

基于UPLC特征图谱和2种成分含量测定的皂角刺药材质量评价



位翠杰^{1,2}, 刘晓霞^{1,2}, 冯涌微^{1,2}, 张芳平^{1,2}, 段志文^{1,2}, 谢文凯^{1,2}, 夏天睿^{1,2}, 李振雨^{1,2}, 何民友^{1,2}, 陈向东^{1,2}, 孙冬梅^{1,2}

1. 广东一方制药有限公司 (广东佛山 528244)
2. 广东省中药配方颗粒企业重点实验室 (广东佛山 528244)

【摘要】目的 建立皂角刺药材超高效液相色谱 (UPLC) 特征图谱及测定东莨菪内酯、花旗松素含量的方法, 为全面评价皂角刺药材的质量提供参考。**方法** 采用 UPLC 法建立了皂角刺药材特征图谱并同时测定东莨菪内酯、花旗松素 2 种有效成分含量的方法。根据特征图谱和含量测定结果, 对 17 批皂角刺药材进行聚类分析, 并对不同产地药材和常见伪品进行对比分析。**结果** 建立皂角刺药材特征图谱, 确定 8 个特征峰, 经质谱分析及与对照品比对, 确认其中 6 个特征峰的成分, 分别为原儿茶醛、东莨菪苷、东莨菪内酯、花旗松素、牡荆素和异牡荆素; 17 批皂角刺药材被为两类; 河南省洛阳市产地药材含量较高, 陕西省和四川省产地药材中花旗松素含量较低; 所建立特征图谱和含量测定方法均能对其常见的 4 种伪品进行快速、有效地区分鉴别。**结论** 该方法为建立完善的皂角刺药材质量标准及全面评价其质量提供参考。

【关键词】 皂角刺; 超高效液相色谱特征图谱; 东莨菪内酯; 花旗松素; 伪品

【中图分类号】 R284.1

【文献标识码】 A

Quality evaluation of Gleditsiae spina based on UPLC specific chromatogram and two components determination

WEI Cuijie^{1,2}, LIU Xiaoxia^{1,2}, FENG Yongwei^{1,2}, ZHANG Fangping^{1,2}, DUAN Zhiwen^{1,2}, XIE Wenkai^{1,2}, XIA Tianrui^{1,2}, LI Zhenyu^{1,2}, HE Minyou^{1,2}, CHEN Xiangdong^{1,2}, SUN Dongmei^{1,2}

1. Guangdong Yi Fang Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528244, Guangdong Province, China

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Foshan 528244, Guangdong Province, China

Corresponding author: LI Zhenyu, Email: lzy1083656123@126.com

【Abstract】Objective To establish ultra performance liquid chromatography (UPLC) specific chromatogram of Gleditsiae spina, determine the contents of scopoletin and taxifolin, and provide reference for comprehensively evaluating the quality of Gleditsiae spina. **Methods** The UPLC method was used to establish the specific chromatogram of Gleditsiae spina and determine the contents of two active components, scopoletin and taxifolin. According to the specific chromatogram and component determination results, clustering analysis was performed on 17 batches of Gleditsiae spina,

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202409023

基金项目: 2022 年产业技术基础公共服务平台项目 - 中药全产业链质量技术服务平台建设 (2022-230-221); 2022 年佛山市南海区重点领域科技攻关专项项目

通信作者: 李振雨, 硕士, 副主任中药师, Email: lzy1083656123@126.com

and comparative analysis was performed on medicinal materials from different origins and common counterfeits. **Results** The specific chromatogram of *Gleditsiae spina* was established, with 8 characteristic peaks identified. After mass spectrometry analysis and comparison with reference substances, it was confirmed that the components of 6 characteristic peaks were protocatechualdehyde, scopolin, scopoletin, taxifolin, vitexin and isovitexin. The 17 batches of *Gleditsiae spina* were divided into two categories, the content of *Gleditsiae spina* was higher in Luoyang, Henan province, and the content of taxifolin in *Gleditsiae spina* was lower in Shaanxi Province and Sichuan Province. The method of characteristic spectrum and content determination can be used to quickly and effectively distinguish the common 4 counterfeits. **Conclusion** This method can provides reference for establishing a comprehensive quality standard for *Gleditsiae spina* and comprehensively evaluating its quality.

【Keywords】 *Gleditsiae spina*; Ultra performance liquid chromatography specific chromatogram; Scopoletin; Taxifolin; Counterfeit

皂角刺为豆科植物皂荚 *Gleditsia sinensis* Lam. 的干燥棘刺，其又名天丁、皂荚刺、皂角针等，为中国传统中药之一，具有消肿托毒、排脓、杀虫的功效，用于痈疽初起或脓成不溃；外治疥癣麻风等症^[1]。皂角刺含有黄酮类（花旗松素、牡荆素等）、香豆素类（东莨菪苷、东莨菪内酯等）、酚酸类等化学成分^[2-3]，其中黄酮类和香豆素类为皂角刺具有多种药理活性的主要成分，如抗肿瘤、抗病毒、抗炎抗菌、抗氧化、调节免疫等^[4-7]。

