

畚药降脂轻身茶的 HPLC 特征图谱及 4 个成分含量测定

刘帅英¹, 张晓芹², 王慧玉², 刘丽仙^{3*}, 吴查青¹, 王发英¹(1.丽水市食品药品与质量技术检验检测院, 浙江 丽水 323000; 2.丽水市中医院, 浙江 丽水 323000; 3.丽水市人民医院, 浙江 丽水 323000)

摘要: 目的 采用 HPLC 建立畚药降脂轻身茶的特征图谱, 并同时测定 4 种成分的含量。方法 以绿原酸、芦丁、异槲皮苷和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷为对照品; 采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.2% 磷酸溶液, 线性梯度洗脱, 流速为 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长为 360 nm, 柱温为 40 °C。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统对结果进行分析。结果 绿原酸、芦丁、异槲皮苷、山奈酚-3-*O*-芸香糖苷分别在 0.072 6~0.726, 0.076 3~0.763, 0.071~0.71, 0.113 1~1.131 μg 内呈良好的线性关系, 相关系数均≥0.999 6; 平均加样回收率分别为 96.15%, 95.62%, 95.28%, 95.76%。结论 所建立的特征图谱相关性强, 可结合 4 种成分含量测定全面控制畚药降脂轻身茶的质量。

关键词: 降脂轻身茶; 特征图谱; 异槲皮苷; 山奈酚-3-*O*-芸香糖苷; 芦丁; 绿原酸; 质量控制

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)01-0077-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.01.015

引用本文: 刘帅英, 张晓芹, 王慧玉, 等. 畚药降脂轻身茶的 HPLC 特征图谱及 4 个成分含量测定[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(1): 77-80.

Study on HPLC Characteristic Spectrum of Jiangzhi Qingshen Tea and Determination of Four Active Components

LIU Shuaiying¹, ZHANG Xiaoqin², WANG Huiyu², LIU Lixian^{3*}, WU Chaqing¹, WANG Faying¹(1.Lishui Inspection Institute for Food and Drug & Quality and Technology Control, Lishui 323000, China; 2.Lishui Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lishui 323000, China; 3.Lishui City People's Hospital, Lishui 323000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC characteristic spectrum of Jiangzhi Qingshen tea and simultaneous determination of four active components. **METHODS** With chlorogenic acid, rutin, isoquercitrin and kaempferol-3-*O*-rutoside as reference substance, the HPLC analysis was carried on an Agilent Zorbax SB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with the column temperature of 40 °C; the mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 0.8 mL·min⁻¹; the detection wavelength was 360 nm. The similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM was used to calculate the similar degree. **RESULTS** The linear ranges of chlorogenic acid, rutin, isoquercitrin, and kaempferol-3-*O*-rutoside were 0.072 6~0.726, 0.076 3~0.763, 0.071~0.71, 0.113 1~1.131 μg, respectively ($r \geq 0.999 6$), and the average recoveries of three components were 96.15%, 95.62%, 95.28%, 95.76%, respectively. **CONCLUSION** With a good correlation, the characteristic spectrum can be combined with the assay of 4 components to control the quality of Jiangzhi Qingshen tea comprehensively.

KEYWORDS: Jiangzhi Qingshen tea; characteristic spectrum; isoquercitrin; kaempferol-3-*O*-rutoside; rutin; chlorogenic acid; quality control

畚药降脂轻身茶由厚朴、食凉茶、山楂、枳实、甜叶菊等 10 味中药配伍组成, 属于临床经验方(浙药制字: ZJ-ZB-0092-2005), 具有降脂减肥、消食化积、润肠通便等功效。有研究发现, 畚药降脂轻身茶能明显改善代谢综合征, 提高患者生活质量^[1]。

