



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112730671 B

(45) 授权公告日 2022.08.09

(21) 申请号 202011538090.1

G01N 30/54 (2006.01)

(22) 申请日 2020.12.23

G01N 30/86 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112730671 A

(56) 对比文件

CN 110133153 A, 2019.08.16

CN 110988238 A, 2020.04.10

(43) 申请公布日 2021.04.30

CN 111537653 A, 2020.08.14

(73) 专利权人 江阴天江药业有限公司

地址 214434 江苏省无锡市江阴高新区新  
胜路1号

胡志平等.HPLC测定苗药半截烂中芹菜素-  
7-0-β-D-葡萄糖醛酸苷的含量.《中国民族医药  
杂志》.2015,(第03期),52-53.

(72) 发明人 顾芹英 张云天 梅春梅 张翊

温聪聪

王丽等.构树叶中牡荆素、芹菜素-7-0-β-  
D-吡喃葡萄糖醛酸苷的含量测定.《安徽农业科  
学》.2011,第39卷(第35期),21647-21649.

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

专利代理师 刘新宇 李茂家

Ibrahim M. Abdel-Salam等.Chemical  
Composition of Aqueous Ethanol Extract of  
Luffa cylindrica Leaves and Its Effect on  
Representation of Caspase-8, Caspase-3,  
and the Proliferation Marker Ki67 in  
Intrinsic Molecular Subtypes of Breast  
Cancer in Vitro.《Chem. Biodiversity》  
.2018,

审查员 林粤美

(51) Int. Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

G01N 30/14 (2006.01)

G01N 30/32 (2006.01)

G01N 30/34 (2006.01)

G01N 30/36 (2006.01)

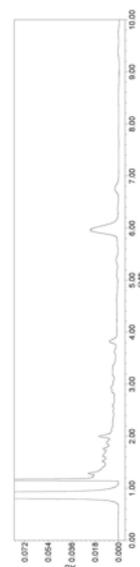
权利要求书2页 说明书17页 附图10页

(54) 发明名称

一种丝瓜络标准汤剂的超高效液相色谱检  
测方法及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种丝瓜络标准汤剂的超高效  
液相色谱检测方法及其应用。该方法通过测定丝  
瓜络标准汤剂中的有效成分成分芹菜素-7-0-  
β-D-葡萄糖醛酸苷的含量,来检测丝瓜络标准  
汤剂。该方法在检测时,检测基线平稳、分离度  
高,耐用性好,操作简便,结果准确,重复性、稳定  
性良好,回收率可靠,极大缩短了检测时间,提升  
了检测效率,减少了有机溶剂的消耗,更加经济  
环保;为丝瓜络药物的质量标准研究提供了一套  
快速高效可行的检测方法。



1. 一种丝瓜络标准汤剂的超高效液相色谱检测方法,其包括以下步骤:

1) 以芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷作为对照品,制备对照品溶液;以丝瓜络标准汤剂作为供试品,制备供试品溶液;

2) 分别对所述对照品溶液和所述供试品溶液进行UPLC分析,获得各自的UPLC图谱;

3) 基于所述对照品溶液的UPLC图谱,确定所述供试品溶液的UPLC图谱中与所述对照品对应的色谱峰,并利用所述色谱峰的峰面积,按照峰面积归一化法计算所述丝瓜络标准汤剂中芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷的含量,以完成所述丝瓜络标准汤剂的检测;

其中,所述步骤2)中UPLC分析的条件包括:

色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱;

流动相:二元流动相体系,流动相A为乙腈,流动相B为水或体积浓度为0.1%的甲酸水溶液;

洗脱方式:等度洗脱,流动相A和流动相B的体积比为1:4;

检测波长:270或350nm。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤1)中制备对照品溶液的方法包括下列步骤:取芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷对照品,精密称定,加入溶剂溶解,即得;

所述步骤1)中制备对照品溶液的溶剂为水、甲醇、乙醇、甲醇与水的混合物或乙醇与水的混合物;

所述步骤1)中对照品溶液的浓度为1-15 $\mu$ g/ml。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述步骤1)中制备对照品溶液的溶剂为甲醇水溶液。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述步骤1)中制备对照品溶液的溶剂为体积浓度为30%-70%的甲醇水溶液。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述步骤1)中制备对照品溶液的溶剂为体积浓度为70%的甲醇水溶液。

6. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述步骤1)中对照品溶液的浓度为7 $\mu$ g/ml。

7. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述步骤1)中制备供试品溶液的方法包括下列步骤:取丝瓜络标准汤剂,精密称定,精密加入溶剂,精密称定,提取后再次精密称定,加入溶剂补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得;

所述步骤1)中制备供试品溶液的溶剂为水、甲醇、乙醇、甲醇与水的混合物或乙醇与水的混合物。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述步骤1)中制备供试品溶液的溶剂为体积浓度为30%-70%的甲醇水溶液、乙醇水溶液或水。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述步骤1)中制备供试品溶液的溶剂为体积浓度为30%-70%的甲醇水溶液。

10. 根据权利要求9所述的方法,其特征在于,所述步骤1)中制备供试品溶液的溶剂为体积浓度为70%的甲醇水溶液。

11. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述提取包括超声处理、振摇提取和/或加热回流提取。

12. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于,所述提取为超声提取。
13. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于,提取时间为15-60分钟。
14. 根据权利要求13所述的方法,其特征在于,提取时间为15-45分钟。
15. 根据权利要求14所述的方法,其特征在于,提取时间为30分钟。
16. 根据权利要求11或13所述的方法,其特征在于,所述丝瓜络标准汤剂与溶剂的用量比为1g:15-60ml。
17. 根据权利要求16所述的方法,其特征在于,所述丝瓜络标准汤剂与溶剂的用量比为1g:30ml。
18. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤2)中UPLC分析的条件包括:  
色谱柱:Hypersil GOLD Aq VANQUISH色谱柱、ACQUITUY UPLC BEH C18色谱柱或ZORBAX SB-C18色谱柱;  
流动相:二元流动相体系,流动相A为乙腈,流动相B为体积浓度为0.1%的甲酸水溶液;  
洗脱方式:等度洗脱,流动相A和流动相B的体积比为1:4;  
检测波长:350nm。
19. 根据权利要求1或18所述的方法,其特征在于,所述UPLC分析的条件还包括:  
流速:0.22-0.28ml/min;  
柱温:35-45℃;  
进样量:1-3 $\mu$ l。
20. 根据权利要求19所述的方法,其特征在于,所述UPLC分析的条件还包括:  
流速:0.25ml/min;  
柱温:40℃;  
进样量:2 $\mu$ l。
21. 根据权利要求1-20任一项所述的丝瓜络标准汤剂的超高效液相色谱检测方法在丝瓜络药物的质量检测和/或质量控制中的应用。
22. 根据权利要求21所述的应用,所述丝瓜络药物包括丝瓜络药材、丝瓜络标准汤剂以及丝瓜络配方颗粒中的任一种。

## 一种丝瓜络标准汤剂的超高效液相色谱检测方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于药物分析技术领域,涉及丝瓜络标准汤剂的超高效液相色谱检测方法,以及该检测方法的具体应用。

### 背景技术

[0002] 丝瓜络为葫芦科植物丝瓜 *Luffa cylindrica* (L.) Roem. 的干燥成熟果实的维管束,别名丝瓜筋、丝瓜布、丝瓜壳等,国外叫植物海绵。

[0003] 丝瓜络具有祛风,通络,活血,下乳的功效。传统用药主要用于痹痛拘挛,胸胁胀痛,乳汁不通,乳痈肿痛等症;另,炒炭(即丝瓜络炭)可以止血,用于治疗便血,崩漏等症。现代药理研究表明其具有利尿消肿、祛痛风、降血脂、降血糖、抗氧化、预防心肌缺血等作用,临床可用于治疗黄褐斑、面部带状疱疹、乳腺增生、急性乳腺炎、高血压、脂肪肝、软组织损伤、静脉输液外渗和糖尿病足等。

[0004] 目前发现丝瓜络中主要含有多糖类及酸、酯、烷类化合物,以及少量蛋白质、氨基酸、黄酮、香豆素、萜内酯及生物碱等化学成分。关于丝瓜络的含量测定研究主要集中在利用紫外分光光度法测定多糖方面,比如:田健等利用紫外可见分光光度法测定丝瓜络配方颗粒中多糖的含量(非专利文献1);于洁等利用苯酚-硫酸法测定河南丝瓜络多糖的含量(非专利文献2);林颖等测定广东丝瓜络的多糖含量(非专利文献3)。