中药材指纹/特征图谱能全面地体现其复杂的化学成分，故被广泛用于药材的质量评价及伪品鉴别。由于皂角刺的物质基础研究薄弱，化学成分复杂且含量较低，因此，对其指纹/特征图谱的研究存在一定的挑战。现有报道的皂角刺指纹/特征图谱的研究，主要集中在黄酮和酚酸类上，而主要活性成分香豆素类等成分均未能表征，不能全面反映皂角刺药材内在质量^[8-9]。《中国药典（2020年版）》一部皂角刺药材项下仅规定其性状、显微特征鉴别和薄层色谱鉴别，其特征图谱和含量测定项均缺失；此外，随着皂角刺药材广泛使用，市场不断出现其伪品，亟需建立完善的皂角刺药材质量标准，进而全面评价药材质量及快速鉴别其真伪^[10-12]。因此，本研究建立皂角刺药材的超高效液相色谱（ultra performance liquid chromatography, UPLC）特征图谱并对活性成分东莨菪内酯和花旗松素的含量进行测定，采用相似度评价和聚类分析对17批药材进行分析，并对其4种常见伪品的特征图谱和含量进行质量分析及鉴别，为建立完善的皂角刺药材质量标准提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Vanquish 超高效液相色谱仪和 Vanquish Flex 超高效液相-Thermo Fisher QE 高分辨质谱联用仪购自赛默飞世尔科技有限公司；JJ600 百分之一电子分析天平（常熟市双杰测试仪器厂）；ME204E 万分之一电子分析天平和 XP26 百万分之一电子分析天平购自瑞士梅特勒-托利多公司；HWS28 型电热恒温水浴锅（上海一恒科技有限公司）；Milli-Q Direct 型超纯水系统（默克股份有限公司）。

1.2 主要药品与试剂

对照品原儿茶醛（批号：110810-201909，纯度 99.6%）、东莨菪内酯（批号：110768-202105，纯度 99.7%）、牡荆素（批号：111687-201704，纯度 94.9%）、花旗松素（批号：111816-201102，纯度 98.9%）均购自中国食品药品检定研究院；对照品东莨菪苷（批号：DST210115-056，纯度 98.0%）和异牡荆苷（批号：DSTDY005401，纯度 98.0%）购自乐美天有限公司；乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯；其余试剂均为分析纯；水为实验室自制超纯水。

从不同产地收集到 29 批药材，其中 17 批药材被广东一方制药有限公司副总经理孙冬梅主任中药师鉴定为豆科植物皂荚 *Gleditsia sinensis* Lam. 的干燥棘刺，且经检验均符合《中国药典（2020年版）》皂角刺项下的有关规定；另有 12 批皂角刺常见伪品，其中 3 批药材为野皂荚 *Gleditsia heterophylla* Bunge. 带枝条的棘刺，3 批药材为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill.

var. spinosa (Bunge) Hu ex H. F. Chow 的茎刺, 3 批药材为豆科植物华南皂荚 *Gleditsia fera* (Lour.) Merr. 的干燥棘刺, 3 批药材为豆科植物日本皂荚 *Gleditsia japonica* Miq. 的棘刺。17 批皂角刺药材及 12 批伪品产地信息见表 1。

表 1 29 批皂角刺药材及伪品药材信息表

Table 1. The source of 29 batches of *Gleditsiae spina* and counterfeits

编号	品名	产地信息
ZJC01	皂角刺	河南省洛阳市
ZJC02	皂角刺	河南省洛阳市
ZJC03	皂角刺	河南省洛阳市
ZJC04	皂角刺	河南省洛阳市
ZJC05	皂角刺	河南省洛阳市
ZJC06	皂角刺	河南省焦作市
ZJC07	皂角刺	河南省焦作市
ZJC08	皂角刺	河南省焦作市
ZJC09	皂角刺	山东省枣庄市
ZJC10	皂角刺	山东省枣庄市
ZJC11	皂角刺	山东省枣庄市
ZJC12	皂角刺	陕西省西安市
ZJC13	皂角刺	陕西省商洛市
ZJC14	皂角刺	陕西省商洛市
ZJC15	皂角刺	四川省成都市
ZJC16	皂角刺	四川省成都市
ZJC17	皂角刺	四川省成都市
YZJC01	野皂荚刺	河南省焦作市
YZJC02	野皂荚刺	河南省焦作市
YZJC03	野皂荚刺	河南省洛阳市
SZC01	酸枣刺	河北省石家庄市
SZC02	酸枣刺	河北省石家庄市
SZC03	酸枣刺	河南省周口市
HNZJC01	华南皂荚刺	广东省肇庆市
HNZJC02	华南皂荚刺	广东省肇庆市
HNZJC03	华南皂荚刺	广东省广州市
RBZJC01	日本皂荚刺	辽宁省大连市
RBZJC02	日本皂荚刺	辽宁省大连市
RBZJC03	日本皂荚刺	黑龙江省齐齐哈尔市

注: ZJC01~ZJC17 为皂角刺正品, 其余批次的皂角刺均为皂角刺伪品。

2 方法与结果

2.1 特征图谱的建立

2.1.1 色谱条件

采用 Thermo Acclaim C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 2.1 mm, 2.2 μm); 流动相为乙腈 - 甲醇 (1:1) (A) - 0.1% 甲酸溶液 (B), 梯度洗脱 (0~11 min, 5%~15% A; 11~26 min, 15%~18% A; 26~45 min, 18%~22% A); 流速为 0.35 mL/min; 柱温为 42 °C; 检测波长为 340 nm; 进样量为 2 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备

取原儿茶醛、东莨菪苷、东莨菪内酯、花旗松素、牡荆素、异牡荆素对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成分别含原儿茶醛 41.792 μg/mL、含东莨菪苷 84.633 μg/mL、含东莨菪内酯 85.423 μg/mL、含花旗松素 40.470 μg/mL、含牡荆素 42.667 μg/mL、含异牡荆素 126.457 μg/mL 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备

