HPLC-CAD 结合固相萃取测定川楝子中川楝素的含量

黄幼媚[1,2], 张兆兰[1,2], 董 跨[1,2], 谷丽华[1,2], 熊爱珍[1,2*], 杨 莉[1,2*], 王峥涛[1,2]

(1. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 国家中医药管理局中药新资源与质量评价重点实验室, 上海 201203; 2. 中药功效成分发掘与利用全国重点实验室, 上海 201203)

摘要: 建立高效液相串联电雾式检测器法 (HPLC-CAD) 测定川楝子中川楝素含量的方法。利用C18固相萃取小柱对样本进行除杂和净化制备供试品溶液: 将川楝子甲醇提取物溶解于 5 mL 30% 甲醇上柱, 6 mL 30% 甲醇、6 mL 甲醇分别洗脱, 收集甲醇洗脱液制备供试品溶液; 供试品溶液采用 Agilent ZOBAX SB C_{18} (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱进行分离, 流动相为乙腈−水 (33∶67), 柱温 30 ℃。以CAD为检测器, 雾化气为氮气, 雾化气压力为55 psi, 雾化室温度35 ℃。结果显示, HPLC-CAD法测定川楝子中川楝素, 其色谱表征清晰、干扰较小、色谱峰分离度好; 方法学考察结果表明, 该方法灵敏、准确、稳定可靠, 定量限为24.0 ng, 精密度、重复性、稳定性RSD均小于5.0%, 高、中、低三个浓度的回收率为95.9%～99.7%; 利用该方法测定10批次川楝子中川楝素的含量并利用Pearson相关性分析, 将该结果与LC-MS法测定结果比较, 表明两种检测方法结果相近且总体呈强正相关 (相关系数为0.995 0, $P < 0.001$)。本研究建立了HPLC-CAD结合固相萃取测定川楝子中川楝素含量的方法, 该方法简便、可靠, 为川楝子质量控制与质量评价提供测定方法和参考依据。

关键词: 川楝子; 川楝素; HPLC-CAD; 固相萃取; 含量测定

中图分类号: R917 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)09-2876-07

Determination of toosendanin in Toosendan Fructus by HPLC-CAD coupled with solid phase extraction

HUANG You-mei[1,2], ZHANG Zhao-lan[1,2], DONG Kua[1,2], GU Li-hua[1,2], XIONG Ai-zhen[1,2*], YANG Li[1,2*], WANG Zheng-tao[1,2]

(*1. The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and the SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. State Key Laboratory of Discovery and Utilization of Functional Components in Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China*)

Abstract: A method was developed for the determination of toosendanin in Toosendan Fructus by HPLC coupled with charged aerosol detector (CAD) in the present study. Solid phase extraction (SPE) was employed for sample pretreatment to remove the impurities and enrich the target compounds. The methanal extracts of Toosendan Fructus were dissolved in 5 mL of 30% methanol and loaded to a C18 SPE column, followed by eluting with 6 mL of 30% methanol and 6 mL of methanol, respectively; and the components eluted with methanol was collected and used for preparation of the sample solution. Samples were separated on an Agilent ZOBAX SB C_{18} column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) using the mixture of acetonitrile and water (33∶67) as the mobile phase, the column temperature

收稿日期: 2025-02-05; 修回日期: 2025-06-11.

基金项目: 国家药典委员会标准制修订研究课题 (2023Z003, 2025Z001); 上海市“科技创新行动计划”技术标准专项 (23DZ2203300); 上海市人才发展资金 (2020099).

*通讯作者 Tel: 86-21-51322506, Fax: 86-21-51322519, E-mail: aizhenxiong@shutcm.edu.cn; yl7@shutcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0096

was 30 ℃. The nitrogen inlet pressure of the CAD detector was 55 psi and the nebulizer chamber temperature was 35 ℃. As results, the HPLC-CAD spectrum of Toosendan Fructus sample was clear with little interference, and the separation of the target compound toosendanin was good. The established method was well validated, and showed high sensitivity, precision, good repeatability, and satisfactory stability. The limit of detection of toosendanin was 24.0 ng, the RSD values for precision, repeatability, and stability tests were all less than 5.0%; the recoveries of toosendanin at high, middle, and low levels were ranged from 95.9% to 99.7%. The established HPLC-CAD method was applied for quantification of toosendanin in 10 batches of Toosendan Fructus samples and compared with those of the LC-MS method. Pearson correlation analysis showed that the contents of toosendanin determined by the two methods were very similar and was highly positively correlated (the correlation coefficient was 0.995 0, $P < 0.001$). In conclusion, a method for determination of toosendanin in Toosendan Fructus was established by HPLC-CAD coupled with SPE, providing references for the quality control and evaluation of Toosendan Fructus.