[0005] 丝瓜络在我国各地均有种植,具有较高的药用价值,为我国传统的出口中药之一。丝瓜原产印度或亚洲南部热带区域,自宋代、明代传入我国以来开始食其瓜、用其络,由南至北,广泛栽培,逐渐形成丰富的具有地方特色的丝瓜种质。在中国,南北均有栽培,品种丰富,广东、广西等华南地区以栽培有棱丝瓜为主,其他地区以栽培无棱丝瓜为主。但关于其含量测定方法的报道较少,主要集中于多糖的测定,其操作复杂,耗时长,准确性较差,不具有专属性。

[0006] 另外,关于丝瓜络的有效成分黄酮类化合物方面的研究报道较少,翟影等研究表明丝瓜络中的黄酮类成分具有抗炎作用,可能为抗风湿的活性成分群(非专利文献4)。现今为止,没有文献报道丝瓜络含有黄酮类化合物芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷。文献研究表明黄酮类化合物具有免疫激活、抗病毒、抗氧化、抗癌等多方面的生物活性。因此,将黄酮类成分作为检测对象具有一定意义。

[0007] 近几年,标准汤剂研究广受关注,俨然成为中药配方颗粒和经典名方复方制剂质量控制中的主角。标准汤剂最能体现临床用药形式,标准汤剂作为中药整体质量控制模式的思路越来越清晰。现行的中药饮片标准汤剂定量指标的选择都是基于现版《中国药典》,但对丝瓜络而言,现行药典未有含量指标。

[0008] 因此,有必要建立寻找一种专属性强、稳定性高、重复性好、尤其适合在规模化生产中检测与监控丝瓜络药材、含有丝瓜络的中药制剂、或丝瓜络标准汤剂的内在质量的新的分析手段,使其达到检测不同产地、不同来源丝瓜络药材的目的。

[0009] 现有技术文献

[0010] 非专利文献1:田健,朱凯,紫外可见分光光度法测定丝瓜络配方颗粒中多糖含量[J],长春中医药大学学报,2016,32(05):917-919.

[0011] 非专利文献2:于洁,程迪,董丽,苯酚-硫酸法测定河南丝瓜络多糖的含量[J],新乡医学院学报,2008,25(1):36-38.

[0012] 非专利文献3:林颖,徐必达,周诚等,广东丝瓜络多糖含量测定[J],江西中医学院学报,2006,18(2):37-38.

[0013] 非专利文献4:翟影,许娇娇,滕杭飞,张旭,基于抗风湿作用酒制丝瓜络的工艺研究[J],广东化工,2017,44(17):5-27-28.

## 发明内容

### [0014] 发明要解决的问题

[0015] 本发明为了解决现有技术中的以上技术问题,而提出了一种专属性强、稳定性高、重复性好、操作简单且检测周期短、成本低,检测效率高的丝瓜络标准汤剂的UPLC检测方法。

### [0016] 用于解决问题的方案

[0017] 本发明通过深入研究后首次发现:丝瓜络中含有芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷,并以该化合物作为丝瓜络的检测指标,结果意外地发现通过检测丝瓜络标准汤剂中的芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷,可以获得专属性强、稳定性高、重复性好、操作简单且检测周期短、成本低,检测效率高的检测丝瓜络标准汤剂的UPLC检测方法,从而完成了本发明。

[0018] 在一个技术方案中,本发明提供一种丝瓜络标准汤剂的超高效液相色谱检测方法,其包括以下步骤:

[0019] 1) 以芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷作为对照品,制备对照品溶液;以丝瓜络标准汤剂作为供试品,制备供试品溶液;

[0020] 2) 分别对所述对照品溶液和所述供试品溶液进行UPLC分析,获得各自的UPLC图谱;

[0021] 3) 基于所述对照品溶液的UPLC图谱,确定所述供试品溶液的UPLC图谱中与所述对照品对应的色谱峰,并利用所述色谱峰的峰面积,按照峰面积归一化法计算所述丝瓜络标准汤剂中芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷的含量,以完成所述丝瓜络标准汤剂的检测。

[0022] 在一个实施方式中,所述步骤1)中制备对照品溶液的方法包括下列步骤:取芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷对照品,精密称定,加入溶剂溶解,即得。

[0023] 优选地,所述步骤1)中制备对照品溶液的溶剂包括水、甲醇、乙醇及甲醇或乙醇与水的混合物,优选甲醇水溶液,更优选体积浓度为30%-70%的甲醇水溶液,进一步优选体积浓度为70%的甲醇水溶液。

[0024] 优选地,所述步骤1)中对照品溶液的浓度为1-15 $\mu$ g/ml,优选7 $\mu$ g/ml。

[0025] 在一个实施方式中,所述步骤1)中制备供试品溶液的方法包括下列步骤:取丝瓜络标准汤剂,精密称定,精密加入溶剂,精密称定,提取后再次精密称定,加入溶剂补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

[0026] 优选地,所述步骤1)中制备供试品溶液的溶剂包括甲醇、乙醇、水及甲醇或乙醇与水的混合物,优选体积浓度为30%-70%的甲醇水溶液、乙醇水溶液或水,更优选体积浓度

为30-70%的甲醇水溶液,进一步优选体积浓度为70%的甲醇水溶液。

[0027] 优选地,所述提取包括超声处理、振摇提取和加热回流提取,优选超声提取。

[0028] 优选地,提取时间为15-60分钟,优选15-45分钟,更优选30分钟。

[0029] 优选地,超声提取的时间为15-60分钟,优选15-45分钟,更优选30分钟。

[0030] 优选地,丝瓜络标准汤剂与溶剂的用量比为1g:15-60ml,优选1g:30ml。

[0031] 在一个实施方式中,所述步骤2)中UPLC分析的条件包括:

[0032] 色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶(ODS)色谱柱,优选Hypersil GOLD Aq VANQUISH色谱柱、ACQUITUY UPLC BEH C18色谱柱或ZORBAX SB-C18色谱柱;

[0033] 流动相:二元流动相体系,流动相A为乙腈,流动相B为水或体积浓度为0.1%的甲酸水溶液,优选流动相B为体积浓度为0.1%的甲酸水溶液;

[0034] 洗脱方式:等度洗脱,流动相A和流动相B的体积比为1:4;

[0035] 检测波长:270或350nm,优选350nm。

[0036] 优选地,所述UPLC分析的条件还包括:

[0037] 流速:0.22-0.28ml/min,优选0.25ml/min;

[0038] 柱温:35-45℃,优选40℃;

[0039] 进样量:1-3 $\mu$ l,优选2 $\mu$ l。

[0040] 在另一个技术方案中,本发明还提供上述丝瓜络标准汤剂的超高效液相色谱检测方法在丝瓜络药物的质量检测和/或质量控制中的应用。

[0041] 优选地,所述丝瓜络药物包括丝瓜络药材、丝瓜络标准汤剂、以及丝瓜络配方颗粒中的任一种。

[0042] 发明的效果

[0043] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0044] (1) 本发明通过采用超高效液相色谱法,并对色谱条件进行合理控制,来测定丝瓜络标准汤剂中芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷的含量,建立丝瓜络标准汤剂含量测定指标,可以为丝瓜络药物的内在质量控制提供新的分析手段。

[0045] (2) 采用本发明的方法进行检测时,检测基线平稳,分离度高,耐用性好;另外,该方法操作简单,结果准确,重现性和稳定性好,回收率可靠,检测周期短,检测成本低,检测效率高,为规范丝瓜络药物的市场和合理开发提供依据。

## 附图说明

[0046] 图1为芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷在200~400nm波长下的UV图谱;

[0047] 图2为丝瓜络标准汤剂的UPLC图谱;

[0048] 图3为不同提取溶剂条件下丝瓜络标准汤剂的UPLC图谱;

[0049] 图4为不同提取方法条件下丝瓜络标准汤剂的UPLC图谱;

[0050] 图5为不同提取体积条件下丝瓜络标准汤剂的UPLC图谱;

[0051] 图6为不同提取时间条件下丝瓜络标准汤剂的UPLC图谱;

[0052] 图7为对照品的线性关系图;

[0053] 图8为丝瓜络标准汤剂专属性试验;

[0054] 图9为丝瓜络标准汤剂延迟性试验;

- [0055] 图10为丝瓜络标准汤剂在不同流速考察条件下的UPLC图谱；  
[0056] 图11为丝瓜络标准汤剂在不同柱温考察条件下的UPLC图谱；  
[0057] 图12为丝瓜络标准汤剂在不同色谱柱考察条件下的UPLC图谱。

### 具体实施方式

[0058] 为了更好地说明本发明,在下文的具体实施方式中给出了众多的具体细节。本领域技术人员应当理解,没有某些具体细节,本发明同样可以实施。在另外一些实例中,对于本领域技术人员熟知的方法、手段、器材和步骤未作详细描述,以便于凸显本发明的主旨。

