

· 中药工业 ·

蒙药蒙根窍吉散质量标准中含量测定方法的建立[△]

李柱¹, 吕颖², 张海涛², 王杰³, 张春红^{3*}, 李旻辉^{3,4*}

(1. 内蒙古额济纳旗蒙医医院, 内蒙古 额济纳旗 735400; 2. 赤峰市药品检验所, 内蒙古 赤峰 024000;

3. 内蒙古科技大学包头医学院, 内蒙古 包头 014060;

4. 内蒙古自治区中医药研究所, 内蒙古 呼和浩特 010110)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法, 测定蒙药蒙根窍吉散中槲皮素、异鼠李素及儿茶素的含量。方法: 槲皮素、异鼠李素含量测定色谱柱为 Diamonasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.4% 磷酸(47:53) 等度洗脱, 儿茶素色谱柱为 Agilent ZORBAX C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 乙腈-乙酸-0.03 mol·L⁻¹ 乙二胺四乙酸-水(9:2:0.2:88.8) 溶液, 流动相 B 乙腈-乙酸-0.03 mol·L⁻¹ 乙二胺四乙酸-水(80:2:0.2:17.8) 溶液梯度洗脱, 检测波长分别为 370、278 nm, 柱温分别为 25、35 °C, 流速均为 1.0 mL·min⁻¹。结果: 槲皮素、异鼠李素及儿茶素分别在 0.283 8~1.419 1、0.280 9~1.404 6、0.115 5~1.155 5 μg(*r*=0.999) 范围内线性关系良好, 平均回收率分别为 92.05%、94.00%、91.25% (*n*=9), RSD 分别为 0.69%、0.96%、0.71%。结论: 本方法快速准确、稳定可靠, 可用于蒙根窍吉散中槲皮素和异鼠李素的含量测定。

[关键词] 蒙根窍吉散; 槲皮素; 异鼠李素; 儿茶素; 含量测定

Methods for Determination of Content in Quality Standard of Mongolian Medicine Powder of Menggenqiaoji

LI zhu¹, LYU Ying², ZHANG Hai-tao², WANG Jie³, ZHANG Chun-hong^{3*}, LI Min-hui^{3,4*}

(1. Inner Mongolia ejin banner hospital, Ejin Banner 735400, China;

2. Chifeng Institute of Drug Inspection, Chifeng 024000, China;

3. Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014060, China;

4. Inner Mongolia Autonomous Region Academy of Chinese Medicine, Hohhot 010110, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determinations of quercetin, isorhamnetin and catechin in mongolian medicine preparation Menggenqiaoji. **Methods:** A Diamonasil-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used with the mobile phase of methanol-0.4% phosphoric(47:53), the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, detecting wavelength 370 nm, the column temperature 25 °C for the determination of quercetin and isomarin. A Agilent ZORBAX-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used with the mobile phase A of acetonitrile-acetic acid-0.03 mol·L⁻¹ ethylenediamine tetra acetic acid-water(9:2:0.2:88.8), the mobile phase B being acetonitrile-acetic acid-0.03 mol·L⁻¹ ethylenediamine tetra acetic acid-water(80:2:0.2:17.8) with gradient elution, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, detecting wavelength 278 nm, the column temperature 35 °C for the determination of catechin. **Results:** The linear response ranged from 0.283 8-1.419 1 μg, 0.280 9-1.404 6 μg and 0.115 5-1.155 5 μg(*r* = 0.999, *n* = 6) of quercetin, isorhamnetin and catechin, the average recoveries(*n* = 9) of the methods were 92.05%, 94.00% and 91.25% with RSD 0.69%, 0.96% and 0.71%, respectively. **Conclusion:** The methods are quick, accurate, reproducible and stable, and can be used for the quality control of Mongolian medicine preparation Menggenqiaoji.

