

HPLC 测定白花蛇舌草配方颗粒中
槲皮素和山奈素含量

梁洁^{1*}, 柳贤福¹, 孙正伊¹, 覃日宏², 甄汉深¹, 翁翎¹
(1. 广西中医药大学药学院, 南宁 530001;
2. 广西中医药大学赛恩斯新医药学院, 南宁 530001)

【摘要】 目的:建立测定白花蛇舌草配方颗粒中槲皮素和山奈素含量的 HPLC 方法。方法:采用正交试验优化白花蛇舌草配方颗粒的提取工艺,用 HPLC 测定白花蛇舌草配方颗粒中槲皮素和山奈素的含量。色谱柱为 Hypersil ODS C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.2% 磷酸(45:55),检测波长 360 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃。结果:槲皮素在 0.09 ~ 0.72 μg 线性关系良好($r=0.999\ 9$),山奈素在 0.034 3 ~ 0.274 4 μg 线性关系良好($r=0.999\ 9$),槲皮素、山奈素的平均加样回收率分别为 100.80% (RSD 1.79%), 101.75% (RSD 1.76%)。结论:该方法简便、快速、重复性好,可作为白花蛇舌草配方颗粒中槲皮素和山奈素的含量测定。

【关键词】 白花蛇舌草配方颗粒; 高效液相色谱; 槲皮素; 山奈素
【中图分类号】 R284.1 【文献标识码】 A 【文章编号】 1005-9903(2012)24-0149-03

Determination of Quercetin and Kaempferol
in Baihua Sheshecao Dispensing Granule by HPLC

LIANG Jie^{1*}, LIU Xian-fu¹, SUN Zheng-yi¹, Qin Ri-hong², ZHEN Han-shen¹, WENG Ling¹
(1. Faculty of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;
2. Faculty of Chinese Medical Science, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

【Abstract】 **Objective:** To establish an HPLC method for determination of quercetin and kaempferol in Baihua Sheshecao dispensing granule. **Method:** Orthogonal experiments were used to optimize extraction technology. The samples were separated on a Hypersil ODS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column which was eluted with methanol-0.2% phosphoric acid solution (45:55) with detective wavelength at 360 nm and flow rate at 1 mL·min⁻¹, column temperature at 30 ℃. **Result:** The method had good linear relationship within the range of 0.09-0.72 μg ($r=0.999\ 9$) for quercetin and 0.034 3-0.274 4 μg ($r=0.999\ 9$) for kaempferol. The average recovery rate were 100.80% (RSD 1.79%) and 101.75% (RSD 1.76%). **Conclusion:** The method is simple, rapid and reliable which can be used to determine quercetin and kaempferol in Baihuashe Shecao dispensing granule.

【Key words】 Baihua Sheshecao dispensing granule; HPLC; quercetin; kaempferol

白花蛇舌草具有清热、利湿、解毒的功效^[1],含有黄酮类、三萜类、蒽醌类、环烯醚萜类、甾醇类、烷烃类等化学成分^[2]。黄酮类化合物具有抗肿瘤、

抗炎作用、抗氧化作用、心血管方面作用^[3-5]。未见有关白花蛇舌草配方颗粒中黄酮类化合物的含量测定的文献报道,本文采用 HPLC 法测定了白花蛇舌草配方颗粒中槲皮素和山奈素的含量,为评价白花蛇舌草配方颗粒的内在质量提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),LG 16-W 型高速离心机(北京医用离

【收稿日期】 20120523(365)
【通讯作者】 * 梁洁,博士,副教授,从事中药药效物质基础与质量标准化研究, Tel: 0771-2976774, E-mail: liangjie1101@126.com

心机厂),B3500S-MT 型超声清洗仪(上海必能信超声有限公司),Millipore Simplicity-185 型超纯水仪(美国密里博公司),电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂);BP211D 型电子分析天平(德国赛多利斯);SHZ-D 型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限公司)。