[0059] [标准汤剂]

[0060] 2016年8月国家药典委员会在《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求(征求意见稿)》和2017年10月原国家食品药品监督管理总局在《中药经典名方复方制剂简化注册审批管理规定(征求意见稿)》分别提出了“标准汤剂”的概念,即标准汤剂是在中医药理论指导下,按照临床汤剂煎煮流程的规范化操作。固液分离,经适当浓缩的方法干燥制得;以古代医籍中记载的经典名方制备方法为依据制备的浓缩浸膏或冻干品。标准汤剂是作为参照物的作用。标准汤剂中的“标准”主要涵盖了中药材的来源、提取工艺的统一性及质控的严谨性等。

[0061] 中药标准汤剂作为一种标准物质和标准体系,不仅确保临床用药的疗效,还可用于标化衡量临床用药的其他机型,从影响汤剂“标准”因素综合分析探讨,规范煎煮过程,确保临床用药的准确性和疗效的一致性,也为配方颗粒、经典名方、中药复方等研究提供参考(参见李艳等,中药标准汤剂的研究与思考,中草药,2018,49(17):3977-3980.)。

[0062] [芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷]

[0063] 本发明中的芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷,CAS号为:29741-09-1,分子式: $C_{21}H_{18}O_{11}$ ,分子量:446.36。

[0064] 以下将结合具体的实施例来进一步阐述本发明中的技术方案。本领域技术人员容易理解的是,下列实施例中所描述的具体实验条件及其结果仅用于说明本发明,而不应当且不会被理解为用于限制本发明。在不偏离本发明的精神和范围的情况下,可以对本发明的细节和形式进行修改和替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围之内。此外,除非另有说明,下列实施例中所使用的仪器、材料、试剂等均可通过常规商业手段获得。

[0065] 实施例1:丝瓜络标准汤剂的UPLC检测方法

[0066] 仪器、试剂与样品

[0067] Waters Acquity UPLC超高效液相色谱仪(Waters公司);Empower 3工作站(Waters公司);Agilent G6530 Accurate-Mass Q-TOF质谱联用仪(Agilent公司);Agilent Mass Hunter Workstation数据采集及定性分析软件(Agilent公司);ME204E/02型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);KQ-250B超声清洗机(昆山市超声仪器有限公司);纯水系统(Sartorius公司);GKC114型控温水浴锅(南通华泰实验仪器有限公司);AS165W型离心机(亚速旺(上海)商贸有限公司)。乙腈(色谱纯,Thermo Fisher公司);水为超纯水;甲酸(色谱纯,aladdin公司);其它试剂均为分析纯。

[0068] 芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷(编号:ST0820120MG-3075)购于上海诗丹德生物科技有限公司,供含量测定用,含量分别以98%计,使用前无须处理。

[0069] 丝瓜络标准汤剂为丝瓜络饮片经炮制而得,具体步骤如下:

[0070] 取丝瓜络饮片(YP13) 100g,称定,置砂锅中,加入1100ml水浸泡30min,采用YMW机械分体煎药壶,先武火煮沸,再文火煎煮30min,趁热过滤,滤液冷水浴冷却;二煎加900ml水,武火煮沸后,再文火煎煮25min,趁热过滤,滤液冷水浴冷却,冷冻干燥,即得丝瓜络标准汤剂。

[0071] 丝瓜络饮片由江阴市天江药业有限公司提供,具体产地如下表:

[0072] 表1.丝瓜络饮片产地

序号	饮片编号	产地	
	1	YP1	江苏省
	2	YP2	江苏省
	3	YP3	江苏省
	4	YP4	山东省
	5	YP5	山东省
	6	YP6	山东省
[0073]	7	YP7	浙江省
	8	YP8	浙江省
	9	YP9	浙江省
	10	YP10	安徽省
	11	YP11	安徽省
	12	YP12	安徽省
	13	YP13	安徽省
	14	YP14	江苏省
	15	YP15	安徽省
	16	YP16	山东省

[0074] 对照品溶液的制备

[0075] 取芹菜素-7-0-β-D-葡萄糖醛酸苷对照品适量,精密称定,加70%甲醇制成每1ml含7μg的溶液,即得。

[0076] 供试品溶液的制备

[0077] 取丝瓜络标准汤剂约0.5g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇15ml,称定重量,超声处理(功率250W,频率40kHz) 30分钟,放冷,再称定重量,用70%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

[0078] 4. 色谱条件的确定

[0079] 4.1检测波长的确定

[0080] 采集对照品溶液在200~400nm波长下的UV光谱图,结果如图1所示,通过对光谱图的分析可知,在270nm及350nm波长处存在明显的UV吸收峰,均可以用作检测波长,但考虑到350处的响应值更大,因此,最终确定丝瓜络标准汤剂中芹菜素-7-0-β-D-葡萄糖醛酸苷含量测定的检测波长为350nm。

[0081] 4.2流动相的选择

[0082] 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(柱长为100mm,内径为2.1mm,粒径为1.8μm);以乙腈-0.1%甲酸溶液(20:80)为流动相;流速为每分钟0.25ml;柱温为40℃;检测波长为350nm。理论板数按芹菜素-7-0-β-D-葡萄糖醛酸苷峰计算应不低于5000。

[0083] 采用该流动相检测基线平稳,目标成分分离度良好,检测时间10分钟内可完成,见

图2。

[0084] 4.3供试品溶液的制备条件考察

[0085] (1) 提取溶剂的考察

[0086] 取丝瓜络标准汤剂约0.5g,平行5份,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入体积浓度为100%的甲醇、70%的甲醇、50%的甲醇、30%的甲醇、水各15ml,称定重量,超声处理(功率250W,频率40kHz)30分钟,放冷,再称定重量,用相应的溶剂补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。分别精密吸取各供试品溶液2 $\mu$ l,注入液相色谱仪,按第4.2项下的色谱条件进样,得到在不同提取溶剂下,丝瓜络标准汤剂中芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷含量测定的考察结果(表2,图3)。

[0087] 结论:采用体积浓度为100%的甲醇、70%的甲醇、50%的甲醇、30%的甲醇、水作为提取溶剂时,芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷含量接近。从提取充分的角度考虑,选择体积浓度为70%的甲醇作为最终的提取溶剂。

[0088] 表2.不同提取溶剂的比较

提取溶剂	称样量/g	芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷		平均%	RSD%
		峰面积	含量%		
甲醇	0.5003	83593	0.011	0.011	0.87
		84044	0.011		
		85179	0.011		
70%甲醇	0.5007	83594	0.011	0.021	0.84
		168625	0.021		
		167762	0.021		
50%甲醇	0.5009	165864	0.021	0.021	0.89
		165668	0.021		
		166346	0.021		
30%甲醇	0.4967	166421	0.021	0.021	0.70
		168442	0.021		
		169856	0.022		
水	0.4978	11524	0.021	0.020	0.68
		11902	0.021		
		11631	0.021		
	0.5006	11837	0.021	0.020	0.68
		12648	0.020		
		13371	0.020		
	0.5026	13238	0.020	0.020	0.68
		14031	0.020		
	0.5025				

[0090] (2) 提取方式的考察

[0091] 取丝瓜络标准汤剂约0.5g, 平行3份, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入70%甲醇15ml, 密塞, 称定重量, 分别超声处理(功率250W, 频率40kHz)、加热回流、振摇提取30分钟, 放冷, 再称定重量, 用70%甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。分别精密吸取各供试品溶液2 $\mu$ l, 注入液相色谱仪, 按第4.2项下的色谱条件进样, 得到在不同提取方式下, 丝瓜络标准汤剂中芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷含量测定的考察结果(见表3, 图4)。

[0092] 结论: 三种提取方式的提取结果接近。其中加热回流的提取方式操作较为复杂, 振摇提取方式容易使提取不完全, 因此, 从提取操作简便性和提取结果稳定性方面考虑, 选择提取方式为超声处理。

[0093] 表3. 提取方式的比较

提取方式	称样量/g	芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷		平均%	RSD%
		峰面积	含量%		
[0094] 加热回流	0.5046	175269	0.022	0.022	1.60
		174634	0.022		
		169675	0.021		
	0.5033	169846	0.021		
		164581	0.021		
		165545	0.021		
[0094] 超声处理	0.4972	164135	0.021	0.021	0.28
		164269	0.021		
		170315	0.021		
	0.5033	169130	0.021		
		167952	0.021		
		166540	0.021		
[0094] 振摇提取	0.5026			0.021	0.89

