

· 药学基础 ·

辣木叶标准汤剂的煎煮工艺优化及质量标准建立

宋亚南¹, 王云¹, 杨洪军^{1,2}, 贾哲¹, 张村^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

2. 中国中医科学院, 北京 100700)

[摘要] 目的: 基于响应面法结合主成分分析, 优选辣木叶标准汤剂最佳煎煮工艺, 建立其多指标质量评价体系, 为辣木叶标准汤剂的质量控制提供科学依据。方法: 采用响应面法结合主成分分析法, 以8个特征峰的相对峰面积及出膏率作为评价指标, 优选出最佳煎煮工艺。在此基础上, 以15批标准汤剂为研究对象, 以高效液相色谱法(HPLC)特征图谱、多指标成分(新绿原酸、L-色氨酸、隐绿原酸、维采宁-2、异槲皮素、紫云英苷)含量测定、大类成分(总黄酮、总有机酸、总多糖、总 α -氨基酸、总芥子碱)含量测定、出膏率、比重、pH等多指标开展其质量标准研究。结果: 优化得到的最佳煎煮工艺是取辣木叶100.00 g, 浸泡30 min, 煎煮2次, 头煎12倍量水, 煎煮30 min; 二煎10倍量水, 煎煮20 min。以 $\bar{x} \pm 30\%$ 限定各数值范围, 含生药量 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的辣木叶标准汤剂, 其比重为0.722~1.340、pH为3.86~7.16、出膏率为23.1%~42.9%、醇溶性浸出物为8.26%~15.34%; 按标准汤剂干燥品计, 新绿原酸、L-色氨酸、隐绿原酸、维采宁-2、异槲皮素、紫云英苷的质量分数分别为1.99~3.69、1.20~2.22、1.44~2.67、0.53~0.99、2.45~4.55、1.22~2.26 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 相对于药材的转移率分别为34.37%~63.83%、62.43%~115.94%、64.65%~120.06%、56.98%~105.82%、37.46%~69.57%、41.81%~77.64%; 总黄酮、总有机酸、总多糖、总 α -氨基酸、总芥子碱的质量分数分别为10.19~18.92、11.82~21.96、94.07~174.71、42.69~79.27、9.55~17.73 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 相对于药材的转移率为25.72%~47.77%、41.78%~77.59%、64.90%~120.54%、42.30%~78.57%、34.99%~64.99%。结论: 优选的辣木叶标准汤剂煎煮工艺稳定可行, 建立的多指标质量评价体系可为该标准汤剂的质量控制奠定基础。

[关键词] 辣木叶; 标准汤剂; 高效液相色谱法(HPLC); 质量标准; 响应面法; 主成分分析(PCA); 煎煮工艺

[中图分类号] R22; C37; R28; O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2024)06-0151-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20231162 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20230613.1008.004>

[网络出版日期] 2023-06-13 16:57:33

Optimization of Decoction Technology and Establishment of Quality Standard for *Moringa oleifera* Leaf Standard Decoction

SONG Yanan¹, WANG Yun¹, YANG Hongjun^{1,2}, JIA Zhe¹, ZHANG Cun^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** Based on response surface methodology combined with principal component analysis(PCA), the optimal decocting process of *Moringa oleifera* leaf standard decoction was optimized, and its multi-index quality evaluation system was established, in order to provide scientific basis for the quality control of this standard decoction. **Method:** Response surface methodology and PCA were used to optimize the decoction process by taking the relative peak areas of 8 characteristic peaks and dry extract yield as indexes. Based on this, the quality of 15 batches of the standard decoction was evaluated by high performance liquid

[收稿日期] 2023-04-17

[基金项目] 云南省重大科技专项计划项目(2017ZF004)

[第一作者] 宋亚南, 在读博士, 从事中药炮制原理及饮片质量评价研究, E-mail: synsong@163.com

[通信作者] * 张村, 博士, 研究员, 从事中药炮制、中药化学研究, Tel: 010-64032658, E-mail: zhc95@163.com

chromatography (HPLC) characteristic chromatogram, determination of major components (neochlorogenic acid, *L*-tryptophan, cryptochlorogenic acid, vicenin-2, isoquercetin, astragalin), determination of active parts (total flavonoids, total organic acids, total polysaccharides, total α -amino acids, total sinapine), dry extract yield, specific gravity and pH. **Result:** The optimal decocting process was to soak *M. oleifera* leaves(100.00 g) for 30 min and decoct twice with the first decoction of 12 times the amount of water for 30 min and the second decoction of 10 times the amount of water for 20 min. Standard decoction containing $0.2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of crude drug was defined by $\bar{x}\pm 30\%$, the specific gravity was 0.722-1.340, pH was 3.86-7.16, dry extract yield was 23.1%-42.9%, and the alcohol-soluble extract content was 8.26%-15.34%. Calculated according to the dried products of the standard decoction, the contents of neochlorogenic acid, *L*-tryptophan, cryptochlorogenic acid, vicenin-2, isoquercetin and astragalin were 1.99-3.69, 1.20-2.22, 1.44-2.67, 0.53-0.99, 2.45-4.55, 1.22-2.26 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, the relative transfer rates relative to the herbs were 34.37%-63.83%, 62.43%-115.94%, 64.65%-120.06%, 56.98%-105.82%, 37.46%-69.57%, 41.81%-77.64%, respectively. The contents of total flavonoids, total organic acids, total polysaccharides, total α -amino acids, total sinapine were 10.19-18.92, 11.82-21.96, 94.07-174.71, 42.69-79.27, 9.55-17.73 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, the relative transfer rates for herbs were 25.72%-47.77%, 41.78%-77.59%, 64.90%-120.54%, 42.30%-78.57%, 34.99%-64.99%, respectively. **Conclusion:** The optimized decocting technology of *M. oleifera* leaf standard decoction is stable and feasible, and the established multi-indicator quality evaluation system can lay the foundation for the quality control of this standard decoction.

