

六月雪-葎草药对指纹图谱研究及其多指标成分的定量分析

范玲¹, 王鑫¹, 王育隆², 朱娇丽¹, 尹浩¹, 薛毅¹, 金庆江¹, 陈国新¹

1. 苏州市中西医结合医院 (江苏苏州 215101)

2. 南京中医药大学翰林学院 (南京 225300)

【摘要】目的 建立六月雪-葎草(以下简称“雪葎”)药对共煎液 HPLC 指纹图谱, 并进行多成分定量分析, 用于评价“雪葎”药对的质量。**方法** 采用 Agilent EC-C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 4 μm) 进行检测; 以甲醇-0.1% 磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱; 流速为 0~30 min: 1.0 mL · min⁻¹, 30~65 min: 0.6 mL · min⁻¹; 检测波长为 350, 240 nm; 柱温为 30℃。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2012.1 版)》对“雪葎”药对共煎液进行相似度评价, 并对其中 4 个指标成分进行定量分析, 并将配伍前指标性成分的含量与配伍后相比。**结果** 在特征指纹图谱研究中, 共标定 12 个共有峰, 以 4 号峰为参照峰, 10 批“雪葎”药对共煎液与共有模式对照图谱之间有良好的相似性, 相似度均在 0.9 以上; 在建立的色谱条件下, 4 个成分具有良好的线性关系, 平均加样回收率在 98.7%~99.6% 之间, RSD 均小于 3% (n=6)。10 份“雪葎”药对共煎液中车叶草苷酸、木犀草苷、芦丁和大波斯菊苷含量范围分别为 0.249 4~0.402 8 mg · g⁻¹, 0.109 1~0.238 9 mg · g⁻¹, 0.045 9~0.076 8 mg · g⁻¹, 0.091 4~0.173 7 mg · g⁻¹。雪葎药对配伍后, 共煎液中木犀草苷、芦丁和大波斯菊苷含量均降低, 降低幅度分别为 296.40%, 47.86% 和 25.02%, 而车叶草苷酸的含量增加, 增长幅度为 8.81%, 其中大波斯菊苷的含量降低具有统计学意义 (P < 0.05), 木犀草苷和芦丁的含量降低具有显著统计学差异 (P < 0.01)。**结论** 所建立的“雪葎”药对共煎液 HPLC 指纹图谱和含量测定方法灵敏度高、专属性强, 可以用于该药对的质量控制, 该方法也为其配伍机制和药理研究奠定了基础。

【关键词】 六月雪; 葎草; 药对; 指纹图谱; 定量分析

Fingerprints and quantitative analysis of multi-index constituents in *Serissa Japonica* and *Humulus Scandens* drug pair

Ling FAN¹, Xin WANG¹, Yu-Long WANG², Jiao-Li ZHU¹, Hao YIN¹, Yi XUE¹, Qing-Jiang JIN¹, Guo-Xin CHEN¹

1. Suzhou Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Suzhou 215101, Jiangsu Province, China

2. Hanlin College, Nanjing University of Chinese Traditional Medicine, Nanjing 225300, China

Corresponding author: Guo-Xin CHEN, Email: 13338009589@163.com

【Abstract】Objective To establish the HPLC fingerprint of the co-decoction of *Serissa japonica* and *Humulus scandens* (hereinafter referred to as “Xuelyu”) and

DOI: 10.12173/j.issn.1008-049X.202209301

基金项目: 江苏省中医药科技发展计划 (YB2020059)

通信作者: 陈国新, 主任药师, Email: 13338009589@163.com

https://zgys.whuzhmedj.com

conduct multi-component quantitative analysis to evaluate the quality of "Xuelyu" drug pair. **Methods** Agilent EC-C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 4 μm) was used for detection. Methanol-0.1% aqueous phosphoric acid solution was used as mobile phase and eluted gradiently; the flow rates were 1.0 mL·min⁻¹ for 0-30 min and 0.6 mL·min⁻¹ for 30-65 min; the detection wavelengths were 350 nm and 240 nm; the column temperature was 30 °C. The "Similarity Evaluation system Software for Traditional Chinese Medicine Fingerprint (2012.1) Edition" co-decoction solution of "Xuelyu" drug pair was evaluated by similarity evaluation, The four index components were quantitatively analyzed and compared before and after compatibility. **Results** In the study of characteristic fingerprintgraph, 12 common peaks were calibrated, with No.4 peak as the reference peak, 10 batches of "Xuelyu" drug pairs had good similarity between the common decoction solution and the common mode control graph, and the similarity was above 0.9; under the established chromatographic conditions, the components had a good linear relationship, and the average dosing recovery rate was between 98.7% and 99.6%. *RSD* values were all less than 3% (*n*=6). The contents of plantain glycolate, luteolin, rutin and cosmos in the 10 batches of "Xuelyu" drug pairs in the co-decoction ranges were 0.249 4-0.402 8 mg·g⁻¹, 0.109 1-0.238 9 mg·g⁻¹, 0.045 9-0.076 8 mg·g⁻¹, 0.091 4-0.173 7 mg·g⁻¹, respectively. After the combination of drug pairs, the contents of luteolin, rutin and cosmopolitan in the decoction were all decreased, and the decreasing rates were 296.40%, 47.86% and 25.02%, respectively, while the content of plantain glycolate was increased and the increasing rate was 8.81%.The content of cosmopolitan was significantly decreased (*P*<0.05), and the content of luteolin and rutin was significantly decreased (*P*<0.01). **Conclusion** The established HPLC fingerprint and content determination method of co-decoction solution have high sensitivity and strong specificity which can be used for the quality control of the drug pair and also laid the foundation for its compatibility mechanism and pharmacological research.

