

HPLC 同时测定肝尔舒微丸中 3 种有效成分的含量

毛敏珏,严国俊,侯振山,蒋志涛,张婷,潘金火*
(南京中医药大学药学院,江苏 南京 210046)

[摘要] 目的:建立 HPLC 同时测定肝尔舒微丸中的槲皮素、山奈素和异鼠李素含量的方法。方法:色谱柱为 Hedera ODS-2 柱(4.6 mm×200 mm,5 μm),流动相 0.4% 磷酸溶液(A)-甲醇(B)梯度洗脱,检测波长 360 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃。结果槲皮素、山奈素和异鼠李素分别在 0.042 8~0.428,0.003 49~0.034 9,0.041 8~0.418 μg 呈良好的线性关系,*r* 分别为 0.999 8,0.999 1,0.999 2;平均加样回收率槲皮素 99.88%,RSD 0.77% (*n*=6);山奈素为 99.44%,RSD 1.2%;异鼠李素为 97.50%,RSD 1.5% (*n*=6)。结论:该法结果准确,重复性好,可用于肝尔舒微丸的质量控制。

[关键词] 肝尔舒微丸,槲皮素,山奈素,异鼠李素,高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0107-03

HPLC Simultaneous Determination
of Three Active Components in Ganershu Pellets

MAO Min-jue, YAN Guo-jun, HOU Zhen-shan, JIANG Zhi-tao, ZHANG Ting, PAN Jin-huo*
(School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method of determining quercetin, kaempferide and isorhamnetin in Ganershu pellets by HPLC. **Method:** An Hedera ODS-2 column (4.6 mm×200 mm, 5 μm) was used at 30 ℃ with the mobile phase of 0.4% phosphate (A) and methanol (B) by gradient elution. The detection wavelength was set at 360 nm and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** The quercetin, kaempferide and isorhamnetin had good linear relationship within the ranges of 0.042 8-0.42 8 μg (*r* = 0.999 8), 0.003 49-0.034 9 μg (*r* = 0.999 1), 0.041 8-0.418 μg (*r* = 0.999 2). The average recoveries were 99.88%, 99.44% and 97.50% with RSD 0.77% (*n* = 6), 1.2% (*n* = 6), 1.5% (*n* = 6) respectively. **Conclusion:** The method was accurate and reproducibility was good. The method can be used for the quality control of Ganershu pellets.

[Key words] Ganershu pellets; quercetin; kaempferide; isorhamnetin; HPLC

肝尔舒微丸由垂盆草、绞股蓝、黄精、枳壳、陈皮等共 14 味中药组成,并对其中的有效部位群进行富集,流化床制成微丸,然后分装胶囊的中药六类新药,具有疏肝健脾、清化湿热之效,对急、慢性肝炎肝郁脾虚,湿热结证具有十分显著的治疗作用^[1-3]。方中垂盆草为君药,含有黄酮类及垂盆草苷等。文献^[4]多报道垂盆草苷为垂盆草的主要活性成分。

具有明显的保肝作用,但是研究表明垂盆草苷不稳定,受热或遇碱易分解,贮藏过程中也可酶解,以其为指标来评价制剂质量很难保证方法的重复性和稳定性^[5]。由于垂盆草中富含黄酮类化合物^[6],且黄酮类成分化学性质较为稳定、药理作用明确,因此为了更好的控制制剂质量,保证垂盆草药用疗效,本实验建立了 HPLC 同时测定槲皮素、山奈素和异鼠李素 3 种有效成分含量的方法,并且为垂盆草及其肝尔舒微丸的质量评价提供一种方法。

1 材料

Waters515 高效液相色谱仪,717 自动进样器,Water-2996 紫外检测器,Empower 色谱工作站,AG135 型电子天平(瑞士梅特勒)。

[收稿日期] 20120114(001)

[基金项目] 江苏省科技支撑计划项目(BE2009682)

[第一作者] 毛敏珏,硕士,从事药物新剂型及新技术研究, Tel:15996255143, E-mail:wjmmj@yahoo.com.cn

[通讯作者] *潘金火,硕士生导师,博士后, Tel: 025-85811517, E-mail:panjinhua@163.com

槲皮素对照品(批号 10081-9905)、山奈素对照品(批号 110861-200303)、异鼠李素对照品(批号 110860-200204)均来自中国药品生物制品检定所;肝尔舒微丸(批号 20110901,20110902,20110910)实验室自制,甲醇、磷酸为色谱纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Hadera ODS-2 色谱柱(4.6 mm × 200 mm,5 μm),流动相 0.4% 磷酸溶液(A)-甲醇(B)梯度洗脱见表 1。检测波长 360 nm,柱温 30 ℃,流速 1 mL·min⁻¹。