取皂角刺药材粉末 (过三号筛) 约 1.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加甲醇 15 mL, 称定质量, 加热回流 30 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 10 mL 使溶解, 转移至分液漏斗中, 再加氨水 10 mL, 洗涤液一并转移至分液漏斗中, 用 20 mL 正丁醇振摇提取 3 次, 合并正丁醇液, 蒸干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 精密度试验

取皂角刺药材 (编号: ZJC06) 粉末 (过三号筛), 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 以花旗松素 (峰 4) 为参照峰, 计算得各特征峰相对保留时间的 *RSD* 范围为 0.15%~0.79% ($n=6$), 相对峰面积的 *RSD* 范围为 1.51%~2.66% ($n=6$), 结果表明该仪器精密度良好。

2.1.5 重复性试验

取皂角刺药材 (编号: ZJC06) 粉末 (过三号筛), 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 平行 6 份, 再按“2.1.1”项下色谱条件进行测定, 以花旗松素 (峰 4) 为参照峰, 计算得各特征峰相对保留时间的 *RSD* 范围为 0.01%~0.03% ($n=6$), 相对峰面积的 *RSD* 范围为 2.42%~4.94% ($n=6$), 结果表明该方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验

精密吸取皂角刺药材 (编号: ZJC06) 粉末 (过三号筛), 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.1”项下色谱条件, 分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 后进样分析, 以花旗松素 (峰 4) 为参照峰, 计算得各特征峰相对保留时间的 *RSD* 范围为 0.02%~0.06% ($n=7$), 相对峰面积的 *RSD* 范围为 0.13%~2.35% ($n=7$), 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 特征图谱的建立

按“2.1.3”项下供试品溶液制备方法及“2.1.1”项下色谱条件测定 17 批皂角刺药材，测得结果采用中药色谱特征图谱相似度评价系统（2012.130723 版）对色谱图进行分析，其中以编号为 ZJC01 的样品特征图谱为参照特征图谱，进行多点校正和主峰匹配，同时生成对照特征图谱，17 批皂角刺药材的特征图谱叠加图见图 1，对照特征图谱见图 2。以对照特征图谱为参照，计算 17 批药材特征图谱与对照特征图谱的相似度，结果均大于 0.90（表 2），表明该特征图谱方法可作为皂角刺药材共性质量特征，可用于其鉴别和质量控制。

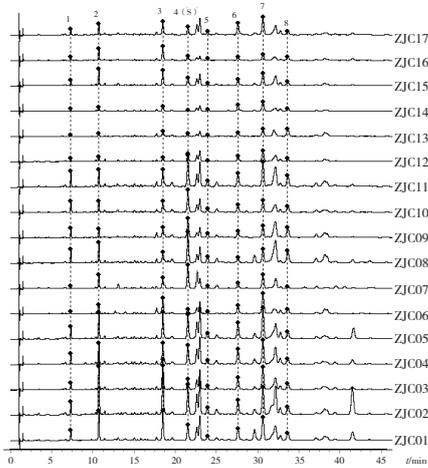


图1 17批皂角刺药材特征图谱叠加图

Figure 1. The specific chromatogram overlay diagram of 17 batches of Gleditsiae spina

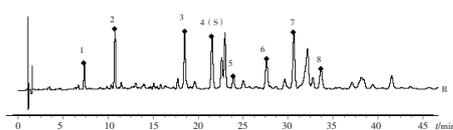


图2 皂角刺药材对照特征图谱

Figure 2. Reference specific chromatogram of Gleditsiae spina

表2 17批皂角刺药材相似度结果

Table 2. Evaluation results of the similarity of 17 batches of Gleditsiae spina

编号	相似度	编号	相似度
ZJC01	0.983	ZJC10	0.946
ZJC02	0.943	ZJC11	0.966
ZJC03	0.965	ZJC12	0.949
ZJC04	0.989	ZJC13	0.903
ZJC05	0.994	ZJC14	0.907
ZJC06	0.921	ZJC15	0.983
ZJC07	0.933	ZJC16	0.917
ZJC08	0.903	ZJC17	0.959
ZJC09	0.935	对照特征图谱	1.000

2.1.8 特征峰的指认及对照品确证

取皂角刺供试品溶液（编号：ZJC06），采用液相色谱-高分辨质谱对共有特征峰进行指认。其液相色谱条件同“2.1.1”项，质谱条件如下：采用电喷雾离子源（electrospray ionization, ESI），鞘气流速为 35 Arb；辅助气流速为 10 Arb；喷雾电压为 3.80 kV；S-lens 电压为 50 V；辅助器加热温度为 350 ℃；毛细管温度为 350 ℃；扫描模式为正、负离子模式；扫描范围为 m/z 120~1 500；归一化碰撞能量为 40 EV；质谱图类型为峰形图峰形图。分别采集皂角刺药材供试品溶液的正、负离子模式下总离子流图及紫外吸收色谱图（图 3）。