【Keywords】 *Serissa japonica*; *Humulus scandens*; Drugpair; Fingerprint; Quantitative analysis

六月雪 *Serissa japonica* (Thunb.) Thunb. 首载于《本草拾遗》，味苦、微甘，性凉，具备祛风散寒、清热润肺，消肿利咽、益气健脾、止血消疮的功效，可用于风湿痛、急慢性肝炎、肾盂肾炎、水肿、痞积、痢疾等疾病^[1]。葎草 *Humulus scandens* (Lour.) Merr. 首次出现在魏晋南北朝的《名医别录》中，以“勒草”为药名收载，而唐朝《新修本草》中第一次以“葎草”作为药用名称记载^[2]，其味甘，性寒，具有抑菌、抗结核病、抗骨质疏松、抗腹渴、抗肿瘤等功效^[3]。六月雪-葎草（以下简称“雪葎”）药对是江苏省名老中医金庆江的经典药对，两者配伍相须为用，是我院肾病科临床常用药对，用于治疗糖尿病肾病。

课题组前期查阅大量文献资料发现，六月雪的主要化学成分包括车叶草苷酸、齐墩果酸等^[4]，葎草的主要化学成分包括木犀草苷^[5]、芦丁^[6]、大波斯菊苷^[7]等。相关文献较多涉及六月雪、葎草单味药的定量及指纹图谱分析^[8-9]，很少涉及“雪葎”药对指纹图谱及定量分析研究^[10]。为保证“雪葎”药对的临床疗效，全面反映药对信息，本文采用 HPLC 法建立“雪葎”药对指纹图谱，并对其主要药效成分车叶草苷酸、木犀草苷、芦丁和大波斯菊苷的含量作定量分析研究，本试验还对“雪葎药对配伍前后指标成分的含量变化并分析其指纹图谱的变化”进行研究，为药对配伍前后在体内药物代谢动力学过程奠定基础，从而指导临床合理用药。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (安捷伦科技公司); FA2004 型十万分之一天平 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司); GM-0.33A 型隔膜真空泵 (天津市津腾试验设备有限公司); B-260 型恒温水浴锅 (上海亚荣生化仪器厂); KQ5200 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); DW-2 型调温电热套 (通州市张芝山镇决心化工电器厂)。

1.2 试药

车叶草苷酸对照品 (批号: 22030202, 纯度 99.6%)、木犀草苷对照品 (批号: 20060301,

纯度 99.34%)、芦丁对照品 (批号: 21010803, 纯度 98.93%)、大波斯菊苷对照品 (批号: 21053112, 纯度 98.47%) 均购自于成都普菲德生物技术有限公司。

磷酸 (色谱纯, 批号: 13040910475, 南京化学试剂有限公司); 甲醇 (色谱纯, 批号: 20200801, 上海展云化工有限公司); 超纯水由苏州市中西医结合医院中心实验室提供。

葎草和六月雪饮片购于安徽亳州药材市场, 经苏州市中西医结合医院顾琴华主任中药师鉴定, 分别为茜草科六月雪 *Serissa japonica* (Thunb.) Thunb. 的全草和桑科葎草 *Humulus scandens* (Lour.) Merr. 的全草, 饮片产地和批号见表 1。

表1 葎草和六月雪饮片的产地和批号信息

Table 1. Origin and batch numbers of *Serissa japonica* and *Humulus scandens*

编号	六月雪		葎草	
	产地	批号	产地	批号
1	四川眉山	211201	安徽亳州	210706
2	湖北麻城	211103	安徽淮北	201001
3	湖北黄冈	210805	安徽铜陵	210402
4	湖北黄冈	210201	安徽铜陵	210903
5	四川眉山	211201	安徽淮北	201001
6	四川眉山	211201	安徽淮北	201204
7	四川眉山	211201	安徽铜陵	210402
8	四川眉山	211201	安徽铜陵	210903
9	湖北麻城	211103	安徽亳州	210706
10	湖北黄冈	210805	安徽亳州	210706

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent EC-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 4 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱 (0~15 min, 16% 甲醇; 15~30 min, 16%~32% 甲醇; 30~50 min, 32% 甲醇; 50~65 min, 32%~45% 甲醇); 流速: 0~30 min, 1.0 mL · min⁻¹; 30~65 min, 0.6 mL · min⁻¹; 检测波长: 0~7 min, 350 nm; 7~25 min, 240 nm; 25~65 min, 350 nm; 柱温: 30℃; 进样量: 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液