表 1 梯度洗脱程序		
t/min	A/%	B/%
0~12	45	55
12~24	50	50
24~36	20	80
36~48	45	55

2.2 溶液的配制

2.2.1 混合对照品溶液 分别称取槲皮素、山奈素、异鼠李素对照品适量,精密称定,加甲醇溶解制成每 1 mL 含槲皮素 0.042 8 mg,山奈素 0.003 49 mg,异鼠李素 0.041 8 mg 的混合对照品溶液。

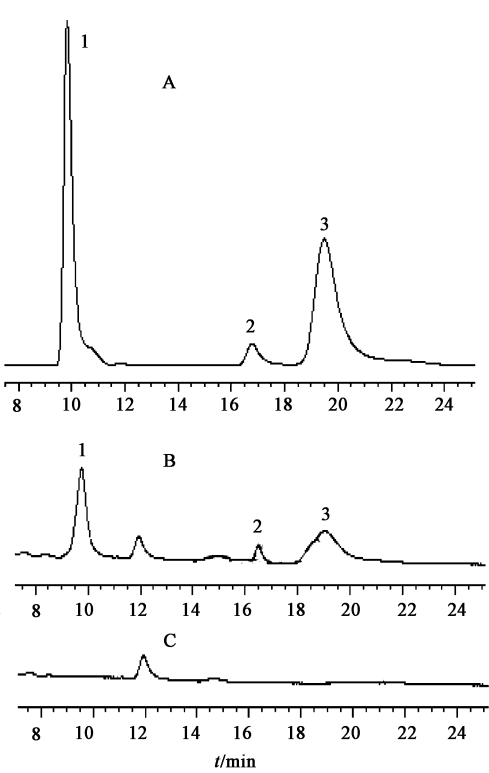
2.2.2 供试品溶液^[7-9] 取本品微丸,研细,取约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇-25% 盐酸溶液(4:1)混合溶液 25 mL,称定质量,加热回流 1 h,放冷,再称定质量,用甲醇-25% 盐酸溶液(4:1)混合溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按照肝尔舒生产工艺、处方比例,制得缺垂盆草的阴性微丸,照供试品溶液的制备方法制备,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 精密吸取上述混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL,按照 2.1 项色谱条件进行测定。供试品溶液色谱图中,呈现与对照品保留时间相同的峰,并且能达到基线分离;阴性对照溶液在对应的保留时间处无吸收峰,表明其他几味药对槲皮素、山奈素和异鼠李素的测定无干扰,见图 1。

2.3.2 线性关系考察 精密吸取上述混合对照品溶液 1,2,4,6,8,10 μL 进样,按照 2.1 项色谱条件进行测定。以各对照品进样量(μg)为横坐标(X),相应的对照品峰面积积分值为纵坐标(Y),进行回归处理得回归方程 $Y_{\text{槲皮素}} = 3\,717\,853X - 7\,994.01$



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性对照液;
1. 槲皮素;2. 山奈素;3. 异鼠李素

图 1 对照品,供试品,阴性对照液的 HPLC

($r = 0.999\,8$); $Y_{\text{山奈素}} = 3\,557\,073.4X - 2\,193.3$ ($r = 0.999\,1$); $Y_{\text{异鼠李素}} = 3\,569\,200.3X - 19\,137.4$ ($r = 0.999\,2$),结果表明,槲皮素在 0.042 8 ~ 0.428 μg、山奈素 0.003 49 ~ 0.034 9 μg、异鼠李素 0.041 8 ~ 0.418 μg 线性关系良好。

2.3.3 精密度试验 精密吸取上述混合对照品溶液重复测定 6 次,按照上述色谱条件进行测定,进样量 6 μL。槲皮素、山奈素、异鼠李素的峰面积的 RSD 值分别为 1.0%,1.2%,1.7%,表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取上述供试品溶液(批号 20110901)分别于配制后的 0,2,4,6,8,12 h 测定槲皮素、山奈素、异鼠李素的峰面积,进样量 10 μL。相应的 3 种成分峰面积的 RSD 分别为 1.8%,1.2%,1.9%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 取同一批次肝尔舒微丸(批号 20110901),共 6 份,分别按上述供试品的制备方法制得供试品溶液,按照上述色谱条件进行测定,进样量 10 μL。制剂中槲皮素、山奈素、异鼠李素的平均质量分数分别为 2.383,0.306 0,2.114 mg·g⁻¹,RSD 分别为 1.0%,1.2%,1.5%,表明方法重复性