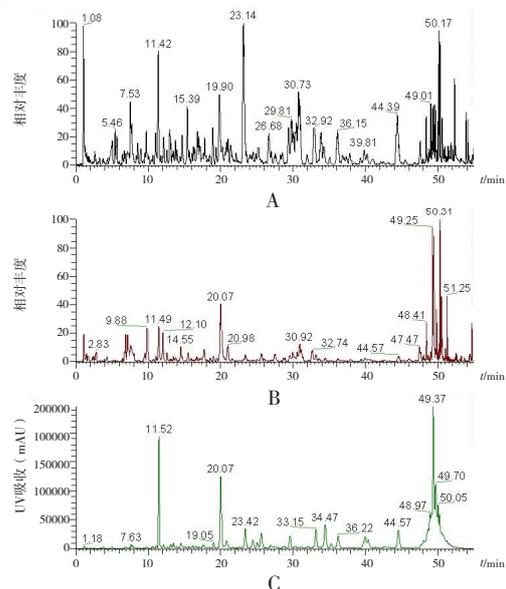


图3 皂角刺药材色谱图

Figure 3. The chromatograms of Gleditsiae spina

注：A. ESI⁻；B. ESI⁺；C. UV 340 nm。

经对各特征峰所代表化合物的一级质谱及二级碎片离子质谱信息进行分析（图 4），并结合中药成分高分辨质谱本地数据库匹配，指认峰 1 为原儿茶醛，峰 2 为东莨菪苷，峰 3 为东莨菪内酯，峰 4 为花旗松素，峰 6 为牡荆素，峰 7 为异牡荆素，具体化合物信息见表 3。取皂角刺药材供试品溶液和“2.1.2”项下的对照品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，经与对照品对比（图 5），确认峰 1 为原儿茶醛，峰 2 为东莨菪苷，峰 3 为东莨菪内酯，峰 4 为花旗松素，峰 6 为牡荆素，峰 7 为异牡荆素。

2.1.9 聚类分析

采用 IBM SPSS Statistics 20 软件，以峰面积为变量，对各产地药材进行聚类分析（图 6）。结果

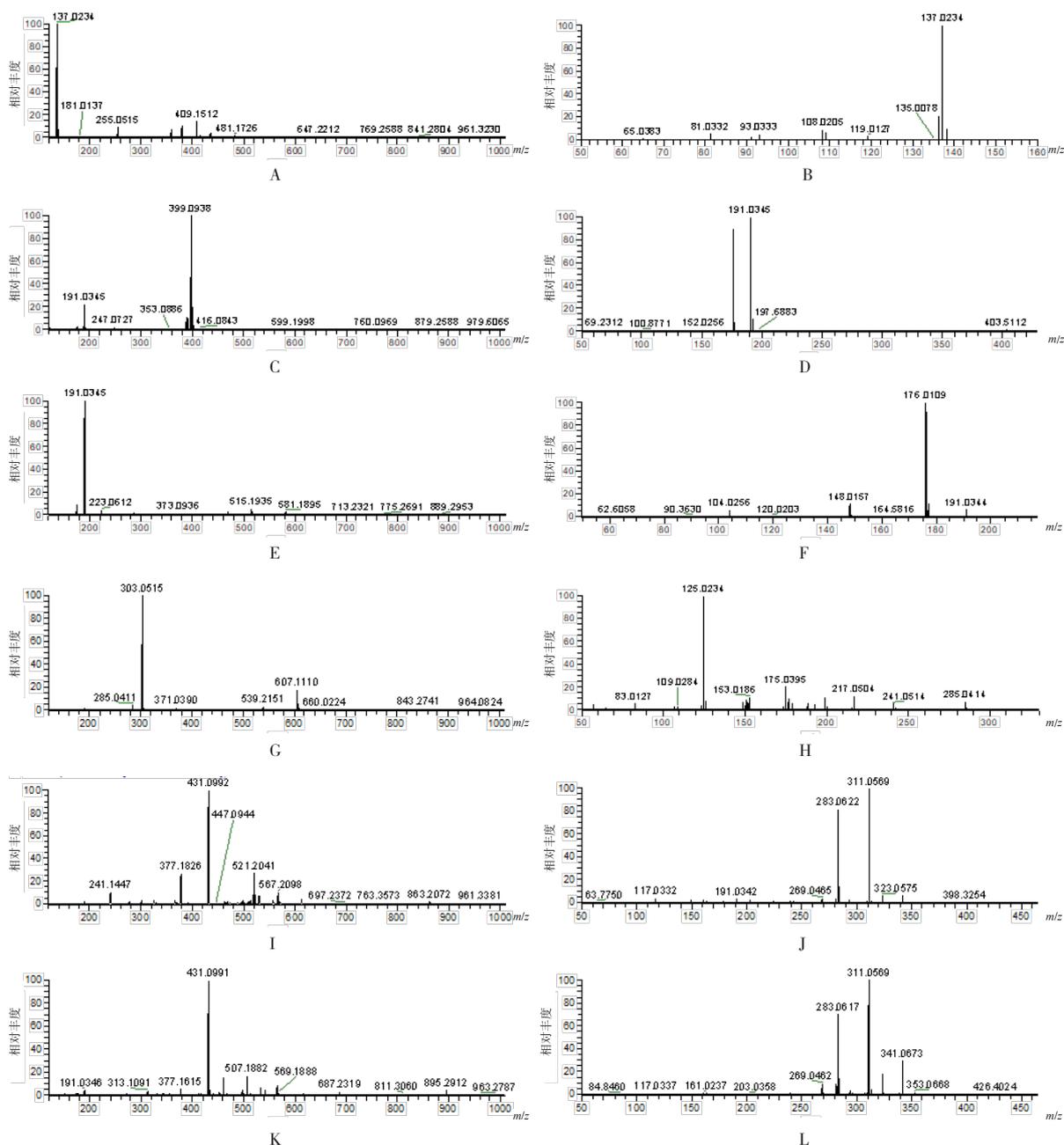


图4 原儿茶醛、东莨菪苷、东莨菪内酯、花旗松素、牡荆素、异牡荆素的一级和二级质谱扫描图（负离子模式）
 Figure 4. Primary and secondary mass spectrometry scans of protocatechualdehyde, scopolin, scopoletin, taxifolin, vitexin, isovitexin (negative ion modes)

