

RP-HPLC法同时测定荷叶颗粒中3种有效成分的含量^Δ

李梦杰*,刘苏珍,周斌#,陈振华(江西科技师范大学药学院,南昌 330013)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)18-2532-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.18.28

摘要 目的:建立同时测定荷叶颗粒中芦丁、槲皮素、荷叶碱含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Hypersil ODS2,流动相为乙腈-水(含0.3%磷酸和0.4%三乙胺)(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为256 nm,柱温为25℃,进样量为10 μl。结果:芦丁、槲皮素、荷叶碱的检测进样量线性范围分别为0.012~0.240、0.010 4~0.208、0.015~0.300 μg(r 均为0.999 9);精密密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为98.5%~101.3%、99.1%~101.6%、98.9%~101.7%,RSD分别为1.1%、1.0%、1.2%($n=6$)。结论:该方法操作简便、结果准确可靠,可为荷叶颗粒的质量控制提供参考。

关键词 荷叶颗粒;芦丁;槲皮素;荷叶碱;反相高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Three Active Compounds in Heye Granule by RP-HPLC

LI Mengjie, LIU Suzhen, ZHOU Bin, CHEN Zhenhua (School of Pharmacy, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of rutin, quercetin and nuciferine in Heye granule. METHODS: HPLC was performed on the column of Hypersil ODS2 with mobile phase of acetonitrile-water (containing 0.3% phosphoric acid and 0.4% triethylamine) (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 256 nm, the column temperature was 25℃, and the injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 0.012-0.240 μg for rutin ($r=0.999 9$), 0.010 4-0.208 μg for quercetin ($r=0.999 9$) and 0.015-0.300 μg for nuciferine ($r=0.999 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recoveries were 98.5%-101.3% (RSD=1.1%, $n=6$), 99.1%-101.6% (RSD=1.0%, $n=6$) and 98.9%-101.7% (RSD=1.2%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reliable, and can provide reference for quality control of Heye granule.

KEYWORDS Heye granule; Rutin; Quercetin; Nuciferine; RP-HPLC

荷叶为睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥叶,在我国分布较为广泛,主要产地为江西、安徽、江苏、浙江、湖北、湖南等^[1]。其味苦性平,归肝、脾、胃经,具有清暑化湿、升发清阳、凉血止血的功效,可用于治疗暑热烦渴、暑湿泄泻、血热吐衄、便血崩漏等症^[2]。现代药理研究表明,荷叶具有抑菌、抗氧化、抗过敏、抗惊厥、抗艾滋病病毒、抗癌、降脂减肥、保护心血管等作用^[3-4]。荷叶含有生物碱、黄酮、有机酸、挥发油等多种化学成分,其中黄酮类和生物碱类为主要活性成分^[5-7]。目前,荷叶及其制剂质量控制的研究相对较多,主要是对单个有效成分或者多个同类有效成分的含量测定^[8-10];而关于荷叶制剂中不同种类的多个有效成分同时进行含量测定的研究,未见有文献报道。荷叶颗粒及其复方颗粒具有降脂、减肥的作用,常用于治疗脂肪肝、肥胖等症^[11]。因此,笔者采用反相高效液相色谱(PR-HPLC)法同时测定荷叶颗粒中两个黄酮类化合物——芦丁、槲皮素和1个生物碱类化合物——荷叶碱的含量,以为荷叶颗粒的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括G-1311C型高压四元泵、G-1329B

型自动进样器、G-1316A型智能化柱温箱、G-4212B型二极管阵列检测器、1260型色谱工作站(美国Agilent公司);KQ-200VDE型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:200 W,频率:45 kHz);XS205型十万分之一电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);XS203S型千分之一电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

型自动进样器、G-1316A型智能化柱温箱、G-4212B型二极管阵列检测器、1260型色谱工作站(美国Agilent公司);KQ-200VDE型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:200 W,频率:45 kHz);XS205型十万分之一电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);XS203S型千分之一电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

