

梅花配方颗粒中4种黄酮类成分含量测定

魏梅, 朱德全, 陈向东, 张光大

(广东一方制药有限公司, 广东佛山 528244)

[摘要] 目的:建立 HPLC 测定梅花配方颗粒中芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷和槲皮素含量的方法。方法:Phenomenex Synergi C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.1%磷酸(B)梯度洗脱, 柱温 30 ℃, 体积流量 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 360 nm。结果:芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷和槲皮素线性范围分别为 0.230 2~2.877 5 μg($r=0.999\ 2$), 0.134 8~1.685 0 μg($r=0.999\ 5$), 0.195 4~2.442 5 μg($r=0.999\ 1$), 0.033 8~0.422 5 μg($r=0.999\ 9$) 线性关系良好, 平均加样回收率分别为 98.39%, 98.71%, 100.00%, 100.57%; RSD 分别为 1.7%, 1.4%, 1.8%, 2.0%。结论:该测定方法简便快捷、准确、重复性好, 为梅花配方颗粒的质量控制和评价提供了依据。

[关键词] 梅花; 配方颗粒; 芦丁; 金丝桃苷; 异槲皮苷; 槲皮素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0049-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015140049

Simultaneous Determination of Four Flavonoids in Mone Flose Dispensing Granule by HPLC WEI Mei, ZHU De-quan, CHEN Xiang-dong, ZHANG Guang-da (Guangdong Yifang Pharmaceutical Co. Ltd., Foshan 528244, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for simultaneous determination of rutin, hyperin, isoquercitrin and quercetin in Mone Flose dispensing granule. **Method:** HPLC method was performed on a Phenomenex C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with Acetonitrile (A) -0.1% phosphoric acid (B) as mobile phase by gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min, column temperature was 30 ℃ and detection wavelength was 360 nm. **Result:** Rutin, hyperin, isoquercitrin and quercetin showed good linearity in the ranges of 0.230 2~2.877 5 μg ($r=0.999\ 2$), 0.134 8~1.685 0 μg ($r=0.999\ 5$), 0.195 4~2.442 5 μg ($r=0.999\ 1$) and 0.033 8~0.422 5 μg ($r=0.999\ 9$) with average recoveries of 98.39%, 98.71%, 100.00% and 100.57%, with RSD 1.7%, 1.4%, 1.8% and 2.0%, respectively. **Conclusion:** The method is rapid, accurate and repeatable, which can provide a reliable way for evaluating the quality of Mone Flose dispensing granule.

[Key words] Mone Flose; dispensing granule; rutin; hyperin; isoquercitrin; quercetin

梅花具有开郁和中、化痰、解毒之功效,用于郁闷心烦、肝胃气痛、梅核气、凛痈疮毒^[1]。用于治疗梅核气,肝胃气痛,食欲不振,头晕,凛病^[2]。《百草镜》对其功效记载为:“性寒或曰平,味酸,清香,开胃散郁,煮粥食助清阳之气上升。蒸露点茶、止渴生津,解暑涤烦”^[3]。《纲目拾遗》记载梅花:“能安神定魂,解痘毒。”梅花主产江苏、浙江等地,日本、朝鲜、新西兰亦有分布^[4]。研究表明,梅花含挥发油,油中含异丁香酚、苯甲醛、苯甲酸。还含黄酮类化合

物芦丁、槲皮素及绿原酸等^[5]。其中黄酮类成分含量较高,具有抗氧化、清除自由基^[6-7],抑制醛糖还原酶和抗血小板凝集的作用^[8]。

梅花配方颗粒是由梅花经水煎煮提取后制粒而成,临床经调配组成复方汤剂使用。目前,梅花尚缺乏定量的质量控制标准。为控制梅花配方颗粒的质量,确保产品的疗效,本文研究建立了梅花配方颗粒中4种黄酮成分的 HPLC 含量测定方法,为梅花配方颗粒的质量标准研究提供可靠依据。

[收稿日期] 20141021(012)

[基金项目] 佛山市科技创新专项(2013GQ100032);广东省教育部产学研结合项目(2012B091100183)

[第一作者] 魏梅,硕士,副主任药师,从事中药配方颗粒开发与质量管理研究, Tel:0757-85603332, E-mail: weim@e-fong.com

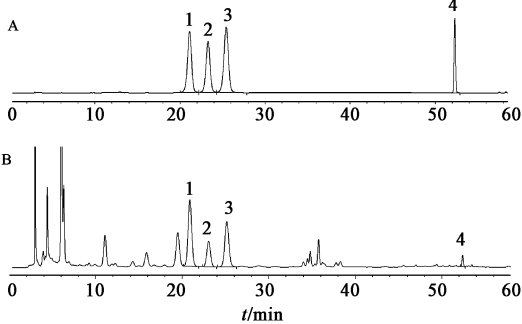
1 仪器与试药

1260 系列液相色谱仪 (G1311C 四元泵, G1129B 自动进样器, G1314B 紫外检测器, Chemstation 色谱工作站, 美国 Agilent), XP26 型 1/100 万电子天平 (Mettler Toledo, 美国), BS110S 型 1/1 万天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司), BS200S-WEI 型 1/1 000 电子天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司)。乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher 公司), 水为怡宝纯净水, 其他试剂均为分析纯。