注：A. 原儿茶醛一级质谱图；B. 原儿茶醛二级质谱图；C. 东莨菪苷一级质谱图；D. 东莨菪苷二级质谱图；E. 东莨菪内酯一级质谱图；F. 东莨菪内酯二级质谱图；G. 花旗松素一级质谱图；H. 花旗松素二级质谱图；I. 牡荆素一级质谱图；J. 牡荆素二级质谱图；K. 异牡荆素一级质谱图；L. 异牡荆素二级质谱图。

表3 皂角刺药特征图谱共有峰的质谱指认结果

Table 3. Identification of common peaks in the specific chromatogram of *Gleditsiae spina* by mass spectrometry

峰号	成分	保留时间 (min)	化学式	准分子离子	实测质荷比 (m/z)	主要碎片离子 (m/z)
1	原儿茶醛	7.63	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	137.0234	108.0205
2	东莨菪苷	11.52	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H+HCOOH] ⁻	399.0938	191.0345、176.0110
3	东莨菪内酯	20.07	C ₁₀ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	191.0345	176.0110、148.0157
4	花旗松素	23.42	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	[M-H] ⁻	303.0515	175.0391、125.0234
6	牡荆素	33.15	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	431.0992	311.0569、283.0622
7	异牡荆素	34.47	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	431.0991	341.0673、311.0569、283.0617、269.0462

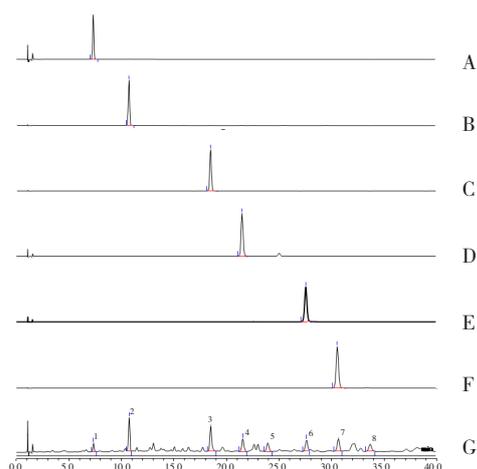


图5 共有峰的确证

Figure 5. Confirmation of common peaks

注: A. 原儿茶醛对照品; B. 东莨菪苷对照品; C. 东莨菪内酯对照品; D. 花旗松素对照品; E. 牡荆素对照品; F. 异牡荆素对照品; G. 供试品; 1. 原儿茶醛; 2. 东莨菪苷; 3. 东莨菪内酯; 4. 花旗松素; 5. 牡荆素; 6. 牡荆素; 7. 异牡荆素。

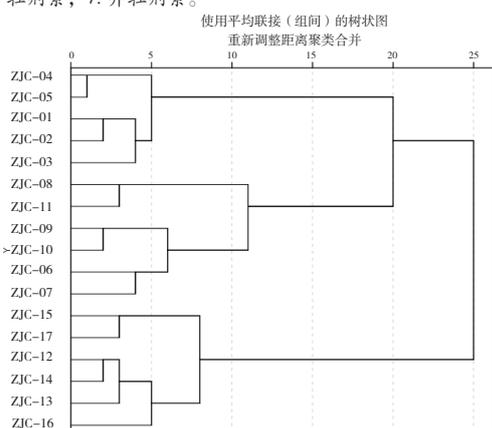


图6 17批不同产地皂角刺药材聚类分析结果

Figure 6. Result of cluster analysis of 17 batches of *Gleditsiae spina*

显示, 当组间联接距离在 20~25 时, 17 批药材被分为两类: ZJC01~ZJC11 为 I 类, 为河南洛阳、河南焦作和山东产地药材; 其中 I 类又可分为河南洛阳产地药材 (ZJC01~ZJC05)、河南焦作和山东产地药材 (ZJC06~ZJC11) 两小类; ZJC12~ZJC17 为 II 类, 为陕西和四川产地药材。综上说明不同产地的皂角刺药材所含化学成分比例存在一定的差异, 可能与地理环境等因素有关系。

2.1.10 皂角刺与常见混淆品特征图谱的鉴别

近年来, 随着中国传统中药材皂角刺的广泛使用, 其相应的伪品相继出现。经调研, 皂角刺常见伪品主要有 3 种同科同属分别为: 野皂荚刺、日本皂角刺、华南皂角刺, 以及其他科带刺植物棘刺, 如鼠李科酸枣刺^[10-12], 本研究采用已确定皂角刺特征图谱方法, 对 4 种常见的伪品进行特征图谱测定,

并与正品皂角刺药材进行对比 (图 7), 结果显示, 4 种常见伪品与皂角刺药材特征图谱的基本轮廓均存在一定的差异: 与皂角刺特征图谱相比, 酸枣刺特征图谱的色谱信息明显少于皂角刺, 缺少峰 5~峰 8, 且峰 1~峰 3 的响应均小于皂角刺; 野皂角刺均含有皂角刺特征图谱中的 8 个特征峰, 其中峰 3 (东莨菪内酯)、峰 6 (牡荆素)、峰 7 (异牡荆素) 的响应明显低于皂角刺, 此外, 野皂角刺特征图谱在 6~7、11~12、36~38 min 处出现 3 个响应较高的色谱峰; 华南皂角刺含有皂角刺特征图谱中的 8 个特征峰, 其中峰 1 (原儿茶醛)、峰 3 (东莨菪内酯)、峰 4 (花旗松素) 的响应明显小于皂角刺; 但华南皂角刺特征图谱在 11~13 min 和 18 min 处出现两个响应较高色谱峰; 日本皂角刺特征图谱中除了峰 4, 未检测到其他 7 个特征峰, 但相比皂角刺出现峰多个响应较高的色谱峰。综上, 该皂角刺特征图谱方法可以有效区分皂角刺和 4 种常见伪品。