Key words: Toosendan Fructus; toosendanin; HPLC-CAD; solid phase extraction; content determination

川楝子 (Toosendan Fructus) 为我国传统用药, 从东汉时期的《神农本草经》至现代各版本的中国药典及地方标准均有收载[1,2]。《神农本草经》称其为“楝实”; 明代《本草正》称之为“川楝子”。中国药典 (2020 年版) 收录川楝子为楝科植物川楝 (*Melia toosendan* Sieb.et Zucc.) 的干燥成熟果实。川楝子苦、寒, 有小毒; 归肝、小肠、膀胱经; 具有疏肝泄热、行气止痛、杀虫的功效, 用于肝郁化火, 胸胁、脘腹胀痛, 疝气疼痛, 虫积腹痛。迄今为止从川楝子中共分离得到 166 种化合物, 包括三萜、有机酸、类黄酮、挥发油、类固醇、木脂素[2,3]等。其中, 三萜类化合物是目前在川楝子中报道最多的一类化合物。川楝素 (toosendanin, TSN) 是一种含 C-19/C-29-桥缩醛结构的柠檬苦素型三萜成分[4], 是川楝子的特征性成分, 也是川楝子的主要活性成分[3], 具有抗肿瘤[5]、抗肉毒中毒[6]、抗肥胖[7]、驱虫杀虫[8]等活性; 川楝素也具有潜在的肝毒性[9-11], 是川楝子中主要的毒性成分[12]。中国药典 (2020 年版) 中川楝子的质量控制指标为川楝素, 规定了其含量范围。在评价川楝子药材的质量时, 必须重点关注川楝子中川楝素的含量。川楝子测定方法主要包括高效液相串联质谱法 (HPLC-MS)[1,13-15]、高效液相串联紫外检测器法 (HPLC-UV)[16-18]、高效液相连接蒸发光散色检测器 (HPLC-ELSD)[19] 和高效液相连接电雾室检测器 (HPLC-CAD)[20]。中国药典 (2020 年版) 采用 LC-MS 法测定川楝子中川楝素的含量, 但该方法检测设备昂贵、使用成本高且操作复杂, 普及率低, 限制了其进一步的推广应用。三萜类化合物紫外吸收弱, 采用 HPLC-UV 分析川楝素的灵敏度低且难以达到理想的基线分离[21], 在一定程度上降低了分析的准确性; HPLC-ELSD 虽然利于末端紫外吸收化合物的检测, 但对于药材中含量较低成分 (如川楝素) 的检测不够灵敏[20]。因此, 亟需建立简单、灵敏、准确的方法, 用于川楝子药材中川楝素的含量测定。

CAD 有效弥补了 ELSD 在灵敏度方面的不足和 UV 无紫外吸收或弱吸收的问题, 为传统检测方法中难以准确测定的微量无紫外吸收或弱吸收成分提供了一种更为可靠的分析手段[22-24]。固相萃取法 (solid phase extraction, SPE) 作为一种广泛应用的净化技术, 能够显著降低样品中的干扰物质, 减少噪声信号水平[25], 从而提升了分析的准确性和灵敏度。因此, 本研究采用 HPLC-CAD 结合固相萃取法建立川楝子中川楝素含量测定的方法, 对不同批次川楝子进行含量测定, 并比较 HPLC-CAD 法和 LC-MS 法的检测结果, 证实 CAD 检测器用于川楝子含量测定研究的优势, 以期为川楝子的质量控制提供依据。

材料与方法

仪器 Thermo Ultimate™ 3000 高效液相色谱仪 (配置 CAD 检测器和 DAD 检测器), 美国赛默飞世尔科技公司; Agilent 1260 高效液相色谱仪 (配置 ELSD 检测器和 DAD 检测器) 和 Agilent ZOBAX SB C_{18} (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 美国安捷伦科技有限公司; SHIMADZU SIL-30ALite 高效液相色谱仪, 日本岛津公司, 连接 QTRAP™ 6500 质谱系统 (配置电喷雾电离离子源), 美国 AB Sciex 公司; Waters XBridge C_{18} (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 固相萃取柱 Sep-Pak C18 (1 g/6 mL), 美国沃特世公司; SelectCore HR C18 (1 g/6 mL), 中国纳谱分析技术有限公司; SQP 型电子天平和 BCE2241-1CCN 型电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司。

试剂与样品 甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher Scientific 公司); 甲醇 (分析纯, 国药集团); 甲酸 (色谱纯, 美国 Acros 公司); Milli-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); 川楝素标准品 (Toosendanin, TSN, 批号为 58812-37-6, 纯度大于 98%) 购于诗丹德; 10 批次市售

