doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.02.022

仙鹤草配方颗粒中槲皮素含量测定及指纹图谱研究*

俞　杰,侯　静,许豪杰,黄　琪,闻佳涛

(浙江佐力药业股份有限公司研发中心,浙江 湖州　313200)

摘要:目的　探讨仙鹤草配方颗粒中槲皮素含量测定及指纹图谱分析方法。**方法**　收集 16 批仙鹤草饮片,制备标准汤剂,采用高效液相色谱法测定标准汤剂中槲皮素含量,色谱柱为 DIKMA Diamonsil C_{18} 柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈 - 0.2% 磷酸水溶液(28∶72,*V*/*V*),流速为 1.0 mL / min,检测波长为 368 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 20 μL。采用"中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)"进行相似度评价,建立 16 批标准汤剂的高效液相色谱指纹图谱,指认共有色谱峰并验证。**结果**　16 批标准汤剂中,槲皮素质量浓度在 2.32 ~ 23.19 μg / mL 范围内与峰面积线性关系良好,精密度、稳定性、重复性试验的 *RSD* 均小于 2.0%,耐用性试验的 *RSD* 均小于 3.6%,槲皮素含量为 2.03 ~ 3.88 mg / g,平均 2.88 mg / g;呈现 5 个共有特征峰,且相似度均大于 0.9;配方颗粒与标准汤剂的指纹图谱基本一致。**结论**　所建立的槲皮素含量测定及指纹图谱分析方法准确、可靠,可为后续质量标准的建立提供参考。

关键词:仙鹤草;槲皮素;标准汤剂;配方颗粒;指纹图谱;高效液相色谱法

中图分类号:R932;R284.1;R286.0　　文献标志码:A　　文章编号:1006 - 4931(2022)02 - 0083 - 05

Content Determination of Quercetin in *Agrimonia Pilosa* Dispensing Granules and Study on Its Fingerprints

YU Jie, HOU Jing, XU Haojie, HUANG Qi, WEN Jiatao

(Research and Development Center, Zhengjiang Jolly Pharmaceutical, Huzhou, Zhejiang, China　313200)

Abstract: Objective　To investigate a method for the content determination of quercetin in Agrimonia pilosa Dispensing Granules and its fingerprint analysis. **Methods**　A total of 16 batches of *Agrimonia pilosa* decoction pieces powder were collected to prepare the standard decoction, and the content of quercetin in the standard decoction was determined by the high - performance liquid chromatography (HPLC) method. The chromatographic column was DIKMA Diamonsil C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.2% phosphoric acid solution (28 ∶ 72, *V* / *V*), the flow rate was 1.0 mL / min, the detection wavelength was 368 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 20 μL. The *Similarity Evaluation System for TCM Chromatographic Fingerprint* (2012 Edition) was used for similarity evaluation, the HPLC fingerprint of 16 batches of standard decoction was established, the common chromatographic peaks were identified and verified. **Results**　Among the 16 batches of standard decoction, the linear range of quercetin was 2.32 - 23.19 μg / mL. The *RSD*s of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0%, the *RSD* of durability test was less than 3.6%, and the content of quercetin was in the range of 2.03 - 3.88 mg / g, with an average of 2.88 mg / g. There were five common characteristic peaks with the similarity more than 0.9. The fingerprint of the dispensing granules was basically consistent with that of the standard decoction. **Conclusion**　The established method for the determination of quercetin and its fingerprint analysis is accurate and reliable, which can provide a basis for the follow - up establishment of quality standard of *Agrimonia pilosa* Dispensing Granules.

Key words: *Agrimonia pilosa*; quercetin; standard decoction; dispensing granules; fingerprint; HPLC

*基金项目:浙江省中药配方颗粒科研专项[浙中医药〔2017〕11 号]。

第一作者:俞杰,男,硕士研究生,工程师,研究方向为中药配方颗粒质量控制与开发,(电子信箱)1131146913@qq.com。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:24 - 25,518.

[2] 孙汉青,李锦萍,张力宽,等. 大黄化学成分与药理作用研究进展[J]. 青海草业,2018,27(1):47 - 51.

[3] 王晓玲. 大黄及其制剂的薄层色谱鉴别[J]. 中成药,2004,26(9):107 - 108.

[4] 罗定强,赵珊珊,吴　芳,等. 一测多评法测定肾康栓中的大黄蒽醌类成分[J]. 西北药学杂志,2019,34(6):751 - 754.