有文献对降脂轻身茶中的槲皮素进行了含量研究^[2], 但是槲皮素单一成分不能完全反映降脂轻身茶的质量。指纹图谱是基于多指标成分对中药

制剂进行质量控制的有效手段。因此, 本研究采用 HPLC 建立畚药降脂轻身茶的特征图谱, 同时对该制剂中 4 个成分即绿原酸、芦丁、异槲皮苷和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷进行定量分析, 以更加全面、客观、科学地评价畚药降脂轻身茶的质量。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 DAD 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); XS105DU 电子天平(瑞士梅特勒公司); DL-360D 智能超声波清洗器(上海之信仪器有

基金项目: 丽水市科技计划项目(2017ZDYF16)

作者简介: 刘帅英, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (0578)2155869
药师 Tel: (0578)2780082 E-mail: lsliulx@163.com

E-mail: liushuaiying123@126.com *通信作者: 刘丽仙, 女, 主任

限公司)。

芦丁对照品(批号: 100080-201409; 含量: 91.9%)、异槲皮苷对照品(批号: 111809-201403; 含量: 92.9%)、山奈酚-3-*O*-芸香糖苷对照品(批号: 112007-201602; 含量: 90.8%)、绿原酸(批号: 110753-201716; 含量: 99.3%)均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇、乙腈均为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。样品为 2013~2018 年的制剂(批号分别为 20131008, 20140616, 20150133, 20150803, 20151207, 20160627, 20170102, 20170424, 20170815, 20180125)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.2%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~10 min, 10%→15%A; 10~24 min, 15%→17%A; 24~35 min, 17%→20%A; 35~45 min, 20%→25%A; 45~50 min, 25%→10%A); 检测波长为 360 nm, 流速为 0.8 mL·min⁻¹, 柱温为 40 °C, 运行时间为 50 min; 进样量为 5 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取绿原酸、芦丁、异槲皮苷和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷对照品适量, 分别加甲醇制成每 1 mL 含绿原酸 601.8 μg、芦丁 272.5 μg、异槲皮苷 177.5 μg、山奈酚-3-*O*-芸香糖苷 565.5 μg 的溶液, 作为储备液。精密吸取 4 种储备液制成每 1 mL 含绿原酸 36.36 μg、芦丁 38.15 μg、异槲皮苷 35.50 μg、山奈酚-3-*O*-芸香糖苷 56.55 μg 的混合溶液, 作为混合对照品溶液(已按各自质量分数折算)。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取本品粉末 5.0 g, 置 100 mL 量瓶中, 加 70%甲醇适量, 超声处理 60 min, 放冷至室温, 用 70%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 特征图谱

2.3.1 仪器精密度试验 精密吸取同一供试品溶液(批号: 20170102), 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图。以芦丁为参照峰, 计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积, 结果各特征峰的相对保留时间 RSD<1%, 特征峰 RSD<2%, 采用中药指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)进行分析, 相似度为 0.99, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液(批号: 20170815), 分别在 0, 2, 6, 8, 12, 18, 24, 30 h 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图。各共有峰保留时间与峰面积的 RSD<3%, 采用中药指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)进行分析, 相似度为 0.99, 表明供试品溶液在 30 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取同一供试品溶液(批号: 20170102), 平行取样 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图。各共有峰保留时间与峰面积的 RSD<3%, 采用中药指纹图谱相似度评价系统进行分析, 相似度为 0.99, 表明该方法重复性良好。

2.3.4 特征图谱的建立 取本品 10 批, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图, 见图 1。依据结果, 采用中药指纹图谱相似度评价系统进行分析处理, 生成降脂轻身茶的特征图谱, 标定 4 个特征峰, 见图 2, 经过与对照品比对并结合 DAD 光谱, 可知分别为绿原酸、芦丁、异槲皮苷、山奈酚-3-*O*-芸香糖苷。

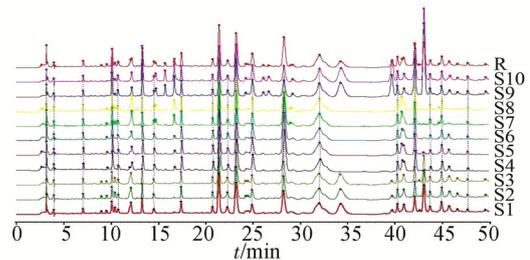


图 1 10 批降脂轻身茶特征图谱叠加图

S1~S10-样品 1~10。

Fig. 1 HPLC overlapping characteristic spectrum of 10 batches of Jiangzhi Qingshen tea

S1~S10-sample 1~10.