芦丁 (批号 080-9303), 金丝桃苷 (纯度 93.9%, 批号 111521-201004), 异槲皮苷 (批号 111809-201001), 槲皮素 (纯度 97.3%, 批号 10081-200406) 对照品均由中国食品药品检定研究院提供; 梅花配方颗粒 (广东一方制药有限公司, 批号 1112253, 1203445, 1306420, 1306910, 311234L, 403367L, 403367T)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Phenomenexsynergi C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈 (A)-0.1% 磷酸 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 28 min, 15% A; 28 ~ 30 min, 15% ~ 20% A; 30 ~ 40 min, 20% A; 40 ~ 60 min, 20% ~ 47% A); 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 360 nm, 柱温 30 °C。在上述色谱条件下, 芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷和槲皮素 4 个色谱峰的分离度均 > 1.5。理论塔板数按金丝桃苷峰计算不低于 5 000, 见图 1。梅花配方颗粒因未添加辅料, 故阴性对照无干扰。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 芦丁; 2. 金丝桃苷; 3. 异槲皮苷; 4. 槲皮素
图1 梅花配方颗粒样品 HPLC 色谱

Fig.1 HPLC chromatograms of Mone Flose dispensing granule

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取芦丁对照品 11.513 mg, 金丝桃苷对照品 7.173 mg, 异槲皮苷对照品 9.772 mg 和槲皮素对照品 1.685 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品储备液; 精密量取混合对照品储备液 1.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇稀释至刻

度, 摇匀, 制得质量浓度分别为 0.115 1, 0.067 4, 0.097 7, 0.016 9 g · L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 梅花配方颗粒研细, 取约 0.40 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 240 W, 频率 25 kHz) 40 min, 放冷, 再称定质量, 用 70% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 标准曲线的制作 精密吸取混合对照品溶液 2, 4, 8, 10, 15, 20, 25 μL 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积。以进样量为横坐标 (X)、峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得回归方程, 结果见表 1。表明 4 种成分在各自线性范围内与峰面积均有良好的线性关系。

表1 梅花配方颗粒 4 种成分的线性回归方程

Table 1 Liner regression equations of 4 components

成分	回归方程	r	线性范围/μg
芦丁	Y = 1 336.2X + 61.046	0.999 2	0.230 2 ~ 2.877 5
金丝桃苷	Y = 2 038.8X + 12.042	0.999 5	0.134 8 ~ 1.685 0
异槲皮苷	Y = 1 907.4X + 69.055	0.999 1	0.195 4 ~ 2.442 5
槲皮素	Y = 4 027.6X + 2.265 8	0.999 9	0.033 8 ~ 0.425 5

2.5 精密度试验 精密吸取同一样品 (批号 1203445) 的供试品溶液, 进样 10 μL, 平行测定 6 次, 测得 4 种成分峰面积 RSD 分别为 0.4%, 0.4%, 0.4%, 1.8%。表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一样品 (批号 1203445) 的供试品溶液, 在 0, 4, 8, 12, 18, 24 h 各进样 10 μL, 测得 4 种成分峰面积 RSD 分别为 1.1%, 0.8%, 0.8%, 1.4%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一批样品 (批号 1203445) 6 份, 每份约 0.4 g, 精密称定, 照 2.3 项下方法制得供试品溶液, 按上述色谱条件进样 10 μL, 测定 4 种成分的含量, 测得芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷和槲皮素 4 种成分的质量分数分别为 12.051, 3.075, 6.301, 0.260 mg · g⁻¹; RSD 分别为 0.6%, 0.5%, 1.2%, 1.5%。表明本方法重复性良好。

2.8 回收率试验 取已知含量的同一梅花配方颗粒 (批号 1203445) 0.2 g, 研细, 精密称定 6 份, 分别精密加入混合对照品溶液 (吸取对照品储备液 8.0 mL, 置于 200 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇定容至刻度, 摇匀) 25 mL, 按供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 测定。结果见表 2。