[5] 李丹丹,张　慧,李思雨,等. 基于 HPLC 指纹图谱及 UPLC - Q - TOF - MS 法的 3 种不同来源大黄差异成分研究[J]. 中国药房,2019,30(23):3240 - 3245.

[6] 曾　芳,李　源. 大黄有效化学成分及其药理作用[J]. 当代医学,2013,19(12):149 - 150.

[7] 赵韶华,许红辉,李晓燕,等. 莲花清瘟胶囊薄层鉴别与 HPLC 定量测定[J]. 中国药品标准,2007,8(1):55 - 59.

[8] 李晓燕,李正杰,许红辉,等. 通淋片薄层鉴别与定量测定研究[J]. 中国药业,2011,20(18):28 - 29.

[9] 陈勇军,黄云祥,王杏娥. 茵黄利胆颗粒中大黄、茵陈的薄层色谱鉴别[J]. 中医学报,2014,29(11):1635 - 1636.

[10] 李　磊,刘　瑞,袁　波,等. 大黄 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中国药学杂志,2005,40(17):1302 - 1305.

[11] 刘　欣,胡芳弟,封士兰,等. 大黄药材指纹图谱研究[J]. 分析测试技术与仪器,2004,10(3):140 - 144.

(收稿日期:2020 - 10 - 18;修回日期:2021 - 06 - 25)

仙鹤草*Agrimonia pilosa* Ledeb L. 始载于北宋苏颂《图经本草》，为蔷薇科多年生草本植物龙芽草的全草，主产于浙江、江苏等地[1-3]，含有黄酮类、三萜类、酚类、酯类、鞣质类等有效成分，具有收敛止血、解毒杀虫、补虚益气强心等功效[4-5]。现代药理学研究表明，仙鹤草有抗肿瘤作用[6]。仙鹤草中的抗氧化成分主要有黄酮类、多酚类和鞣质[7]，黄酮类物质有降血糖作用[8]。对仙鹤草中黄酮类成分的研究发现，其主要含槲皮素、山柰酚、木犀草素、芹菜素及糖苷[8-9]。目前，《中国药典》中暂未规定仙鹤草质量控制的指标性成分。为此，本研究中对仙鹤草标准汤剂中槲皮素含量及指纹图谱进行研究，为该颗粒制剂质量标准的建立提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪（美国Agilent公司）；Mettler SX205型电子分析天平（瑞士Mettler公司，精度为十万分之一）；FA2004B型电子分析天平（上海精密科学仪器有限公司，精度为万分之一）；LS220A型电子分析天平（德国Sartorius公司，精度为千分之一）；KQ-500VDB型超声波清洗器（昆山超声仪器公司）。

1.2 试药

槲皮素对照品（批号为100081-201610，含量99.1%），仙鹤草对照药材（批号为121464-201303），均购自中国食品药品检定研究院；仙鹤草配方颗粒（浙江佐力药业股份有限公司、批号为19080162，浙江贝尼菲特股份有限公司、批号为1908024，浙江景岳堂股份有限公司、批号为YK2003006，依次记为P1，P2，P3）；乙腈为色谱纯，甲醇、磷酸均为分析纯，水为纯化水。共收集仙鹤草药材16批（记为S1-S16，批号及产地见表1）。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱：DIKMA Diamonsil C_{18}柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈-0.2%磷酸水溶液（28∶72，*V*/*V*）；流速：1.0 mL/min；检测波长：368 nm；柱温：30 ℃；进样量：20 μL。

表1 仙鹤草药材的批号与产地

Tab. 1 Batch numbers and origin of *Agrimonia pilosa*

编号	批号	产地	编号	批号	产地
S1	20170501	浙江舟山	S9	20190401	浙江舟山
S2	20181201	河南信阳	S10	20190801	浙江舟山
S3	20170601	浙江舟山	S11	190825	河南信阳
S4	20171001	浙江舟山	S12	1908085	河南信阳
S5	190729	河南信阳	S13	20171201	江苏苏州
S6	20170801	浙江舟山	S14	20180501	江苏苏州
S7	20180701	浙江舟山	S15	20181001	江苏苏州
S8	20180401	浙江舟山	S16	20190101	江苏苏州