1.2 试药 槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100081-200406,供含量测定用),山奈素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100861-200606,供含量测定用),白花蛇舌草配方颗粒(江阴天江药业有限公司,批号 1104036,1107060,1109027),甲醇(色谱纯,美国 Fisher 科学世界公司),其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Hypersil ODS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.2% 磷酸(45:55),检测波长 360 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30℃,进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

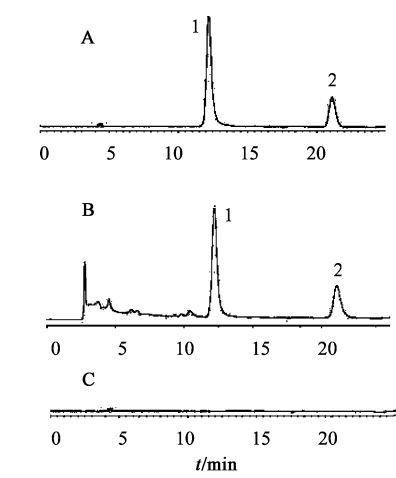
2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取 105℃干燥至恒重的槲皮素对照品 9.00 mg 和山奈素对照品 3.43 mg,分别置 100 mL 量瓶中,加甲醇适量使溶解并定容至刻度,摇匀,即得 0.09 g·L⁻¹ 的槲皮素和 0.034 3 g·L⁻¹ 山奈素对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取白花蛇舌草配方颗粒 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇-盐酸(4:1)混合溶液 10 mL,密塞,称定质量,超声(功率 140 W,频率 42 kHz)提取 50 min,放冷,再称定质量,用甲醇-盐酸(4:1)混合溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 取白花蛇舌草配方颗粒的辅料交联淀粉适量,按供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。

2.3 专属性试验 分别精密吸取上述槲皮素对照品溶液、山奈素对照品溶液、白花蛇舌草配方颗粒供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL 进样分析,结果见图 1。槲皮素和山奈素的保留时间分别为 12.1,21.3 min,与各自相邻峰的分离度>1.5。阴性对照不干扰本品中活性成分的测定。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取上述槲皮素和山奈素对照品溶液 1,3,5,6,7,8 μL 注入液相色谱仪进行分析,以进样量(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得到槲皮素回归方程为 Y = 4 099.6X - 14.809 (r = 0.999 9),山奈素回归方程



A. 混合对照品;B. 供试品;C. 阴性对照样品;
1. 槲皮素;2. 山奈素

图 1 白花蛇舌草配方颗粒高效液相色谱

为 $Y = 7\,426.6X - 15.06$ ($r = 0.999\,9$)。结果表明,槲皮素在 0.09 ~ 0.72 μg,山奈素在 0.034 3 ~ 0.274 4 μg 与峰面积成良好线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取上述槲皮素对照品溶液、山奈素对照品溶液 10 μL,连续进样 6 次,计算峰面积的 RSD 分别为 0.27%,0.45%。表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批样品(批号 1104036),按 2.2.2 项下方法分别制备 6 份供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,记录峰面积,按回归方程计算槲皮素和山奈素含量。结果槲皮素平均含量为 1.134 9 mg·g⁻¹,RSD 0.53%;山奈素平均含量为 0.339 2 mg·g⁻¹,RSD 0.99%。表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一份供试品(批号 1104036)溶液,按 2.1 项下色谱条件分别在供试品溶液制备后 0,2,4,6,8,12 h 进样 10 μL,测定槲皮素和山奈素的峰面积,RSD 分别为 0.37%,0.53%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 取同批号(批号 1104036)已知含量的样品 6 份,每份约 0.3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入 0.09 g·L⁻¹ 槲皮素对照品溶液 4 mL 和 0.034 3 g·L⁻¹ 山奈素对照品溶液 3 mL,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 10 μL,测定槲皮素和山奈素的含量。槲皮素平均回收率为 100.8%,RSD 1.8%;山奈素平均回收率为 101.8%,RSD 1.8%,表明该方法可靠,准确度高。结果见表 1。

