

HPLC法同时测定辣木叶颗粒中异槲皮苷、紫云英苷和丹酚酸B的含量^Δ

杨海洋^{1*}, 刘洋^{1#}, 李梦薇¹, 李雪岩¹, 何军², 顾文宏², 尹济云²(1.北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2.云南天佑科技开发有限公司, 云南 芒市 678400)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)09-1164-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.09.03

摘要 目的:建立同时测定辣木叶颗粒中异槲皮苷、紫云英苷和丹酚酸B含量的方法。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法。色谱柱为Cosmosil-C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.3 mL/min,柱温为40 ℃,检测波长为260 nm,进样量为10 μL。结果:异槲皮苷、紫云英苷和丹酚酸B检测质量浓度线性范围分别为0.017~0.341、0.010~0.194、0.010~0.195 mg/mL(*r*均>0.999 0);检测限分别为0.085、0.143、0.117 μg/mL;定量限分别为0.283、0.476、0.392 μg/mL;精密度、稳定性(24 h)、重复性试验的RSD均≤2.0%(*n*=6);平均加样回收率分别为101.22%、98.76%、98.72%,RSD分别为0.66%、0.30%、0.30%(*n*=6)。结论:建立的方法简便、准确、重复性好,可用于同时测定辣木叶颗粒中异槲皮苷、紫云英苷和丹酚酸B的含量。

关键词 辣木叶颗粒;高效液相色谱法;异槲皮苷;紫云英苷;丹酚酸B;含量测定

参考文献

- [1] 《中国国家处方集》编委会. 中国国家处方集(化学药品与生物制品·儿童版)[M]. 北京:人民军医出版社, 2013: 1-64.
- [2] WHO. WHO model formulary for children 2010[EB/OL]. [2018-10-28]. <http://apps.who.int/medicinedocs/en/m/abstract/Js17151e/>.
- [3] British Medical Association and the Royal Pharmaceutical Society. British National Formulary for Children[M]. 2016-2017 edition. London: BMJ Group and Pharmaceutical Press, 2016: I-23.
- [4] WHO. New WHO guidance to improve use of medicines for children[EB/OL]. [2018-10-28]. http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/medicines_children_20100618/en/.
- [5] LENNEY W. The development of a national children's formulary[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2015, 79(3): 441-445.
- [6] 王莉, 张川, 袁强, 等. 我国和WHO基本药物目录2009年版比较分析[J]. *中国循证医学杂志*, 2009, 9(11): 1173-1184.
- [7] EICHENWALD EC. Committee on fetus and newborn: response from committee on fetus and newborn[J]. *Pediatrics*, 2016, 137(5): 10-20.
- [8] 柯华, 李占奎, 余倩, 等. 2016欧洲呼吸窘迫综合征管理指南介绍[J]. *中国新生儿科杂志*, 2017, 32(1): 76-78.
- [9] DYKEWICZ MS, FINEMAN S, SKONER DP, et al. Diagnosis and management of rhinitis: complete guidelines of the joint task force on practice parameters in allergy, asthma and immunology. American academy of allergy, asthma, and immunology[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 1998, 81(5 Pt 2): 478-518.
- [10] HENDRICKSON RG, KUSIN S. Gastrointestinal decontamination of the poisoned patient[EB/OL]. [2018-10-28]. https://so.uptodate.cn/contents/gastrointestinal-decontamination-of-the-poisoned-patient?search=Charcoal,%20activated&source=search_result&selectedTitle=2~148&usage_type=default&display_rank=5.
- [11] DIAMANTE C, BERGFELD WF, BELSITO DV, et al. Final report on the safety assessment of basic violet 1, basic violet 3 and basic violet 4[J]. *Int J Toxicol*, 2009, 28(6 Suppl 2): 193S-204S.
- [12] AU W, BUTLER MA, BLOOM SE, et al. Further study of the genetic toxicity of gentian violet[J]. *Mutat Res*, 1979, 66(2): 103-112.
- [13] 倪新兴, 陶钊, 李玲, 等. 论我国临床药师处方权[J]. *中国药房*, 2016, 27(17): 2422-2424.
- [14] 国家卫生健康委员会. 我国响应世卫组织决议实施脊灰疫苗免疫新策略[EB/OL]. (2018-09-07) [2018-10-28]. <http://www.nhfp.gov.cn/zhuz/xwfb/201604/8c760a934d-5b4d41a81752915c58d304.shtml>.