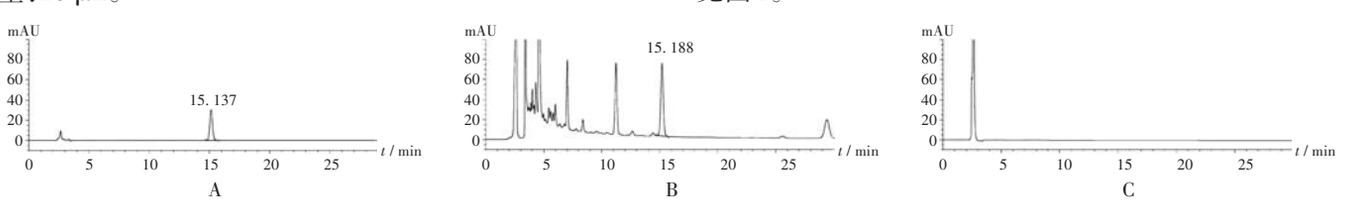
2.1.2 样品及溶液制备

标准汤剂：称取药材饮片样品100 g，置煎药锅中，加水煎煮2次，第一次加饮片量8倍的水，搅拌，浸润，浸泡30 min，大火加热至微沸，转小火煮沸30 min，药液用100目不锈钢筛滤过；第2次加饮片量6倍的水，大火加热至微沸，转小火煎煮20 min，药液用100目不锈钢筛滤过，合并2次的滤液，置旋转蒸发器，50~60 ℃减压浓缩至体积约为1∶1的浸膏，冷冻干燥，即得饮片标准浸膏（汤剂）。

相关溶液：取槲皮素对照品适量，精密称定，加甲醇定容，制成质量浓度为11.60 μg/mL的对照品溶液。取标准浸膏样品和配方颗粒样品各约1.0 g，精密称定，加甲醇-25%盐酸溶液（4∶1，*V*/*V*）50 mL，称定质量，加热回流30 min，取出，放冷至室温，再次称定质量，用甲醇-25%盐酸溶液（4∶1，*V*/*V*）补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。按样品处方工艺取辅料，制成阴性样品，按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

专属性试验：取配方颗粒供试品溶液（批号为19080162）、对照品溶液、阴性对照品溶液各适量，按2.1.1项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果供试品溶液色谱图中，在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应吸收峰，阴性对照无干扰，专属性良好。详见图1。



1. 槲皮素

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Quercetin

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

线性关系考察：量取2.1.2项下对照品溶液2，4，6，8，10，20 μL，按2.1.1项下色谱条件进样测定，记录色谱图。以槲皮素质量浓度（X，μg/mL）为横坐标、峰面积（Y）为纵坐标进行线性回归，得槲皮素回归方程 Y = 56.191X − 7.615 9（R^2 = 1.000 0，n = 6）。结果表明，槲皮素质量浓度在2.32～23.19 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验：精密吸取2.1.2项下对照品溶液，按2.1.1项下色谱条件连续进样测定6次，记录峰面积。结果的*RSD*小于2.0%（n = 6），表明仪器精密度良好。

稳定性试验：取2.1.2项下配方颗粒供试品溶液，室温下放置0，2，4，8，12，18，24，36 h时，按2.1.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果的*RSD*小于2.0%（n = 8），表明室温下供试品溶液放置36 h内稳定。

重复性试验：取2.1.2项下配方颗粒供试品溶液6份，按2.1.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果的*RSD*小于2.0%（n = 6），表明方法重复性良好。

加样回收试验：取配方颗粒样品（批号为19080162），研细，取约0.5 g，共6份，精密称定，精密加入槲皮素对照品溶液50 mL，混匀，按2.1.1项下色谱条件进样测定，记录色谱图，计算加样回收率。结果见表2。

表2　加样回收试验结果（n = 6）

Tab. 2　Results of the recovery test（n = 6）

取样量（g）	样品含量（mg）	加入量（mg）	测得量（mg）	回收率（%）	$\overline{X}$（%）	*RSD*（%）
0.463 2	0.613 6	0.695 7	1.273 7	94.88	97.12	1.54
0.505 9	0.670 2	0.695 7	1.350 6	97.80		
0.451 3	0.597 9	0.695 7	1.274 0	97.18		
0.506 3	0.670 7	0.695 7	1.352 3	97.97		
0.465 9	0.617 2	0.695 7	1.284 5	95.92		
0.505 5	0.669 7	0.695 7	1.358 4	98.99		

