

高效液相色谱法测定不同产地山柰中山柰素的含量

封传华, 李刚*, 张静, 徐兰, 陶晓璇
(中国人民解放军第九四医院, 南昌 330002)

[摘要] 目的:建立高效液相色谱法测定山柰药材中山柰素的含量,并对不同产地山柰药材中山柰素含量进行分析,为评价药材质量提供参考。方法:使用 ODS2 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)。流动相甲醇-0.4% 磷酸(50:50),流速 1 mL·min⁻¹,柱温室温,检测波长 367 nm,进样量为 10 μL。结果:山柰素在 0.015 8~1.58 μg 线性关系良好,加样回收率为 97.8%,RSD 1.6%。结论:不同产地山柰中山柰素的含量差异较大,所建立的含量测定方法具有操作简单、结果准确、重复性较好等特点,可用于山柰药材质量控制。

[关键词] 高效液相色谱法; 山柰; 山柰素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)03-0035-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017030035

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160920.0951.062.html>

[网络出版时间] 2016-09-20 9:51

Determination of Kaempferol in Kaempferiae Rhizoma from Different Origins by Using HPLC

FENG Chuan-hua, LI Gang*, ZHANG Jing, XU Lan, TAO Xiao-xuan
(The No. 94 Hospital of PLA, Nanchang 330002, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC method for the determination of kaempferol in Kaempferiae Rhizoma, analyze the contents of kaempferol in Kaempferiae Rhizoma from different origins, and provide reference for the evaluation of the medicinal quality. **Method:** ODS2 C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used as chromatographic column, with methanol-0.4% phosphate (50:50) as the mobile phase; the flow rate was 1 mL·min⁻¹, column temperature was room temperature; the detection wavelength was set at 367 nm; and the injection volume was 10 μL. **Result:** Kaempferol showed good linear relationship in the concentration range of 0.015 8-1.58 μg; the recovery rate was 97.8%, RSD of 1.6%. **Conclusion:** There was great difference in content of kaempferol in Kaempferiae Rhizoma from different origins. The established method is simple, accurate, repeatable, and can be used for quality control of Kaempferiae Rhizoma.

[Key words] HPLC; Kaempferiae Rhizoma; kaempferol

山柰又名三柰子、沙姜、山辣等,主要分布于广东、广西、云南、四川等地,味辛、性温,具有行气温中、消食、止痛等功效,临床可用于胸膈胀满、脘腹冷痛、饮食不消、跌打损伤、急性胃肠炎等疾患的治疗,药用价值较高^[1]。

现代研究已证实,山柰含有多种挥发油、香豆

素、黄酮、黏液质等成分,有关山柰挥发油的研究较为全面,主要包括山柰挥发油的提取、化学成分分离与含量测定、生物活性等方面,如张桂芝等^[2]采用 GC-MS 法对山柰药材中挥发油成分进行分析,共鉴定出 54 种化合物,其中以对甲氧基肉桂酸乙酯、反式肉桂酸乙酯、正十五烷为代表的 13 种成分的相对

[收稿日期] 20160106(007)

[第一作者] 封传华, 硕士, 主管药师, 从事药物新剂型及新制剂的研究, Tel:0791-88848314, E-mail:fengch1986@126.com

[通讯作者] *李刚, 硕士, 副主任药师, 从事药物制剂、临床药学的研究, Tel:0791-88848181, E-mail:858466@qq.com

含量约占挥发油总成分的 94.5% 以上;刘彦芳等^[3]发现山柰挥发油有可能通过抗肿瘤血管生成而抑制胃癌细胞增殖的作用,而山柰中其他成分的研究则相对较少。

山柰素为山柰药材中的一种重要的黄酮醇类化合物,具有平哮、止咳、抗氧化、降血压、降血脂、增强冠脉血流量等多种药理活性,测定山柰药材中山柰素的含量对于全面评价其质量具有较大的指导意义^[4-5]。不同产地药材因环境、气候等因素的影响,有效成分含量会存在较大的差异,甚至会影响药材的临床疗效,采用合适的方法对不同产地药材的质量进行评定具有十分重要的意义。笔者建立了高效液相色谱法测定山柰药材中山柰素含量测定的方法,并测定了不同产地山柰中山柰素的含量,为合理选药提供一定的参考。