川楝子药材购自全国不同地区, 经作者鉴定为楝科植物川楝 *Melia toosendan* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果实 (表 1)。

Table 1 The details of 10 batches of Toosendan Fructus samples

No.	Geographical origin	Supplier
1	Sichuan	Linyi City You Jia big pharmacy, Shandong
2	Sichuan	Guangming decoction piece processing plant, Henan
3	Guangxi	Xiamen Wenzao lotus pharmacy, Fujian
4	Sichuan	Chengdu Lotus Pond medicinal materials market, Sichuan
5	Sichuan	Chengdu Lotus Pond medicinal materials market, Sichuan
6	Sichuan	Chengdu Lotus Pond medicinal materials market, Sichuan
7	Sichuan	Chengdu Lotus Pond medicinal materials market, Sichuan
8	Sichuan	Shanghai Shiming TCM pharmacy, Shanghai
9	Yunnan	Yulin Chinese herbal medicine market, Guangxi
10	Yunnan	Yulin Chinese herbal medicine market, Guangxi

HPLC-CAD法检测条件 色谱柱: Agilent ZOBAX SB C_{18} (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 进样量: 10 μL; 流动相: 乙腈−水 (33∶67) 等度洗脱; 流速: 1 mL·min^{-1}; 柱温: 30 ℃; CAD雾化气为氮气, 数据收集率5 Hz, 过滤时间5 s, 雾化气压力为55 psi, 雾化室温度35 ℃。

LC-MS法检测条件 色谱柱: Waters Acquity UPLC BEH C_{18} (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 柱温: 40 ℃; 进样量: 2 μL; 流速: 0.4 mL·min^{-1}; 流动相: 乙腈 (A)−0.01%甲酸水溶液 (B) 梯度洗脱: 0～0.2 min, 31% A; 0.2～4 min, 55% A; 4～4.1 min, 95% A; 4.1～5 min, 95% A; 负离子模式下选择离子监测 *m*/*z* 573.2。

SPE方法优化 取同一川楝子供试品 (7号), 按中国药典 (2020年版) 川楝子“含量测定”项提取: 取川楝子药材中粉0.25 g, 精密称定, 精密加入甲醇50 mL, 称定重量, 加热回流1 h, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀。滤过, 取续滤液25 mL, 减压回收至干, 计算川楝素两色谱峰面积之和, 分别考察SPE方法中不同SPE小柱 (SelectCore HR C18、Sep-Pak C18)、上样液溶剂 (20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%甲醇)、淋洗液体积 (2、4、6、8、10 mL) 和洗脱液体积 (2、4、6、8、10 mL) 等。

对照品溶液储备液 精密称取川楝素对照品适量, 甲醇溶解并定容, 摇匀, 配制成浓度为1.0 mg·mL^{-1}的川楝素对照品储备液。

供试品溶液的制备 取川楝子药材中粉0.25 g, 精密称定, 精密加入甲醇50 mL, 称定重量, 加热回流1 h, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 过滤。取续滤液25 mL, 减压回收至干, 加甲醇1.5 mL溶解, 加水3.5 mL, 摇匀, 溶液转移至固相萃取小柱 (固相萃取小柱分别用适量甲醇和水预洗), 用30%甲醇6 mL洗脱, 弃去洗脱液; 再用甲醇6 mL洗脱, 收集洗脱液, 转移至10 mL量瓶中, 用甲醇定容, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

方法学考察

线性与范围 精密吸取川楝素对照品储备液适量, 加甲醇逐级稀释得到浓度分别为4.0、8.0、16.0、32.0、64.0、128.0、256.0 μg·mL^{-1}的系列对照品溶液。精密吸取各浓度对照品溶液10 μL, 分别注入液相色谱仪, 按“HPLC-CAD法检测条件”分析。以对照品浓度 (*X*) 为横坐标, 以川楝素两色谱峰面积之和 (*Y*) 为纵坐标, 进行线性回归, 计算线性回归方程和相关系数。

检测限和定量限 以对照品溶液逐级稀释法进样检测, 根据川楝素较小峰确定检测限与灵敏度: 以信噪比为3∶1和10∶1确定川楝素的检测限和定量限。

精密度试验 取同一川楝素对照品溶液连续进样6次, 记录川楝素两色谱峰面积之和, 计算相对标准偏差 (RSD), 考察仪器日内精密度; 连续进样三天, 记录川楝素两色谱峰面积之和, 计算RSD值, 考察仪器日间精密度。