[0095] (3) 提取体积的考察

[0096] 取丝瓜络标准汤剂约0.5g, 平行3份, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入70%甲醇10ml、15ml、25ml, 密塞, 称定重量, 分别超声处理(功率500W, 频率40kHz) 30分钟, 取出, 放冷, 再称定重量, 用70%甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。分别精密吸取各供试品溶液2 $\mu$ l, 注入液相色谱仪, 按“4.2”项下色谱条件进样, 得到在不同提取体积下, 丝瓜络标准汤剂中芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷含量测定的考察结果(见表4, 图5)。

[0097] 结论: 当标汤样品用量约为0.5g, 提取溶剂体积为10ml、15ml、25ml时, 三者提取效率均相近, 从节省溶剂的角度及萃取方便综合考虑, 确定提取体积为15ml。

[0098] 表4. 提取体积的比较

提取体积	称样量/g	芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷		平均%	RSD%	
		峰面积	含量%			
10ml	0.5013	239956	0.020	0.020	0.17	
		240540	0.020			
	0.5016	241118	0.020			
		240609	0.020			
	15ml	0.5009	167929			0.021
			168078			0.021
0.5014		166025	0.021			
		165040	0.021			
25ml	0.5029	100530	0.021	0.021	0.42	
		100946	0.021			
	0.5021	99768	0.021			
		100232	0.021			

[0100] (4) 提取时间的考察

[0101] 取丝瓜络标准汤剂约0.5g, 平行3份, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入70%甲醇15ml, 密塞, 称定重量, 分别超声处理(功率250W, 频率40kHz) 15分钟、30分钟、45分钟, 取出, 放冷, 再称定重量, 用70%甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。分别精密吸取各供试品溶液2μl, 注入液相色谱仪, 按“4.2”项下色谱条件进样, 得到在不同提取时间下, 丝瓜络标准汤剂中芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷含量测定的考察结果(见表5, 图6)。

[0102] 结论: 不同超声处理时间, 丝瓜络标准汤剂中的芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷含量较为接近, 为保证提取完全, 提取时间采用30分钟。

[0103] 表5. 提取时间的比较

提取时间	称样量/g	芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷		平均%	RSD%		
		峰面积	含量%				
15min	0.4983	168225	0.021	0.021	1.97		
		168394	0.021				
	0.4989	162821	0.021				
		162915	0.021				
	0.4975	167636	0.021				
		166585	0.021				
30min	0.5035	177717	0.023	0.022	2.98		
		178350	0.023				
	0.5017	163968	0.021				
		165133	0.021				
	0.5014	166269	0.021			0.021	0.88
		167196	0.021				

[0105] 综合以上结果,检测丝瓜络标准汤剂的色谱条件为:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(柱长为100mm,内径为2.1mm,粒径为1.8μm);以乙腈-0.1%甲酸溶液(20:80)为流动相;流速为每分钟0.25ml;柱温为40℃;检测波长为350nm。理论板数按芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷峰计算应不低于5000。

[0106] 供试品溶液的制备方法为:取丝瓜络标准汤剂约0.5g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇15ml,称定重量,超声处理(功率250W,频率40kHz)30分钟,放冷,再称定重量,用70%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

[0107] 5.方法学验证

[0108] 5.1线性

[0109] 分别精密吸取混合对照品溶液(芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷浓度为0.03195mg/ml)0.1μl、0.2μl、0.5μl、0.8μl、1.0μl、1.2μl、1.5μl、2.0μl、2.5μl注入液相色谱仪,按以上确定的色谱条件进样,以峰面积积分值为纵坐标,各成分进样量(μg)为横坐标,绘制标准曲线,芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷回归方程: $Y = -2036.921075 + 1035430435X$ ,  $R = 0.9999$ ,结果见表6,图谱见图7。

[0110] 结果表明:对照品溶液中芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的进样量在0.00003μg~0.000080μg范围内,与峰面积值呈良好的线性关系。

[0111] 表6.对照品峰面积积分值与进样量关系

	进样体积 ( $\mu\text{l}$ )	进样量 ( $\mu\text{g}$ )	峰面积
	0.1	0.00003	28624
	0.2	0.00006	62469
	0.5	0.00016	162079
	0.8	0.00026	262470
[0112]	1.0	0.00032	334925
	1.2	0.00038	399618
	1.5	0.00048	488931
	2.0	0.00064	664132
	2.5	0.00080	820253

[0113] 5.2精密度试验

[0114] (1) 仪器精密度试验

[0115] 精密吸取供试品溶液,注入液相色谱仪,按以上确定的色谱条件进样,连续进样6次,记录其峰面积,计算相对标准偏差,结果见下表7。

[0116] 结果:仪器精密度,试验良好。

[0117] 表7. 仪器精密度试验

序号	峰面积
	芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷
1	163470
2	164276
3	164276
[0118] 4	164599
5	163680
6	164402
均值	164117
RSD%	0.27

[0119] 5.3重复性试验

[0120] 取丝瓜络标准汤剂样品约0.5g,精密称定,平行6份,分别按上述供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,按照以上确定的色谱条件分别进样 $1\mu\text{l}$ ,测定芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷峰面积,计算其含量及RSD,结果见表8。

[0121] 结果:重复性试验(RSD%=0.88%)良好。

[0122] 表8. 丝瓜络标准汤剂样品的重复性试验

序号	称样量/g	芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷		平均%	RSD (%)
		峰面积	含量%		
1	0.5040	164729	0.021	0.021	0
		164446	0.021		
2	0.5013	163509	0.021		
		163346	0.021		
3	0.5022	165892	0.021		
		167013	0.021		
4	0.5018	163334	0.021		
		163702	0.021		
5	0.5020	166102	0.021		
		164483	0.021		
6	0.5016	167178	0.021		
		166224	0.021		

[0124] 5.4中间精密度

[0125] 取丝瓜络标准汤剂样品,分别由两个实验员按以上确定的供试品溶液制备方法制备3份供试品溶液,分别按照以上确定的色谱条件于不同时间在相同仪器上(Waters-ACQUIYT-UPLC-H-Class,超高效液相色谱系统)分别进样1μl,测定其峰面积值,并计算其含量,计算其RSD,结果见表9。

[0126] 结果:中间精密度(RSD%=0.88%)良好。

[0127] 表9.中间精密度试验

实验人员	称样量/g	芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷		平均/%	RSD (%)
		峰面积	含量/%		
[0128]	X		161147	0.021	0.021
		0.5040	160525	0.020	
			161313	0.021	
		0.5013	160381	0.021	
			162868	0.021	
	Y	0.5022	162559	0.021	0.021
			164729	0.021	
		0.5040	164446	0.021	
			163509	0.021	
		0.5013	163346	0.021	
	165892	0.021	0.88		
0.5022	167013	0.021			

[0129] 5.5准确度试验

[0130] 取丝瓜络标准汤剂样品(芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷:0.21mg/g),平行六份,精密称定,分别加入与0.25g样品含量相同的芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷对照品溶液,按以上确定的供试品溶液制备方法制成加样回收供试品溶液,按以上确定的色谱条件进样,分别进样1μl,以下列公式计算回收率,RSD,结果见表10。

测得量 (mg) - 样品中含量 (mg)

$$[0131] \quad \text{回收率} (\%) = \frac{\text{测得量 (mg) - 样品中含量 (mg)}}{\text{加入对照品量 (mg)}} \times 100\%$$

[0132] 结果:芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷回收率在85%~110%之间,准确度试验良好。

[0133] 表10.准确度试验

序号	取样量 (g)	总样品 量(mg)	总加标 量(mg)	总测得 量(mg)	回收率 (%)	平均回收 率 (%)	RSD (%)
1	0.2497	0.0528	0.0622	0.1057	85.08	85.03	0.69
		0.0528	0.0622	0.1057	85.03		
2	0.2486	0.0525	0.0622	0.1059	85.72		
		0.0525	0.0622	0.1050	84.33		
3	0.2452	0.0518	0.0622	0.1047	84.92		
		0.0518	0.0622	0.1050	85.42		
4	0.2465	0.0521	0.0622	0.1048	84.77		
		0.0521	0.0622	0.1052	85.31		
5	0.2491	0.0526	0.0622	0.1050	84.13		
		0.0526	0.0622	0.1050	84.21		
6	0.2486	0.0525	0.0622	0.1058	85.64		
		0.0525	0.0622	0.1059	85.81		

[0135] 5.6专属性试验

[0136] 取空白溶剂,芹菜素-7-0-β-D-葡萄糖醛酸苷对照品溶液,供试品溶液,按以上确定的色谱条件各进样1μl,结果见图8。

[0137] 结论:由结果可知,溶剂对芹菜素-7-0-β-D-葡萄糖醛酸苷没有干扰,具有较强的专属性。

[0138] 5.7延迟性试验

[0139] 取丝瓜络标准汤剂样品1份,按以上确定的色谱条件进样分析,在相同的色谱条件上,保持乙腈比例最高时的洗脱梯度,洗脱时间延长一倍,记录色谱图,结果见图9。