表 1 2 种成分加样回收率的试验 (n = 6)

化合物	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	0.345 2	0.360	0.700 1	98.58	100.8	1.8
	0.358 5	0.360	0.715 6	99.19		
	0.344 4	0.360	0.711 4	101.94		
	0.349 9	0.360	0.709 7	99.94		
	0.347 5	0.360	0.718 5	103.06		
	0.346 1	0.360	0.713 5	102.06		
山奈素	0.103 2	0.102 9	0.209 9	103.69	101.8	1.8
	0.104 2	0.102 9	0.206 3	99.22		
	0.102 9	0.102 9	0.208 8	102.92		
	0.104 6	0.102 9	0.208 7	101.17		
	0.103 9	0.102 9	0.207 1	100.29		
	0.103 5	0.102 9	0.209 7	103.21		

2.9 样品的测定 取 3 批白花蛇舌草配方颗粒,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,测定其中槲皮素和山奈素的含量,结果见表 2。

表 2 白花蛇舌草配方颗粒槲皮素和山奈素的含量测定 (n = 3)

批号	槲皮素 /mg·g ⁻¹	RSD /%	山奈素 /mg·g ⁻¹	RSD /%
1104036	1.132 0	0.32	0.338 7	0.60
1107060	1.176 0	0.25	0.347 6	0.44
1109027	1.092 7	0.46	0.323 0	0.67

3 讨论

考察了回流提取、索氏提取、超声提取、冷浸 4 种提取方法,结果回流提取和超声提取较好,回流提取操作繁琐,故选择超声提取。黄酮类化合物紫外光谱的最大吸收为 270,360 nm,通过比较,360 nm 下被检测的色谱峰峰形亦较好,并参考文献[6-8]最终选择 360 nm 作为检测波长。笔者曾对多种流动相进行了考察比较,结果表明以甲醇-0.2% 磷酸溶液(45:55)为流动相得到的色谱峰峰形较好,保留

时间适中,分离度 >1.5,且阴性供试品无干扰^[9-10]。

以槲皮素和山奈素为指标成分,测定同一厂家不同批号白花蛇舌草配方颗粒的含量,其结果存在一定差异,这可能与白花蛇舌草的原料产地、采收季节、用药部位、炮制过程、储存时间及配方颗粒的生产过程有关。因此建议厂家进一步完善白花蛇舌草配方颗粒的制备工艺,对原药材质量及生产流程建立统一的质量控制体系,使产品的质量更加稳定、可控。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 上册[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:1039.

[2] 陈永康. 白花蛇舌草的化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):290.

[3] 刘晶芝,王莉. 白花蛇舌草化学成分研究[J]. 河北医科大学学报,2007,28(3):188.

[4] 单保恩,张金艳,杜肖娜,等. 白花蛇舌草的免疫学调节活性和抗肿瘤活性[J]. 中国中西医结合杂志,2001,21(5):370.

[5] 崔健,施松善,王顺春,等. 白花蛇舌草的化学成分及药理作用研究进展[J]. 上海中医药杂志,2005,39(7):57.

[6] 邵振中,贾晓斌,施峰,等. HPLC 同时测定白花蛇舌草中咖啡酸、槲皮素和山奈酚[J]. 中成药,2009,31(12):1894.

[7] 朱晓勤,彭水梅,吴锦忠. HPLC 测定截叶铁扫帚不同药用部位中槲皮素、山奈酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):80.

[8] 杨燕飞. HPLC 测定金胆片中山奈素和槲皮素的含量[J]. 中成药,2005,27(11):1263.

[9] 田吉,陆松梅,何兵. HPLC 测定皂角刺中的槲皮素[J]. 华西药学杂志,2009,24(6):667.

[10] 梁臣艳,甄汉深,马雯芳,等. 高效液相色谱法测定广西余甘子叶中槲皮素和山奈酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(8):41.

[责任编辑 顾雪竹]