Δ 基金项目:国家自然科学基金面上项目(No.81274042)

* 硕士研究生。研究方向:多成分药物代谢。E-mail: yanghaiyang_bucm@163.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:多成分药物代谢。E-mail: liuyang@bucm.edu.cn

(收稿日期:2018-11-23 修回日期:2019-02-01)

(编辑:刘明伟)

Simultaneous Determination of Isoquercitrin, Astragaloside and Salvianolic Acid B in *Moringa oleifera* Leaves Granules by HPLC

YANG Haiyang¹, LIU Yang¹, LI Mengwei¹, LI Xueyan¹, HE Jun², GU Wenhong², YIN Jiyun² (1. College of TCM, Beijing University of TCM, Beijing 102488, China; 2. Yunnan Tianyou Technology Co., Ltd., Yunnan Mangshi 678400, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of isoquercitrin, astragaloside and salvianolic acid B in *Moringa oleifera* leaves granules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Cosmosil-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution) at flow rate of 1.3 mL/min. The column temperature was 40 °C and detection wavelength was set at 260 nm. The sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges of isoquercitrin, astragaloside and salvianolic acid B were 0.017-0.341, 0.010-0.194, 0.010-0.195 mg/mL, respectively (all $r > 0.999$). The detection limits were 0.085, 0.143, 0.117 μg/mL, and the limits of quantitation were 0.283, 0.476, 0.392 μg/mL, respectively. RSDs of precision, stability (24 h) and reproducibility tests were all lower than 2.0% ($n=6$). Average recoveries were 101.22%, 98.76% and 98.72%, and RSDs were 0.66%, 0.30%, 0.30% ($n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The established method is simple, accurate and reproducible. It can be used for simultaneous determination of isoquercitrin, astragaloside and salvianolic acid B in *M. oleifera* leaves granules.

KEYWORDS *Moringa oleifera* leaves granules; HPLC; Isoquercitrin; Astragaloside; Salvianolic acid B; Content determination

辣木叶颗粒是根据《校注妇人良方》中天王补心丹组方制备而来,由辣木叶、酸枣仁、丹参、远志、五味子五味中药制备而成。其中,辣木叶是辣木科辣木属辣木(*Moringa oleifera* Lam.)的干燥叶,具有改善睡眠的作用^[1];酸枣仁可养心肝之血,进而起到安神的作用,是治疗失眠复方中使用最多的一味药材^[1-2],具有镇静催眠^[3]、对抗神经系统兴奋^[4]、宁心安神的作用;丹参具有活血凉血、养血安神的作用^[5-6];远志具有交通心神、强志安神的作用;五味子具有敛心气、养心阴的作用,与酸枣仁合用可养心除烦,镇静安神^[7-8]。本课题组根据处方,制备辣木叶颗粒,然后采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定辣木叶颗粒中君药辣木叶有效成分异槲皮苷、紫云英苷^[9]和丹参中的丹酚酸B^[10-11]的含量,以期对辣木叶颗粒的质量控制和进一步研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-16 HPLC仪(日本岛津公司);SB-5200DT超声波清洗仪器(宁波新芝生物科技股份有限公司);CPA225D电子分析天平(德国赛多利斯公司);DZTW电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司);RE-52AA旋转蒸发器(北京佳源兴业科技有限公司);DZ-2BC真空干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

辣木叶(云南天佑科技开发有限公司,批号:160824)、远志(批号:1702048)、五味子(批号:1702047)、丹参(批号:1701027)、酸枣仁(批号:1503009)均购自北京太阳树康中药饮片厂,经北京中医药大学中药鉴定系张贵君教授鉴定为真品;异槲皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111809-201403,纯度:92.9%);紫云英苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:Y27J7H9634,

纯度:99.5%);丹酚酸B对照品(上海诗丹德标准技术服务有限公司,批号:ST00050120MG,纯度:99.5%);甲醇、磷酸为分析纯,乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 辣木叶颗粒的制备

