好且峰面积较大的蛇床子素峰的保留时间和峰面积为参照, 计算所有共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明, 各共有峰相对保留时间的 RSD 值均小于 1.5%, 相对峰面积 RSD 值均小于 2.0%, 表明本方法精密度良好。

2.2.4 重复性试验 取同一批蛇床子配方颗粒样品 (S1) 6 份, 每份 0.10 g, 精密称定, 按照“2.2.1”

项下方法制备供试品溶液, 并按“2.1”项下色谱条件连续进样, 记录色谱图, 以蛇床子素峰的保留时间和峰面积为参照, 计算所有共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明, 各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 2.0%。

2.2.5 稳定性试验 精密称取同一批蛇床子配方颗粒样品 (S1), 按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 分别在制备后的 0、2、4、8、12、24、48 h 按“2.1”项下色谱条件进样, 以蛇床子素峰的保留时间和峰面积为参照, 计算所有共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明, 各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 2.0%, 说明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.2.6 HPLC 指纹图谱的建立及相似度评价 将 18 批蛇床子配方颗粒样品 (S1~S18), 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.1”项下色谱条件依次进样测定。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”进行指纹图谱分析, 以 S1 为参照指纹图谱, 采用多点校正后进行自动匹配, 用中位数法生成对照指纹图谱, 结果见图 1。各共有峰相对保留时间的 RSD 值均小于 2.0%, 18 批蛇床子配方颗粒色谱图与对照指纹图谱进行相似度评价, S1~S18 相似度均≥0.992, 结果见表 1。

2.2.7 指纹图谱共有峰的指认与归属 取“2.2.1”和“2.2.2”项下制备的蛇床子配方颗粒 (S1) 供试品溶液和混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 通过保留时间和 UV 紫外图谱对照分析, 确定 19 个共有峰中 9 号峰为花椒毒酚, 13 号峰为花椒毒素, 14 号峰为异茴芹素, 15 号峰为佛手柑内酯, 17 号峰为欧前胡素, 19 号峰为蛇床子素, 混合对照品以及蛇床子配方颗粒样品的 HPLC 色谱图见图 2。

2.3 6 种香豆素类成分含量测定

2.3.1 色谱条件及供试品溶液、混合对照品溶液的制备 同“2.1”“2.2.1”“2.2.2”项下方法。

2.3.2 线性关系考察 按“2.2.2”项下方法制备含花椒毒酚 53.33 μg/mL、花椒毒素 50.00 μg/mL、异茴芹素 43.33 μg/mL、佛手柑内酯 43.33 μg/mL、欧前胡素 163.33 μg/mL、蛇床子素 63.33 μg/mL 的混合对照品溶液。精密吸取 10.0、7.5、5.0、3.0、1.0 mL 混合对照品溶液, 分别置于 10 mL 量瓶中, 以甲醇定容, 摇匀, 得系列质量浓度的混合对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件依次进样测定, 以对照品质