良好。

2.3.6 加样回收试验 取已知含量的肝尔舒微丸,共 6 份,各约 0.50 g,精密称定,分别精密加入一定质量浓度的槲皮素($0.241\ 2\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、山奈素对照品溶液($0.027\ 54\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、异鼠李素对照品溶液($0.197\ 6\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)各 5 mL,各精密加甲醇 5 mL 和 25% 盐酸溶液 5 mL,即配制成甲醇-25% 盐酸溶液(4:1)混合溶液各 25 mL,分别按上述供试品的制备方法制得供试品溶液,照上述色谱条件进行测定,分别进样 10 μL ,计算加样回收率,结果见表 2。

表 2 肝尔舒中 3 种成分加样回收率试验($n=6$)

成分	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	1.191	1.206	2.404	101.1	99.88	0.77
	1.173	1.206	2.372	99.91		
	1.189	1.206	2.383	99.48		
	1.210	1.206	2.395	98.78		
	1.197	1.206	2.399	100.2		
	1.185	1.206	2.383	99.80		
山奈素	0.153 0	0.137 7	0.288 3	98.29	99.44	1.2
	0.149 3	0.137 7	0.285 2	98.67		
	0.160 7	0.137 7	0.297 2	99.12		
	0.152 4	0.137 7	0.288 5	98.87		
	0.171 0	0.137 7	0.308 9	100.1		
	0.161 3	0.137 7	0.301 1	101.6		
异鼠李素	1.057	0.998	2.021	96.57	97.50	1.5
	1.064	0.998	2.031	96.84		
	1.048	0.998	2.019	97.35		
	1.055	0.998	2.015	96.20		
	1.079	0.998	2.053	97.65		
	1.081	0.998	2.083	100.4		

2.4 样品含量测定 取 3 批样品按供试品溶液制备方法制得供试品溶液,并按上述色谱条件进行测定,见表 3。

3 讨论

参考 2010 年版《中国药典》,以甲醇-0.4% 磷酸不同比例为流动相进行等度、梯度洗脱实验,由于异

鼠李素、山奈素在等度洗脱时分离度不好,为简便检测,节约时间,着重考察了梯度洗脱,并优化了梯度洗脱程序。

表 3 3 种成分的样品含量测定($n=3$)

批号	槲皮素 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD /%	山奈素 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD /%	异鼠李素 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD /%
20110901	2.383		0.306 0		2.114	
20110902	2.359	0.85	0.304 1	0.98	2.108	0.26
20110910	2.399		0.310 0		2.119	

分别取槲皮素、山奈素、异鼠李素的对照品溶液,在 200 ~ 400 nm 进行扫描,结果槲皮素在 255, 371 nm 处有吸收峰,山奈素在 266,324,365 nm 处有吸收峰,异鼠李素在 254,307,370 nm 处有吸收峰。根据各成分的吸收情况,发现在 360 nm 处 3 种成分均表现较好的色谱峰形和检测灵敏度,且杂质干扰较少。

[参考文献]

[1] 谭勇,杨静,赵宁,等. 利用文本挖掘技术探索中西药治疗慢性乙型肝炎的用药规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(24):232.

[2] 萧焕明,谢玉宝,池晓玲,等. 池晓玲论肝功能季节性变化的临证经验[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):280.

[3] 曹敏玲. 乙型肝炎病毒基因水平研究进展及治疗动态[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):220.

[4] 魏太明,阎玉凝,关昕璐,等. 垂盆草的化学成分研究[J]. 北京中医药大学学报,2003,26(4):59.

[5] 潘金火,罗兰,何满堂,等. 垂盆草药材质量控制方法研究[J]. 成都中医药大学学报,2002,25(1):44.

[6] 张洪超,兰天,张晓辉. 垂盆草化学成分与药理作用研究进展[J]. 中成药,2005,27(10):1201.

[7] 燕成英. HPLC 测定脉通颗粒中异鼠李素的含量[J]. 中国中药杂志,2008,33(18):2149.

[8] 张可峰,陈旭. 金花茶叶中 3 种黄酮苷元的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(23):60.

[9] 刘燕,唐铁鑫. 野牡丹中槲皮素的测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):84.

[责任编辑 顾雪竹]