按处方量称取辣木叶、酸枣仁、丹参、五味子、远志适量,加入10倍量水回流提取2次,每次2 h,过滤,静置过夜,滤去沉淀,旋转蒸发浓缩至一定体积,得浓缩液;60 °C水浴浓缩至浸膏,移置60 °C真空干燥箱中减压干燥,粉碎得干浸膏粉(得率为36.02%)。以乳糖为辅料,干浸膏粉与乳糖的质量比为1:1,润湿剂为80%乙醇适量,混合,制粒,干燥,即得辣木叶颗粒。本研究共制备6批样品,批号分别为20170901、20170902、20170903、20170904、20170905、20170906。

2.2 色谱条件

色谱柱为Cosmosil-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~16 min, 20% A; 16~30 min, 40% A, 30~36 min, 20% A);流速为1.3 mL/min;柱温为40 °C;检测波长为260 nm;进样量为10 μL。

2.3 溶液的制备

2.3.1 混合对照品溶液 取异槲皮苷10.56 mg、紫云英苷10.16 mg、丹酚酸B 10.23 mg,分别置于10 mL的量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,得对照品贮备液。精密吸取异槲皮苷贮备液1.74 mL、紫云英苷贮备液0.94 mL、丹酚酸B 0.96 mL于5 mL的量瓶中,加甲醇定容至刻度,混匀,即得混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液 取辣木叶颗粒样品1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50 mL 70%甲醇溶液,称质量;超声(功率:250 W,频率:33 kHz) 30 min后取出,

放冷,称质量,加入甲醇补足质量,摇匀,即得。

2.3.3 阴性对照品溶液 精密称取乳糖 1.0 g,并按“2.3.2”项下方法制备成辣木叶颗粒阴性样品溶液。

2.4 专属性试验

取“2.3”项下混合对照品溶液、供试品溶液(批号:20170901)、阴性对照品溶液适量,按“2.2”项下的色谱条件进样分析,记录色谱图。结果,异槲皮苷、紫云英苷、丹酚酸B与其他成分色谱峰均能完全分离,分离度均>1.5,理论板数以异槲皮苷计不低于13 000。高效液相色谱图见图1。

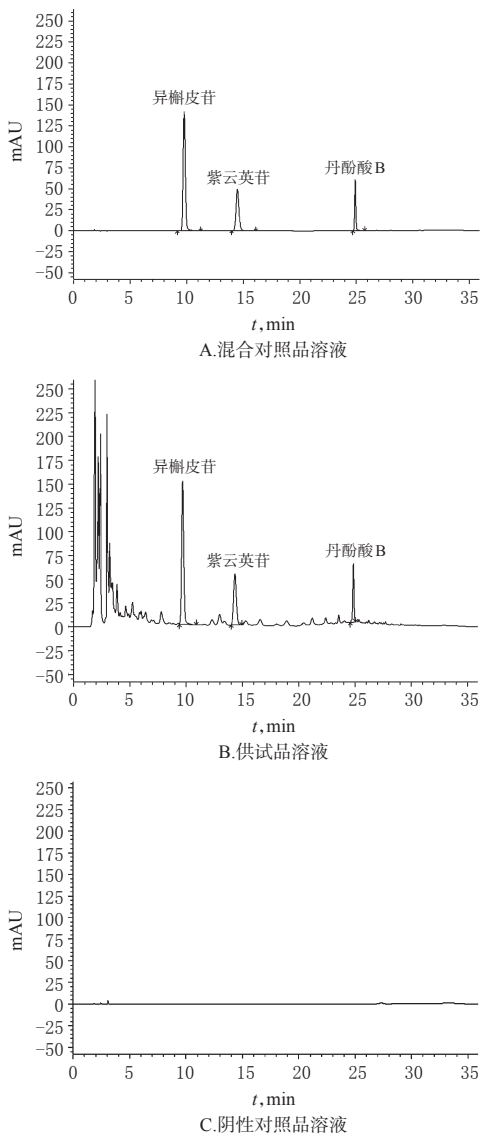


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.5 线性关系考察

将“2.3.1”项下的混合对照品溶液定量稀释成含异槲皮苷 0.017、0.034、0.051、0.068、0.085、0.128、0.171、0.341 mg/mL,紫云英苷 0.010、0.019、0.029、0.039、0.049、0.073、0.097、0.194 mg/mL,丹酚酸B 0.010、0.020、0.029、0.039、0.049、0.073、0.098、0.195 mg/mL的系列浓度混合