[Keywords] *Moringa oleifera* leaves; standard decoction; high performance liquid chromatography (HPLC); quality standard; response surface methodology; principal component analysis (PCA); decocting technology

辣木叶 *Moringa oleifera* 为辣木科 Moringaceae 辣木属 *Moringa* 热带落叶乔木辣木的干燥叶,原产于印度^[1]。其营养丰富、包含多种化学物质群、具有明显的药理活性,如总黄酮^[2]、总多糖^[3]、总多酚^[4]具有抗氧化活性,总有机酸^[5]具有抑菌活性,总芥子碱^[6]具有抑制肿瘤细胞增殖的作用。

我国云南省于20世纪60年代引种辣木,辣木叶在我国部分省市已有几十年的食用历史,于2012年被我国卫生部列为新资源食品,其食品行业现行标准^[7]于2018年3月1日起正式实施。该行业标准对辣木叶鲜品、干品、粉末、辣木茶进行了感官分级,并明确了理化、污染物限量及农药残留限量指标的数值参考。此外,2021年5月19日正式实施了辣木叶粉的行业标准^[8]。另检索到辣木叶企业标准相关条目1条(金庆辣木叶,发布于2018年1月12日,无标准号)。由此可知,辣木叶在食品行业中发展迅速,且已有可供参考的质量标准。鉴于辣木叶资源丰富、且已发现了多种化学成分类型(如黄酮类、苯丙素类、萜类、甾体类、生物碱类、异硫氰酸酯类等)及降血糖^[9]、降血脂^[10-11]、润肠通便^[12-13]、降血压、抗肿瘤、保肝等广泛的药理活性,证实其药用前景广阔,为其以药材身份纳入我国中医药体系奠定了基础。

中药标准汤剂是基于中医理论与临床应用,并经优化提取方法与制备工艺的水煎剂,保障临床用药的准确性和剂量的一致性,在标准化临床用药过程中发挥了重要作用,同时中药标准汤剂的研究也对药材的质量及安全性把控奠定了坚实的基础。

目前尚未有辣木叶标准汤剂的研究报道,课题组前期已开展了辣木叶煎煮过程动力学研究^[14]。根据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术指导》中标准汤剂的相关研究要求^[15-17],本研究拟在单因素实验基础上,采用响应面法结合主成分分析,以多指标对辣木叶汤剂煎煮工艺参数进行优选,进而选用15批辣木叶制备标准汤剂,建立大类成分和指标成分含量测定方法,结合转移率、出膏率、比重和pH等指标,为建立基于中医临床应用的辣木叶标准汤剂质控标准奠定基础。

1 材料

LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司),XS105DU型十万分之一分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),LD-T100A型高速万能粉碎机(上海顶帅电器有限公司),FX101-2型电热鼓风干燥箱(上海树立仪器仪表有限公司),KQ-300B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),BSM-3200.2型百分之

一电子天平(上海卓精电子科技有限公司),UV-1800型紫外-可见分光光度计(上海美普达仪器有限公司),HH-61型数显恒温水浴锅(江苏杰瑞尔电器有限公司),C21-WT2112T型多功能电磁炉(广州美的生活电器制造有限公司),SHB-Ⅲ型循环水式多用真空泵(郑州赛美德仪器有限公司),N-1100型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司),PHSJ-3F型pH计(上海仪电科学仪器股份有限公司),14支组密度计(河北省青县燕河仪器仪表有限公司),LGJ-10型冷冻干燥机[四环福瑞科仪发展(北京)有限公司]。

维采宁-2对照品(成都普思生物科技股份有限公司,批号PS000897),芦丁对照品(成都曼斯特生物科

技股份有限公司,批号MUST-15010707),L-色氨酸、新绿原酸、隐绿原酸、异槲皮素、紫云英苷、绿原酸、D-(+)-葡萄糖(无水)、L-精氨酸、芥子碱硫氰酸盐对照品(成都克洛玛生物有限公司,批号分别是CHB190220、CHB190217、CHB170828、CHB160506、CHB181115、CHB160418、CHB180929、CHB190120、CHB-J-028,纯度均≥98%),水为娃哈哈纯净水,乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

15批PKM1型辣木叶药材购自云南天佑科技开发有限公司,经中国中医科学院李志勇研究员鉴定为辣木科辣木属辣木*M. oleifera*的干燥叶,样品具体信息见表1。

表1 辣木叶样品信息
Table 1 Sample information of *Moringa oleifera* leaves

编号	药材批号	产地	编号	药材批号	产地
Y1	1005410424-1	云南西双版纳	Y9	1005410191-3	云南省德宏州芒市
Y2	1005410424-2	云南西双版纳	Y10	1005410191-4	云南省德宏州芒市
Y3	1005410424-3	云南西双版纳	Y11	1005410191-5	云南省德宏州芒市
Y4	1005410057-1	云南西双版纳	Y12	1005410191-6	云南省德宏州芒市
Y5	1005410057-2	云南西双版纳	Y13	1005410191-7	云南省德宏州芒市
Y6	1005410057-3	云南西双版纳	Y14	1005410191-8	云南省德宏州芒市
Y7	1005410191-1	云南省德宏州芒市	Y15	1005410191-9	云南省德宏州芒市
Y8	1005410191-2	云南省德宏州芒市			

注:所有药材采收时间均为2018年12月

2 方法与结果

2.1 辣木叶标准汤剂供试品溶液的制备 参考《医疗机构中药煎药室管理规范》研究辣木叶煎煮工艺,最终确定的工艺参数为称取辣木叶100.00 g,置于砂锅中,加水浸泡30 min。头煎12倍量水,煎煮30 min,趁热过滤,二煎10倍量水,煎煮20 min,趁热过滤。合并2次滤液,60℃减压浓缩至500 mL,-50℃冷冻干燥,制成冻干粉备用。取冻干粉适量,精密称定,加水溶解制成相当于生药量0.2 g·mL⁻¹的辣木叶标准汤剂溶液。编号S1~S15表示15批辣木叶药材所对应的标准汤剂。精密量取溶液2.5 mL加水稀释并定容到10 mL量瓶中,摇匀,以0.45 μm微孔滤膜滤过即得0.05 g·mL⁻¹的辣木叶标准汤剂供试品溶液。