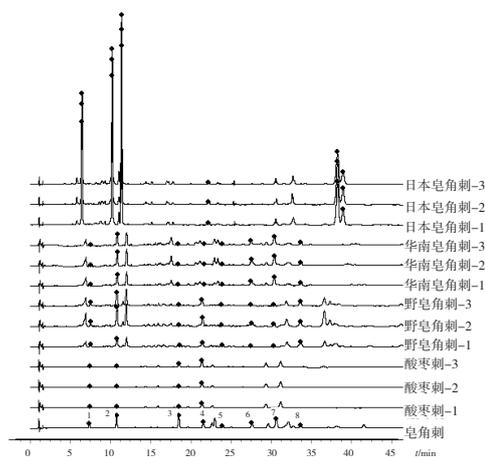


图7 皂角刺与常见伪品特征图谱对比图

Figure 7. Comparison of the specific chromatogram of *Gleditsia sinensis* and common counterfeits

注: 1. 原儿茶醛; 2. 东莨菪苷; 3. 东莨菪内酯; 4. 花旗松素; 5. 牡荆素; 6. 牡荆素; 7. 异牡荆素。

2.2 指标成分含量测定

2.2.1 线性关系考察

取花旗松素对照品适量, 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇制成含花旗松素 75.115 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品储备液, 分别精密吸取上述对照品储备液 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 分别制成不同质量浓度的花旗松素对照品溶液; 取东莨菪内酯对照品适量, 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇制成含东莨菪内酯 193.418 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品储备液, 分别精密吸取上述对照品储备液 0.1、0.2、1.0、1.0、2.0、5.0 mL 置 50、

50、50、10、5、2 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，分别制成不同质量浓度的东莨菪内酯对照品溶液。分别精密吸取上述花旗松素对照品储备液和不同质量浓度的花旗松素对照品溶液、不同质量浓度的东莨菪内酯对照品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，以对照品质量浓度为横坐标 (X , $\mu\text{g/mL}$)、峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线，计算得花旗松素和东莨菪内酯的回归方程分别为： $Y=33.792X+6.673$ ($r=0.999\ 9$)、 $Y=417.180 X+0.006$ ($r=1.000\ 0$)，2 种成分分别在 1.502~75.115、0.387~145.064 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好。

2.2.2 精密度考察

取“2.1.2”项下花旗松素对照品溶液和东莨菪内酯对照品溶液，并按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次，计算得花旗松素和东莨菪内酯峰面积的 RSD 分别为 0.51% 和 0.95% ($n=6$)，结果表明该仪器精密度良好。

2.2.3 稳定性考察

取皂角刺药材 (编号: ZJC06) 供试品溶液，分别在室温放置 0、2、4、6、12、24 h 后按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，计算得东莨菪内酯和花旗松素峰面积的 RSD 分别为 2.68% 和 2.23% ($n=6$)，结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.4 重复性考察

取同一份皂角刺药材 (编号: ZJC06) 粉末 (过三号筛)，按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，并按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，计算得东莨菪内酯和花旗松素的平均含量分别为

0.0193 mg/g 和 2.80 mg/g, RSD 分别为 2.76% 和 1.87% ($n=6$)，表明该方法重复性良好。

2.2.5 加样回收考察

精密称取已知含量的皂角刺药材 (编号: ZJC06) 粉末 (过三号筛) 约 0.75 g，按东莨菪内酯对照品和花旗松素对照品与皂角刺药材中待测成分含量之比分别为 0.5:1, 1:1, 1.5:1 设计 3 组试验，每组平行 3 份。按“2.1.3”项下方法制备 9 份供试品溶液，并按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，计算得东莨菪内酯和花旗松素的平均回收率分别为 91.81% 和 98.73%， RSD 分别为 0.94% 和 1.06% ($n=9$)，表明该方法的准确度良好。

2.2.6 样品测定

取 17 批皂角刺及 12 批伪品药材，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，并按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，采用外标法计算药材中东莨菪内酯和花旗松素的含量，结果见表 4。17 批不同产地皂角刺药材东莨菪内酯和花旗松素的含量范围分别为 0.010 9~0.049 2、0.88~3.32 mg/g；其中河南省洛阳市产地药材含量较高，陕西和四川产地药材花旗松素含量较低；野皂角刺、华南皂角刺和日本皂角刺中均不含东莨菪内酯，3 批酸枣刺东莨菪内酯含量均远低于皂角刺药材；野皂角刺中花旗松素含量与皂角刺药材无明显差异，但酸枣刺、华南皂角刺及日本皂角刺中花旗松素的含量均低于皂角刺药材。说明本研究通过基于特征图谱所建立的东莨菪内酯和花旗松素的含量测定方法可以有效的区分 4 种常见伪品。

表4 29批皂角刺药材和伪品药材样品含量测定结果 (mg/g)

Table 4. The determination results of 29 batches of Gleditsiae spina and counterfeits (mg/g)