[Keywords] powder of Menggenqiaoji; quercetin; isorhamnetin; catechin; content determination

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180702002

[△] [基金项目] 包头医学院博士科研启动基金项目(BSJJ201610)

* [通信作者] 张春红, 教授, 研究方向: 中药资源保护与质量评价; Tel: (0472)7167795, Email: zchlhh@126.com
李旻辉, 教授, 研究方向: 蒙药资源保护与利用; Email: li_minhui@aliyun.com

蒙药蒙根窍吉散为内蒙古西部常用蒙药制剂,由锁阳、沙枣果、骆驼奶酪、冰糖等配方组成,有强壮、镇静、固精、止泻、调经等功能,临床上主要用于治疗胃痛、腹泻、身体虚弱、肺热咳嗽等疾病,其效果显著。由于目前评价蒙根窍吉散质量的检测方法水平较低,指标较少,尚无薄层鉴别、含量测定等控制指标,无法满足当前国家、自治区对蒙医药制剂的质量评价要求,无法更好地指导临床用药。因此本文利用高效液相色谱分析技术,以蒙根窍吉散中主要药效成分槲皮素、异鼠李素及儿茶素为考察指标,建立了含量测定方法,该方法简单快捷,结果准确可靠,为提高蒙药蒙根窍吉散的质量标准水平提供了借鉴和参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1120 液相色谱仪、EZChrom Elite 色谱工作站; Thermo Fisher Scientific UltiMate 3000 高效液相色谱仪 [赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; METTLER TOLEDO AB-135S 型电子分析天平、FA1104 型电子分析天平(上海良平仪器仪表有限公司); KT-300 TDV 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); MILLI-Q 超纯水制备仪(Millipore, Bedford, MA); VDRTEX-5 涡旋混合器(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); 微量移液器(Eppendorf, Germany)。

1.2 试剂

对照品槲皮素(批号 100081-201610, 纯度 > 99%)、异鼠李素(批号 110860-201410, 纯度 > 99%)、儿茶素(批号 100081-201610, 纯度 > 94%)均购自中国食品药品检定研究院; 色谱纯甲醇、乙腈、醋酸均购自 Fisher 公司(Nepean, Ont., Canada); 磷酸、盐酸试剂均为分析纯, 均购自国药集团化学试剂有限公司; 水为超纯水, 制备于 Milli-Q 超纯水仪(Millipore, Bedford, MA)。

3 批蒙根窍吉散均为额济纳旗蒙医院院内制剂(批号分别为 20170103、20170108、20170116); 沙枣果阴性对照供试品: 按处方比例以相同工艺制备缺沙枣果的阴性对照供试品; 锁阳阴性对照供试品: 按处方比例以相同工艺制备缺锁阳的阴性对照供试品。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备

槲皮素、异鼠李素混合对照品溶液: 分别精密称取对照品槲皮素、异鼠李素各 7 mg 于 50 mL 棕色容量瓶中, 加入甲醇使其溶解, 并定容至刻度, 制槲皮素、异鼠李素质量浓度分别为 141.9、140.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 即得。

儿茶素对照品溶液: 精密称取儿茶素对照品 1.5 mg 于 25 mL 棕色容量瓶中, 加稳定溶液(分别取新鲜配制的 0.03 mol·L⁻¹ 乙二胺四乙酸溶液 25 mL、0.06 mol·L⁻¹ 抗坏血酸溶液 25 mL、乙腈 50 mL, 至 500 mL 量瓶, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得)使其溶解, 并定容至刻度, 制得质量浓度为 580.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 儿茶素对照品溶液, 即得。

2.2 供试品溶液制备

供试品 a(用于检测槲皮素、异鼠李素): 精密称取样品及沙枣果阴性对照供试品 2.0 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇-盐酸(10:1)混合溶液 50 mL, 密塞, 称定重量, 静置 30 min。置 60 °C 水浴超声处理 1 h(功率为 250 W, 频率为 50 kHz), 放冷, 再称定重量, 用甲醇-盐酸(10:1)混合溶液补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

供试品 b(用于检测儿茶素): 精密称取样品及锁阳阴性对照供试品 2.0 g, 置 50 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇 25 mL, 70 °C 水浴浸泡 10 min, 超声处理(功率为 250 W, 频率为 50 kHz) 20 min, 放冷, 加稳定溶液至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 色谱条件

槲皮素、异鼠李素含量测定色谱条件: Diamonasil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.4% 磷酸水(47:53)等度洗脱; 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温为 25 °C; 检测波长为 370 nm; 进样量为 10 μL 。