2.2 色谱条件 依据前期建立的特征图谱方法进行分析,采用Phenomenex Luna C₁₈(2)100A色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为乙腈(A)-0.5%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~20 min,5%~13%A,20~40 min,13%~18%A,40~50 min,18%~30%A,

50~60 min,30%~60%A,60~70 min,60%~100%A,70~80 min,100%A,80~95 min,100%~5%A),流速0.8 mL·min⁻¹,柱温35℃,进样量5 μL,检测波长254 nm。

2.3 基于响应面法优化辣木叶标准汤剂煎煮工艺

2.3.1 响应面试验设计 在单因素实验的基础上,以新绿原酸、L-色氨酸、隐绿原酸、维采宁-2、异槲皮素、槲皮素-3-O-β-D-(6"-O-丙二酰)葡萄糖苷、紫云英苷、山柰酚-3-O-β-D-(6"-O-丙二酰)葡萄糖苷8个特征成分的相对峰面积及出膏率为评价指标,以头煎溶剂倍量(A)、二煎溶剂倍量(B)、头煎煎煮时间(C)、二煎煎煮时间(D)为影响因素,以-1、0、1编码各因素的低、中、高水平。采用Design-Expert 8.0.5软件设计四因素三水平的Box-Behnken响应面法进行实验,方案见表2。出膏率计算公式为出膏率=(M₁×V₂)/(M₂×V₁)×100%,式中M₁表示实际称重的干膏质量平均值(g),M₂为辣木叶质量(g),V₁为出膏率测定时所用的体积,V₂为标准溶液总体积。

2.3.2 主成分分析 使用SPSS 26.0软件,原始数据

表2 辣木叶标准汤剂煎煮工艺优选的响应面试验分析
Table 2 Response surface test analysis for optimizing decoction process of *M. oleifera* leaf standard decoction

编号	溶剂倍量/倍		煎煮时间/min		Y	Z
	头煎	二煎	头煎	二煎		
1	14	12	30	20	-2.598	0.272
2	12	8	40	20	-2.690	0.261
3	10	10	20	20	-1.194	0.450
4	12	10	30	20	2.656	0.939
5	10	10	30	10	0.391	0.651
6	10	10	40	20	0.567	0.674
7	12	12	30	10	1.926	0.846
8	12	12	20	20	-1.370	0.428
9	12	8	30	10	-0.330	0.560
10	14	10	20	20	-1.132	0.458
11	12	10	20	10	1.730	0.821
12	14	8	30	20	-3.682	0.135
13	12	10	20	30	0.955	0.723
14	12	10	30	20	2.561	0.927
15	12	12	40	20	1.534	0.796
16	12	10	30	20	3.140	1.000
17	12	10	40	30	-0.628	0.522
18	12	10	30	20	2.691	0.943
19	12	10	40	10	2.385	0.904
20	14	10	30	10	1.578	0.802
21	10	10	30	30	0.724	0.694
22	14	10	40	20	-2.111	0.334
23	10	8	30	20	-3.670	0.136
24	14	10	30	30	-4.744	0.000
25	12	8	20	20	0.642	0.683
26	10	12	30	20	-0.391	0.552
27	12	12	30	30	0.077	0.611
28	12	8	30	30	-1.782	0.376
29	12	10	30	20	2.766	0.953

进行标准化(Z-Score)处理,通过KOM检验法和 Bartlett 球体检验法进行适用性检验,KOM=0.802>0.6, Bartlett 球形度检验结果为 378.345, Sig=0.000<0.01,说明各个指标之间具有关联性,适用主成分分析。将特征值>1的因子作为提取标准,前2个主成分解释了全部方差的 86.253%(特征值分别为 6.599 及 1.164,比例分别为 73.324% 及 12.928%),进一步计算主成分的分值及规范化综合得分,以规范化综合得分值为响应面值做响应面分析,综合得分(Y)和规范化得分(Z)见表2。

$$F = (FAC_1 \times \sqrt{x_1} \times W_1 + \cdots + FAC_2 \times \sqrt{x_2} \times W_2) \times W_{1+2} \tag{1}$$

$$Y = (F_1 \times W_1 + F_2 \times W_2) / (W_1 + W_2) \tag{2}$$

$$Z = (Y - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min}) \tag{3}$$

公式(1)为主成分得分(F)计算公式:FAC表示主成分SPSS生成值,x表示主成分对应的特征值,W表示主成分对应的占比;公式(2)为综合评分值(Y)计算公式;公式(3)为综合评分规范化值(Z)计算公式。

2.3.3 回归方程方差分析 将Z值录入 Design-Expert 8.0.5 软件,根据 fifth 模型进行分析,以Z为效应值,对各因素编码值进行拟合,得回归方程

$$Z=0.95-0.097A+0.11B-0.006C-0.14D-0.07AB-0.087AC-0.21AD+0.20BC-0.013BD-0.071CD-0.36A^2-0.30B^2-0.12C^2-0.064D^2$$

根据回归模型方差分析得出,方差模型 $P<0.01$,差异具有统计学意义,失拟项不明显,表明该回归模型与实际试验具有较高的拟合度,因此可用该回归方程预测辣木的煎煮工艺最佳工艺参数。该回归模型决定系数 $R^2=0.975>0.9$,调整决定系数 $R^2_{Adj}=0.95>0.9$,说明该模型可以解释 95% 响应值的变化,回归模型较为可靠,可用于辣木叶煎煮工艺优化的理论推测。在该模型中,一次项 A、B、D 具有显著影响,C 不明显;二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 均呈显著影响, D^2 具有明显影响;交互项中,AD、BC 具有显著性差异,AB、AC、CD 具有明显差异,BD 无明显差异。各因素的影响大小为二煎煎煮时间(D)>二煎溶剂倍量(B)>头煎溶剂倍量(A)>头煎煎煮时间(C)。见表3。