稳定性试验 取同一川楝子供试品溶液 (7号), 于不同时间 (0、2、4、8、16、24、48 h) 进样, 计算川楝素两色谱峰面积之和, 计算RSD值, 考察仪器的稳定性。

重复性试验 取同一供试品粉末共6份 (7号), 精密称定, 按“供试品溶液制备”项下方法制备供试品溶液, 按“HPLC-CAD法检测条件”项下进样测定, 计算川楝素两色谱峰面积之和, 计算RSD值, 考察方法的重复性。

加样回收试验 取已知川楝素含量的供试品粉末9份 (7号), 精密称定, 分别加入已知含量50%、100%、150%的川楝素对照品, 按“供试品溶液制备”项下方法制备供试品溶液, 按“HPLC-CAD法检测条件”项下进样测定, 记录川楝素两色谱峰面积之和, 计算川楝素的含量, 计算加样回收率。

系统适用性考察 取同一川楝子供试品溶液 (7号), 分别考察色谱条件的不同色谱柱 (Agilent ZOBAX SB C_{18}, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm; Waters XBridge C_{18}, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 不同柱温 (28、30、32 ℃), 不同流速 (0.8、1.0、1.2 mL·min^{-1}), 测定待测成分的含量并计算不同条件的RSD值。

HPLC-CAD法测定川楝子样品中川楝素的含量 取不同批次川楝子, 按“供试品溶液制备”项下方法制备供试品溶液, 按“HPLC-CAD法检测条件”项下

进样测定, 记录川楝素两色谱峰面积之和, 计算各批次川楝子中川楝素的含量。

LC-MS 法测定川楝子样品中川楝素的含量 取不同批次的川楝子粉末, 按中国药典(2020 年版) 川楝子“含量测定”项进行测定, 记录川楝素两色谱峰面积之和, 计算各批次川楝子中川楝素的含量。

相关性分析 采用 GraphPad Prism 9.5 软件对 LC-MS 法和 HPLC-CAD 法测得的川楝子中川楝素含量进行 Pearson 相关性分析, 获得相关性系数 r 和显著性 P: 若 $0.8 \leqslant |r| < 1$, 则两变量强相关; $P < 0.001$, 两变量具有显著的线性相关性。

结果

1 HPLC-CAD、HPLC-UV 及 HPLC-ELSD 测定川楝素灵敏度比较和图谱对比

分别以 HPLC-CAD、HPLC-UV 及 HPLC-ELSD 法测定 1.0 mg·mL^{-1} 川楝素对照品溶液。结果如图 1 所示, HPLC-CAD 含量测定色谱图中指标性成分川楝素的色谱峰较 HPLC-ELSD 及 HPLC-UV 有更高的灵敏度 (川楝素最小峰信噪比: HPLC-CAD, 164.9; HPLC-ELSD, 80.0; HPLC-UV, 96.0), 因此 CAD 检测器更适用于川楝子中川楝素的含量测定。

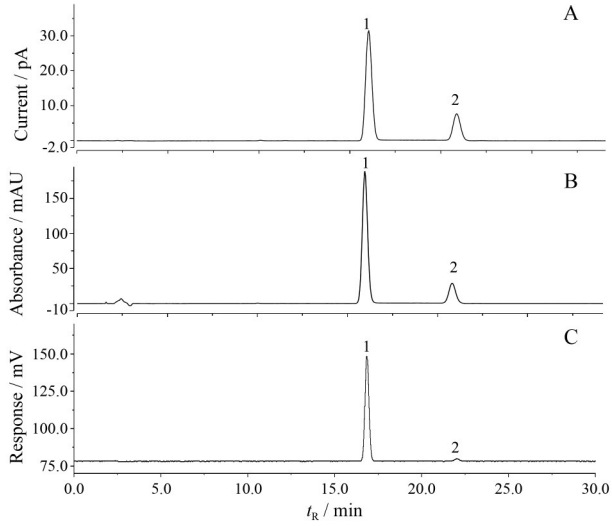


Figure 1 Comparison of the chromatogram of toosendanin by HPLC-CAD (A), HPLC-UV (B) and HPLC-ELSD (C). 1, 2: Toosendanin

2 HPLC-CAD 测定川楝子中川楝素含量的供试品前处理方法优化

川楝子成分复杂, 含多种川楝素类似物, 参考中国药典 (2020 年版) 川楝子含量测定项下方法进行样本提取, 并采用 HPLC-CAD 方法对其含量测定时, 可见大量前端干扰 (图 2A), 影响川楝素含量测定的准确度。固相萃取法是样本前处理时常用的净化方法, 操作简便, 降低干扰、降低噪声信号水平, 采用商品化固相萃取柱可依托其标准化生产工艺与严格质控体系, 显著提升方法的实验室间可重复性与长期操作稳定性, 这一优势在复杂基质样本分析中尤为关键。固相萃取在中药材[26-29]及复方[30-32]分析中已得到大量应用。本研究将固相萃取法应用于川楝子含量测定中, 并对其进行优化, 以实现目标化合物川楝素的净化和富集。