荷叶颗粒为江西科技师范大学药学院自制(编号:S1-S3);芦丁对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:YM0316SA13,纯度>98%);槲皮素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100081-200406,纯度>98%);荷叶碱对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:YM0507YA14,纯度>98%);乙腈、甲醇为色谱纯,糊精、磷酸、冰醋酸、三乙胺均为分析纯,水为娃娃哈纯净水。

1.3 药材

荷叶购自安徽普仁中药饮片有限公司(批号:141020),经江西中医药大学药学院邓可众副教授鉴定为睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥叶。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil ODS2(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-水(含0.3%磷酸和0.4%三乙胺)(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;检测波长:256 nm;柱温:25℃;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81560635)

* 硕士研究生。研究方向:中药及天然药物活性成分。电话:0791-83805385。E-mail:Limengjie-com@163.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:中药及天然药物活性成分。E-mail:Tju_zhoubin@163.com

表1 梯度洗脱程序
Tab 1 Gradient elution procedure

时间,min	A,%	B,%
0	14	86
10	14	86
17	5	95
25	14	86
50	14	86
75	34	66

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取芦丁对照品、槲皮素对照品、荷叶碱对照品各适量,分别置于10 ml量瓶中,用甲醇溶解并定容,制成每1 ml溶液中含芦丁91.15 μg、槲皮素75.04 μg、荷叶碱116.50 μg的单一对照品溶液。另精密称取芦丁对照品12.00 mg、槲皮素对照品10.40 mg、荷叶碱对照品15.00 mg,置于同一10 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,作为混合对照品贮备液。分别精密量取上述混合对照品贮备液2 ml,置于100 ml量瓶中,用甲醇稀释并定容,摇匀,制成每1 ml溶液中含芦丁24 μg、槲皮素20.8 μg、荷叶碱30 μg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取荷叶颗粒剂约0.500 g,研成粉末,精密称定,置于50 ml量瓶中,加甲醇45 ml,超声处理60 min,冷却至室温,加甲醇定容,摇匀,静置15 min,取上清液,经0.22 μm有机微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照品溶液 称取糊精约0.500 g,精密称定,置于10 ml量瓶中,按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法制备阴性对照品溶液,经0.22 μm有机微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5,理论板数以芦丁峰、槲皮素峰、荷叶碱峰计均>4 000,保留时间分别为16.598、46.776、64.123 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.5、1、2、4、6、8、10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程与线性范围,详见表2。

表2 回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	线性范围, μg	r
芦丁	$y=2\,540.1x-0.512\,4$	0.012~0.240	0.999 9
槲皮素	$y=3\,357.4x-0.536\,0$	0.010 4~0.208	0.999 9
荷叶碱	$y=1\,816.7x-0.960\,5$	0.015~0.300	0.999 9

2.5 检测限与定量限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,等倍逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为3:1时,得检测限(LOD);当信噪比为10:1时,得定量限(LOQ),结果见表3。

2.6 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液10 μl,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,芦丁、槲皮素、荷叶碱峰面积的RSD分别为0.29%、0.21%、0.26%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液(编号:S1)适量,分别于室温(25℃)下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录

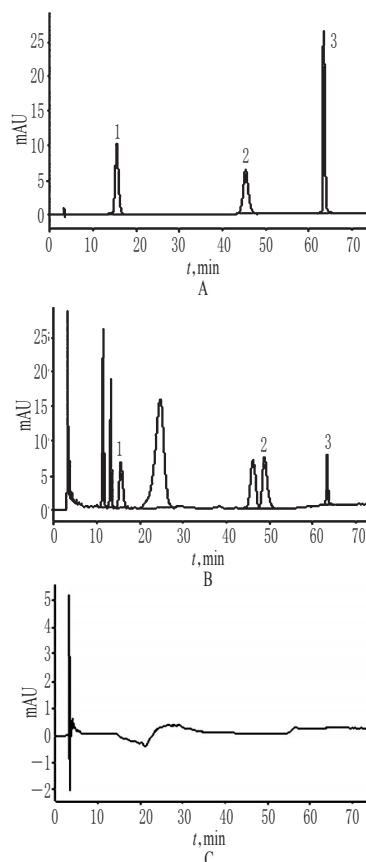


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照品;1.芦丁;2.荷叶碱;3.槲皮素

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance; B.test sample; C. negative reference substance; 1.rutin; 2.nuciferine; 3.queretetin