2.3.4 两因素间交互分析 两因素间的交互作用见增强出版附加材料,结果显示,头煎溶剂倍量与头煎煎煮时间、二煎煎煮时间的交互作用显著($P<0.01$),而 AB、AC、CD 交互作用明显($P<0.05$)。根据模拟拟合结果,辣木叶的预测最佳煎煮工艺为头煎及二煎溶剂倍量分别为 12.30、10.73 倍,头煎及二煎煎煮时间分别为 30.87、15.16 min。

2.3.5 煎煮工艺的验证 根据以上结果,选择以头煎倍量及二煎倍量分别为 12、10 倍,头煎及二煎煎煮时间分别为 30、20 min,平行煎煮 3 批实验样品。按照 2.1 项下步骤进行供试品溶液制备,按照 2.2 项下步骤进行检测,结果显示,3 批水煎液的 8 个特征峰相对峰面积的相对标准偏差(RSD)为 1.2%~3.6%,出膏率 RSD 为 2.3%,表明选择的工艺稳定性较好。见表4。最终确定辣木叶最优煎煮工艺为头煎及二煎的溶剂倍量分别为 12 倍和 10 倍,头煎及二煎的煎煮时间分别为 30、20 min。

2.4 辣木叶标准汤剂的质量标准研究

2.4.1 对照品溶液的制备 精密称定新绿原酸、

表3 辣木叶标准汤剂煎煮工艺优选的回归方程系数检验

Table 3 Coefficient test of regression equation for optimizing decoction process of *M. oleifera* leaf standard decoction

方差来源	平方和	自由度	均方	F
模型	2.10	14	0.15	39.06 ²⁾
A	0.11	1	0.11	29.38 ²⁾
B	0.15	1	0.15	39.83 ²⁾
C	0.000 432	1	0.000 432	0.11
D	0.23	1	0.23	60.22 ²⁾
AB	0.019	1	0.019	5.07 ¹⁾
AC	0.030	1	0.030	7.89 ¹⁾
AD	0.18	1	0.18	45.76 ²⁾
BC	0.16	1	0.16	40.67 ²⁾
BD	0.000 650 3	1	0.000 650 3	0.17
CD	0.020	1	0.020	5.26 ¹⁾
A ²	0.83	1	0.83	216.68 ²⁾
B ²	0.57	1	0.57	148.75 ²⁾
C ²	0.096	1	0.096	25.11 ²⁾
D ²	0.027	1	0.027	6.92 ¹⁾
残差	0.054	14	0.003 836	—
失拟项	0.050	10	0.005 002	5.43
纯误差	0.003 685	4	0.000 921 2	—
总和	2.15	28	—	—

注: ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01

表4 辣木叶标准汤剂煎煮工艺的验证试验

Table 4 Validation test of decoction process of *M. oleifera* leaf standard decoction

No.	新绿原酸	L-色氨酸	隐绿原酸	维采宁-2	异槲皮素	槲皮素-3-O-β-D-(6"-O-丙二酰)葡萄糖苷	紫云英苷	山柰酚-3-O-β-D-(6"-O-丙二酰)葡萄糖苷	出膏率/%
1	753 605	514 335	634 126	362 988	2 554 153	1 914 568	1 119 689	876 124	39.54
2	737 122	536 719	665 140	356 142	2 742 046	1 891 996	1 187 165	917 347	38.12
3	767 320	533 895	674 629	355 269	2 644 156	1 963 180	1 196 068	921 895	37.91

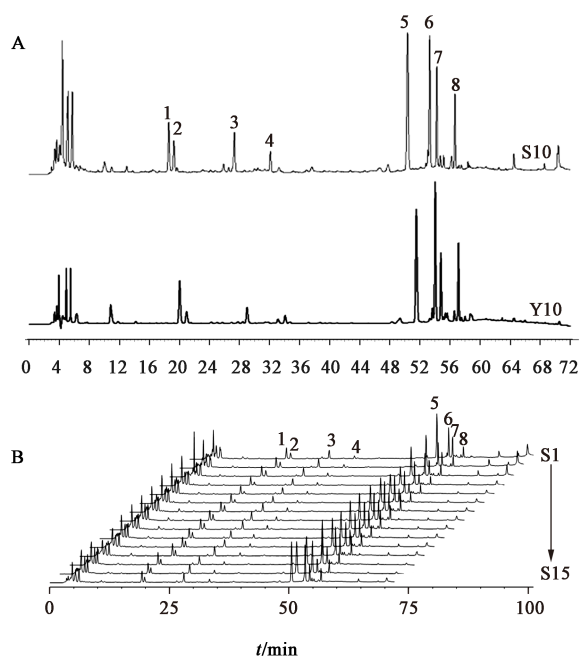
L-色氨酸、隐绿原酸、维采宁-2、异槲皮素、紫云英苷6个对照品各适量,分别置于10 mL量瓶中,加50%甲醇水使溶解并定容至刻度,吸取适量母液,配制成质量浓度分别为79.20、88.80、38.00、15.47、39.68、86.10 mg·L⁻¹混合对照品溶液。精密称定芦丁、绿原酸、D-(+)-葡萄糖(无水)、L-精氨酸、芥子碱硫氰酸盐对照品适量,分别配制成质量浓度分别为0.082、0.170、0.350、0.117、0.360 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备 取辣木叶粉末(过四号筛)0.2 g,精密称定,置25 mL圆底烧瓶中,精密加入50%甲醇溶液10 mL,称定质量,加热回流提取60 min,取出,放冷。再称定质量,用50%甲醇水补足减失的质量,摇匀,过0.45 μm微孔滤膜,即得辣木叶药材供试品溶液。按2.1项下方法制备含生药量为0.05 g·mL⁻¹的辣木叶标准汤剂供试品溶液。