比较两种常用的 SPE 小柱, Sep-Pak C18 对川楝素的富集效果明显优于 Select-Core HR C18 柱, 对川楝素的富集率可达 96.5% (RSD = 2.69%, n = 5)。通过系统优化上样溶剂极性, 发现 30% 甲醇可在有效洗脱中等极性干扰物的同时, 又保留川楝素, 故选定 30% 甲醇为上样溶剂; 40% 甲醇可洗脱少量川楝素; 50% 甲醇可洗脱 77.15% 的川楝素; 60% 甲醇可洗脱 99.64% 的川楝素; 90% 甲醇可将川楝素完全洗脱。因此, 选择 30% 甲醇作为上样液和淋洗液, 以甲醇作为洗脱液。进一步考察淋洗液和洗脱液体积, 发现 6 mL 30% 甲醇淋洗液可去除大部分的前端干扰, 川楝素的吸附率达 99.99% (RSD = 0.01%, n = 5); 6 mL 甲醇可将川楝素全部洗脱, 川楝素的解吸附率达 97.00% (RSD = 1.64%, n = 5)。因此, 确定 SPE 条件为: 川楝子提取物以 30% 甲醇溶解上 Sep-Pak C18 (1 g/6 mL) 柱, 6 mL 30% 甲醇淋洗并弃去淋洗液, 再以 6 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液。经固相萃取处理后供试品溶液色谱图如图 2B 所示, 前端干扰大幅度降低, 色图谱更加美观, 川楝素表征更清晰, 基线更平稳, 川楝素的色谱峰与其他色谱峰分离度良好。因此, 采用固相萃取法进行样本前处理, 极大地降低了噪声干扰, 提高川楝素含量测定的灵敏度和准确性。

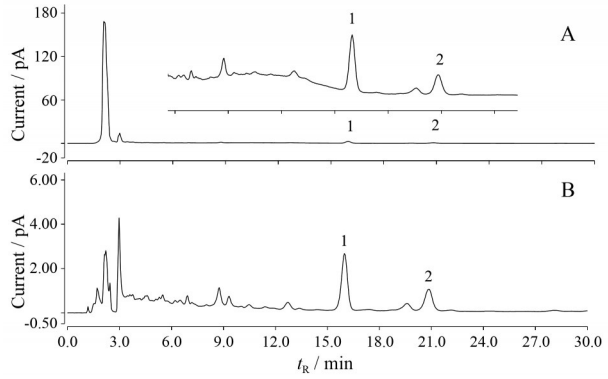


Figure 2 SPE improves the HPLC-CAD chromatogram of Toosendan Fructus. A: Toosendan Fructus sample solution before SPE treatment; B: Toosendan Fructus sample solution after SPE treatment

3 HPLC-CAD法测定川楝子中川楝素含量的方法学考察

3.1 线性及灵敏度 川楝素在4.0～256.0 μg·mL^{-1}内呈良好线性关系 (回归方程为 $Y = 0.011\ 7X + 0.031\ 8$, $R^2 = 0.999\ 7$)。以川楝素较小峰计算检测限与定量限: 确定川楝素的检测限为8.0 ng, 定量限为24.0 ng。

3.2 精密度 以川楝素两峰面积之和计算, 日内、间的RSD分别为0.91%、2.54%, 表明日间、日间精密度均良好。

3.3 稳定性 以川楝素两峰面积之和计算, 48 h内的峰面积RSD为0.59%, 表明供试品溶液在48 h内稳定性良好。

3.4 重复性 以川楝素两峰面积之和计算, RSD为4.38% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

3.5 加样回收率 三个浓度水平 (50%、100%和150%) 川楝素回收率均在95.86%～99.73%之间 (RSD < 5%), 说明该方法准确度良好。

3.6 系统适应性 三种不同流速 (0.8、1.0和1.2 mL·min^{-1}) 下测得川楝素含量的RSD为0.38%; 三种不同柱温 (28、30和32 ℃) 下测得川楝素含量的RSD为2.70%; 两种不同色谱柱测得川楝素含量的RSD为2.57%。以上结果表明流速、柱温、色谱柱对检测结果影响较小, 方法耐用性良好。