表3 检测限与定量限考察结果

Tab 3 Determination results of detection limit and quantitation limit

待测成分	LOD,ng	LOQ,ng
芦丁	3.20	9.60
槲皮素	2.08	6.24
荷叶碱	4.48	13.44

峰面积。结果,芦丁、槲皮素、荷叶碱峰面积的RSD分别为1.9%、1.2%、2.0%(n=6),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

精密称取同一批样品(编号:S1)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,芦丁、槲皮素、荷叶碱峰面积的RSD分别为0.37%、0.61%、0.79%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品(编号:S1)适量,共6份,每份约0.250 g,分别精密加入“2.2.1”项下单一芦丁对照品溶液1 ml、槲皮素对照品溶液0.5 ml、荷叶碱对照品溶液1 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表4。

2.10 样品含量测定

取3批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算各成分

的含量,结果见表5。

表4 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 4 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	称样量, g	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
芦丁	0.251	91.53	91.15	182.96	100.3	99.7	1.1
	0.253	92.26	91.15	182.72	99.2		
	0.248	90.43	91.15	182.79	101.3		
	0.250	91.16	91.15	182.43	100.1		
	0.249	90.80	91.15	180.54	98.5		
	0.252	91.89	91.15	181.91	98.8		
槲皮素	0.251	37.86	37.52	75.15	99.4	99.9	1.0
	0.253	38.16	37.52	75.92	100.6		
	0.248	37.41	37.52	74.63	99.2		
	0.250	37.71	37.52	74.89	99.1		
	0.249	37.56	37.52	75.68	101.6		
	0.252	38.01	37.52	75.26	99.3		
荷叶碱	0.251	116.99	116.50	233.92	100.4	100.0	1.2
	0.253	117.93	116.50	235.64	101.0		
	0.248	115.60	116.50	231.25	99.3		
	0.250	116.53	116.50	231.76	98.9		
	0.249	116.06	116.50	231.41	99.0		
	0.252	117.46	116.50	235.93	101.7		

表5 样品含量测定结果(n=3, $\mu\text{g/g}$)

Tab 5 Results of content determination of samples (n=3, $\mu\text{g/g}$)

编号	芦丁		槲皮素		荷叶碱	
	含量	平均值	含量	平均值	含量	平均值
S1	364.63	364.65	150.96	150.85	466.16	466.11
	363.48		151.21		465.07	
	365.85		150.38		467.09	
S2	363.92	363.52	151.62	151.56	465.05	465.76
	362.75		152.89		467.13	
	363.90		150.16		465.11	
S3	365.80	365.43	149.57	150.28	464.89	463.56
	366.07		152.36		463.54	
	364.43		148.91		462.25	

3 讨论

3.1 检测波长的选择

笔者取单一芦丁对照品溶液、槲皮素对照品溶液、荷叶碱对照品溶液分别进行全波长扫描(190~900 nm),发现芦丁、槲皮素、荷叶碱的最大紫外吸收波长分别在259、256、270 nm附近;同时参考相关文献^[8-9,11],最终选择256、266、270 nm作为检测波长分别进行预试验。结果,在270 nm波长处芦丁、槲皮素的吸收相对较小;在266 nm波长处槲皮素的吸收相对较小;而在256 nm波长处3种待测成分的吸收均相对较大,检测灵敏度均相对较高。因此,选择256 nm作为本试验的检测波长。

3.2 流动相的选择

色谱条件优化时,参考相关文献^[10-11],当以乙腈-0.1%磷酸、乙腈-0.1%冰醋酸为流动相时,荷叶碱色谱峰拖尾严重,分离度差;当以乙腈-水(含0.1%磷酸和0.2%三乙胺)、乙腈-水(含0.1%冰醋酸和0.2%三乙胺)、乙腈-水(含0.3%冰醋酸和0.4%三乙胺)^[8,14-15]为流动相时,荷叶碱色谱峰拖尾情况和分离度有所改善;当以乙腈-水(含0.3%磷酸和0.4%三乙胺)为流动相时,荷叶颗粒中芦丁、槲皮素、荷叶碱色谱峰的峰形、分离度均较好。因此,选择乙腈-水(含0.3%磷酸和0.4%三乙胺)作为本试验的流动相。