供特征图谱及特征成分检测分析。

取辣木叶药材样品粉末(过四号筛)50.00 mg,精密称定,置50 mL具塞锥形瓶中,精密加入甲醇20 mL,称定质量,超声处理30 min(300 W,40 kHz),放冷,用甲醇补足损失质量,滤过,得总黄酮供试品溶液。取辣木叶样品粉末50.00 mg,精密称定,置50 mL具塞锥形瓶中,精密加入75%甲醇20 mL,称定质量,超声处理30 min,放冷,用75%甲醇补足损失质量,滤过,得总有机酸/总芥子碱供试品溶液。取辣木叶样品粉末20.00 mg,精密称定,置50 mL圆底烧瓶中,精密加水20 mL,称定质量,加热回流30 min,放冷,用水补足减失质量,滤过,得总多糖/总α-氨基酸供试品溶液。按2.1项下方法制备含生药量0.2 g·mL⁻¹的辣木叶标准汤剂供试品溶液。供大类成分检测分析。

2.4.3 特征图谱的建立 按2.4.2项下方法制备药材供试品溶液及含生药量 $0.05\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的辣木叶标准汤剂供试品溶液,按2.2项下色谱条件进样检测。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版),对15批标准汤剂的特征图谱进行分析,采用中位数法,时间窗设为 0.1 min ,进行多点校正,手动标定8个Mark峰,进行Mark峰匹配,将相似度结果及匹配峰数据导出。15批标准汤剂的相似度均 >0.95 。以峰5(异槲皮素)为参照峰(S),15批标准汤剂相对保留时间的RSD均 $<3.0\%$,峰面积RSD在 $4.0\%\sim 18.9\%$ 之间(峰2、峰7、峰8峰面积的RSD分别为 17.5% 、 17.6% 、 18.9%),这可能与不同批次药材的产地不同有关。见图1。



注:A. 辣木叶药材及标准汤剂的色谱叠加;B. 15批标准汤剂特征谱叠加;1. 新绿原酸;2. *L*-色氨酸;3. 隐绿原酸;4. 维采宁-2;5(S). 异槲皮素;6. 槲皮素-3-*O*- β -D-(6''-*O*-丙二酰)葡萄糖苷;7. 紫云英苷;8. 山柰酚-3-*O*- β -D-(6''-*O*-丙二酰)葡萄糖苷

图1 辣木叶药材及其标准汤剂的色谱叠加

Fig. 1 Chromatographic superposition of *M. oleifera* leaf medicinal materials and standard decoction

2.4.4 特征成分含量测定 按2.4.2项下方法制备药材供试品溶液及含生药量 $0.05\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的辣木叶标准汤剂供试品溶液,按2.2项下色谱条件进样检测。结果显示,15批辣木叶药材中6个单体成分新绿原酸、*L*-色氨酸、隐绿原酸、维采宁-2、异槲皮素、紫云英苷的平均质量分数分别为 5.81 、 1.91 、 2.23 、 0.94 、 6.59 、 $2.91\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD分别为 9.2% 、 19.7% 、 10.9% 、 7.6% 、 9.4% 、 12.0% ,以异槲皮素含量最高,新

绿原酸含量次之,维采宁-2的含量最低,6个成分的质量分数总和为 $18.36\sim 22.24\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。15批辣木叶标准汤剂中6个成分新绿原酸、*L*-色氨酸、隐绿原酸、维采宁-2、异槲皮素、紫云英苷按投药量计算的平均质量分数分别为 2.84 、 1.71 、 2.05 、 0.76 、 3.50 、 $1.74\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD分别为 11.1% 、 21.9% 、 11.9% 、 11.1% 、 13.8% 、 21.5% ,高低排序与药材基本一致。参照《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术指导》中标准汤剂的相关研究要求^[15],以 $\bar{x}\pm 30\%$ 限定标准汤剂的质量分数及转移率范围来反映辣木叶从药材-标准汤剂的转移情况。标准汤剂中新绿原酸、*L*-色氨酸、隐绿原酸、维采宁-2、异槲皮素、紫云英苷的 $\bar{x}\pm 30\%$ 质量分数范围分别为 $1.99\sim 3.69$ 、 $1.20\sim 2.22$ 、 $1.44\sim 2.67$ 、 $0.53\sim 0.99$ 、 $2.45\sim 4.55$ 、 $1.22\sim 2.26\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$;6个成分的平均转移率分别为 49.10% 、 89.18% 、 92.36% 、 81.40% 、 53.51% 、 59.72% ,RSD分别为 9.8% 、 12.6% 、 15.2% 、 13.1% 、 14.9% 、 20.5% ;6个成分的 $\bar{x}\pm 30\%$ 转移率范围分别为 $34.37\%\sim 63.83\%$ 、 $62.43\%\sim 115.94\%$ 、 $64.65\%\sim 120.06\%$ 、 $56.98\%\sim 105.82\%$ 、 $37.46\%\sim 69.57\%$ 、 $41.81\%\sim 77.64\%$ 。个别批次的某些指标的含量略低于下限,如*L*-色氨酸(S4、S5、S6)、紫云英苷(S4、S5、S6),Y8-S8的隐绿原酸(120.25%)转移率略高于 $\bar{x}\pm 30\%$ 。见表5。

2.4.5 大类成分含量测定 按2.4.2项下方法制备辣木叶药材供试品溶液及含生药量 $0.2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 辣木叶标准汤剂溶液,按照2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)通则0401紫外-可见分光光度法,精密量取 $25\text{ }\mu\text{L}$ 标准汤剂,分别在 420 、 328 、 388 nm 波长下测定辣木叶药材及标准汤剂中总黄酮、总有机酸、总芥子碱含量,精密量取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 和 $5\text{ }\mu\text{L}$ 标准汤剂,分别在 490 、 568 nm 波长下测定总多糖、总 α -氨基酸含量。结果显示,辣木叶药材中5个大类成分总黄酮、总有机酸、总多糖、总 α -氨基酸、总芥子碱的平均质量分数分别为 39.67 、 28.34 、 145.83 、 100.69 、 $27.39\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD分别为 8.2% 、 6.7% 、 19.4% 、 11.5% 、 7.2% ,以总多糖含量最高,总 α -氨基酸、总黄酮次之,总有机酸和总芥子碱最低,5个大类成分的质量分数总和为 $301.95\sim 409.56\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,辣木叶药材中可测成分超过 30% ,但15批药材质量存在一定的差异性。辣木叶标准汤剂中5个大类成分平均质量分数按投药量计算分别为 14.55 、 16.89 、 134.39 、 60.98 、 $13.64\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD分别为 16.4% 、 11.2% 、 16.3% 、 19.2% 、 9.4% ,以总多糖含量最高,总 α -氨基酸次之,总有机酸、总黄酮、总芥子碱含量最低