分别精密称取车叶草苷酸、木犀草苷、芦丁、大波斯菊苷对照品适量, 加 50% 甲醇超声处理 (功率: 200 W, 频率: 40 kHz) 使完全溶解, 定容

后制成浓度分别 308, 68, 40, 72 μg · mL⁻¹ 的对照品混合溶液。

2.2.2 “雪葎”药对共煎液

分别称取六月雪 20 g, 葎草 10 g, 根据前期研究^[4]确定的最优水提方法: 加 15 倍量水, 提取 1.5 h, 共提取 3 次。将回流提取液过滤后合并、浓缩作为共煎液。

2.2.3 “雪葎”药对共煎供试品溶液

精密吸取上述药对共煎液 100 mL 置于蒸发皿中, 水浴蒸干后加 50% 甲醇溶解, 定容至 25 mL 量瓶中, 超声处理 (功率: 200w, 频率: 40 kHz) 20 min 后, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过至液相瓶中进样。

2.2.4 六月雪单煎供试品溶液

称取六月雪 20 g, 按“2.2.2”项下方法制得六月雪水煎液, 再按“2.2.3”项下方法操作,

制得六月雪单煎供试品溶液。

2.2.5 葎草单煎供试品溶液

称取葎草 10 g, 按“2.2.2”项下方法制得葎草水煎液, 再按“2.2.3”项下方法操作, 制得葎草单煎供试品溶液。

2.3 HPLC指纹图谱方法学考察

2.3.1 精密度试验

取同一雪葎药对共煎供试品溶液(六月雪批号: 210805; 葎草批号: 210706), 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图。以 4 号峰为参比峰, 得“雪葎”药对共煎供试品 12 个共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.01%~0.75%, 相对峰面积的 RSD 为 0.35%~2.79% ($n=6$), 结果表明仪器的精密度良好。

2.3.2 稳定性试验

取同一“雪葎”药对共煎供试品溶液(六月雪批号: 210805; 葎草批号: 210706), 按“2.1”项下色谱条件, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 依次进样, 记录色谱图。以 4 号峰为参比峰, 得“雪葎”药对共煎供试品 12 个共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.2%~1.07%, 相对峰面积的 RSD 为 0.26%~2.81% ($n=8$), 表明“雪葎”药对供试液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验

取同一批次六月雪、葎草各 6 份(六月雪批号: 210805; 葎草批号: 210706), 每份六月雪 20 g, 葎草 10 g, 按“2.2.2”和“2.2.3”项下方法制备

“雪葎”药对共煎供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图。以 4 号峰为参比峰, 得到“雪葎”药对共煎供试品的 12 个共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.05%~2.77%, 相对峰面积的 RSD 为 0.17%~2.72% ($n=6$), 结果表明, 该方法重复性良好。

2.4 “雪葎”药对指纹图谱的建立及相似度评价

2.4.1 共有峰的确定

取表 1 中 10 份六月雪-葎草饮片, 每份六月雪 20 g, 葎草 10 g, 按“2.2.2”和“2.2.3”项下方法制备“雪葎”药对共煎供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱结果, 标记为 S1~S10。将 S1~S10 色谱图通过《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012.1 版)》生成对照图谱并进行分析, 10 批不同产地饮片的指纹图谱见图 1。计算其相似度, 结果见表 2。根据指纹图谱特点, 标定了其中 12 个色谱峰为共有峰, 4 号峰形较好, 保留时间恰当, 故选为参照峰。10 批“雪葎”药对指纹图谱的相似度为 0.901~0.999, 均大于 0.9, 表明不同批次六月雪-葎草的化学成分具有较好的一致性。