3.3 提取条件的选择

荷叶颗粒提取条件优化时,分别对不同体积提取溶剂(10、20、50 ml)进行考察,结果随着提取溶剂体积的增加,芦丁、槲皮素、荷叶碱的含量均呈上升趋势,因此选择50 ml作为本试验的提取溶剂体积。此外,笔者还分别考察了不同超声提取时间(20、40、60、80 min)对三种成分提取效率的影响,结果随着超声时间的延长,芦丁、槲皮素、荷叶碱的含量均呈上升趋势,但超过60 min后,各成分的含量呈下降趋势。因此,选择60 min作为本试验的超声时间。

芦丁、槲皮素是黄酮类化合物,荷叶碱是生物碱类化合物,都具有很好的生物活性。2015年版《中国药典》(一部)还未收录荷叶颗粒剂,本试验建立的方法可以同时荷叶颗粒中芦丁、槲皮素、荷叶碱进行定量分析,有助于荷叶颗粒剂质量标准的建立及其质量控制。

参考文献

- [1] 黄开颜,张志国.荷叶研究概况[J].中国药业,2008,17(11):77.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:276.
- [3] 陈曦,戚进.荷叶中黄酮和生物碱的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(18):211.
- [4] 周健鹏.荷叶化学成分和药理作用研究进展[J].天津药学,2014,26(2):65.
- [5] 张国庆,冯习坤,曾为驰,等.荷叶的化学和药理研究进展[J].药学实践杂志,2010,28(5):328.
- [6] 王福刚,曹娟,刘斌,等.荷叶的化学成分及其药理作用研究进展[J].时珍国医国药,2010,21(9):2339.
- [7] 刘淑萍,樊淑彦,侯海妮,等.荷叶化学成分及药理作用研究进展[J].河北医科大学学报,2004,25(4):254.
- [8] 张静怡,徐先顺,徐琰,等.HPLC法测定荷叶中荷叶碱[J].现代预防医学,2015,42(8):1479.
- [9] 高丽,操得群,刘芳,等.高效液相色谱法测定荷叶中槲皮素的含量[J].中国酿造,2012,31(6):175.
- [10] 方建国,万进,王文清,等.鄂产药材荷叶中荷叶碱及槲皮素的含量分析[J].中国医院药学杂志,2007,27(4):439.
- [11] 杨鹏,陈希平,文宁.HPLC法测定不同产地和采收期荷叶中芦丁和荷叶碱的含量[J].湖南中医药大学学报,2010,30(3):37.
- [12] 孙敏,刘嘉铭,张丽萍,等.荷叶中4种黄酮类物质含量的测定[J].贵州农业科学,2015,43(5):72.
- [13] 朱滢润,王新财.HPLC法同时测定荷叶中金丝桃苷、异槲皮苷和槲皮素[J].中成药,2015,37(6):1276.
- [14] 吴昊,刘斌,王伟,等.HPLC法测定不同市售荷叶药材中4种生物碱类成分的含量[J].北京中医药大学学报,2008,31(7):478.
- [15] 才华兴,徐瑶,朱莹莹,等.高效液相法测荷叶配方颗粒中荷叶碱的含量[J].中外食品工业,2014(2):22.
- [16] 沈萍,章海,周明.荷叶降脂颗粒的制备及质量控制[J].亚太传统医药,2013,9(12):55.
- [17] 万勇,林云华,尹燕耀,等.荷叶降脂颗粒对脂肪肝影响的随机双盲对照临床研究[J].中华中医药杂志,2015,30(8):3030.

(收稿日期:2015-11-07 修回日期:2016-03-12)

(编辑:刘柳)