[0140] 结论:原梯度洗脱结束后无明显色谱峰流出,表明该色谱条件基本满足了信息量最大的原则。

[0141] 5.8耐用性试验

[0142] 1) 稳定性试验

[0143] 取丝瓜络标准汤剂样品1份,按以上确定的供试品溶液的制备方法制备供试液,按以上确定的色谱条件进样分析,每隔2小时进样1μl,测定峰面积值,计算其RSD,共测定12小时,结果见表11。

[0144] 结果:供试品溶液在12小时内稳定性良好(RSD% < 2.0%)。

[0145] 表11. 稳定性试验测定结果

进样时间/h	峰面积
	芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷
0	164446
2	164146
4	164375
[0146] 6	164602
8	161968
12	161231
均值	163461
RSD%	0.82

[0147] 2) 不同流速考察

[0148] 取丝瓜络标准汤剂样品1份,按以上供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,考察0.22ml/min、0.25ml/min、0.28ml/min三个流速,结果见表12、图10。

[0149] 结果:流速在0.22ml~0.28ml区间对样品的测定结果影响较小,耐用性良好,因为0.25ml/min较为常用,将流速最终确定为0.25ml/min。

[0150] 表12.不同流速考察

流速 (ml/min)	称样 量/g	芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷			芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸 苷含量%
		峰面积	分离度	塔板数	
[0151] 0.22	0.5040	188026	7.04	7584	0.021
0.25	0.5040	164729	7.94	8304	0.021
0.28	0.5040	150284	7.63	7083	0.022

[0152] 3) 不同柱温考察

[0153] 取丝瓜络标准汤剂样品1份,按以上确定的供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,考察35℃、40℃、45℃三个温度,结果见表13、图11。

[0154] 结果:柱温35℃时,芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷峰形及分离度较差;柱温在40℃~45℃区间对样品的测定结果影响较小,耐用性良好。由于45℃温度较高,色谱柱长时间处于高温状态下,填料稳定性受到影响,最终确定柱温为40℃。

[0155] 表13.不同柱温的考察

	柱温/°C	称样量/g	芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷			含量%
			峰面积	分离度	塔板数	
[0156]	35	0.5040	128329	10.64	10031	0.017
	40	0.5040	164446	7.73	7676	0.021
	45	0.5040	161633	6.79	7062	0.020

[0157] 4) 色谱柱考察

[0158] 取丝瓜络标准汤剂样品1份,按以上确定的供试品溶液的制备方法制备供试液,分别采用柱1:Hypersil GOLD Aq VANQUISH (Thermo, 2.1×150mm, 1.9μm)、柱2:ACQUITUY UPLC BEH C18 (Waters, 2.1×100mm, 1.7μm)、柱3:ZORBAX SB-C18 (Agilent, 2.1×100mm, 1.8μm) 三种色谱柱,对丝瓜络标准汤剂样品进行分析,结果见表14、图12。

[0159] 结果:三种不同型号色谱柱的分离效果均较好,保留时间适中,说明色谱柱对样品的测定结果影响较小。

[0160] 表14. 不同色谱柱的比较

	色谱柱型号	称样量/g	芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷			
			峰面积	分离度	塔板数	含量%
[0161]	柱 1	0.5040	161323	10.52	14983	0.017
	柱 2	0.5040	167066	7.14	7901	0.017
	柱 3	0.5040	164729	7.94	8304	0.021

[0162] 实施例2:不同批次的丝瓜络标准汤剂的UPLC检测方法

[0163] 取16批不同产地的丝瓜络饮片(见表1),按实施例1中制备标准汤剂相同的方法制成标准汤剂,按实施例1确定的供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,按以上确定的色谱条件进样分析,具体结果如下:

[0164] 表15. 不同批次的丝瓜络标准汤剂的芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的检测

序号	批号	芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷的含量%
1	YP1	0.028
2	YP2	0.034
3	YP3	0.017
4	YP4	0.038
5	YP5	0.0019
6	YP6	0.014
7	YP7	0.017
8	YP8	0.0029
[0165] 9	YP9	0.0032
10	YP10	0.015
11	YP11	0.030
12	YP12	0.013
13	YP13	0.025
14	YP14	0.039
15	YP15	0.050
16	YP16	0.038
	平均值	0.0227
	SD	0.0146

[0166] 结果表明,采用本发明的UPLC含量检测方法能够对来自不同产地的丝瓜络的标准汤剂进行检测。

[0167] 以上实施例仅用于阐明本发明的若干实施方案,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明的范围产生任何限制。应当明确的是,对于本领域技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围之内。