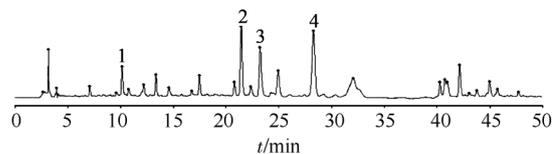


图 2 10 批降脂轻身茶 HPLC 特征图谱的共有模式

1-绿原酸; 2-芦丁; 3-异槲皮苷; 4-山奈酚-3-*O*-芸香糖苷。

Fig. 2 Common pattern of HPLC characteristic spectrum of Jiangzhi Qingshen tea

1-chlorogenic acid; 2-rutin; 3-isoquercitrin; 4-kaempferol-3-*O*-rutinoside.

2.3.5 相似度评价 采用中药指纹图谱相似度评价系统, 计算 10 批样品与“2.3.4”项下建立的特征图谱的相似度, 分别为 1.00, 0.97, 0.97, 0.96, 0.93, 0.94, 0.93, 0.85, 0.84, 分析表明不同批次

样品之间存在较大差异,这可能与所投原料不同批次及制备工艺有关。10批降脂轻身茶共有峰(1~4号峰)保留时间的RSD分别为0.24%,0.12%,0.07%,0.08%,表明各批次降脂轻身茶中各峰相对保留时间具有良好的一致性。

2.4 4种成分的含量测定

2.4.1 系统适用性试验 分别精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各5 μL,按“2.1”项下色谱条件进样分析,并记录色谱图,目标峰与其相邻色谱峰的分度度>1.5,理论板数>30 000,具有良好的分离效果,结果见图3。

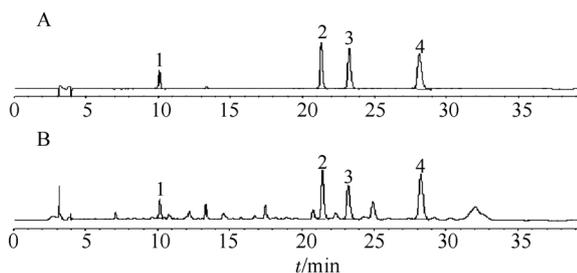


图3 高效液相色谱图

A-混合对照品; B-样品; 1-绿原酸; 2-芦丁; 3-异槲皮苷; 4-山奈酚-3-O-芸香糖苷。

Fig. 3 HPLC chromatograms

A-reference substances; B-sample; 1-chlorogenic acid; 2-rutin; 3-isoquercitrin; 4-kaempferol-3-O-rutinoside.

2.4.2 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液2, 5, 10, 15, 20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样,以绿原酸、芦丁、异槲皮苷和山奈酚-3-O-芸香糖苷的峰面积(Y)为纵坐标,各组分的质量(X)为横坐标,绘制标准曲线。得到绿原酸、芦丁、异槲皮苷和山奈酚-3-O-芸香糖苷线性回归方程分别为 $Y=544.1X+16.69(r=0.9996)$ 、 $Y=1952X+0.276(r=0.9999)$ 、 $Y=2343X-12.00(r=0.9999)$ 、 $Y=1637X+18.96(r=0.9999)$ 。结果表明四者分别在0.0726~0.726, 0.0763~0.763, 0.071~0.71, 0.1131~1.131 μg内呈良好的线性关系。