编号	东莨菪内酯	花旗松素	编号	东莨菪内酯	花旗松素
ZJC01	0.037 8	2.03	ZJC16	0.015 7	1.32
ZJC02	0.049 2	3.32	ZJC17	0.016 9	1.44
ZJC03	0.041 3	1.89	YZJC01	未检出	2.20
ZJC04	0.020 7	2.19	YZJC02	未检出	2.03
ZJC05	0.027 6	2.56	YZJC03	未检出	2.15
ZJC06	0.019 5	2.81	SJC01	0.002 5	0.57
ZJC07	0.013 0	2.11	SJC02	0.002 7	0.60
ZJC08	0.020 2	3.26	SJC03	0.007 0	0.81
ZJC09	0.010 9	2.51	HNZJC01	未检出	0.21
ZJC10	0.011 9	2.82	HNZJC02	未检出	0.18
ZJC11	0.017 0	2.57	HNZJC03	未检出	0.20
ZJC12	0.019 4	1.25	RBZJC01	未检出	0.36
ZJC13	0.012 2	0.88	RBZJC02	未检出	0.44
ZJC14	0.019 6	0.97	RBZJC03	未检出	0.35
ZJC15	0.019 7	1.50			

3 讨论

3.1 色谱条件优化及供试品制备方法考察

经 210~400 nm 波长范围内全波长扫描发现, 皂角刺药材特征图谱在 340 nm 处所得到的色谱信息较多(同时表征多种化学成分), 且图谱基线整体较平稳; 通过比较 3 种不同类型色谱柱: Thermo Acclaim C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 2.2 μm)、Waters HSS T3 C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)、Agilent SB C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 对特征图谱的影响, 结果显示不同类型的色谱柱耐用性较好。此外, 通过对不同流动相[有机相: 乙腈、甲醇、乙腈-甲醇(1:1), 水相: 0.1% 甲酸、0.1% 磷酸]进行考察, 发现采用乙腈-甲醇(1:1)为有机相、0.1% 甲酸为水相时特征图谱各特征峰的分度、峰型以及图谱的基线均较好。此外, 本研究通过对药材特征图谱的提取溶剂、提取溶剂用量、提取方式、提取时间以及正丁醇振摇提取次数进行考察, 确定采用 15 mL 甲醇加热回流提取 30 min、正丁醇振摇提取 3 次的方式制备供试品溶液。

3.2 特征图谱的建立及分析

中药材各种组分群体特征的共有峰可以在特征图谱中进行标识, 用于鉴别中药材的真伪、评价质量的均一性及稳定性。本研究所建立的皂角刺药材 UPLC 特征图谱, 确定其中 8 个共有峰, 并指认其中 6 个特征峰分别为原儿茶醛(峰 1)、东莨菪苷(峰 2)、东莨菪内酯(峰 3)、花旗松素(峰 4)、牡荆素(峰 6)、异牡荆素(峰 7)。通过聚类分析可将研究用批次皂角刺药材分为两类, 说明不同产地的皂角刺药材所含化学成分比例存在一定的差异, 可能与地理环境等因素有关系。该特征图谱的方法可以简单、有效地区分市场上常见的皂角刺伪品。

3.3 含量测定分析

东莨菪内酯又称莨菪酚, 是植物体内的重要酚类植物抗毒素之一, 也是一种皂角刺中重要香豆素类成分。研究表明, 东莨菪内酯具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、降血压等多种药理活性, 以及良好的杀虫、抗菌杀菌等生物活性^[13-15]。花旗松素是皂角刺中主要黄酮类成分, 其药理活性广泛, 包括抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗炎、抗寄生虫等活性, 也是最好的天然强效抗氧化剂之一^[16-17]。

综上, 以上两个成分与皂角刺传统功效“消肿托毒、排脓、杀虫”及药理作用“抗氧化、抗菌和抗肿瘤等”相类似, 均可作为皂角刺药材的质量标志物。目前, 《中国药典(2020年版)》一部皂角刺药材项下尚未确定指标成分, 含量测定项缺失, 缺乏科学统一的质量控制标准。因此, 本研究在皂角刺药材特征图谱的基础上建立了测定东莨菪内酯和花旗松素含量的方法, 并对 17 批不同产地皂角刺药材及 4 种常见伪品进行测定, 结果显示, 不同产地皂角刺药材存在一定的差异, 其中河南省洛阳市产地药材含量较高, 陕西和四川产地药材花旗松素含量较低, 可能与采收季节及所分布的地理环境有关。

综上所述, 本研究所建立的皂角刺药材特征图谱用于其药材的鉴别及质量的均一性及稳定性评价; 基于特征图谱所建立的皂角刺两个主成分东莨菪内酯和花旗松素含量测定的方法, 可用于评价药材质量的优劣及快速地鉴别其真伪, 为建立完善的皂角刺质量控制标准提供参考。