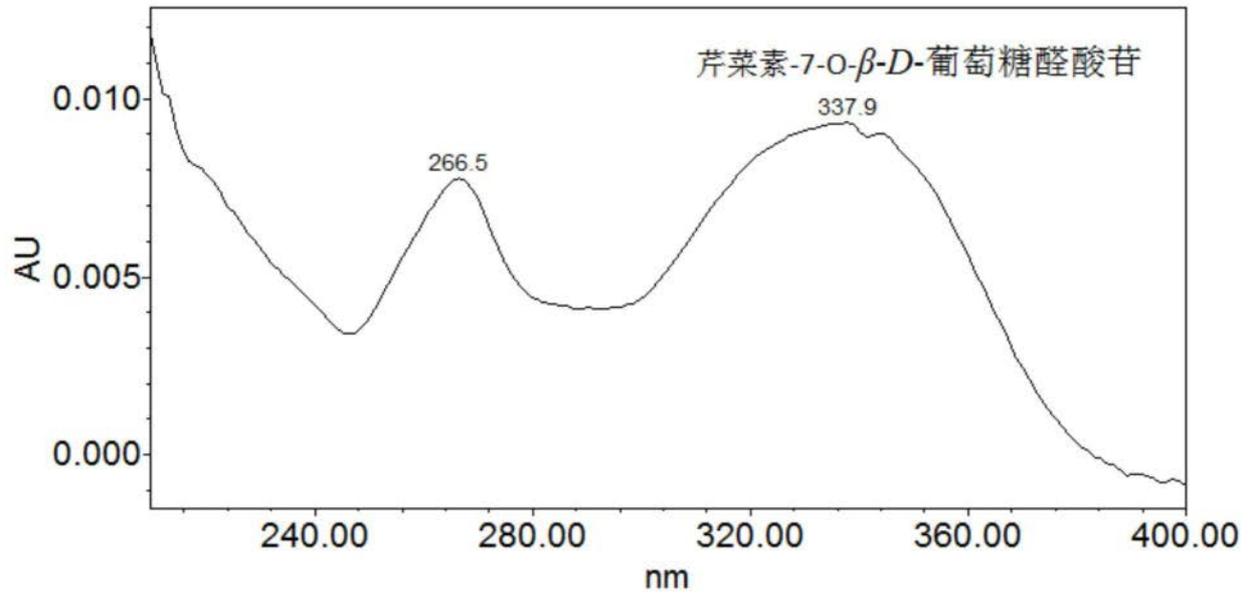


图1

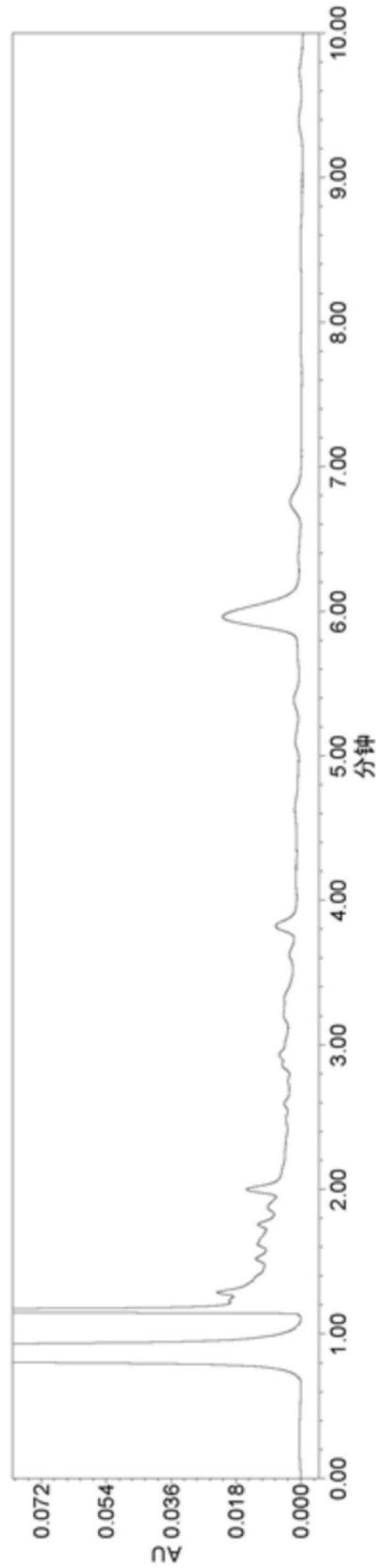


图2

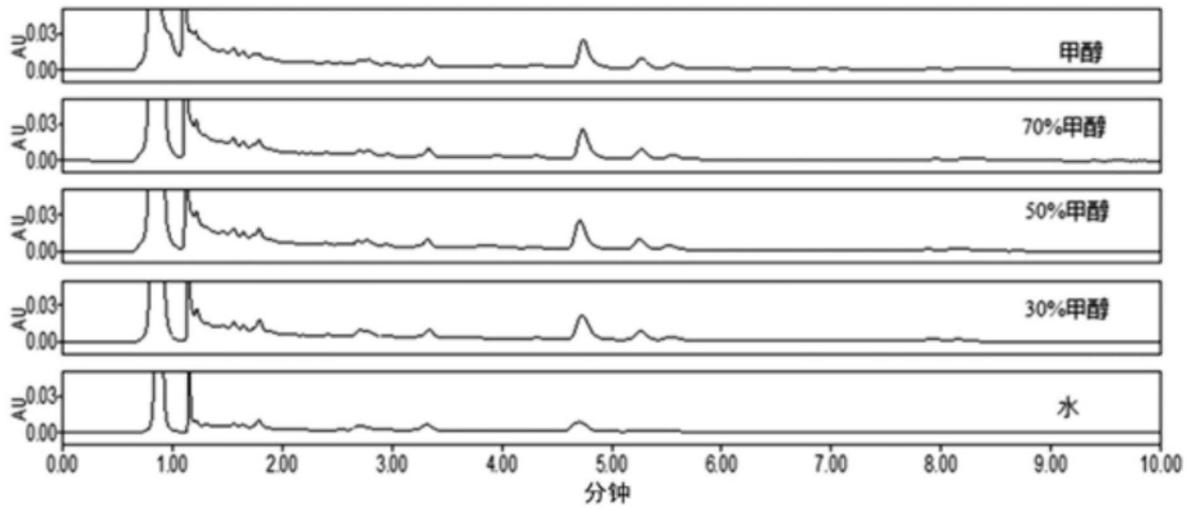


图3

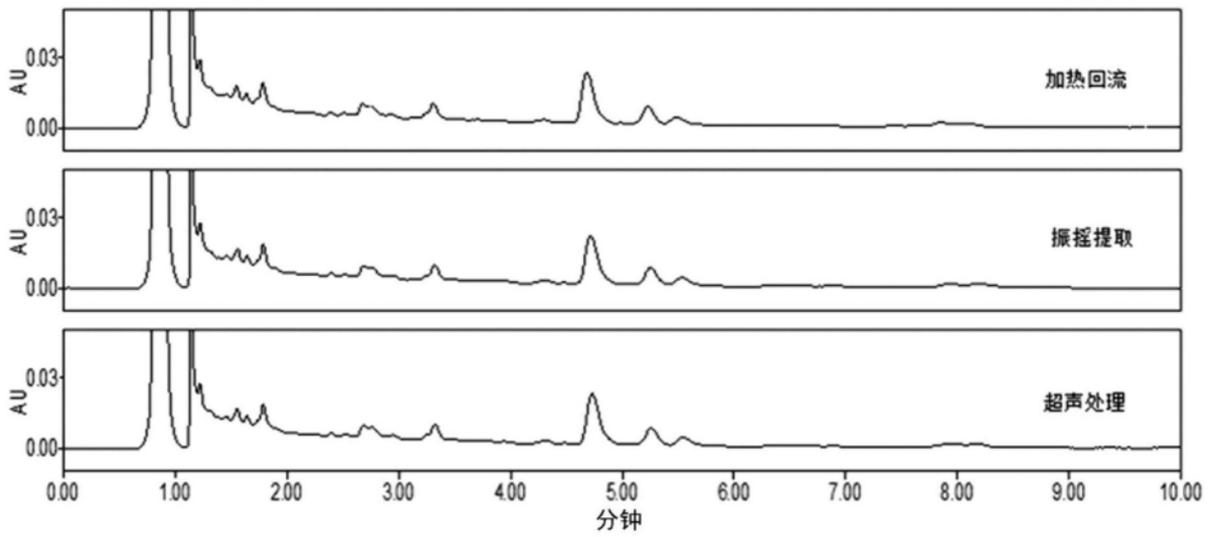


图4