2.4.2 指纹图谱色谱峰的标定

精密取“2.2.1”项下的混合对照品溶液 10 μ L, 进样测定, 得到混合对照品色谱图。混合对照品色谱图与“雪葎”药对色谱图的比较结果见图 2。

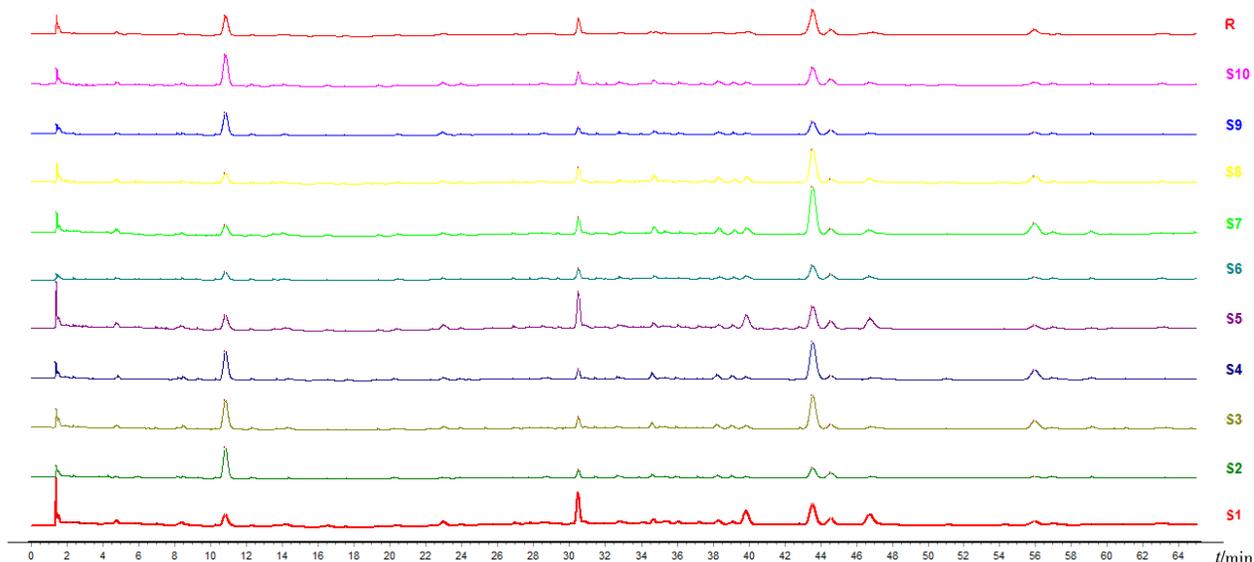


图1 10批“雪葎”药对共煎液的HPLC指纹图谱

Figure 1. HPLC fingerprint of the co-decoction of "Xueyu" drug pair

表2 10 批饮片 HPLC指纹图谱的相似度数据

Table 2. Similarity data of HPLC fingerprints of 10 batches of decoction pieces

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照
S1	1.000										
S2	0.992	1.000									
S3	0.974	0.990	1.000								
S4	0.910	0.955	0.964	1.000							
S5	0.928	0.967	0.980	0.997	1.000						
S6	0.952	0.907	0.878	0.742	0.775	1.000					
S7	0.945	0.898	0.867	0.727	0.760	1.000	1.000				
S8	0.998	0.993	0.984	0.916	0.936	0.948	0.940	1.000			
S9	0.954	0.982	0.994	0.986	0.995	0.827	0.813	0.963	1.000		
S10	0.993	0.997	0.994	0.941	0.958	0.922	0.913	0.997	0.980	1.000	
对照	0.991	0.999	0.995	0.955	0.969	0.906	0.901	0.994	0.986	0.999	1.000