2.1.4　耐用性试验

考察不同色谱柱、柱温、流动相比例及流速对本色谱条件的耐用性，结果见表3。可见，各色谱条件发生一定程度变化时，本方法能满足试验要求，耐用性良好。

2.1.5　样品含量测定

取16批标准汤剂样品及3批配方颗粒样品，依法制备供试品溶液，按2.1.1项下色谱条件进样测定，记录色谱图，计算样品含量。结果见表4。

2.2　指纹图谱建立

2.2.1　色谱条件与系统适用性试验

色谱柱：DIKMA Diamonsil C_{18}柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈（A）－0.2%磷酸水溶液（B），梯度洗脱（0～20 min时 0%A → 20%A，20～30 min时 20%A，30～40 min时 20%A → 30%A，40～50 min时 30%A → 40%A，50～60 min时 40%A → 50%A）；流速：1.0 mL/min；检测波长：250 nm；柱温：30 ℃。结果各峰分离度和峰形均较好。

表3　耐用性试验结果

Tab 1　Results of the durability test

项目	考察条件	槲皮素含量（mg/g）	*RSD*（%）
不同色谱柱	Welch Ultimate XB－C_{18}柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）	1.32	
	Kromasil 100－5 C_{18}柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）	1.38	3.04
	DIKMA Diamonsil C_{18}柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）	1.40	
柱温	25 ℃	1.37	
	30 ℃	1.32	2.65
	35 ℃	1.39	
流速	0.9 mL/min	1.41	
	1.0 mL/min	1.32	3.58
	1.1 mL/min	1.40	
流动相	乙腈－0.2%磷酸水溶液（24∶76，V/V）	1.38	
	乙腈－0.2%磷酸水溶液（28∶72，V/V）	1.32	3.04
	乙腈－0.2%磷酸水溶液（30∶70，V/V）	1.40	

表4　样品中槲皮素含量测定结果（mg/g，n = 2）

Tab. 2　Results of content determination of quercetin in the samples（mg/g，n = 2）

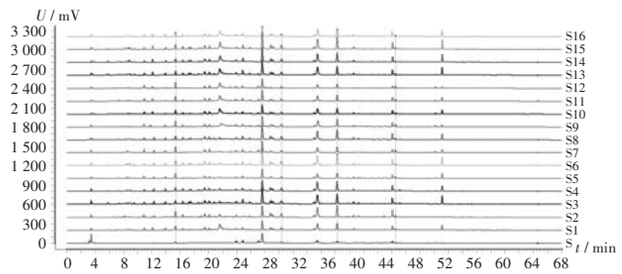
编号	槲皮素	编号	槲皮素	编号	槲皮素
S1	3.68	S8	3.33	S15	2.67
S2	2.04	S9	3.26	S16	3.24
S3	2.39	S10	2.26	P1	1.32
S4	2.03	S11	2.47	P2	1.57
S5	3.08	S12	3.86	P3	1.93
S6	2.28	S13	3.88		
S7	2.38	S14	3.30		

2.2.2　参照物选择及相关成分确认

标准汤剂化学成分多为黄酮类（主要有槲皮素和芦丁等），考虑到多成分、整体质量控制，以仙鹤草对照药材作对照，为保持对照药材与标准汤剂工艺基本一致，将对照药材以水超声提取，取对照药材约2 g，加水25 mL，加水煎煮30 min，放冷，滤过，蒸干，加入甲醇25 mL，密塞，称定质量，超声处理30 min，取出，放冷至室温，再次称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。结果对照药材与配方颗粒样品色谱图基本一致。

2.2.3　对照指纹图谱建立

按国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）”，对16批标准汤剂的HPLC图的色谱峰进行自动匹配，形成共有峰，建立对照指纹图谱。结果见图2。16批标准汤剂样品的指纹图谱无明显差异，共有5个共有峰，相对保留时间的*RSD*为0.00%～1.09%，表明不同产地的饮片制成的标准汤剂具有类似的化学成分，5个共有峰的相对峰面积的*RSD*无明显差异，表明不同产地标准汤剂中化学成分含量



S. 仙鹤草对照药材 S1－S16. 仙鹤草标准汤剂

图2 16批标准汤剂叠加指纹图谱

S. *Agrimonia pilosa* reference material S1－S16. *Agrimonia pilosa* standard decoction

Fig. 2 HPLC superimposed fingerprints of 16 batches of standard decoction

无明显差异。

2.2.4 相似度计算

采用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件系统(2012版)”,以共有峰计算16批样品与对照指纹图谱的相似度,结果整体相似度为0.985～1.000,表明标准汤剂一致性良好。详见表5。