对照品溶液,按“2.2”项下的色谱条件进样分析,以待测成分质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,线性关系考察结果见表1。

表1 异槲皮苷、紫云英苷、丹酚酸B的回归方程及线性范围

Tab 1 Regression equations and linear range of isoquercitrin, astragaloside and salvianolic acid B

成分	回归方程	r	线性范围,mg/mL
异槲皮苷	$y=22\ 192\ 290.98x-1\ 763.98$	0.999 9	0.017~0.341
紫云英苷	$y=18\ 649\ 037.15x-2\ 914.13$	0.999 9	0.010~0.194
丹酚酸B	$y=9\ 433\ 929.73x-2\ 018.43$	0.999 9	0.010~0.195

2.6 检测限与定量限考察

取“2.3.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.2”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;当信噪比为10:1时,得定量限。结果,异槲皮苷、紫云英苷、丹酚酸B的检测限分别为0.085、0.143、0.117 $\mu\text{g/mL}$;异槲皮苷、紫云英苷、丹酚酸B的定量限分别为0.283、0.476、0.392 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.7 精密度试验

精密量取“2.3.2”项下供试品溶液适量,按“2.2”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。结果,异槲皮苷、紫云英苷和丹酚酸B的峰面积的RSD分别为1.17%、1.37%、0.69% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

精密量取“2.3.2”项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0、4、6、8、12、24 h后,按照“2.2”的色谱条件进样分析,记录峰面积。结果,异槲皮苷、紫云英苷和丹酚酸B的峰面积的RSD分别为1.07%、1.67%、0.60% ($n=6$)。表明供试品溶液样品在24 h内稳定性良好。

2.9 重复性试验

精密称取辣木叶颗粒(批号:20170901) 1 g,按“2.3.2”项下方法制备样品6份,按“2.2”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。结果,异槲皮苷、紫云英苷和丹酚酸B峰面积的RSD分别为0.50%、0.54%、0.85% ($n=6$),表明该方法的重复性良好。

2.10 加样回收率试验

精密称取辣木叶颗粒(批号:20170902) 0.5 g,共6份,各加入约与样品中异槲皮苷、紫云英苷、丹酚酸B 3种成分含量相同的对照品于具塞锥形瓶中,再分别精密加入50 mL 70%甲醇溶液,按“2.3.2”项下方法制备样品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样分析,记录峰面积并计算加样回收率。结果,异槲皮苷、紫云英苷和丹酚酸B平均加样回收率分别为101.22%、98.76%、98.72%,RSD分别为0.66%、0.30%、0.30% ($n=6$)。回收率结果见表2。

2.11 样品测定结果

精密称取6批辣木叶颗粒的样品约1 g,按“2.3.2”项

表2 回收率结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery rate(n=6)

成分	样品质量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
异槲皮苷	0.496 2	2.18	2.13	4.35	102.01	101.22	0.66
	0.506 8	2.15	2.13	4.29	100.55		
	0.500 4	2.15	2.13	4.30	100.87		
	0.501 0	2.15	2.13	4.30	100.58		
	0.500 4	2.16	2.13	4.32	101.31		
	0.499 6	2.18	2.13	4.33	100.99		
紫云英苷	0.496 2	1.20	1.21	2.40	99.31	98.76	0.30
	0.506 8	1.18	1.21	2.36	97.34		
	0.500 4	1.19	1.21	2.38	98.37		
	0.501 0	1.20	1.21	2.40	99.27		
	0.500 4	1.19	1.21	2.38	98.45		
	0.499 6	1.21	1.21	2.42	99.85		
丹酚酸B	0.496 2	1.22	1.23	2.43	98.66	98.72	0.30
	0.506 8	1.21	1.23	2.42	98.38		
	0.500 4	1.22	1.23	2.43	98.74		
	0.501 0	1.22	1.23	2.43	98.55		
	0.500 4	1.22	1.23	2.43	98.78		
	0.499 6	1.22	1.23	2.44	99.20		

下方法制备样品溶液,按“2.2”项下色谱条件进行分析,记录色谱图。结果,6批样品中异槲皮苷、紫云英苷、丹酚酸B的平均含量分别为4.27、2.48、2.48 mg/g,样品含量测定结果见表3。