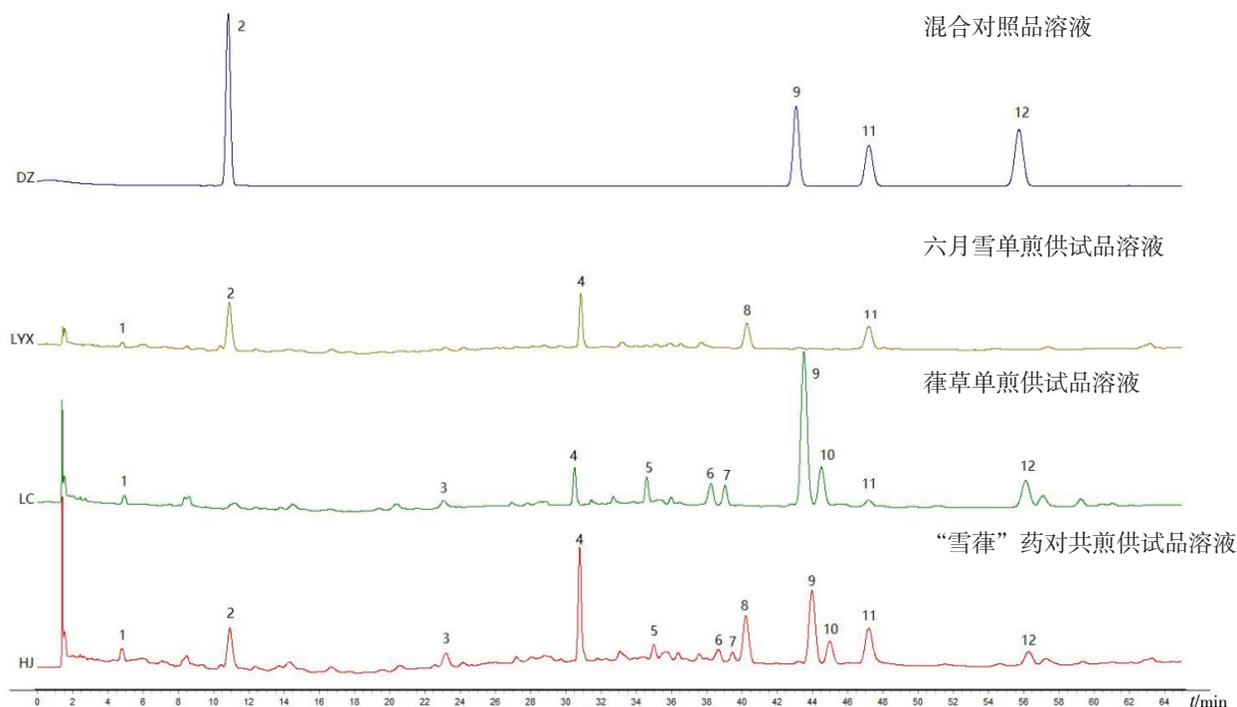


图2 混合对照品和“雪葎”药对共煎供试品溶液的 HPLC 色谱图

Figure 2. HPLC diagram of the co-decoction of "Xueyu" drug pair

注：2-车叶草苷酸；9-木犀草苷；11-芦丁；12-大波斯菊苷

2.4.3 指纹图谱色谱峰的归属

取六月雪单煎供试品溶液、葎草单煎供试品溶液及“雪葎”药对共煎供试品溶液分别进样，确定六月雪、葎草配伍后色谱峰的归属，结果见图 3。由图 3 可以看出，1、2、4、8、11 号峰来源于六月雪，1、3、4、5、6、7、9、10、11、12 号峰来源于葎草，由此得出 1、4、11 号峰同时来自六月雪和葎草。

2.5 “雪葎”药对中4个有效成分含量测定

2.5.1 专属性试验

分别精密吸取“2.2”项下制备的混合对照品溶液、六月雪、葎草单煎供试品溶液和“雪葎”药对共煎供试品溶液各 10 μL，按“2.1”项下色谱条件测定。结果 4 个有效成分与相邻色谱峰之间的分离度均符合要求，各阴性样品溶液色谱图显示在相应色谱峰位置对分析结果无干扰，说明该色谱系统专属性较好。色谱图见图 2。

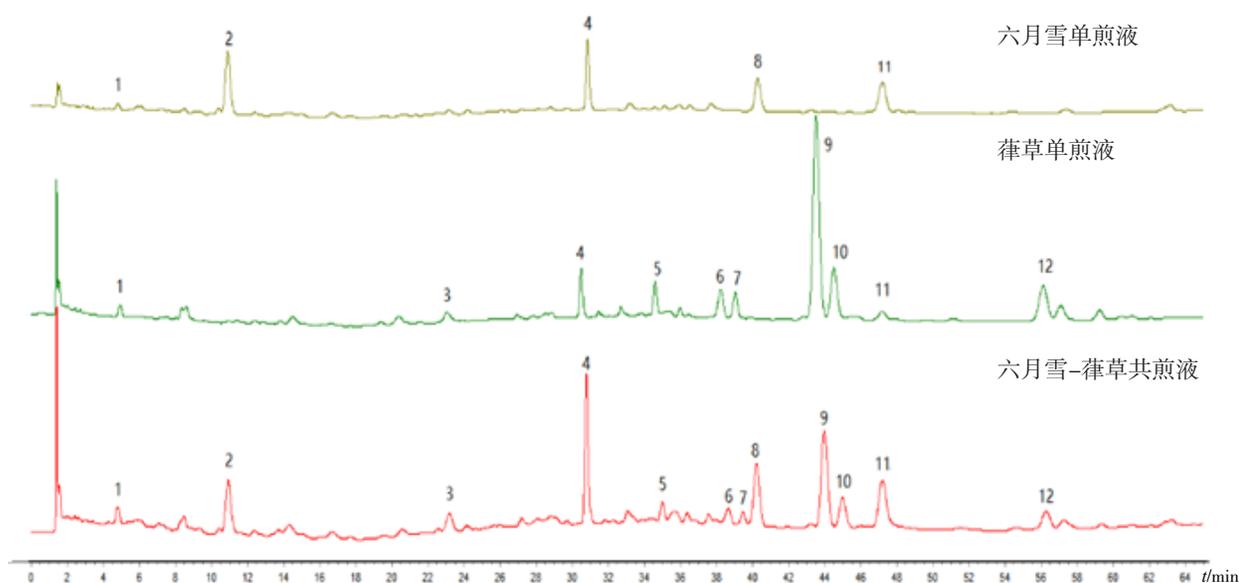


图3 六月雪、葎草单煎供试品溶液和“雪葎”药对共煎供试品溶液的 HPLC 色谱图

Figure 3. HPLC diagram of *Serissa japonica*, *Humulus scandens* single decoction and the co-decoction of "Xuelyu" drug pair

2.5.2 线性关系考察

将“2.2.1”项下对照品混合溶液用 50% 的甲醇分别稀释 0, 5, 10, 15, 25 倍, 按“2.1”项下色谱条件依次进样, 以峰面积为 (Y) 为纵坐标, 浓度 (X , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标^[11] 进行线性回归, 得出车叶草苷酸、木犀草苷、芦丁、大波斯菊苷的标准曲线方程及线性范围, 见表 3。各指标性成分于各自范围内的线性关系均良好。

2.5.3 精密度试验

取“2.5.1”项下制备的同一浓度对照品混合溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 结果车叶草苷酸、木犀草苷、芦丁、大波斯菊苷峰面积的 RSD 分别为 0.63%, 0.42%, 0.45%, 0.41% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.5.4 稳定性试验