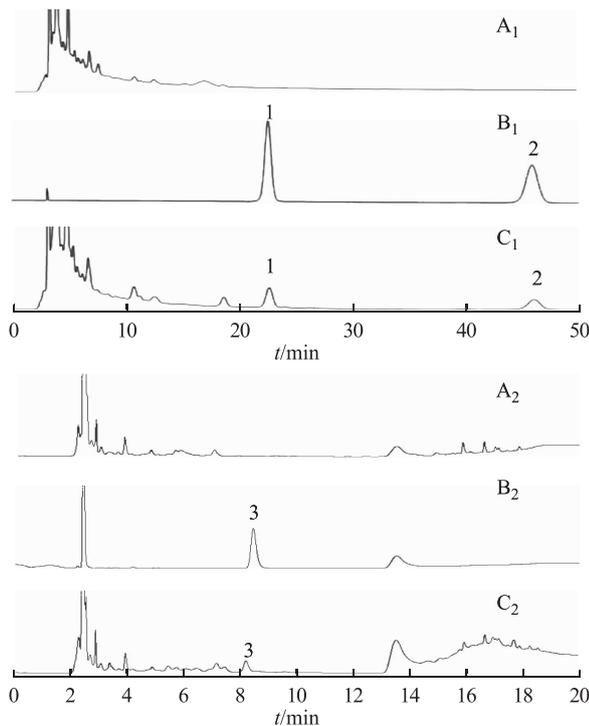
儿茶素含量测定色谱条件: Agilent ZORBAX C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 以乙腈-乙酸-0.03 mol·L⁻¹ 乙二胺四乙酸-水(9:2:0.2:88.8)溶液为流动相 A; 乙腈-乙酸-0.03 mol·L⁻¹ 乙二胺四乙酸-水(80:2:0.2:17.8)溶液为流动相 B, 按表 1 中规定进行梯度洗脱^[1]; 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 35 °C; 检测波长: 278 nm; 进样量: 10 μL 。

表1 儿茶素含量测定梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0	100	0
10	100	0
15	68	32
25	68	32
30	100	0

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 分别精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液、阴性对照供试品溶液各 10 μL ，在 2.3 色谱条件下分别测定。结果显示，沙枣果阴性对照供试品溶液、锁阳阴性对照供试品溶液在与槲皮素、异鼠李素混合对照品、儿茶素对照品及供试品溶液色谱相应保留时间处未出现干扰色谱峰，表明在本实验条件下槲皮素、异鼠李素、儿茶素与其他组分峰完全分离，专属性强。色谱图见图 1。



注：A₁、沙枣果阴性对照供试品；B₁、对照品；C₁、供试品 a；1、槲皮素；2、异鼠李素；A₂、锁阳阴性对照供试品；B₂、对照品；C₂、供试品 b；3、儿茶素。

图1 阴性对照供试品、对照品及蒙根穹吉散供试品 HPLC 图

2.4.2 线性关系 在 2.3 槲皮素、异鼠李素含量测定色谱条件下，分别精密吸取槲皮素、异鼠李素混合对照品溶液 2、4、6、8、10 μL ，注入液相色谱仪，记录峰面积，以峰面积(Y)与对照品进样量(X)进行线

性回归，得到槲皮素和异鼠李素回归方程、相关系数及线性范围。结果见表 2，表明槲皮素在 0.283 8 ~ 1.419 1 μg ，异鼠李素在 0.280 9 ~ 1.404 6 μg 线性关系良好。

在 2.3 儿茶素含量测定色谱条件下，分别精密吸取儿茶素对照品溶液 2、5、10、15、20 μL ，注入液相色谱仪，记录峰面积，以峰面积(Y)与对照品进样量(X)进行线性回归，得到儿茶素回归方程、相关系数及线性范围。结果见表 2，表明儿茶素在 0.115 5 ~ 1.155 5 μg 线性关系良好。

表2 槲皮素、异鼠李素、儿茶素的线性方程、相关系数、线性范围

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
槲皮素	$Y = 2\,049\,605.070X - 9\,769.7408$	0.999	0.283 8 ~ 1.419 1
异鼠李素	$Y = 2\,002\,258.883X - 42\,879.6514$	0.999	0.280 9 ~ 1.404 6
儿茶素	$Y = 10\,005\,291.130X - 26\,643.1224$	0.999	0.115 5 ~ 1.155 5