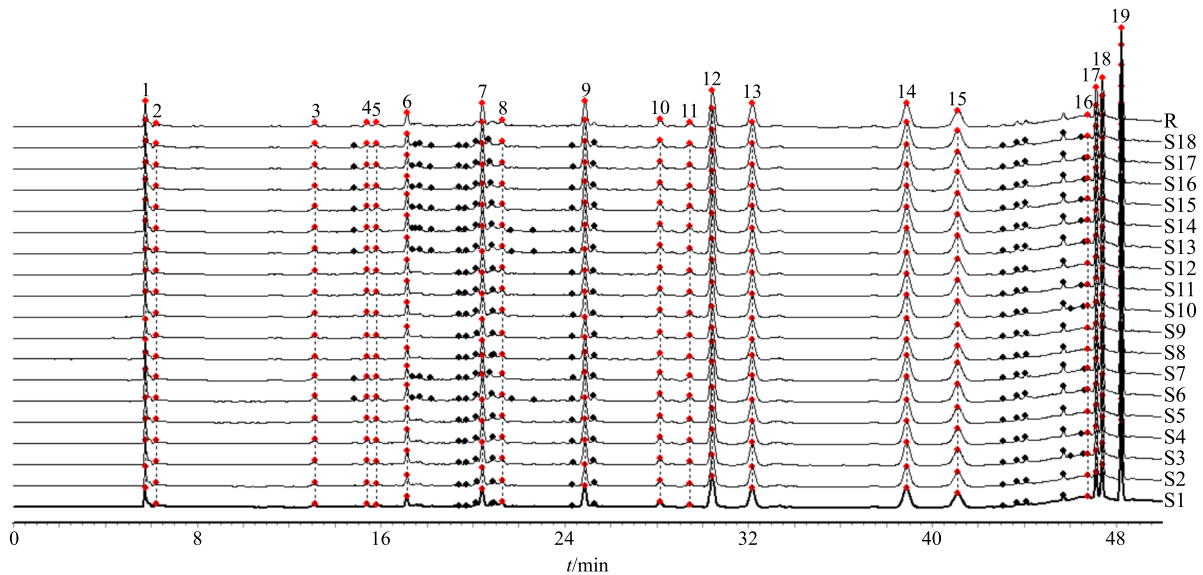


图 1 18 批蛇床子配方颗粒指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 Fingerprint of 18 batches of *Cnidii Fructus* formula granule and their reference fingerprint (R)

表 1 18 批配方颗粒样品的指纹图谱与对照指纹图谱相似度评价结果

Table 1 Similarity of fingerprint of 18 batches of *Cnidii Fructus* formula granule and their reference fingerprint

| 样品 | 相似度 | | | | | | | | | | | | | | | | | | R |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | S13 | S14 | S15 | S16 | S17 | S18 | |
| S1 | 1.000 | 0.996 | 0.994 | 0.995 | 0.995 | 0.992 | 0.994 | 0.995 | 0.996 | 0.994 | 0.995 | 0.995 | 0.992 | 0.992 | 0.993 | 0.993 | 0.994 | 0.995 | 0.999 |
| S2 | 0.996 | 1.000 | 0.999 | 0.999 | 0.999 | 0.996 | 0.993 | 0.996 | 0.997 | 0.998 | 0.999 | 0.999 | 0.996 | 0.993 | 0.997 | 0.992 | 0.993 | 0.994 | 0.999 |
| S3 | 0.994 | 0.998 | 1.000 | 0.997 | 0.998 | 0.997 | 0.993 | 0.994 | 0.998 | 0.995 | 0.996 | 0.998 | 0.997 | 0.997 | 0.998 | 0.992 | 0.993 | 0.994 | 0.998 |
| S4 | 0.995 | 0.999 | 0.997 | 1.000 | 0.999 | 0.998 | 0.994 | 0.995 | 0.999 | 0.996 | 0.997 | 0.999 | 0.998 | 0.998 | 0.998 | 0.993 | 0.994 | 0.994 | 0.998 |
| S5 | 0.995 | 0.999 | 0.998 | 0.999 | 1.000 | 0.997 | 0.993 | 0.995 | 0.999 | 0.998 | 0.999 | 0.997 | 0.997 | 0.998 | 0.998 | 0.992 | 0.993 | 0.994 | 0.999 |
| S6 | 0.992 | 0.996 | 0.997 | 0.998 | 0.997 | 1.000 | 0.994 | 0.992 | 0.996 | 0.997 | 0.998 | 0.997 | 0.997 | 0.997 | 0.999 | 0.992 | 0.994 | 0.993 | 0.998 |
| S7 | 0.994 | 0.993 | 0.993 | 0.994 | 0.993 | 0.994 | 1.000 | 0.994 | 0.993 | 0.993 | 0.994 | 0.993 | 0.994 | 0.993 | 0.994 | 0.997 | 0.997 | 0.998 | 0.994 |
| S8 | 0.995 | 0.996 | 0.994 | 0.995 | 0.995 | 0.992 | 0.994 | 1.000 | 0.996 | 0.994 | 0.995 | 0.995 | 0.992 | 0.992 | 0.993 | 0.993 | 0.994 | 0.995 | 0.995 |
| S9 | 0.996 | 0.997 | 0.998 | 0.999 | 0.999 | 0.996 | 0.993 | 0.996 | 1.000 | 0.998 | 0.999 | 0.999 | 0.996 | 0.996 | 0.997 | 0.992 | 0.993 | 0.994 | 0.999 |
| S10 | 0.994 | 0.998 | 0.995 | 0.996 | 0.998 | 0.997 | 0.993 | 0.994 | 0.998 | 1.000 | 0.998 | 0.998 | 0.997 | 0.997 | 0.998 | 0.992 | 0.993 | 0.994 | 0.998 |
| S11 | 0.995 | 0.999 | 0.996 | 0.997 | 0.999 | 0.998 | 0.994 | 0.995 | 0.999 | 0.998 | 1.000 | 0.999 | 0.998 | 0.998 | 0.998 | 0.993 | 0.994 | 0.994 | 0.994 |
| S12 | 0.995 | 0.999 | 0.998 | 0.999 | 0.995 | 0.997 | 0.993 | 0.995 | 0.999 | 0.998 | 0.999 | 1.000 | 0.997 | 0.998 | 0.998 | 0.992 | 0.993 | 0.994 | 0.999 |
| S13 | 0.992 | 0.996 | 0.997 | 0.998 | 0.997 | 0.997 | 0.994 | 0.992 | 0.996 | 0.997 | 0.998 | 0.997 | 1.000 | 0.999 | 0.999 | 0.992 | 0.994 | 0.993 | 0.998 |
| S14 | 0.992 | 0.996 | 0.997 | 0.998 | 0.998 | 0.997 | 0.993 | 0.992 | 0.996 | 0.997 | 0.998 | 0.998 | 0.999 | 1.000 | 0.999 | 0.992 | 0.993 | 0.993 | 0.998 |
| S15 | 0.993 | 0.997 | 0.998 | 0.998 | 0.998 | 0.999 | 0.994 | 0.993 | 0.997 | 0.998 | 0.998 | 0.998 | 0.999 | 0.999 | 1.000 | 0.993 | 0.994 | 0.994 | 0.998 |
| S16 | 0.993 | 0.992 | 0.992 | 0.993 | 0.992 | 0.992 | 0.997 | 0.993 | 0.992 | 0.992 | 0.993 | 0.992 | 0.992 | 0.992 | 0.992 | 0.993 | 1.000 | 0.999 | 0.998 |
| S17 | 0.994 | 0.993 | 0.993 | 0.994 | 0.993 | 0.994 | 0.997 | 0.994 | 0.993 | 0.993 | 0.994 | 0.993 | 0.994 | 0.993 | 0.994 | 0.999 | 1.000 | 0.998 | 0.994 |
| S18 | 0.995 | 0.994 | 0.994 | 0.994 | 0.994 | 0.993 | 0.998 | 0.995 | 0.994 | 0.994 | 0.994 | 0.994 | 0.993 | 0.993 | 0.994 | 0.998 | 0.998 | 1.000 | 0.995 |
| R | 0.995 | 0.999 | 0.998 | 0.998 | 0.999 | 0.998 | 0.994 | 0.995 | 0.999 | 0.998 | 0.994 | 0.999 | 0.998 | 0.998 | 0.998 | 0.993 | 0.994 | 0.995 | 1.000 |