4 HPLC-CAD法测定川楝子中川楝素的含量

采用HPLC-CAD法测定10批川楝子中川楝素的含量, 典型色谱图如图3, 不同批次样本川楝素含量见表2。结果表明, 不同批次川楝子中川楝素含量差异较大 (0.66～2.44 mg·g^{-1}), 平均含量为1.50 mg·g^{-1}; 两批采自云南的川楝子样本中川楝素含量较高, 均高于2.00 mg·g^{-1}。

参照中国药典 (2020年版) 川楝子含量测定项下方法, 采用LC-MS法测定10批不同川楝子中川楝素的含量, 结果见表2。对两种方法测得的川楝素含量进行Pearson相关性分析, 二者总体呈正相关趋势, 相关系数为0.995 0 ($P < 0.001$), 表明HPLC-CAD法和LC-MS法测得的含量具有强相关性, 符合统计学意义。两种方法均以川楝素两异构体峰之和计算川楝素含量。LC-MS法选择性强、灵敏度高、样本前处理简单, 但方法检测设备昂贵、使用成本高且操作复杂, 普及率低, 限制了其进一步的推广应用。CAD检测器具有较高的灵敏度且兼顾重现性与稳定性, 操作简单, 维护简便; 本研究结合固相萃取进行样本前处理, 利用HPLC-CAD方法检测川楝素, 可满足川楝子中川楝素含量测定的要求。

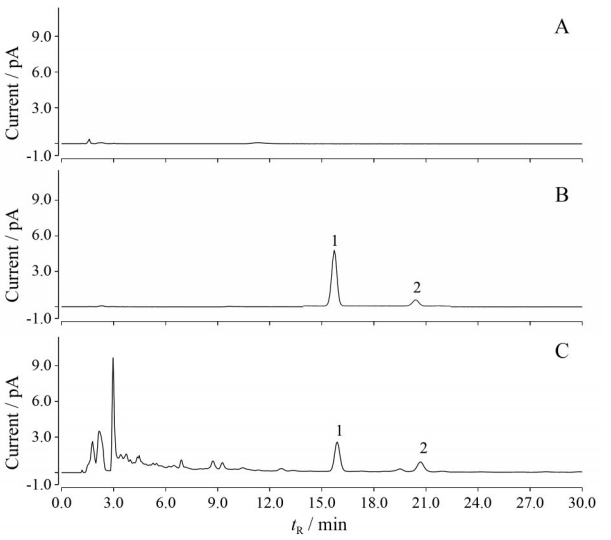


Figure 3 Typical chromatogram for HPLC-CAD analysis of toosendanin in Toosendan Fructus. A: Blank solvent; B: Toosendanin standard solution; C: Toosendan Fructus sample solution

Table 2 Contents of toosendanin in different batches of Toosendan Fructus (mg·g^{-1}). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

Sample No.	Content	
	HPLC-CAD	LC-MS
1	1.06 ± 0.003 8	1.02 ± 0.013 9
2	1.53 ± 0.004 2	1.67 ± 0.045 6
3	1.80 ± 0.010 5	1.98 ± 0.024 4
4	0.66 ± 0.007 3	0.69 ± 0.025 9
5	0.81 ± 0.010 5	0.92 ± 0.047 7
6	1.16 ± 0.030 3	1.30 ± 0.040 0
7	1.26 ± 0.006 8	1.32 ± 0.060 0
8	1.34 ± 0.002 3	1.53 ± 0.024 7
9	2.24 ± 0.019 5	2.49 ± 0.030 4
10	2.13 ± 0.012 5	2.33 ± 0.019 2

讨论

川楝素是川楝子发挥驱虫杀虫、抗肿瘤等药理活性的关键成分, 又具有潜在的肝脏毒性, 建立简便、灵敏、准确的川楝子中川楝素含量测定方法, 对于川楝子药材质量控制、保障其临床应用的安全性与有效性至关重要。本文建立了基于HPLC-CAD结合固相萃取的川楝子中川楝素含量测定方法, 并将其应用于不同批次川楝子的含量测定, 为川楝子质量控制提供依据。

本研究对利用固相萃取进行样本前处理的方法进行了细致的考察, 优化固相萃取净化与富集参数, 最终考察结果显示, 将川楝子提取液制成5 mL 30%甲醇上样液过Sep-Pak C18小柱, 再经过6 mL 30%甲醇淋洗除杂和6 mL甲醇洗脱富集, 可将大部分前端大极性干扰物去除并很好地富集川楝素, 提高了川楝素检测的灵敏度和准确度。Sep-Pak C18小柱对川楝素有较好的吸附力和解吸附能力。通过系统的方法学考察, 结果显示采用HPLC-CAD方法所建立的含量测定方法,