表3 样品含量测定结果

Tab 3 Results of content determination of samples

成分	取样量,g	含量,mg/g	平均含量,mg/g	RSD,%
异槲皮苷	0.992 9	4.27	4.27	0.12
	0.993 3	4.27		
	0.992 4	4.27		
	0.995 6	4.28		
	0.994 8	4.28		
	0.993 5	4.27		
紫云英苷	0.992 9	2.48	2.48	0.20
	0.993 3	2.48		
	0.992 4	2.48		
	0.995 6	2.49		
	0.994 8	2.49		
	0.993 5	2.48		
丹酚酸B	0.992 9	2.48	2.48	0.20
	0.993 3	2.48		
	0.992 4	2.48		
	0.995 6	2.49		
	0.994 8	2.49		
	0.993 5	2.48		

3 讨论

本课题组在制备辣木叶颗粒的供试品溶液时,为了使操作更加快捷、节约溶剂和时间,笔者对提取方法(超声提取和回流提取)、提取溶剂(纯甲醇、30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、水)、提取时间(30、45、60 min)、提取次数(1、2、3次)进行综合考察。结果表明,辣木叶颗粒用超声提取和回流提取对待测成分提取率无影响,故优先选择超声提取;用70%甲醇提取的异槲皮苷和紫云英

苷、丹酚酸B的提取率最高,故选择70%甲醇为提取溶剂。提取时间30、45、60 min,提取次数也对待测成分提取率无影响,故优先选择30 min提取1次。

笔者前期也对异槲皮苷、紫云英苷、丹酚酸B进行全波长扫描,发现异槲皮苷的最大吸收波长为297 nm,丁香酚在362 nm和266 nm波长下有较大吸收,丹酚酸B在254 nm和287 nm波长下有较大吸收;最后综合考虑3种指标成分色谱峰对称因子、分离度、响应值、基线噪音,以及检测方法对各含量范围样品的适用性、灵敏度等因素后,选择260 nm作为同时检测的波长。

综上所述,本研究成功建立了同时测定辣木叶颗粒中异槲皮苷、紫云英苷和丹酚酸B含量的方法,且该法简便、准确、重复性好,可为辣木叶颗粒的质量评价提供参考依据。

参考文献

- [1] PAL SK, MUKHERJEE PK, SAHA K, et al. Studies on some psychopharmacological actions of moringa oleifera lam. (moringaceae) leaf extract[J]. *Phytotherapy Research*, 2015, 10(5):402-405.
- [2] 赵曹文聪,海英,任路.基于数据挖掘中药复方治疗失眠用药规律分析[J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(9):1851-1853.
- [3] 崔思娇,贾英,罗洁,等.酸枣仁镇静催眠活性部位的筛选[J]. *中国药房*, 2013, 24(23):2128-2129.
- [4] 杨楠,叶晓川.酸枣仁汤的神经药理作用及分子机制研究进展[J]. *湖北中医药大学学报*, 2017, 19(3):114-117.
- [5] 李雪君,姜肖,丁元庆.丁元庆辨治瘀热不寐用药规律分析[J]. *山东中医药大学学报*, 2017, 41(1):13-17.
- [6] 尚丛珊,孟婷婷.酸枣仁-丹参炮制品镇静催眠作用及对失眠小鼠脑电图的影响[J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2018, 6(9):137-138.
- [7] 蔡向军,陈腾宇,梁浩锐,等.基于中医传承辅助平台软件分析治疗失眠膏方的组方规律[J]. *中国药房*, 2018, 29(23):3236-3240.
- [8] 陈金锋,高家荣,季文博,等.酸枣仁-五味子药对镇静催眠作用及机制研究[J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(4):128-131.
- [9] 朱宝生,陈军,余远江,等.辣木有效成分及其开发利用研究进展[J]. *轻工科技*, 2018, 34(7):19-21, 23.
- [10] 杜冠华,张均田.丹参现代研究概况与进展(续一)[J]. *医药导报*, 2004, 23(6):355-360.
- [11] 陈旭青,陈醒,吴苏亚,等.超高效液相色谱法对丹参不同部位化学成分的研究[J]. *安徽医药*, 2018, 22(11):2096-2099.

(收稿日期:2018-10-08 修回日期:2019-01-27)

(编辑:唐晓莲)