量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得回归方程分别为花椒毒酚 $Y=372\ 360 X-39\ 304, r=0.999\ 8$, 线性范围 $5.33\sim 53.33\ \mu\text{g/mL}$; 花椒毒素 $Y=186\ 951 X+30\ 567, r=0.999\ 8$, 线性

范围 $5.00\sim 50.00\ \mu\text{g/mL}$; 异茴芹素 $Y=327\ 881 X-52\ 595, r=0.999\ 8$, 线性范围 $4.33\sim 43.33\ \mu\text{g/mL}$; 佛手柑内酯 $Y=290\ 926 X-48\ 400, r=0.999\ 9$, 线性范围 $4.33\sim 43.33\ \mu\text{g/mL}$; 欧前胡素 $Y=635\ 755$

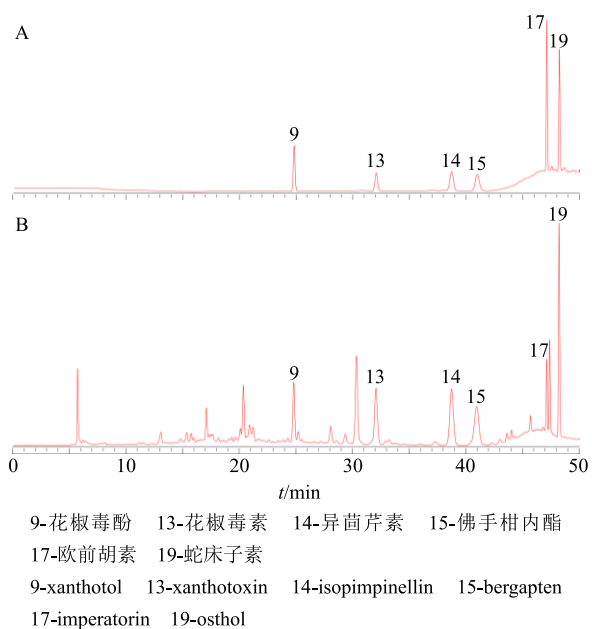


图 2 混合对照品 (A) 和蛇床子配方颗粒样品 (B) 溶液的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of six main coumarin components (A) and sample of *Cnidii Fructus* formula granule (B)