2.4.3 精密度试验 精密吸取 2.1 项下的对照品溶液，按上述色谱条件下重复测定 6 次，结果槲皮素、异鼠李素、儿茶素峰面积的 RSD 分别为 0.94%、0.63%、0.51%，表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 精密称取蒙根穹吉散样品 2.0 g，按 2.2 项下方法制备供试品溶液。在上述色谱条件下，分别于 0、5、10、20、24 h 进样 10 μL ，记录槲皮素、异鼠李素、儿茶素的峰面积，计算相对标准偏差。结果显示，供试品槲皮素、异鼠李素、儿茶素的峰面积 RSD 分别为 0.18%、0.89%、1.77% ($n=6$)，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 精密称取 2.0 g 同一批号蒙根穹吉散样品(批号：20170108)6 份，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，在上述色谱条件下进样 10 μL ，分别记录槲皮素、异鼠李素、儿茶素的峰面积，计算平均含量的相对标准偏差 RSD 分别为 0.87%、1.26%、1.69% ($n=6$)，表明本方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 精密称取 1.0 g 已知含量的样品(批号：20170108)9 份，分别精密加入适量的对照品溶液^[2]，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，在上述色谱条件下进行测定，结果见表 3。槲皮素、异鼠李素、儿茶素的加样回收率 RSD 分别为 92.05%、94.00%、91.25% ($n=9$)，表明本方法准确性高。

表3 蒙根窍吉散中槲皮素、异鼠李素、儿茶素的加样回收率试验($n=9$)

成分	样品量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
槲皮素	1.081 4	0.114 2	0.0567 6	0.165 6	90.54	92.05	0.69
	1.079 7	0.114 0	0.0567 6	0.165 8	91.22		
	1.080 8	0.114 1	0.0567 6	0.166 8	92.71		
	1.079 4	0.114 0	0.113 5	0.217 5	91.18		
	1.081 1	0.114 2	0.113 5	0.218 5	91.96		
	1.079 6	0.114 0	0.113 5	0.218 5	92.04		
	1.081 1	0.114 2	0.172 3	0.274 1	92.84		
	1.079 5	0.114 0	0.172 3	0.274 9	93.41		
	1.080 7	0.114 1	0.172 3	0.273 6	92.58		
异鼠李素	1.081 4	0.121 9	0.060 9	0.179 3	94.32	94.00	0.96
	1.079 7	0.121 7	0.060 9	0.179 6	95.07		
	1.080 8	0.121 8	0.060 9	0.178 2	92.61		
	1.079 4	0.121 6	0.121 8	0.237 2	94.87		
	1.081 1	0.121 8	0.121 8	0.235 4	93.27		
	1.079 6	0.121 7	0.121 8	0.236 2	94.04		
	1.081 1	0.121 8	0.182 7	0.294 6	94.56		
	1.079 5	0.121 7	0.182 7	0.295 9	95.37		
	1.080 7	0.121 8	0.182 7	0.296 2	95.46		
儿茶素	1.067 1	0.704 9	0.352 4	1.023 1	90.28	91.25	0.71
	1.093 7	0.722 5	0.352 4	1.043 0	90.96		
	1.107 4	0.731 5	0.352 4	1.052 9	91.2		
	1.029 7	0.680 2	0.704 8	1.319 5	90.71		
	1.067 3	0.705 1	0.704 8	1.350 2	91.54		
	1.092 6	0.721 8	0.704 8	1.370 3	92.01		
	1.081 6	0.714 5	1.057 2	1.678 4	91.17		
	1.045 1	0.690 4	1.057 2	1.651 3	90.89		
	1.077 3	0.711 7	1.057 2	1.689 9	92.53		

2.5 样品的含量测定

精密称取不同批号蒙根窍吉散样品各3份,按2.2项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下,分别进样10 μL 测定,分别记录峰面积并计算样品含量,结果见表4。由结果可知,按干燥品计算,槲皮素($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$)、异鼠李素($\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$)、儿茶素($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$)平均含量分别为0.11、0.12、0.62 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

表4 蒙根窍吉散中槲皮素、异鼠李素及儿茶素的平均含量($n=3$)