1 材料

LC-15C 型高效液相色谱仪(日本岛津公司,包括 CTO 柱温箱, SIL-10AF 自动进样器, LC-15C 泵, SPD-15C 紫外检测器), HH-6 型恒温水浴锅(国华电器有限公司), KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), FW80 型高速万能粉碎机(北京市永光明医疗仪器厂), AL104/01 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司), RE52-99 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

对照品山柰素(中国食品药品检定研究院,批号 110861-201310,纯度 93.2%);不同产地山柰药材购自江西樟树药材市场,经江西中医药大学褚小兰教授鉴定为姜科植物山柰 *Kaempferia galanga* 的干燥根茎。甲醇(色谱纯,上海振兴化工一厂,批号 201402033),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 依利特 ODS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.4% 磷酸(50:50), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 367 nm, 柱温室温, 理论板数按山柰素峰计算不低于 3 000。

2.2 对照品溶液 精密称取山柰素对照品适量, 将其置于 50 mL 量瓶中, 加适量甲醇超声溶解, 放置至室温, 加适量甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得山柰素对照品储备液, 质量浓度 0.158 g·L⁻¹, 备用。

2.3 供试品溶液的制备 取山柰药材, 粉碎过筛(过 65 目), 精密称取粉末 1.0 g, 将其置于具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 超声提取(250 W, 40 kHz) 30 min, 放冷至室温, 再次精密称定, 用适量的甲醇补足减失的质量, 摇匀并过滤。

精密量取续滤液 15 mL 置于烧瓶中, 加 25% 的盐酸溶液 5 mL, 摇匀, 置水浴中加热水解 30 min, 取出, 置于冷水中迅速冷却, 吸取冷却液转移至 50 mL 的量瓶中, 用适量的甲醇将其稀释并定容, 摇匀后过滤, 即得供试品溶液。

2.4 标准曲线的绘制 精密吸取山柰素对照品储备液 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释并定容, 摇匀即得系列浓度的对照品溶液。分别吸取各浓度的对照品溶液 10 μL, 进样, 按照 2.1 项下的色谱条件进行测定。以山柰素的质量浓度对其峰面积绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 1\ 000\ 000X - 53\ 245$ ($r = 0.999\ 7$)。结果表明山柰素在 0.001 58 ~ 1.58 g·L⁻¹ 线性关系良好。

2.5 精密度试验 取供试品溶液(广东湛江), 连续进样 6 次, 每次的进样量为 10 μL, 按照 2.1 项下的色谱条件对样品进行测定, 经计算可知, 山柰素峰面积的 RSD 1.7%。结果显示该方法的精密度良好。

2.6 稳定性试验 取供试品溶液(批号 2015021508), 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样, 每次的进样量为 10 μL, 按照 2.1 项下的色谱条件对样品进行测定, 经计算可知, 山柰素峰面积的 RSD 2.0%, 结果显示样品中的山柰素在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取山柰药材(广东湛江), 粉碎(过 65 目), 精密称取适量。按照 2.3 项下的的方法平行制备 6 份供试品溶液, 分别进样, 进样量为 10 μL, 按照 2.1 项下的色谱条件对样品进行测定, 将山柰素峰面积代入标准曲线进行计算, 可得出山柰药材中山柰素的质量分数分别为 0.18%, 0.21%, 0.17%, 0.18%, 0.20%, 0.17%, RSD 1.6%。结果显示采用该方法测定山柰药材中山柰素的含量, 重复性较好。