$X-44\ 071$, $r=0.999\ 7$, 线性范围 $16.33\sim 163.33\ \mu\text{g}/\text{mL}$; 蛇床子素 $Y=550\ 687\ X-86\ 127$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 $6.33\sim 63.33\ \mu\text{g}/\text{mL}$; 结果表明花椒毒酚、花椒毒素、异茴芹素、佛手柑内酯、欧前胡素和蛇床子素在相应的质量浓度范围内与峰面积的线性关系良好。

2.3.3 精密度试验 取蛇床子配方颗粒 (S1), 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 计算得到花椒毒酚、花椒毒素、异茴芹素、佛手柑内酯、欧前胡素和蛇床子素峰面积的 RSD 值分别为 1.48%、1.65%、1.08%、1.41%、0.78%、1.37%, 表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取同一批蛇床子配方颗粒 (S1), 按“2.2.1”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按“2.1”项下色谱条件连续进样, 计算得到花椒毒酚、花椒毒素、异茴芹素、佛手柑内酯、欧前胡素和蛇床子素质量分数的 RSD 值分别为 0.96%、1.21%、1.42%、0.85%、0.77%、1.51%, 表明该方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 取同一批蛇床子配方颗粒 (S1), 按“2.2.1”项下方法平行制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 分别于 0、2、4、6、12、24、48 h 进样测定, 计算得到花椒毒酚、花椒毒素、异茴芹素、佛手柑内酯、欧前胡素和蛇床子素峰面

积的 RSD 值分别为 1.83%、0.90%、0.72%、1.68%、1.44%、0.98%, 结果表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.3.6 加样回收率试验 取同一批蛇床子配方颗粒 (S1) 0.05 g, 精密称定 6 份, 置 100 mL 量瓶中, 分别加入花椒毒酚 0.406 mg、花椒毒素 0.127 mg、异茴芹素 0.226 mg、佛手柑内酯 0.209 mg、欧前胡素 0.185 mg 和蛇床子素 0.311 mg, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算得到花椒毒酚、花椒毒素、异茴芹素、佛手柑内酯、欧前胡素和蛇床子素的平均加样回收率分别为 100.69%、101.03%、99.48%、100.88%、101.27%、100.35%, RSD 值分别为 0.94%、1.53%、1.37%、1.19%、1.96%、0.75%, 表明该方法的准确度良好。

2.3.7 样品测定 按“2.2.1”项下方法平行制备 18 批蛇床子配方颗粒供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算样品中 6 种香豆素成分的含量, 结果见表 2。18 批蛇床子配方颗粒中, 花椒毒酚、花椒毒素、异茴芹素、佛手柑内酯、欧前胡素、蛇床子素的质量分数分别为 8.01~8.29、2.37~2.63、4.30~4.61、4.04~4.40、3.45~3.90、6.02~6.80 mg/g, 其中花椒毒酚与蛇床子素含量较高, 花椒毒素含量较少。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

蛇床子配方颗粒由蛇床子经水提、浓缩、干燥、制粒而成, 而蛇床子中主要的药效成分为香豆素类成分^[2-3], 故认为蛇床子配方颗粒中药效成为香豆素类化合物。本实验选择花椒毒酚、花椒毒素、异茴芹素、佛手柑内酯、欧前胡素和蛇床子素 6 种香豆素类成分为对照品。将 6 种对照品溶液于 190~400 nm 紫外可见光处进行全波长扫描, 结果发现 6 种对照品在 320 nm 处均有较强的紫外吸收, HPLC 图谱中的色谱峰以香豆素类成分为主, 故选用 320 nm 为检测波长。

本实验考察了不同提取溶剂 (甲醇、乙醇、水)、不同提取时间 (20、30、40 min)、不同柱温 (30、35、40、45 °C)、不同流动相体系 (乙腈-水、乙腈-0.1%醋酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液、甲醇-水、甲醇-0.1%醋酸水溶液、甲醇-0.1%磷酸水溶液) 的影响。结果表明, 提取溶剂为甲醇, 提取时间为 30 min, 提取效率最高; 色谱柱的柱温为 40 °C, 流动相为甲醇-0.1%醋酸水溶液时, 各色谱峰峰形与分离