表5 辣木叶标准汤剂中特征成分质量分数及转移率
Table 5 Contents and transfer rates of of characteristic compounds in *M. oleifera* leaf standard decoction mg·g⁻¹

No.	新绿原酸			L-色氨酸			隐绿原酸			维采宁-2			异槲皮素			紫云英苷		
	Y	S	转移率/%	Y	S	转移率/%	Y	S	转移率/%	Y	S	转移率/%	Y	S	转移率/%	Y	S	转移率/%
1	5.48	3.15	57.55	2.32	2.01	86.77	2.69	2.16	80.31	1.00	0.76	76.42	7.00	3.70	52.92	3.47	1.96	56.43
2	5.35	2.99	55.82	2.28	1.89	83.15	2.47	2.06	83.43	0.97	0.70	72.32	6.49	3.49	53.71	3.31	1.79	54.04
3	5.57	2.96	53.16	2.34	1.97	84.30	2.60	2.25	86.48	0.99	0.76	77.19	6.44	3.61	56.07	3.22	1.89	58.69
4	5.24	2.29	43.79	1.31	0.98	75.16	2.17	1.57	72.39	0.88	0.61	68.66	6.76	2.78	41.20	2.61	1.00	38.48
5	5.10	2.31	45.34	1.26	0.99	78.96	2.15	1.69	78.87	0.87	0.61	70.54	6.50	2.79	43.00	2.49	1.01	40.74
6	5.16	2.42	46.81	1.32	1.02	77.25	2.10	1.66	79.02	0.88	0.64	72.42	7.15	2.98	41.69	2.59	1.07	41.37
7	5.62	2.78	49.49	1.92	1.81	94.50	1.88	2.05	108.69	0.89	0.84	94.59	5.67	3.59	63.34	2.92	1.93	66.24
8	5.58	2.90	51.97	1.84	1.95	106.46	1.84	2.22	120.25	0.89	0.86	96.18	5.52	3.32	60.26	2.94	2.00	68.15
9	5.64	2.95	52.27	1.96	1.99	101.31	1.97	2.23	113.17	0.86	0.86	100.18	5.49	3.66	66.62	2.72	2.01	73.59
10	6.61	2.76	41.76	2.29	1.86	81.20	2.35	1.95	83.20	1.09	0.81	73.82	6.59	3.22	48.90	3.32	1.88	56.71
11	6.28	2.64	42.03	2.26	1.79	79.25	2.20	1.91	86.87	1.01	0.75	74.84	6.73	3.21	47.74	3.28	1.88	57.17
12	6.21	2.86	46.02	2.13	1.73	81.20	2.15	2.07	96.27	1.03	0.77	75.01	6.80	3.49	51.29	3.14	2.04	64.92
13	6.19	3.24	52.29	1.75	1.85	105.35	2.26	2.27	100.38	0.89	0.82	91.99	6.87	4.3	62.68	2.43	1.84	75.58
14	6.61	3.26	49.30	1.85	1.86	100.23	2.37	2.36	99.48	0.93	0.80	86.07	7.31	4.04	55.34	2.67	1.88	70.26
15	6.46	3.16	48.95	1.83	1.87	102.65	2.31	2.23	96.55	0.89	0.81	90.74	7.54	4.37	57.95	2.61	1.92	73.52

注:Y.药材,S.标准汤剂(表6同)

且三者相差不大。辣木叶煎煮过程对各成分的影响不尽一致,药材中的成分均可转移至标准汤剂中,标准汤剂中可检测成分>25%。标准汤剂中总黄酮、总有机酸、总多糖、总α-氨基酸、总芥子碱的 $\bar{x}\pm 30\%$ 质量分数范围分别为10.19~18.92、11.82~21.96、94.07~174.71、42.69~79.27、9.55~17.73 mg·g⁻¹;5大类成分的平均转移率分别为36.75%、59.68%、92.72%、60.43%、49.99%,RSD分别为13.4%、10.6%、6.5%、14.3%、10.6%;5大类成分的 $\bar{x}\pm 30\%$ 转移率范围分别为25.72%~47.77%、41.78%~77.59%、64.90%~120.54%、42.30%~78.57%、34.99%~64.99%。其中S3总α-氨基酸略高于 $\bar{x}\pm 30\%$ 上限。见表6。

2.4.6 一般理化指标检测 按文献[18]方法测定水分,结果显示15批辣木叶药材的含水量均<14%。参照2020年版《中国药典》通则2201热浸法及《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》,精密称定15批标准汤剂冻干粉各2.0 g,置100 mL锥形瓶中,加乙醇50 mL,密塞,称定质量,静置1 h后,回流加热,煮沸1 h。放冷补足质量,摇匀滤过。精密量取滤液25 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于烘箱105℃干燥3 h,置干燥器中冷却30 min,称定质量,计算冻干粉及相应生药量下醇溶性浸出物平均含量为11.80%。

测定标准汤剂的平均出膏率为33.0%,RSD分别为9.9%及3.3%,表明15批标准汤剂样品存在一定的差异。分别使用密度计、pH计测定0.2 g·mL⁻¹标准汤剂溶液的比重及pH。15批标准汤剂平均比重为1.031、pH均值为5.51,RSD分别为0.2%和1.6%,说明不同批次样品的比重及pH区别较小。15批次标准汤剂比重、pH、出膏率、醇溶性浸出物均在其 $\bar{x}\pm 30\%$ 的范围内,分别为0.722~1.340、3.86~7.16、23.1%~42.9%、8.26%~15.34%,所有批次各指标均在范围内,说明该质量标准的范围设置在整体上可行。见表7。