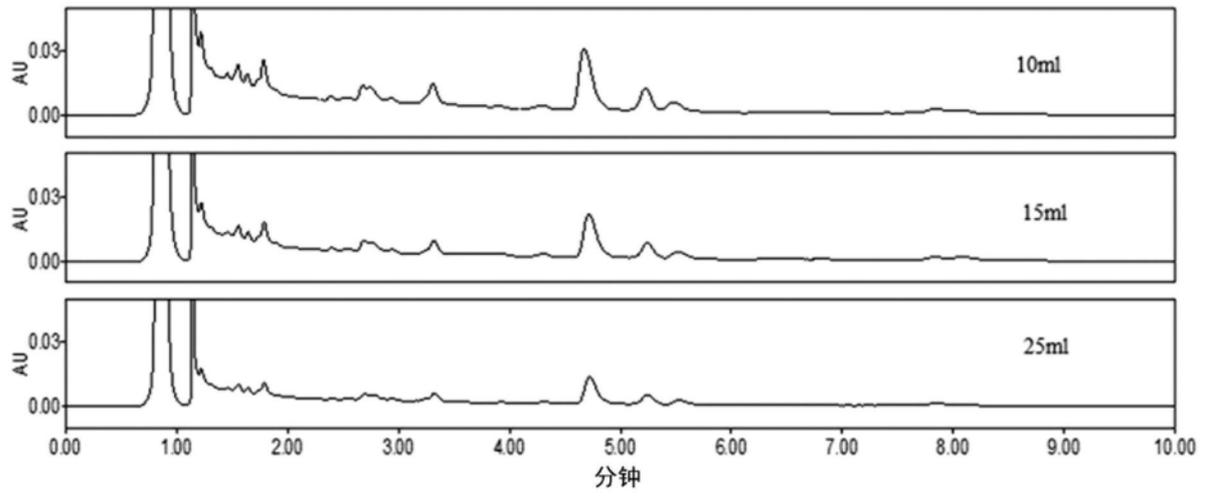


图5

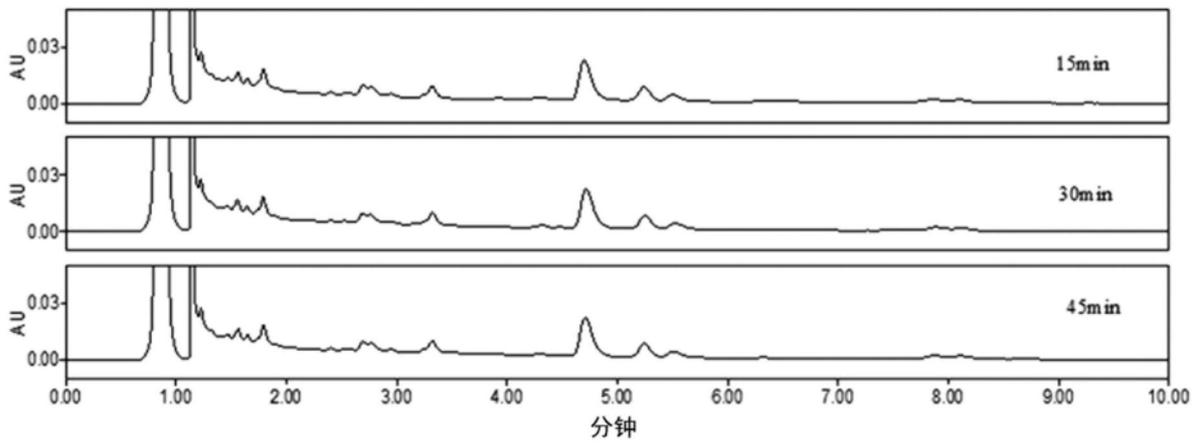


图6

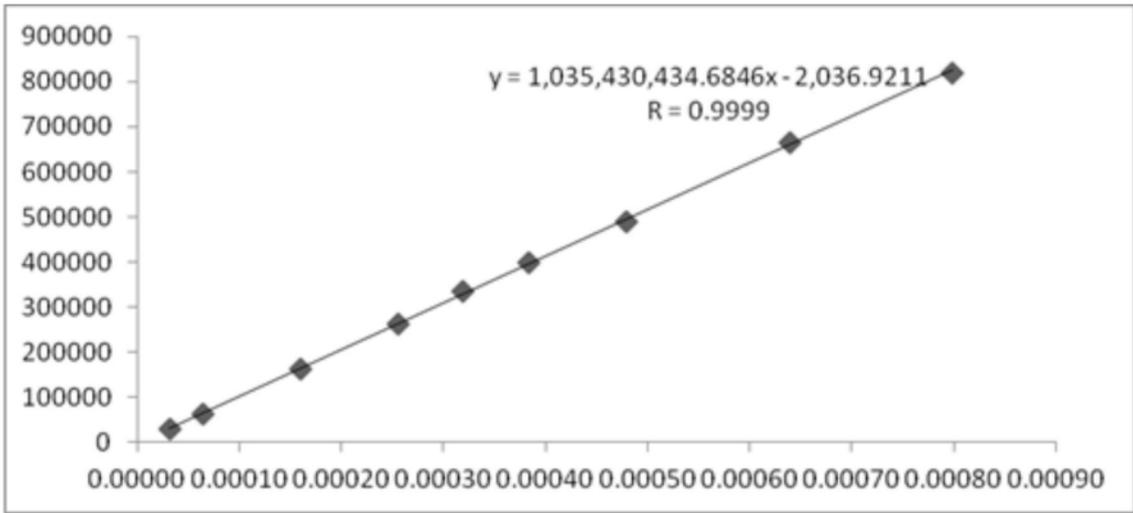


图7

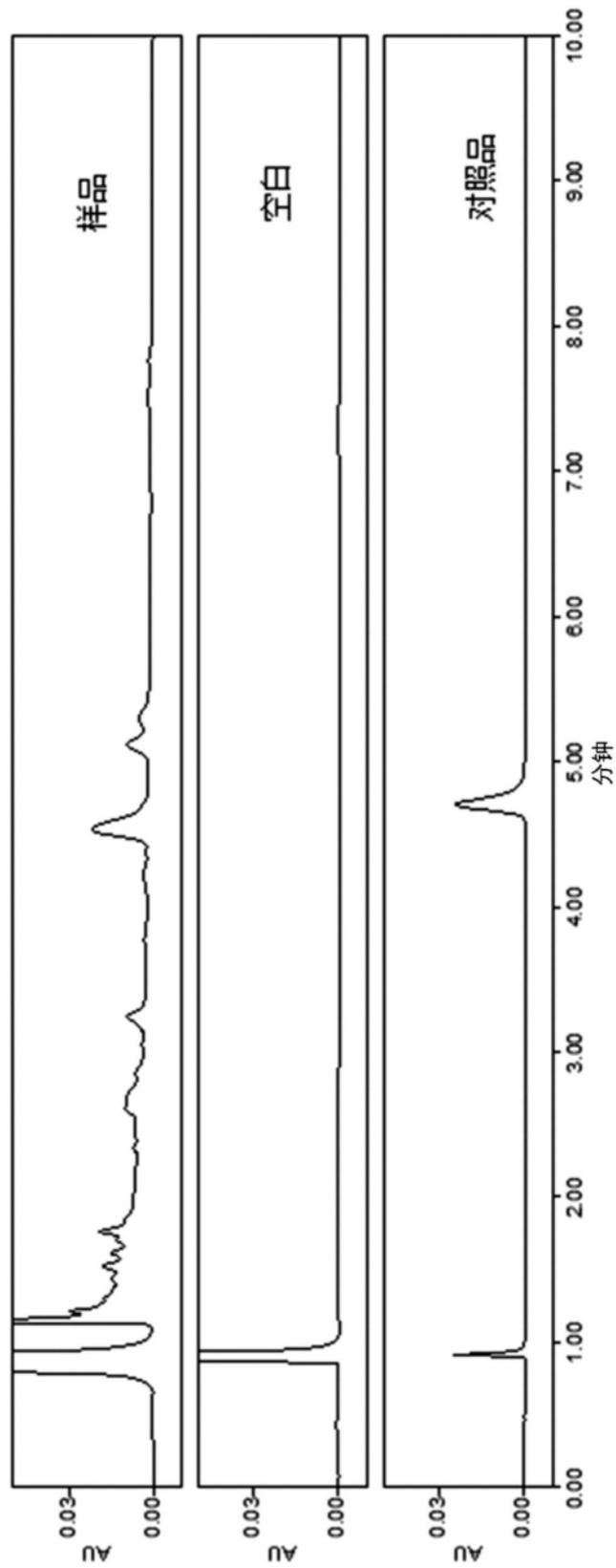


图8