表 2 18 批蛇床子配方颗粒样品中 6 种香豆素成分含量测定结果 (n = 3)

Table 2 Determination results of six coumarin components in 18 batches of *Cnidii Fructus* formula granule (n = 3)

| 编号 | 质量分数/(mg·g ⁻¹) | | | | | |
|-----|----------------------------|------|------|-------|------|------|
| | 花椒毒酚 | 花椒毒素 | 异茴芹素 | 佛手柑内酯 | 欧前胡素 | 蛇床子素 |
| S1 | 8.12 | 2.54 | 4.52 | 4.18 | 3.70 | 6.22 |
| S2 | 8.18 | 2.63 | 4.60 | 4.24 | 3.73 | 6.64 |
| S3 | 8.16 | 2.48 | 4.60 | 4.20 | 3.71 | 6.23 |
| S4 | 8.22 | 2.54 | 4.49 | 4.21 | 3.71 | 6.33 |
| S5 | 8.29 | 2.53 | 4.47 | 4.36 | 3.49 | 6.71 |
| S6 | 8.16 | 2.43 | 4.59 | 4.20 | 3.64 | 6.80 |
| S7 | 8.01 | 2.46 | 4.42 | 4.04 | 3.53 | 6.06 |
| S8 | 8.03 | 2.50 | 4.49 | 4.11 | 3.65 | 6.19 |
| S9 | 8.21 | 2.37 | 4.53 | 4.22 | 3.59 | 6.20 |
| S10 | 8.18 | 2.40 | 4.35 | 4.24 | 3.71 | 6.22 |
| S11 | 8.08 | 2.49 | 4.52 | 4.28 | 3.49 | 6.20 |
| S12 | 8.27 | 2.44 | 4.61 | 4.18 | 3.73 | 6.21 |
| S13 | 8.16 | 2.54 | 4.49 | 4.31 | 3.55 | 6.02 |
| S14 | 8.07 | 2.50 | 4.55 | 4.05 | 3.45 | 6.51 |
| S15 | 8.13 | 2.39 | 4.30 | 4.40 | 3.90 | 6.22 |
| S16 | 8.08 | 2.47 | 4.52 | 4.20 | 3.50 | 6.11 |
| S17 | 8.12 | 2.56 | 4.51 | 4.18 | 3.69 | 6.20 |
| S18 | 8.20 | 2.57 | 4.58 | 4.20 | 3.59 | 6.08 |

程度较好。

3.2 指纹图谱及含量测定结果分析

本研究对 18 批蛇床子配方颗粒样品进行指纹图谱分析,并对其中 6 种香豆素类成分进行含量测定,18 批样品指纹图谱相似度均在 0.992 以上,表明不同批次样品的化学成分具有较好的一致性。通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”分析,共检测出 19 个共有峰,指认了花椒毒酚、花椒毒素、异茴芹素、佛手柑内酯、欧前胡素和蛇床子素 6 种香豆素类成分的色谱峰,并对 6 种香豆素类成分进行了含量测定。结果表明,在蛇床子配方颗粒所含有的 6 种香豆素类成分中,花椒毒酚与蛇床子素含量较高,花椒毒素含量较少。

蛇床子药材中除了香豆素类成分之外,还包括部分倍半萜烯类、萜醇类等挥发油类成分和部分黄酮类成分^[25]。因此,可在以后的实验中,考虑应用气相色谱法或高效液相色谱-质谱联用法,更为精确地对蛇床子饮片及配方颗粒中有效成分进行定性与定量分析。