3 讨论

本研究基于响应面结合主成分分析法,以8个特征峰的相对峰面积及出膏率作为评价指标,优化并经验证得到辣木叶的最佳煎煮工艺。在此基础上制备15批标准汤剂,以特征图谱、多成分含量测定、大类成分含量测定,结合其出膏率、比重、pH等理化指标开展其质量评价研究。

在响应面实验中,辣木叶标准汤剂影响因素的主次顺序为二煎煎煮时间>二煎溶剂倍量>头煎溶剂倍量>头煎煎煮时间。推测二煎影响因素高于头煎的原因可能是在头煎所设的因素水平下,成分已达到最大溶出水平,药材内外的成分含量达到动态

表6 辣木叶标准汤剂中大类成分质量分数及转移率

Table 6 Contents and transfer rates of of active parts in <i>M. oleifera</i> leaf standard decoction															mg·g ⁻¹	
No.	总黄酮			总有机酸			总多糖			总α-氨基酸			总芥子碱			
	Y	S	转移率/%	Y	S	转移率/%	Y	S	转移率/%	Y	S	转移率/%	Y	S	转移率/%	
1	38.02	16.80	44.17	30.03	18.31	60.98	134.66	132.14	98.13	119.81	76.30	63.69	28.50	14.30	50.18	
2	38.16	15.80	41.40	29.44	18.65	63.34	130.84	121.74	93.04	118.44	73.56	62.10	27.98	13.99	50.00	
3	38.95	15.31	39.30	29.90	17.43	58.29	131.61	126.13	95.84	126.68	80.88	63.85	27.55	13.53	49.11	
4	38.10	11.14	29.23	25.59	13.38	52.28	143.56	143.71	100.11	94.94	41.49	43.70	25.45	11.48	45.10	
5	38.31	10.43	27.24	27.50	14.21	51.67	154.89	142.58	92.05	97.21	45.11	46.41	26.84	11.51	42.89	
6	39.36	11.28	28.65	27.21	14.75	54.21	151.87	132.57	87.29	89.96	44.66	49.65	26.32	12.45	47.30	
7	38.27	14.09	36.82	25.96	16.29	62.74	126.37	116.09	91.86	91.35	68.35	74.83	25.75	14.60	56.70	
8	37.36	15.42	41.26	25.43	17.53	68.95	124.11	108.94	87.78	100.37	65.20	64.96	24.02	14.32	59.63	
9	39.04	15.28	39.13	26.13	16.99	65.04	127.68	110.82	86.80	96.76	69.71	72.04	23.88	13.53	56.65	
10	37.29	12.79	36.42	30.41	15.81	51.99	130.99	124.28	94.88	96.21	53.89	56.01	30.15	12.81	42.48	
11	38.07	13.58	36.42	30.24	15.51	51.30	122.72	126.79	103.31	90.67	58.97	65.04	29.09	12.70	43.66	
12	36.72	13.87	36.54	29.65	16.99	57.33	118.68	115.33	97.17	89.29	57.12	63.97	27.61	13.51	48.95	
13	44.63	16.73	37.48	29.91	19.79	66.15	205.47	163.27	79.46	100.04	57.35	57.33	29.51	14.85	50.30	
14	46.22	18.31	39.62	29.87	18.38	61.54	188.45	176.23	93.51	101.90	62.46	61.29	28.80	15.95	55.36	
15	46.50	17.45	37.52	27.83	19.32	69.42	195.61	175.17	89.55	96.79	59.67	61.65	29.34	15.13	51.57	

表7 15批辣木叶标准汤剂的其他指标测定

Table 7 Determination of other indexes of 15 batches of *M. oleifera* leaf standard decoction

编号	每克冻干粉相当生药量/g	比重	pH	出膏率/%	醇溶性浸出物/%
S1	2.564	1.030	5.55	37.1	11.48
S2	2.768	1.029	5.56	36.4	11.24
S3	2.516	1.032	5.49	37.0	11.98
S4	2.346	1.033	5.50	31.1	12.13
S5	2.508	1.033	5.53	31.5	11.17
S6	2.857	1.035	5.48	33.7	11.41
S7	2.837	1.032	5.60	36.6	11.41
S8	2.721	1.029	5.64	35.5	11.93
S9	2.845	1.028	5.68	34.3	11.89
S10	2.963	1.028	5.42	28.2	11.77
S11	2.721	1.030	5.50	29.1	11.76
S12	2.686	1.030	5.42	26.9	12.14
S13	2.594	1.032	5.49	32.2	12.58
S14	2.552	1.030	5.46	33.2	11.96
S15	2.491	1.031	5.34	32.4	12.11

平衡。但在滤出头煎煎液后,重新加水二煎时,药材内外的成分含量受浓度差影响较大,同时,二煎是头煎的延伸,煎煮时间的延长,导致成分分解更为显著。因此,二煎影响因素较大。目前,针对煎煮工艺的研究大多表明,煎煮次数的增加能有效提

高成分的溶出率,但针对二煎、三煎等煎煮工艺的研究较少,其煎煮时间及溶剂倍量多与头煎保持一致^[19]。有研究发现,黄连解毒汤中小檗碱煎煮两次的溶出量为煎煮一次的226.13%,表明了二煎能有效增加小檗碱的溶出率,且溶出量高于头煎^[20]。这也进一步佐证了本研究结果具备参考性,可为中药煎煮工艺的优化提供一定的借鉴。

从转移率均值来看,总多糖、隐绿原酸、*L*-色氨酸、维采宁-2的转移率均>80%,总多糖在水煎过程中转移率最高,本方法以无水葡萄糖为测定指标,推测煎煮过程可能促使多糖分解为单糖,因而总多糖转移率较高。有研究表明在酸性条件下,新绿原酸、隐绿原酸较为稳定^[21],绿原酸受热会异构化为新绿原酸和隐绿原酸^[22],而辣木叶水煎液pH呈酸性,新绿原酸和隐绿原酸较为稳定,其转移率相对较高,总有机酸的转移率与新绿原酸、隐绿原酸的转移率基本相符。总α-氨基酸平均转移率约为60.43%,可能是水煎过程导致含有结合型α-氨基酸成分被破坏分解为相应的氨基酸所致,如辣木叶中含有1-β-*D*-吡喃葡萄糖基-*L*-色氨酸(本课题组鉴定),水煎过程中促使分解生成*L*-色氨酸,而*L*-色氨酸的转移率较高证实上述结构转化过程。维采宁-2的含量最低,但平均转移率达81.40%,与该成分为双碳链苷类成分、结构较为稳定,水煎煮可促使其