取同一“雪葎”药对共煎供试品溶液 (编号: 10), 按“2.1”项下色谱条件, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 依次进样, 结果车叶草苷酸、木犀草苷、芦丁、大波斯菊苷峰面积的 RSD 分别

为 2.03%、1.70%、2.31%、0.99% ($n=8$), 表明“雪葎”药对共煎供试品在 24 h 内稳定性良好。

2.5.5 重复性试验

取同一批次六月雪、葎草各 6 份 (编号: 10), 按“2.2.2”和“2.2.3”项下方法制备“雪葎”药对共煎供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 计算车叶草苷酸、木犀草苷、芦丁、大波斯菊苷的含量, 结果 4 个指标性成分含量平均值分别为 0.378 0, 0.224 1, 0.070 5, 0.168 8 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD 分别为 3.75%, 1.65%, 2.84%, 3.29% ($n=6$)。表明此法重复性良好。

2.5.6 加样回收试验

配制含车叶草苷酸、木犀草苷、芦丁、大波斯菊苷浓度分别为 1.6, 1.1, 0.4, 0.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加样回收混合对照品溶液。取“2.2.2”和“2.2.3”项下方法制备的“雪葎”药对共煎供试品溶液 6 份, 按“2.1”项下色谱条件测定, 计算车叶草苷酸、木犀草苷、芦丁、大波斯菊苷的含量。精密吸取已知指标性成分含量的上述 6 份“雪葎”共煎液

表3 4个指标性成分的回归方程及线性范围

Table 3. Regression equations and linear ranges of the four index components

成分	回归方程	r	线性范围 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
车叶草苷酸	$Y=14.38X-3.194$	1.000 0	12.32~308.00
木犀草苷	$Y=41.05X-10.386$	1.000 0	2.72~68.00
芦丁	$Y=44.514X-5.628 9$	1.000 0	1.60~40.00
大波斯菊苷	$Y=37.295X-3.724 5$	1.000 0	2.88~72.00

各 100 mL, 分别加入 1 mL 上述加样回收混合对照品溶液。按“2.2.3”项下方法制备 6 份“雪菴”药对加样回收供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定指标性成分的含量, 计算加样回收率。结果车叶草苷酸、木犀草苷、芦丁和大波斯菊苷的平均加样回收率分别为 99.6%, 98.8%, 98.7%, 99.0%, RSD 分别为 2.87%, 2.89%, 2.55%, 2.96% ($n=6$)。4 种成分的回收率均符合相关规定。

2.5.7 样品含量测定

取 S1-S10 批六月雪 20 g- 菴草 10 g、六月雪 20 g、菴草 10 g, 平行 3 份, 按“2.2.2”和“2.2.3”项下方法制备雪菴药对共煎供试品溶液 (GJ1-10)、六月雪单煎供试品溶液 (LYX1-10)、菴

草单煎供试品溶液 (LC1-10), 按“2.1”项下色谱条件测定, 计算每份供试品中车叶草苷酸、木犀草苷、芦丁、大波斯菊苷的含量, 结果见表 4。

2.5.8 雪菴药对配伍前后指标性成分含量变化

用 SPSS 17.0 对不同组别间的浓度测定结果进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。雪菴药对配伍后, 共煎液中木犀草苷、芦丁和大波斯菊苷含量均降低, 降低幅度分别为 296.40%、47.86% 和 25.02%, 而车叶草苷酸的含量增加, 增长幅度为 8.81%, 其中大波斯菊苷的含量降低具有统计学意义 ($P < 0.05$), 木犀草苷和芦丁的含量降低具有显著统计学差异 ($P < 0.01$)。结果见表 5。

表4 各成分含量测定结果($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=10$)

Table 4. Content determination results of each component ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=10$)

编号	车叶草苷酸	木犀草苷	芦丁	大波斯菊苷
GJ1	0.249 4	0.125 6	0.075 8	0.105 4
GJ2	0.335 8	0.135 8	0.066 0	0.102 5
GJ3	0.402 8	0.142 3	0.076 0	0.097 5
GJ4	0.331 2	0.159 3	0.064 7	0.109 5
GJ5	0.344 0	0.118 3	0.071 1	0.091 4
GJ6	0.317 2	0.109 1	0.053 2	0.101 1
GJ7	0.402 6	0.235 7	0.045 9	0.162 6
GJ8	0.337 4	0.238 9	0.073 6	0.173 7
GJ9	0.378 0	0.173 1	0.076 8	0.135 0
GJ10	0.395 3	0.222 9	0.071 1	0.170 2
LYX1	0.366 6	0.014 2	0.082 8	-
LYX2	0.307 3	0.015 5	0.067 9	-
LYX3	0.365 0	0.015 0	0.071 0	-
LYX4	0.378 3	0.015 4	0.074 6	-
LYX5	0.375 5	0.016 2	0.073 2	-
LYX6	0.419 8	0.016 3	0.075 8	-
LYX7	0.353 0	0.020 5	0.094 2	-
LYX8	0.268 5	0.014 5	0.069 1	-
LYX9	0.315 7	0.022 3	0.107 4	-
LYX10	0.364 8	0.019 7	0.083 2	-
LC1	-	0.574 0	0.022 2	0.145 3
LC2	-	0.592 9	0.022 1	0.135 7
LC3	-	0.639 1	0.027 7	0.159 0
LC4	-	0.532 9	0.026 5	0.128 8
LC5	-	0.693 8	0.027 5	0.172 3
LC6	-	0.469 3	0.020 8	0.116 6
LC7	-	0.927 1	0.032 2	0.221 8
LC8	-	0.685 4	0.026 1	0.157 0
LC9	-	0.675 4	0.030 4	0.166 8
LC10	-	0.637 6	0.026 1	0.158 0