参考文献

- 1 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 185.
- 2 刘勇, 张彩虹, 谢普军, 等. 皂角刺化学组成及药理活性应用研究进展[J]. 生物质化学工程, 2023, 57(2): 89-98. [Liu Y, Zhang CH, Xie PJ, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of thorns of *Gleditsia sinensis*[J]. Biomass Chemical Engineering, 2023, 57(2): 89-98.] DOI: 10.3969/j.issn.1673-5854.2023.02.011.
- 3 李岗, 仙云霞, 王晓, 等. 皂角刺化学成分及其抗肿瘤活性研究[J]. 中草药, 2015, 46(19): 2846-2850. [Li G, Xian YX, Wang X, et al. Chemical constituents of *Gleditsiae spina* and their antitumor activity[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2015, 46(19): 2846-2850.] DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.19.005.
- 4 魏璐. 皂角刺黄酮研究进展[J]. 山西林业科技, 2021, 50(1): 34-37. [Wei L. Research progress of flavonoids from *Gleditsia sinensis*[J]. Shanxi Forestry Science and Technology, 2021, 50(1): 34-37.] DOI: 10.3969/j.issn.1007-726X.2021.01.012.
- 5 宋忠兴, 唐志书, 严邑萍, 等. 皂角刺中总黄酮含量测定及其抗氧化活性研究[J]. 中国药业, 2019, 28(6): 1-3. [Song ZX, Tang ZS, Yan YP, et al. Content determination of total flavonoids from *Gleditsia sinensis* and study on its antioxidant activity[J]. China Pharmaceuticals, 2019, 28(6): 1-3.] DOI: 10.3969/j.issn.1006-4931.2019.06.001.
- 6 程果, 徐国兵. 香豆素类化合物的药理作用研究进展[J]. 中成药, 2013, 35(6): 1288-1291. [Cheng G, Xu GB. The study progress on pharmacological action of coumarins[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2013, 35(6): 1288-1291.] DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2013.06.042.

- 7 杨橛, 谭文霞, 王婷婷, 等. 皂角刺黄酮和香豆素类活性成分的体外抗癌活性筛选 [J]. 中国继续医学教育, 2017, 9(12): 215–217. [Yang X, Tan WX, Wang TT, et al. Screening of anticancer activity of *Gleditsia sinensis* flavonoids and coumarins of active ingredients[J]. China Continuing Medical Education, 2017, 9(12): 215–217.] DOI: 10.3969/j.issn.1004-7484.2017.18.084.
- 8 姚娜, 黄燕明, 陈桂生, 等. 皂角刺配方颗粒 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 亚太传统医药, 2019, 15(11): 79–82. [Yao N, Huang YM, Chen GS, et al. Study on fingerprint analysis of *Gleditsiae spina* granules by HPLC[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2019, 15(11): 79–82.] DOI: 10.11954/ytetyy.201911023.
- 9 李菁, 江坤, 殷果, 等. 中药皂角刺的 HPLC 指纹图谱 [J]. 沈阳药科大学学报, 2017, 34(8): 660–666. [Li J, Jiang K, Yin G, et al. Research on HPLC fingerprint of *Gleditsiae spina*[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2017, 34(8): 660–666.] DOI: 10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2017.08.007.
- 10 张晓明, 王红丽. 皂角刺及其常见易混品的性状鉴别 [J]. 西部中医药, 2011, 24(4): 70–71. [Zhang XM, Wang HL. Appearance differentiation between *Gleditsiae Spina* and its confounding and fake objects[J]. Western Journal of Traditional Chinese Medicine, 2011, 24(4): 70–71.] DOI: 10.3969/j.issn.1004-6852.2011.04.033.
- 11 耿燕楠, 崔璐, 韩丽丽, 等. 皂角刺及其伪品的薄层色谱鉴别 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(24): 25–26. [Geng YN, Cui L, Han LL, et al. Identification of thorns of *Gleditsia spina* and its falsify by TLC[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2017, 13(24): 25–26.] DOI: 10.11954/ytetyy.201724010.
- 12 王云珠, 孙立伟, 刘文权. 皂角刺及其伪品的性状及理化鉴别 [J]. 辽宁中医杂志, 2005, 32(7): 720. [Wang YZ, Sun LW, Liu WQ. Characteristic and physicochemical identification of *Gleditsia spina* and its falsify[J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2005, 32(7): 720.] DOI: 10.3969/j.issn.1000-1719.2005.07.074.
- 13 侯秋莉, 杨振国, 丁伟, 等. 东莨菪内酯的生物活性研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(10): 1461–1467. [Hou QL, Yang ZG, Ding W, et al. Advances in studies on biological activities of scopoletin[J]. Natural Product Research and Development, 2013, 25(10): 1461–1467.] DOI: 10.16333/j.1001-6880.2013.10.011.
- 14 韩枫. 东莨菪内酯的药理活性和药动学研究进展 [J]. 中国药房, 2011, 22(31): 2971–2972. [Han F. Research advances on pharmacological activities and pharmacokinetics of scopoletin[J]. China Pharmacy, 2011, 22(31): 2971–2972.] DOI: 10.1631/jzus.B1000135.
- 15 刘瑾林, 周红, 郭富友, 等. 香豆素类化合物的农药活性及东莨菪内酯杀螨作用机理研究进展 [J]. 农药学学报, 2019, 21(5–6): 692–708. [Liu JL, Zhou H, Guo FY, et al. Research advances in pesticidal activities of coumarin derivatives and acaricidal mechanism of scopoletin[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2019, 21(5–6): 692–708.] DOI: 10.16801/j.issn.1008-7303.2019.0113.
- 16 杨松霖, 杜姣姣, 赵丽娟, 等. 花旗松素的研究进展及展望 [J]. 化工管理, 2018, (22): 54–55, 59. [Yang SL, Du JJ, Zhao LJ, et al. Research progress and prospect of taxifolin[J]. Chemical Management, 2018, (22): 54–55, 59.] DOI: CNKI:SUN:FGGL.0.2018-22-036.
- 17 张星艳, 李新, 李虎玲, 等. 花旗松素植物来源、提取方法和药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(7): 2214–2226. [Zhang XY, Li X, Li HL, et al. Research progress on origin, extraction method and pharmacological activities of taxifolin[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(7): 2214–2226.] DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.07.031.

收稿日期: 2024 年 09 月 06 日 修回日期: 2024 年 12 月 12 日

本文编辑: 钟巧妮 李 阳