综上,本研究采用 HPLC 法建立了蛇床子配方颗粒指纹图谱,并同时测定 6 种香豆素成分的含量。

该方法简便、准确,有效地反映了蛇床子配方颗粒的定性特征和定量信息,为其全面质量控制提供了方法。

参考文献

- [1] 张 闯, 田 伟, 王 相, 等. HPLC 法同时测定蛇床子配方颗粒中蛇床子素、花椒毒酚、花椒毒素的含量研究 [J]. 河北中医药学报, 2017, 32(3): 34-36.
- [2] 宋丽娇, 李 晋, 姜 艳, 等. 蛇床子香豆素类成分的含量测定及指纹图谱研究 [J]. 天津中医药, 2016, 33(6): 368-372.
- [3] Hussain M I, Syed Q A, Khattak M N K, et al. Natural product coumarins: Biological and pharmacological perspectives [J]. *Biologia*, 2019, 74(7): 863-888.
- [4] Zhou Y, Ren H Z, Dai B, et al. Osthol inhibits triple negative breast cancer cells by suppressing STAT3 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, doi: org/10.1186/s13046-018-0992-z.
- [5] Li L P, Wang X J, Zhang J Y, et al. Antifungal activity of osthol *in vitro* and enhancement *in vivo* through Eudragit S100 nanocarriers [J]. *Virulence*, 2018, 9(1): 555-562.
- [6] 覃小燕, 胡 珍, 张花美, 等. 蛇床子素药理作用及相关机制研究进展 [J]. 天津中医药, 2018, 35(11):

- 877-880.
- [7] 王震芳, 张智强, 葛振华. 蛇床子素 3 种制剂的制备、表征及药动学比较研究 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3615-3621.
- [8] 伍冠一, 李 慧, 黄尚尚, 等. 花椒毒酚生物活性与药理作用 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(1): 62-64.
- [9] Lahiri D, Dash S, Dutta R, *et al.* Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants [J]. *J Biosci*, 2019, doi: org/10.1007/s12038-019-9868-4.
- [10] 李海云, 杜汝晴, 罗思凡, 等. 佛手柑内酯抑制鼻咽癌肿瘤干细胞特性的体外研究 [J]. 今日药学, 2019, 29(8): 515-520.
- [11] 何凤兰, 谭梅英. HPLC 法同时测定石柑子中两种镇痛抗炎类活性成分 [J]. 按摩与康复医学, 2019, 10(11): 56-58.
- [12] 咸哲民, 姜京植, 赵雨喆, 等. 欧前胡素通过 Nrf2/HO-1 抗氧化途径对哮喘模型小鼠气道炎症的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(19): 4596-4601.
- [13] 尹云泽. 中药配方颗粒的指纹图谱研究进展 [J]. 中国处方药, 2019, 17(9): 16-17.
- [14] 赵国明. 中药配方颗粒的研究进展 [J]. 中国处方药, 2019, 17(6): 31-32.
- [15] 李 霞. 中药配方颗粒和中药饮片的主要特点以及临床效果对比 [J]. 中国医药指南, 2019, 17(19): 139.
- [16] 邓瑞雪, 徐丽科, 闫 秘, 等. 不同生产厂家赤芍配方颗粒中单萜苷类化合物含量比较 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2332-2338.
- [17] 张斐姝, 蔡舒婷, 舒 忻, 等. 中药配方颗粒的临床运用概况与未来趋势 [J]. 中国医药导报, 2016, 13(16): 70-73.
- [18] 王 杰, 刘 冰, 周 军, 等. 六味地黄配方颗粒与传统汤剂中 6 种有效成分的比较研究 [J]. 中草药, 2015, 46(19): 2887-2891.
- [19] Qin Y, Zhou R, Huang J, *et al.* Comprehensive comparison of the anti-inflammatory activity and chemical consistency of traditional Chinese medicine formula granules with Ge-Gen decoction as a representative sample [J]. *Biomed Chromatogr*, 2019, doi: org/10.1002/bmc.4689.
- [20] 曾 杰, 肖亚平, 安 尧, 等. 右归饮 HPLC 指纹图谱研究及 9 种成分定量分析 [J]. 中草药, 2017, 48(24): 5143-5150.
- [21] Gao S M, Liu J S, Wang M, *et al.* Quantitative and HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics for quality evaluation of *Codonopsis Radix* processed with different methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(2): 160-168.
- [22] 沈 晨, 魏婷婷, 韩园园, 等. 止动颗粒 UPLC 指纹图谱建立及 3 种成分测定 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 388-395.
- [23] Liu J, Zhou J, Zhang Q Q, *et al.* Monosaccharide analysis and fingerprinting identification of polysaccharides from *Poria cocos* and *Polyporus umbellatus* by HPLC combined with chemometrics methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(4): 406-411.
- [24] 何 军, 朱旭江, 杨平荣, 等. 中药配方颗粒的现状与发展新思路 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4717-4725.
- [25] 李 昱. 关于蛇床子的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 全科口腔医学电子杂志, 2019, 6(26): 22-23.