表 2 梅花配方颗粒中 4 种成分的加样回收率

Table 2 Results of recovery tests of 4 components

组分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均 回收率 /%	RSD /%
芦丁	0.202 2	2.436 7	1.151 3	3.587 7	98.39	1.7
	0.201 6	2.429 5	1.151 3	3.565 2		
	0.200 9	2.421 1	1.151 3	3.535 7		
	0.203 4	2.451 2	1.151 3	3.557 8		
	0.200 2	2.412 6	1.151 3	3.566 4		
	0.200 1	2.411 4	1.151 3	3.546 5		
金丝桃苷	0.202 2	0.621 7	0.673 5	1.292 1	98.71	1.4
	0.201 6	0.619 9	0.673 5	1.278 9		
	0.200 9	0.617 7	0.673 5	1.290 4		
	0.203 4	0.625 4	0.673 5	1.273 6		
	0.200 2	0.615 6	0.673 5	1.282 2		
	0.200 1	0.615 2	0.673 5	1.287 2		
异槲皮苷	0.202 2	1.274 1	0.977 2	2.252 5	100.00	1.8
	0.201 6	1.270 3	0.977 2	2.231 8		
	0.200 9	1.265 9	0.977 2	2.261 5		
	0.203 4	1.281 7	0.977 2	2.232 0		
	0.200 2	1.261 5	0.977 2	2.245 9		
	0.200 1	1.260 9	0.977 2	2.254 0		
槲皮素	0.202 2	0.052 6	0.164 0	0.221 6	100.57	2.0
	0.201 6	0.052 4	0.164 0	0.221 1		
	0.200 9	0.052 2	0.164 0	0.217 4		
	0.203 4	0.052 9	0.164 0	0.215 8		
	0.200 2	0.052 1	0.164 0	0.214 4		
	0.200 1	0.052 0	0.164 0	0.213 5		

2.9 样品的测定 取梅花配方颗粒 7 批,按 2.3 项下制备得样品溶液,按 2.1 项色谱条件进样 10 μ L,测定并计算芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷和槲皮素的含量。结果见表 3。

表 3 梅花配方颗粒 7 批样品测定 ($n=2$)

Table 3 Determination of 7 batches of samples ($n=2$) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

批号	芦丁	金丝桃苷	异槲皮苷	槲皮素
1112253	8.754 8	3.593 7	6.312 4	0.356 4
1203445	12.012 0	3.072 1	6.293 6	0.260 0
1306420	10.045 9	5.036 7	6.660 1	0.415 1
1306910	9.934 4	5.006 9	6.879 0	0.405 7
311234L	9.307 3	5.049 5	6.870 2	0.373 0
403367L	9.476 8	5.115 2	6.865 9	0.358 3
403367T	8.809 3	5.064 9	6.806 1	0.348 7

3 讨论

3.1 液相条件的考察 流动相考察了甲醇、乙腈和不同浓度的磷酸、甲酸、乙酸溶液的组合流动相系统,发现乙腈-0.1% 磷酸的梯度洗脱效果最佳。采用二极管阵列检测器,对混合对照品溶液在 200 ~ 400 nm 进行全波长扫描,结果显示,4 种黄酮成分芦丁、

金丝桃苷、异槲皮苷和槲皮素在 360 nm 处均有较强的紫外吸收峰,故选择 360 nm 为测定波长;考察了 Phenomenexsynergi C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) 和 Dikma Diamonsil C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) 均能达到较理想的分离效果,本实验采用了色谱柱。

3.2 供试品溶液制备方法的考察 分别考察了提取溶剂(甲醇,乙醇,30% 乙醇,50% 乙醇和 70% 乙醇),提取方法(回流、超声),提取时间(20,30,40,60 min)和溶剂倍量(10,25,50 mL),结果发现采用 70% 乙醇 25 mL 超声处理 40 min,4 种黄酮成分可以达到最佳的提取效率。

3.3 测定结果 本实验采用 HPLC 法同时对梅花配方颗粒中的芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷和槲皮素进行含量测定。所建立方法简单快捷、重复性好,为梅花配方颗粒的质量控制提供了依据。结果显示,广东一方制药有限公司生产的 7 批(2011—2014 年)梅花配方颗粒中 4 种黄酮成分的含量不同批次间相差不大:芦丁的质量分数为 8.754 8 ~ 12.012 0 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,金丝桃苷的质量分数为 3.072 1 ~ 5.115 2 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,异槲皮苷的质量分数为 6.293 6 ~ 6.879 0 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和槲皮素的质量分数为 0.260 0 ~ 0.415 1 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,表明梅花配方颗粒的质量相对稳定,有助于控制临床用药剂量和保证药效的稳定。

[参考文献]

- [1] 国家药典编委会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:292.
- [2] 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,1997:735.
- [3] 肖根培. 新编中药志. 第一卷[M]. 北京:化学工业出版社,2001:783.
- [4] 任宪威. 树木学(北方本)[M]. 北京:中国林业出版社,1997.
- [5] 郑虎占. 中药现代研究与应用. 第六卷[M]. 北京:学苑出版社,1998:5834-5835.
- [6] 郑小微,夏道宗,张英. 梅花总黄酮对黄嘌呤氧化酶的抑制作用及其抗氧化活性评价[J]. 食品工业科技,2001,32(11):168-173.
- [7] 罗涛,何平,陈晓林,等. 梅花研究进展[J]. 北京林业大学学报,2010,32(2):194-497.
- [8] Yoshieava M, Murakami T. New flavonoligoglycosides and Polyacylated sueroses with inhibitory effects on aldose reductase and platelet aggregation from the flowers of *Prunus mume*[J]. J Nat Prod,2002,65(8):1151-1155.

[责任编辑 顾雪竹]