溶出所致^[23];而总黄酮的平均转移率仅为36.75%,判断为异槲皮素、紫云英苷等黄酮苷类成分,受热不稳定易分解,导致从药材-标准汤剂的转移率存在不同程度的降低^[24]。此外,辣木叶从药材-标准汤剂的主要成分及大类成分的整体转移率分别为43.26%~80.33%、49.26%~91.48%,说明水煎能较好地保留其主要成分。

综上,辣木叶标准汤剂的制备工艺稳定、重复性好;以多成分和大类成分相结合对辣木叶标准汤剂进行了较为全面质量评价研究,据此提出了建议标准符合配方颗粒的相关技术要求,可用于辣木叶标准汤剂的初步质量控制。本研究为辣木叶引入我国中医药体系提供参考,为建立基于中医临床应用的辣木叶标准汤剂的质控标准奠定基础。

〔利益冲突〕 本文不存在任何利益冲突。

〔参考文献〕

- 〔1〕 刘昌芬,李国华. 辣木的研究现状及其开发前景[J]. 云南热作科技,2002,25(3):20-24.
- 〔2〕 周丹蓉,孙凯慧,叶新福,等. 辣木叶黄酮苷的分离鉴定及抗氧化活性研究[J]. 热带作物学报,2018,39(3):455-458.
- 〔3〕 常雪飞,欧阳茜茜,王韵,等. 辣木叶多糖提取分离及其抗氧化研究[J]. 热带农业科学,2022,42(2):77-83.
- 〔4〕 崔巧玉,沈雯娟,孙小璐,等. 郁金香总多酚提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 中成药,2022,44(6):1918-1922.
- 〔5〕 汤喜兰,刘建勋,李磊. 中药有机酸类成分的药理作用及在心血管疾病的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):243-246.
- 〔6〕 高远,李冀,韩东卫. 芥子碱对肝癌细胞增殖、凋亡的影响及机制研究[J]. 中国免疫学杂志,2021,37(23):2845-2849.
- 〔7〕 全国辛香料标准化技术委员会. 辣木叶粉:LS/T 3268-2020[S]. 北京:中国标准出版社,2018.
- 〔8〕 全国辛香料标准化技术委员会. 辣木叶质量等级:GH/T 1142-2017[S]. 北京:中国标准出版社,2018.
- 〔9〕 TOMA A, MAKONNEN E, MEKONNEN Y, et al. Antidiabetic activities of aqueous ethanol and n-butanol fraction of *Moringa stenopetala* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. BMC Complement Altern Med,2015,15:242.
- 〔10〕 CHEN G L, XU Y B, WU J L, et al. Hypoglycemic and

hypolipidemic effects of *Moringa oleifera* leaves and their functional chemical constituents[J]. Food Chem, 2020,333:127478.

- 〔11〕 OLAYAKI L A, IREKPITA J E, YAKUBU M T, et al. Methanolic extract of *Moringa oleifera* leaves improves glucose tolerance, glycogen synthesis and lipid metabolism in alloxan-induced diabetic rats[J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol,2015,26(6):585-593.
- 〔12〕 党玥,田梦媛,王承潇,等. 辣木叶提取物对便秘小鼠润肠通便的作用及机制研究[J]. 中草药,2021,52(14):4241-4247.
- 〔13〕 张明晓,李化,陈娜,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS和GC-MS技术结合网络药理学探究辣木叶治疗便秘的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(22):182-188.
- 〔14〕 宋亚南,王云,高雅,等. 基于煎煮因素-多成分关联分析的辣木叶煎煮动力学研究[J]. 中国中药杂志,2022,47(18):4950-4958.
- 〔15〕 许鑫,姜慧洁,汪佳楠,等. 基于传统煎煮标准汤剂的桂枝配方颗粒制备及质量标准研究[J]. 中国药理学杂志,2020,55(13):1103-1110.
- 〔16〕 薛晓霞,靳如娜,王学圆,等. 经典名方二冬汤基准样品的指标成分含量测定及量值传递规律探索[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(11):1-7.
- 〔17〕 代云桃,靳如娜,吴治丽,等. 基于标准汤剂(物质基准)的经典名方制备工艺和质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(2):164-174.
- 〔18〕 田梦媛. 辣木叶产地加工及润肠通便效果研究[D]. 昆明:昆明理工大学,2019.
- 〔19〕 张立双,江丰,赵晨,等. 中药汤剂煎煮法的文献调查分析[J]. 天津中医药,2017,34(6):422-428.
- 〔20〕 梁晓,赵锦,马文龙. 不同煎煮条件下黄连解毒汤中小檗碱溶出率考察[J]. 陕西中医学院学报,2012,35(3):76-77.
- 〔21〕 朱鹏,苗潇磊,陈勇. 绿原酸、隐绿原酸和新绿原酸在中性和碱性pH条件下的降解动力学[J]. 药科学报,2016,51(1):122-126.
- 〔22〕 刘兴勇,陈兴连,杜丽娟,等. 多因素交互作用导致烘焙咖啡中绿原酸快速降解[J]. 食品科学,2021,42(9):7-14.
- 〔23〕 唐圆,谭周进,谢果珍. 植物中苷类化合物的水解及其药理作用研究进展[J]. 现代农业科技,2021(17):216-219,226.
- 〔24〕 李振雨,何民友,刘晓霞,等. 基于UPLC指纹图谱和多成分定量的布渣叶饮片和标准汤剂量值传递研究[J]. 天然产物研究与开发,2023,35(9):1505-1517.

〔责任编辑 李嘉麟〕