2.4.3 仪器精密度试验 将“2.2.1”项下的混合对照品溶液注入液相色谱仪,连续进样6次,每次5 μL,记录保留时间和峰面积,绿原酸、芦丁、异槲皮苷和山奈酚-3-O-芸香糖苷峰面积RSD分别为0.60%, 0.26%, 0.17%, 0.45%,保留时间RSD均<0.5%,表明仪器精密度符合要求。

2.4.4 稳定性试验 取同一批供试品溶液(批号:20170815),分别在0, 2, 6, 8, 12, 18, 24, 30 h

按“2.1”项下色谱条件进样,结果绿原酸、芦丁、异槲皮苷和山奈酚-3-O-芸香糖苷峰面积RSD值分别为2.61%, 1.92%, 1.18%, 1.10%。表明供试品溶液在30 h内稳定。

2.4.5 重复性试验 精密称取同批(批号:20170815)畜药降脂轻身茶6份,各5.0 g。按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,结果绿原酸、芦丁、异槲皮苷和山奈酚-3-O-芸香糖苷峰面积的RSD分别为2.20%, 1.15%, 1.97%, 1.09%。表明提取方法的重复性良好。

2.4.6 加样回收率考察 取已知含量的同一批样品(批号:20170815)6份,每份约1 g,精密称定,分别精密加入绿原酸、芦丁、异槲皮苷和山奈酚-3-O-芸香糖苷对照品溶液适量,按“2.2.2”项下方法制备供试溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,计算加样回收率。结果见表1。

表1 加样回收率考察结果(n=6)

Tab. 1 Result of recovery tests(n=6)

组份	原含量/ μg	加入量/ μg	检出量/ μg	回收率/%	平均回 收率/%	RSD/ %
绿原酸	950.00	907.50	1 827.23	96.66	96.15	0.60
	952.33	907.50	1 827.01	96.38		
	951.66	907.50	1 818.99	95.57		
	950.92	907.50	1 829.38	96.80		
	966.78	907.50	1 838.54	96.06		
	978.23	907.50	1 843.92	95.39		
芦丁	1 005.52	1 090.00	2 055.40	96.32	95.62	0.52
	1 006.89	1 090.00	2 045.62	95.30		
	1 004.95	1 090.00	2 044.33	95.36		
	1 010.22	1 090.00	2 049.87	95.38		
	1 011.89	1 090.00	2 049.21	95.17		
	1 010.22	1 090.00	2 058.65	96.19		
异槲皮苷	740.36	710.00	1 423.58	96.23	95.28	1.66
	740.89	710.00	1 419.26	95.55		
	744.17	710.00	1 411.26	93.96		
	742.38	710.00	1 418.98	95.30		
	735.22	710.00	1 427.77	97.54		
	750.28	710.00	1 411.36	93.11		
山奈酚-3-O-芸香糖苷	1 670.80	1 696.50	3 306.87	96.44	95.76	0.94
	1 677.28	1 696.50	3 276.76	94.28		
	1 677.90	1 696.50	3 301.01	95.67		
	1 681.35	1 696.50	3 297.65	95.27		
	1 659.28	1 696.50	3 289.55	96.10		
	1 666.74	1 696.50	3 308.63	96.78		

2.4.7 样品4种成分含量测定 取各批次样品,按“2.2.2”项下方法制备,按“2.1”项下色谱条件测定,计算含量,结果见表2。

表 2 样品含量测定结果($n=2$)Tab. 2 Results of the content determination of sample($n=2$)

批号	芦丁/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	异槲皮苷/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	山奈酚-3- <i>O</i> -芸 香糖苷/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	绿原酸/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
20170815	1.005	0.740	1.670	0.950
20170424	1.135	0.835	1.915	1.015
20170102	0.788	0.580	1.313	0.628
20151207	0.980	0.735	1.640	0.855
20160627	0.890	0.780	0.865	0.545
20150803	0.890	0.785	0.875	0.550
20150113	0.950	0.840	1.295	0.830
20140616	0.945	0.850	1.325	0.745
20131008	0.742	0.689	1.114	0.716
20180125	0.895	0.840	0.675	0.805
RSD/%	11.99	11.11	31.27	20.78