批次				$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
	槲皮素	异鼠李素	儿茶素	水分(%)
20170103	0.106 4	0.111 6	0.610 5	4.39
20170108	0.105 6	0.112 7	0.660 6	4.45
20170116	0.119 3	0.123 0	0.584 5	4.46

3 讨论

蒙根窍吉散由沙枣、锁阳等配方组成,其中沙枣果为方中君药,所占处方比例较大,具有强壮、镇静、固精、健胃、止泻等功能。其化学成分主要有:挥发油、生物碱、黄酮、芳香族、酚酸类成分(没食子酸、咖啡酸等)、鞣质、糖类(还原糖、蔗糖)、蛋白质、氨基酸、脂肪、淀粉、粗纤维、总酸、维生素和矿物质等^[3]。通过文献分析,槲皮素和异鼠李素的药理作用与沙枣的主要药理作用相吻合^[4],推断槲皮素和异鼠李素是沙枣的主要活性成分之一,因此把二者作为沙枣的指标性成分,进行了HPLC含量测定方法研究,效果较理想。经分析方法验证,表明该方法重复性好、专属性强,方中其他组分对槲皮素、异鼠李素的测定无干扰,故拟收入质量标准中。

锁阳为方中臣药,亦称不老药,历来作为中医常用的补肾壮阳药,临床用于补肾阳、精血、润肠通便等^[5]。其化学成分主要有:黄酮类化合物[(+)-儿茶素、(-)-儿茶素、表儿茶素、异槲皮苷、柑桔素等]

三萜类(熊果酸、乙酰熊果酸、齐墩果酸丙二酸半酯等)、糖和糖苷类、鞣质类、木脂素类、有机酸(没食子酸、原儿茶素、琥珀酸等)、甾体类、挥发性成分、氨基酸类等^[6],根据其所含有的主要化学成分及其主要药理作用,推断其有效成分可能是儿茶素、熊果酸、多糖、鞣质等。通过大量文献分析,儿茶素在锁阳中含量较高,其药理活性与锁阳的主要药理作用相吻合^[7-8],因此把儿茶素作为控制锁阳药材质量的指标性成分,对其进行了含量测定方法研究。经分析方法验证,方中其他组分对儿茶素的测定无干扰,但回收率偏低(约63%)。通过进一步分析发现,儿茶素类成分之间互为同分异构体,在热水浸提过程中有部分组分相互转化,使测得结果含量偏低。经反复摸索,供试品前处理过程中加入稳定溶液后,发现该方法重复性好、专属性强,回收率达90%以上,故拟收入质量标准中。

其他成分如粗多酚、粗多糖^[9],虽具有较广的生物活性,但天然含量低、分离困难、质量标准不易控制、分子结构难以测定;鞣质可能具有非常好的药理作用,但其是一类比较复杂的多元酚类化合

物,更好的药理作用还需进一步的实验证明^[10]。因此,未对以上成分作进一步分析。

参考文献

- [1] 周卫龙,徐建峰,许凌,等.茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法 GB/T 8313—2008[S].北京:中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会,2008:1-3.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:375.
- [3] 王雅,周尚臻,李家寅,等.沙枣功能成分及药理活性研究进展[J].食品工业科技,2013,34(03):361.
- [4] 肖颖,余英才,余雄鹰,等.异鼠李素和槲皮素抗氧化活性研究[J].时珍国医国药,2012,23(5):1118-1120.
- [5] 杨帆,赵鹏伟,孙鹏,等.锁阳多糖对肺癌细胞端粒的影响[J].中国中药杂志,2016,41(5):917-921.
- [6] 李振华,郭静霞,崔占虎,等.锁阳的研究进展与资源保护[J].中国现代中药,2014,16(10):862.
- [7] 程丹,郑俊超,马素亚,等.锁阳化学成分及其药理毒理作用研究进展[J].中医药导报,2018,24(05):108-110,113.
- [8] 薛海燕,焦婵媛,姚军.锁阳药理作用的研究进展[J].现代药物与临床,2018,33(03):709-712.
- [9] 段园园,马耀,陈贵林.锁阳中粗多酚和粗多糖抗氧化活性的比较[J].中国现代中药,2012,14(1):43-45.
- [10] 常艳旭.锁阳药材有效成分及指标性成分研究[D].呼和浩特:内蒙古大学,2006.

(收稿日期 2018-07-02)