表5 雪菴药对配伍前后多指标成分的平均含量变化 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 5. Average Content Changes of Multiple Index Components before and after Compatibility of "Xuelyu" drug pair ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

指标成分	LYX	LC	LYX+LC	GJ
车叶草苷酸	0.318 6 ± 0.102 4	—	0.318 6 ± 0.102 4	0.349 4 ± 0.045 1
木犀草苷	0.015 6 ± 0.005 4	0.642 8 ± 0.116 5	0.658 4 ± 0.118 0 ^b	0.166 1 ± 0.047 0 ^b
芦丁	0.073 5 ± 0.024 9	0.026 1 ± 0.003 5	0.099 7 ± 0.025 7 ^b	0.067 4 ± 0.009 8 ^b
大波斯菊苷	—	0.156 1 ± 0.027 5	0.156 1 ± 0.027 5 ^a	0.124 9 ± 0.030 8 ^a

注: 与 GJ组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

试验使用紫外全波长扫描,发现车叶草苷酸、木犀草苷、芦丁和大波斯菊苷的最大吸收波长分别为 237, 350, 355, 348 nm, 通过对比色谱峰数量与质量,并能保证在一定时间内各指标性成分都能于最大吸收波长时出峰,且互不影响^[12],选择多波长切换法^[13],检测波长为 0~7 min, 350 nm(使基线更加平稳); 7~25 min, 240 nm(检测车叶草苷酸); 25~65 min, 350 nm(检测木犀草苷、芦丁、大波斯菊苷)。试验考察了 1.0, 0.8, 0.6, 0.4 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 4 个流速,发现 0~30 min 内选择 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 且 30~65 min 内选择 0.6 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,出峰时间适中,洗脱效果较好。比较了甲醇-0.1% 磷酸水、乙腈-水等度和不同比例梯度洗脱,发现甲醇-0.1% 磷酸水梯度洗脱可以使雪菴药对成分得到比较好的分离,故本试验选用甲醇-0.1% 磷酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱。

3.2 指标性成分的选择

菴草化学成分复杂,主要包括黄酮类、多糖类、香豆素类等。黄酮类中主要包括大波斯菊苷、芦丁、木犀草苷、木犀草素,具有抑菌、抗结核病、抗骨质疏松、抗腹渴、抗肿瘤等功效^[3]。六月雪中化学成分复杂,主要包括甾体类、木质素类、萜类等。萜类中的齐墩果酸、车叶草苷酸多次在文献中以指标性成分出现,能够作为质量标准考察的重要指标。故预试验中选用木犀草苷、木犀草素、大波斯菊苷、齐墩果酸、车叶草苷酸作为指标性成分。预试验结果显示木犀草素峰面积过低,齐墩果酸分离效果不好,故最终选用车叶草苷酸、木犀草苷、芦丁和大波斯菊苷作为指标性成分。

3.3 溶剂浓度对峰形的影响

根据各个对照品自身不同性质,往往采用的是不同的溶剂来溶解以达到更好的试验效果。本试验中选取的 4 个对照品根据已有文献查阅整理,常使用的溶剂有水、甲醇、50% 甲醇,或直接加入流动相来溶解。本试验综合考察色谱峰峰形、分离度等因素,最终选取 50% 甲醇作为溶剂。

3.4 小结

本研究采用 HPLC 法建立“雪菴”药对指纹图谱,以及车叶草苷酸、木犀草苷、芦丁和大波斯菊苷 4 个有效成分含量测定方法,经准确、有效的方法学(如:精密度、重复性、稳定性、加样回收率等)考察,为雪菴药对中有有效成分的定性及定量分析提供科学依据,本研究还通过比较雪菴药对配伍前后指标性成分的变化,为药对配伍前后在体内药物代谢动力学过程奠定基础,从而指导临床合理用药。

参考文献

- 1 韩晶晶,柳航,郭培,等.六月雪全草化学成分研究[J].中药材,2016,39(1):94-97.[Han JJ, Liu H, Guo P, et al. Chemical constituents from *Serissa japonica*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2016, 39(1): 94-97.] DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2016.01.022.
- 2 孙婉萍,谢明,康廷国,等.菴草的本草考证[J].中国药房,2021,32(5):630-634.[Sun WP, Xie M, Kang TG, et al. Research on *Humulus scandens*[J]. Chinese Pharmacy, 2021, 32(5): 630-634.] DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.05.21.
- 3 郭兆娟,袁一平,孔李婷,等.中国商品学会第五届全国中药商品学术大会论文集[C].2017:299-301.
- 4 李洪亮,程齐来,王铮,等.赣南六月雪质量标准研究[J].赣南医学院学报,2015,35(3):346-349.[Li HL,