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

根据文献报道^[3-6], 结合二极管阵列检测器全波长扫描, 分别采用 210, 254, 280, 360 nm 4 个波长进行考察, 发现 360 nm 基线平稳, 色谱特征性强, 峰型较好。因此选择 360 nm 作为检测波长。本试验对供试品溶液的处理方法进行了考察, 通过对纯水、80%甲醇、50%甲醇、纯甲醇、70%甲醇作为溶剂进行了比较试验, 结果发现用 70%甲醇样品溶解性较好, 样品分离效果好。

3.2 特征图谱

10 批畜药降脂轻身茶 HPLC 图谱与特征图谱之间的相似度(除 9、10 号样品)均 >0.90 , 相似度良好, 但不同批次之间有一定的差异性, 可能与使用的不同批次原料及制备工艺有关。

3.3 含量测定

由表 2 可知, 10 批样品中绿原酸含量为 $0.545\sim 1.015\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、芦丁的含量为 $0.742\sim 1.135\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、异槲皮苷的含量为 $0.580\sim 0.850\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、山奈酚-3-*O*-芸香糖苷的含量为 $0.675\sim 1.915\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 分别为 20.78%, 11.99%, 11.11%和 31.27%, 说明不同批次质量差别较大。

3.4 共有峰(1~4)的归属

选择稳定性好、吸收强、特征明显的色谱峰

为共有峰, 根据各共有峰的保留时间及紫外光谱信息、供试品溶液和各单味对照药材溶液图谱进行比较分析, 并结合相关文献^[7-9], 绿原酸为山楂、甜叶菊和番泻叶共同所有, 芦丁和异槲皮苷为山楂、食凉茶和番泻叶共同所有, 山奈酚-3-*O*-芸香糖苷存在于食凉茶中。

本研究建立了畜药降脂轻身茶的特征指纹图谱测定方法及 4 个成分的含量测定方法, 方法简便、稳定、可靠, 可为畜药降脂轻身茶的质量控制提供参考。

REFERENCES

- [1] PAN Q, LIU Z D, CHEN L P, et al. Clinical research on she medicine Jiangzhi Qingshen Tea in treatment of metabolic syndrome of damp-phlegm pattern [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2014, 32(6): 1401-1403.
- [2] YUAN Z X, LIU Z D. To determine content determination of quercetin in Jiangzhi Qingshen Tea [J]. China Pharm(中国药业), 2007, 16(1): 28-29.
- [3] LI H L, YUAN J, YU R H, et al. Determination of six phenolic acids in the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2017, 37(2): 219-223.
- [4] FAN S M, XU H L, XIE X Y, et al. Study on UHPLC fingerprint and determination of eight phenolic components of *Tetragium hemsleyanum* leaves [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2016, 44(21): 3975-3981.
- [5] CHEN H G, ZHOU X, YANG S L, et al. Study on HPLC fingerprint of Huangqi granules and determination of four components [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2013, 33(10): 1756-1763.
- [6] LI Y, LIU S X, ZHANG T J, et al. HPLC fingerprint of Fructus Aurantii Immaturus [J]. Chin Tradit Herb Drug(中草药), 2009, 40(9): 1469-1474.
- [7] WANG Z, LI X X, LI J, et al. Determination of rutin, hyperoside and quercetin extract from *Crataegus pinnatifida* Bge. by HPLC [J]. Sci Technol Food Indust(食品工业科技), 2013, 34(9): 302-305.
- [8] WANG W Y, MAO J H, ZHANG W B, et al. Study on HPLC characteristic spectrum of traditional She medicine-Shi Liang Cha and determination of four active components [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(4): 557-562.
- [9] BAI B, XU J, GAO L J, et al. Fingerprint and multi-component quantification analysis of Xiaoyan tablets by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(2): 258-261.

收稿日期: 2018-04-11

(本文责编: 李艳芳)