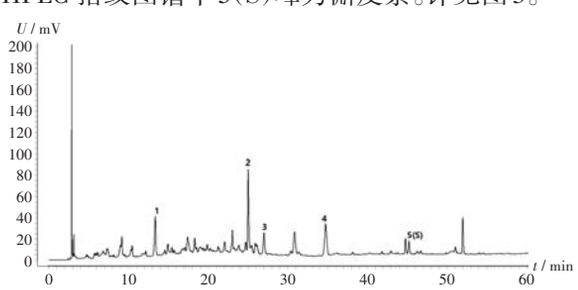
表5 16批标准汤剂指纹图谱相似度

Tab. 5 Similarity of fingerprints of 16 batches of standard decoction

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.985	S7	0.997	S13	1.000
S2	1.000	S8	0.997	S14	0.999
S3	0.999	S9	0.999	S15	0.998
S4	0.999	S10	0.999	S16	0.997
S5	1.000	S11	0.999		
S6	0.999	S12	0.999		

2.2.5 共有峰标定

将标准汤剂HPLC指纹图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”,选择时间宽度为0.1,中位数法生成对照指纹图谱,通过分析共确定5个共有峰。与仙鹤草对照品色谱图进行对比,确认标准汤剂HPLC指纹图谱中5(S)峰为槲皮素。详见图3。



5(S). 槲皮素

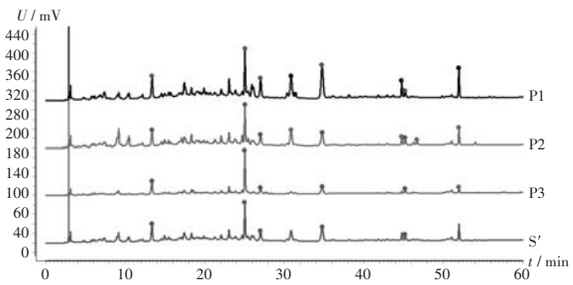
图3 标准汤剂对照指纹图谱

5(S). Quercetin

Fig. 3 Reference fingerprints of standard decoction

2.2.6 配方颗粒检测

取3批配方颗粒样品(批号依次为19080162, 1908024, YK2003006),按2.2.2项下方法制备供试品溶液,图谱见图4。各共有峰相对保留时间和标准汤剂对照特征图谱基本一致,重复性较好,4批样品与对照指纹图谱的相似度均大于0.9。表明建立的特征图谱可用于配方颗粒的质量分析。



S′. 标准汤剂 P1－P3. 配方颗粒

图4 3批配方颗粒叠加指纹图谱

S′. Standard decoction P1－P3. Dispensing granules

Fig. 4 HPLC superimposed fingerprints of three batches of dispensing granules

3 讨论

中药配方颗粒以传统中医药理论为指导,以临床应用为基础,按现代标准化工艺将中药饮片制成颗粒剂,可保障用药准确性和剂量的一致性[10]。2016年,国家药典委员会《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》(征求意见稿)中提出,将标准汤剂作为中药配方颗粒是否与临床汤剂基本一致的标准参照物,用中药饮片标准汤剂作为标准体系,有利于保障临床疗效的一致性,可为中药配方颗粒制备工艺的标准化和产品质量的一致性提供参照[11－14]。中药的成分复杂多样,指纹图谱或特征图谱等可对多组分进行分析,可更好地用于中药质量的整体性评价[15]。

本研究中基于传统煎药工艺,运用现代实验室方法制备仙鹤草饮片标准汤剂,以3批仙鹤草配方颗粒对其进行质量标准研究。饮片产地包含浙江舟山、河南信阳、江苏苏州3个产地,涵盖了仙鹤草的道地产地和主产区,具有较好的代表性。由于槲皮素在仙鹤草中具有抗氧化作用和降血糖作用[11－12],药理作用明确,故以槲皮素作为仙鹤草配方颗粒含量测定的指标性成分。

本研究中考察了乙腈－0.2%磷酸水溶液不同比例流动相,发现以28∶72(*V*/*V*)为宜,各峰分离度和峰形均较好,保留时间适中,故使用该方法作为流动相。由于中药所含黄酮、蒽醌等活性成分多数有紫外吸收,适用于光电二极管阵列检测器检测[16]。本研究中在200～400 nm波长范围内对供试品溶液进行扫描,通过等吸收图谱进行分析,发现波长为250 nm时效果最好,故以其作为检测波长。方法学考察中,仪器精密度、重复性、稳定性、耐用性和中间精密度的*RSD*均小于3%,表明该方法准确、可行、重复性良好,可用于仙鹤草配方颗