其精密性、重复性和稳定性良好, 表明该方法稳定、可靠。

有研究[19]比较了CAD、ELSD、UV三种检测器在川楝子指纹图谱研究的应用, 发现CAD指纹图谱能够表征出更多的色谱峰信息, 且更适用于川楝子中无紫外吸收或弱紫外吸收化合物 (如川楝素) 的检测。本研究在利用固相萃取进行样本前处理的基础上, 进一步比较了三种检测器在川楝素含量测定中的应用, 发现HPLC-CAD法测定川楝子中川楝素的含量具有更高的灵敏度、分离度、对称性, CAD检测器更适用于川楝子中川楝素的含量测定。

中国药典 (2020年版) 以LC-MS测定川楝子中川楝素的含量, 其选择性强、灵敏度高, 检测限可达0.007 ng[14]; 但该方法检测设备昂贵、使用成本高且操作复杂, 普及率低, 限制了其进一步的推广应用。本研究建立HPLC-CAD方法检测川楝素, 检测限为24.0 ng, 满足川楝子中川楝素含量测定的要求。此外, 采用HPLC-CAD法和LC-MS法测定10批次川楝子中川楝素的含量, 并对结果进行比较, 两种方法的测定结果相差较小, 进一步证实了HPLC-CAD法用于川楝子中川楝素含量测定的可靠性和简便性, 为川楝子中川楝素的含量测定和质量控制提供测定方法和参考依据。

作者贡献: 黄幼媚、熊爱珍设计实验、撰写及修改论文; 张兆兰、董跨负责实验样本及数据的采集; 谷丽华、杨莉、王峥涛提供学术指导; 熊爱珍、杨莉提供基金支持。

利益冲突: 无利益冲突。

References

[1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 ed. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 44.

[2] Chang H, Wang C, Gong LL, et al. An overview of Fructus Meliae Toosendan: botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 157: 113795.

[3] Fan WX, Fan LH, Wang ZT, et al. Limonoids from the Genus *Melia* (Meliaceae): phytochemistry, synthesis, bioactivities, pharmacokinetics, and toxicology [J]. Front Pharmacol, 2022, 12: 795565.

[4] Zhao B, Cheng M, Xue YB, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological activities and clinical application of Melia Cortex [J]. West China J Pharm Sci (华西药学杂志), 2023, 38: 227-235.

[5] Zhang J, Yang F, Mei X, et al. Toosendanin and isotoosendanin suppress triple-negative breast cancer growth *via* inducing necrosis, apoptosis and autophagy [J]. Chem Biol Interact, 2022, 351: 109739.

[6] Fischer A, Nakai Y, Eubanks LM, et al. Bimodal modulation of the botulinum neurotoxin protein-conducting channel [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106: 1330-1335.

[7] Chen T, Cheng X, Wang Y, et al. Toosendanin inhibits adipogenesis by activating Wnt/*β*-catenin signaling [J]. Sci Rep, 2018, 8: 4626.

[8] Lin YZ, Huang YT, Liu JF, et al. Characterization of the physiological, histopathological, and gene expression alterations in *Spodoptera frugiperda* larval midguts affected by toosendanin exposure [J]. Pestic Biochem Physiol, 2023, 195: 105537.

[9] Yang F, Li L, Yang R, et al. Identification of serum microRNAs as potential toxicological biomarkers for toosendanin-induced liver injury in mice [J]. Phytomedicine, 2019, 58: 152867.

[10] Luo L, Liang Y, Fu Y, et al. Toosendanin induces hepatocyte damage by inhibiting autophagic flux *via* TFEB-mediated lysosomal dysfunction [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2022, 15: 1509.

[11] Zhuo Y, Zhang YD, Li M, et al. Hepatotoxic evaluation of toosendanin *via* biomarker quantification and pathway mapping of large-scale chemical proteomics [J]. Food Chem Toxicol, 2021, 153: 112257.

[12] Li HB, Ma SJ, Shi DF, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological action and toxicity of *Melia toosendan* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51: 4059-4074.

[13] Zhu Y, Wang JH. Rapid determination of toosendanin in Toosendan Fructus by UPLC-MS [J]. Asia-Pac Tradit Med (亚太传统医药), 2018, 14: 54-56.

[14] Hu YX, Li J, Wang YW, et al. Simultaneous content determination of twelve constituents in Tufuling Qiwei Powder by HPLC-MS/MS [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2023, 46: 3906-3910.