- Cheng QL, Wang Z, et al. The study of quality standard of *Gannan Serissa serissoides*(DC.)[J]. Journal of Gannan Medical College, 2015, 35(3): 346–349.] DOI: 10.3969/j.issn.1001-5779.2015.03.004.
- 5 陈静梅,董丽艳,李冰韶,等. 葎椒口服液质量标准研究[J]. 今日药学, 2018, 28(11): 740–744. [Chen JM, Dong LY, Li BS, et al. Study of quality standard for Lyujiao oral liquid[J]. Pharmacy Today, 2018, 28(11): 740–744.] DOI: 10.12048/j.issn.1674-229X.2018.11.006.
- 6 才志阳,郭伟英. 紫外分光光度法测定葎草总黄酮含量的不确定度评定[J]. 锦州医科大学学报, 2019, 40(1): 17–21. [Cai ZY, Guo WY. Evaluation of uncertainty on the determination of total flavones in *Humulus scandens* by UV spectrophotometry [J]. Journal of Jinzhou Medical University, 2019, 40(1): 17–21.] DOI:10.13847/j.cnki.ljmu.2019.01.005.
- 7 陈再兴,孟舒,朱旭,等. 葎草不同部位中木犀草素-7-O-位中木犀葡萄糖苷和大波斯菊苷的含量测定[J]. 中国药事, 2011, 25(6): 547–549. [Chen ZX, Meng S, Zhu X, et al. Determination of luteolin-7-O-β-D-glucoside and cosmosiin of different parts in *Humulus scandens*[J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2011, 25(6): 547–549.] DOI: CNKI:SUN:ZGYS.0.2011-06-007.
- 8 庄星星,倪受东,陈明,等. “细辛-干姜”药对配伍前后指纹图谱变化及其多指标成分的定量分析[J]. 中医药临床杂志, 2021, 33(5): 927–932. [Zhuang XX, Ni SD, Chen M, et al. Change of fingerprints and quantitative analysis of multi-index constituents in asari *Radix et rhizoma* and dried ginger drug pair before and after compatibility[J]. Clinical Journal of Traditional Chinese Medicine, 2021, 33(5): 927–932.] DOI: 10.16448/j.cjtem.2021.0532.
- 9 朱红霞,邓兆盈,姚佳玉,等. 葎草药材 HPLC 指纹图谱的初步研究[J]. 今日药学, 2015, 25(12): 830–833.[Zhu HX, Deng ZY, Yao JY, et al. HPLC fingerprint of *Humulus scandens*[J]. Pharmacy Today, 2015, 25(12): 830–833.] DOI: CNKI:SUN:YAXU.0.2015-12-007.
- 10 范玲,王鑫,胡风华,等. 正交试验与响应面法优选六月雪-葎草药对提取工艺比较[J]. 中国药业, 2021, 30(10): 40–44. [Fan Ling, Wang Xin, Hu Fenghua, et al. Comparison of extraction techniques for *Humulus scandens* from *Humulus scandens* Herb by orthogonal test and response surface method[J]. China Pharmaceuticals, 2021, 30(10): 40–44.] DOI: 10.3969/j.issn.1006-4931.2021.10.010.
- 11 田伟,甄亚钦,董秋菊,等. 车前子煎煮过程中 4 种化学成分含量变化规律研究[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(16): 5. [Tian W, Zhen YQ, Dong QJ, et al. Variation of four chemical components in plantaginis semen during decoction process[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2018, 27(16): 1927–1931.] DOI: CNKI:SUN:ZXYZ.0.2018-16-018.
- 12 王琳,蒋燕萍,江华娟,等. 经典名方身痛逐瘀汤物质基准 UPLC 指纹图谱建立及其 5 种成分含量测定[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(2): 334–342. [Wang L, Jiang YP, Jiang HJ, et al. UPLC fingerprint and determination of five components of substance benchmark of classical prescription Shentong Zhuyu decoction[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, 47(2): 334–342.] DOI: 10.19540/j.cnki.cjmm.20210319.302.
- 13 戴丽娜,刘益庆,陈泳君. 基于波长切换法测定参三七伤药胶囊(片)中松香酸和苏丹红 IV 的含量[J]. 中国药师, 2022, 25(1): 150–154. [Dai LN, Liu YQ, Chen YJ. Determination of abietic acid and sudan IV in ShenSanqi Shangyao capsules (tablets) by HPLC wavelength swiching method[J]. China Pharmacists, 2022, 25(1): 150–154.] DOI: 10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.01.029.

收稿日期: 2022 年 09 月 07 日 修回日期: 2023 年 05 月 06 日
本文编辑: 周璐敏 钟巧妮