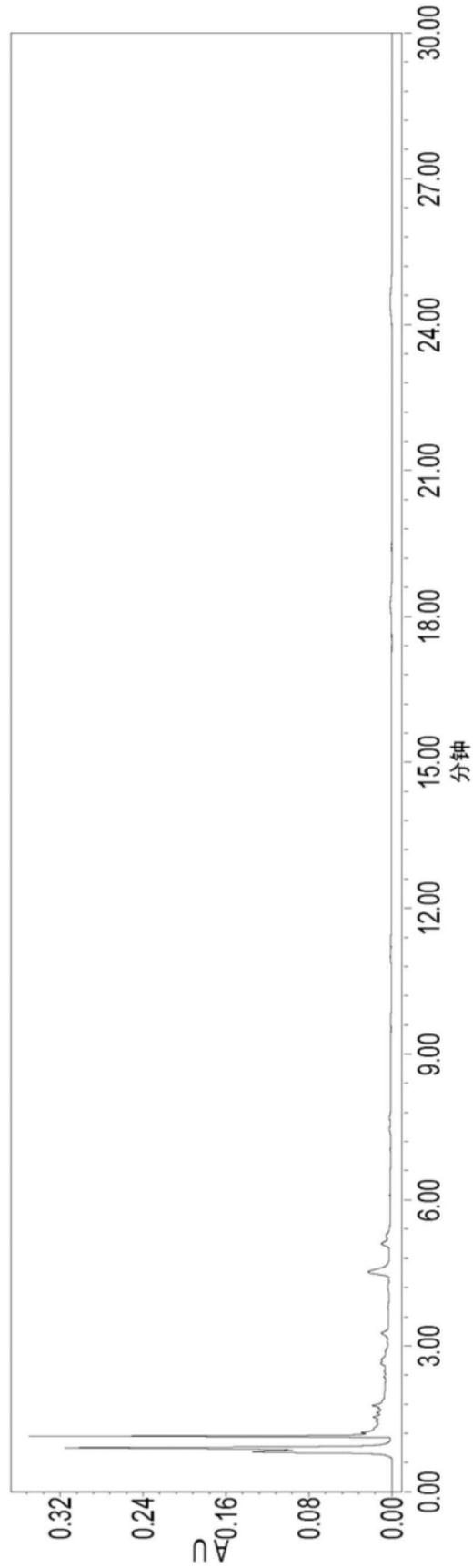


图9

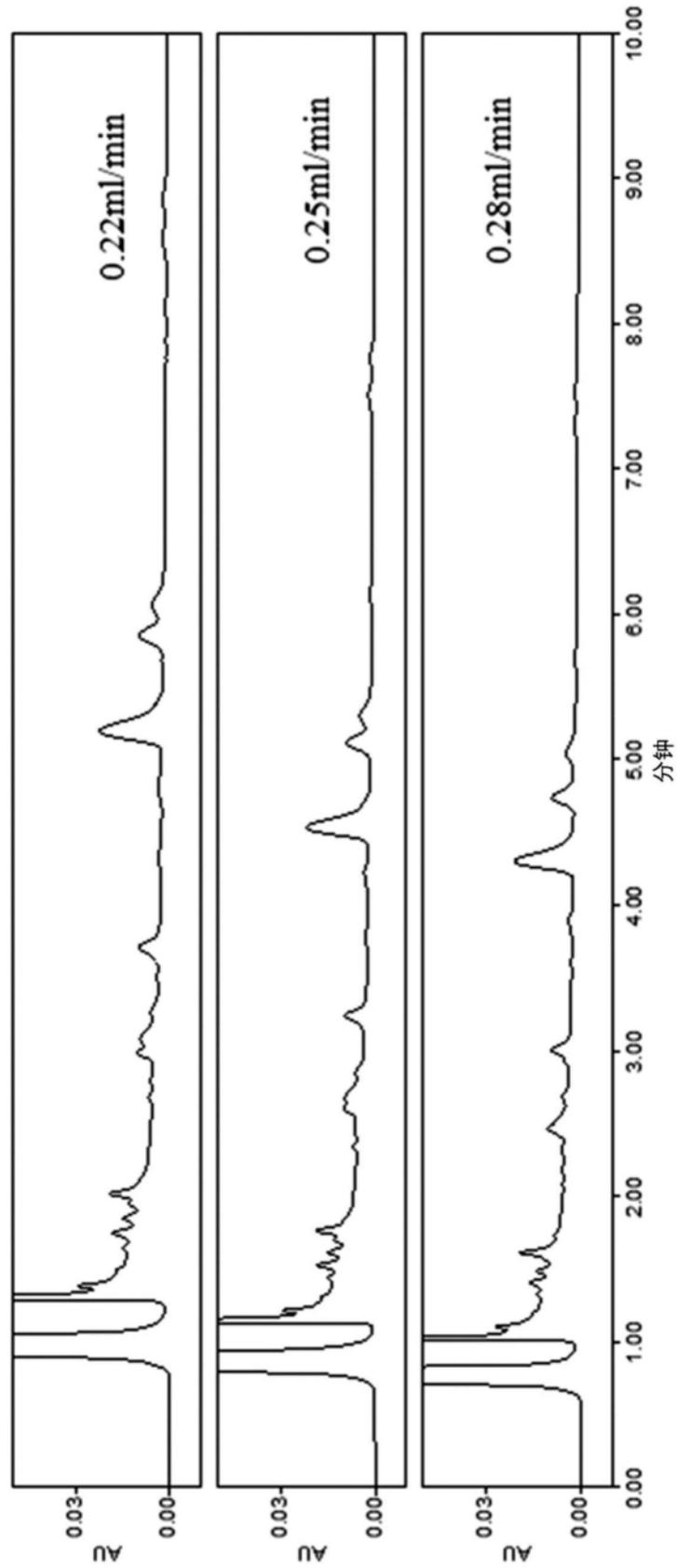


图10

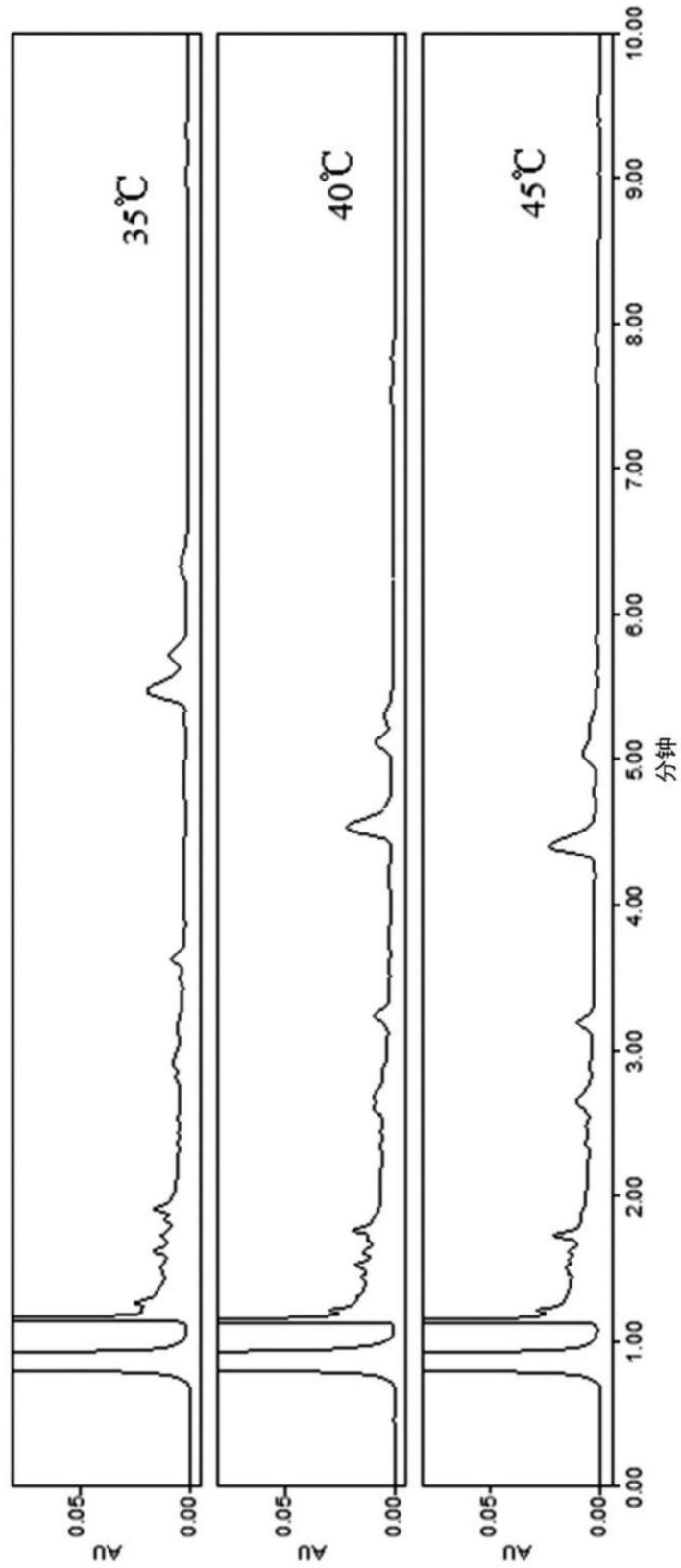


图11

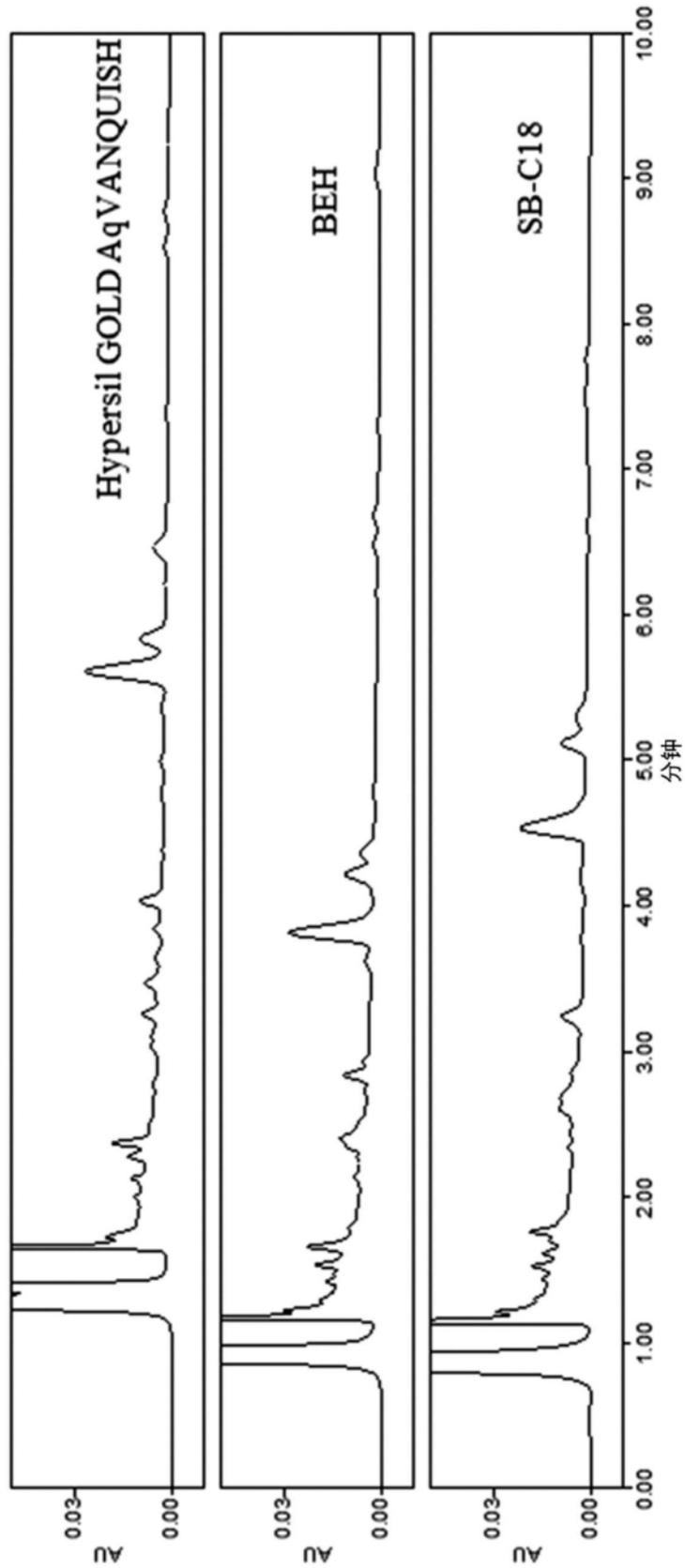


图12