[15] Shen CP, Pan ZS, Wu XJ, et al. A sensitive liquid chromatography-mass spectrometry method for determination of toosendanin in rat plasma and its application to pharmacokinetic study [J]. J Chromatogr Sci, 2022, 60: 478-485.

[16] Hou JZ, Zhu SJ, Li Y, et al. Effect of compatibility ratio and processing method on contents of nine constituents in combination use of Toosendan Fructus and Foeniculi Fructus [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2024, 46: 156-161.

[17] Zhang QR, Zhou N, Yang M. Determination of toosendanin in Yiganning Granules by HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae (中国实验方剂学杂志), 2010, 16: 78-82.

[18] Wang X, Yang JY, Xiao BK, et al. Determination of toosendanin in water extraction and ethanol precipitate of the Melia Toosendan Sieb by RP-HPLC [J]. Sci Technol Eng (科学技术与工程), 2013, 13: 4631-4634.

[19] Du WY, Yun GQ, Zhang JP. Determination of toosendanin in Mongolian patent medicine Sanzisan by HPLC-ELSD [J]. J Med Pharm Chin Minor (中国民族医药杂志), 2021, 27: 38-41.

[20] Zhang CN, Sun XG, Zhao Y, et al. Quantitative analysis of

toosendanin in the fruit of *Melia toosendan* Sieb. Et Zucc (Meliaceae) by high-performance liquid chromatography coupled with charged aerosol detection [J]. Chromatographia, 2016, 79: 1381-1386.

[21] Zhang CN, Wang YZ, Sun XG, et al. Chromatographic fingerprint analysis of Toosendan Fructus by HPLC-CAD coupled with chemometrics methods [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2017, 52: 456-461.

[22] Zhang HB, Fu QS, Yao GZ, et al. Establishment of HPLC-CAD characteristic chromatograms and content determination of six carbohydrates for Qingzhi Huayu Formula [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2024, 46: 3212-3217.

[23] Yao J, Sun XG, Dong R, et al. Simultaneous quantitative analyses of six components in *Astragalus membranaceus* based on HPLC-CAD and quantitative analysis of multi-components with a single-marker [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2021, 56: 557-564.

[24] Si LT, Ni HF, Li Q, et al. Simultaneous determination of five saponins in Yaobitong capsule by HPLC-CAD [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2020, 55: 2449-2453.

[25] Yao YH, Wu PG, Wang JL, et al. Determination of 9 biogenic amines in water by high performance liquid chromatography combined with solid phase extraction and pre-column derivatization [J]. Phys Test Chem Anal Part B (理化检验−化学分册), 2025, 61: 400-406.

[26] Dong ZY, Ma XY, Bi RF, et al. Determination of residues of 70 pesticides and their metabolites in Gastrodiae Rhizoma by gas chromatography-tandem mass spectrometry with QuEChERS [J]. Phys Test Chem Anal Part B (理化检验−化学分册), 2024, 60: 1132-1140.

[27] Wang YQ, Wang K, Ke QQ, et al. Simultaneous determination of eight antiviral drugs and two metabolites in Chinese softshell turtles using pass-through solid-phase extraction an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr (色谱), 2024, 42: 1164-1172.

[28] Sun J, Tang DR, Qiang HM, et al. Simultaneous determination of 43 per- and polyfluoroalkyl substances in Chinese medicinal material *Pheretima* by UPLC-Q Orbitrap MS [J]. J Pharm Anal (药物分析杂志), 2024, 44: 1756-1771.

[29] Shen L, Tang Y, Chen TZ, et al. Determination of 10 mycotoxins in Polygonati Rhizoma and Ophiopogonis Radix as a genuine regional drug of Sichuan by solid-phase extraction coupled with LC-MS/MS [J]. J Pharm Anal (药物分析杂志), 2023, 43: 1369-1380.

[30] Tang Z, Dai SY, Wang W, et al. Identification of Polygoni Multiflori Radix, Dipsaci Radix, Morindae Officinalis Radix and Atractylodis Macrocephalae Rhizoma in Zishen Yutai pills by solid-phase extraction combined with thin layer chromatography [J]. J Pharm Anal (药物分析杂志), 2022, 42: 1306-1311.

[31] Zhang Y, Hou Y, Liu XD, et al. Determination of five triterpene glycosides in Fufang Danshen tablets by HPLC coupled with solid phase extraction [J]. J Pharm Anal (药物分析杂志), 2022, 42: 510-517.

[32] Liu SX, Chen LN, Cheng XM, et al. Simultaneous determination of eight aconitum alkaloids in Shenkangning capsules by UPLC-MS/MS assisted by solid phase extraction [J]. J Pharm Anal (药物分析杂志), 2022, 42: 302-311.