2.8 加样回收率试验 取同一批山柰药材(广东湛江), 山柰素质量分数为 0.15%, 粉碎(过 65 目筛), 称取 6 份, 每份约 0.2 g, 精密称定, 分别向每份样品中加适量的山柰素对照品溶液, 按照 2.3 项下的方法制备, 分别进样, 进样量为 10 μL, 按照 2.1 项下的色谱条件对样品进行测定, 计算加样回收率, 结果见表 1。

2.9 样品含量测定 根据已建立的含量测定方法, 取不同产地的山柰药材, 每产地 3 份, 粉碎(过 65 目筛), 称取适量的粉末, 按照 2.3 项下的方法制备样品溶液, 分别进样, 进样量为 10 μL, 按照 2.1 项下

表 1 山柰中山柰素加样回收率试验

Table 1 Kaempferol recovery results

称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.205 9	0.305 9	0.601 4	95.3	97.8	1.6
0.210 4	0.318 7	0.618 3	96.6		
0.203 6	0.305 5	0.609 8	98.2		
0.207 8	0.306 1	0.608 7	97.6		
0.209 8	0.314 8	0.624 3	99.8		
0.208 4	0.312 7	0.619 7	99.0		

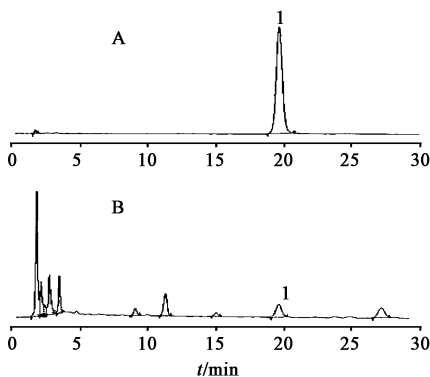
注:加入量均为 0.31 mg。

色谱条件对样品进行测定,将山柰素的峰面积代入线性回归方程中进行计算,可得出各产地山柰药材中山柰素的含量,具体结果见表 2,色谱图见图 1。

表 2 不同产地山柰药材中山柰素含量测定

Table 2 Determination of kaempferol in different areas

No.	产地	山柰素 /%
1	广东化州	0.09
2	广西贵港	0.15
3	海南琼中	0.11
4	广东湛江	0.18
5	广东阳春	0.08
6	广西桂平	0.12
7	云南红河	0.16
8	福建泉州	0.14



A. 对照品; B. 样品; 1. 山柰素

图 1 山柰 HPLC

Fig. 1 HPLC of *Kaempferia galanga*

3 讨论

山柰具有多种药理活性,据文献报道^[6-8],山柰中所含有的挥发油可显著抑制胃癌细胞的增殖和转移,能够使人胃癌细胞裸鼠原位移植瘤缩小;山柰的甲醇提取物具有较强的杀线虫能力,山柰的水提取

物具有明显的镇痛、抗炎作用,且山柰叶的水提取物的作用效果强于山柰根茎的水提取物。由此可见,山柰是一种极具发展潜力的药材。已有报道主要集中于山柰挥发油的研究,而山柰中的其他成分的研究报道相对较少,如山柰中的山柰素、槲皮素等成分,山柰素系山柰提取物中具有多种生理活性的黄酮类化合物,建立山柰药材中山柰素含量测定的方法对于全面评价药材的质量具有十分重要的意义^[9-11]。

笔者在研究过程中考察了不同提取方法的提取效果,如加热回流提取法、超声提取法、温浸法等。结果表明,不同提取方法的效果相差甚大,温浸法的出膏率及山柰素均最低;回流提取法出膏率虽高,但山柰素总量未明显增加,且液相色谱图杂质峰较多,对山柰素含量测定有一定的影响;超声提取法所得样品中山柰素含量与回流提取法相差不大,液相色谱图中干扰较少,且操作较方便,比较适合含量测定中样品的处理。本研究同时考察了超声提取时间和与提取液中山柰素含量的关系,分别考察了超声提取 15, 30, 45, 60 min 后提取液中山柰素的含量,结果显示超声提取 30 min 即可,时间进一步延长,提取液中山柰素未出现明显增加,故超声提取 30 min 即可。

山柰素主要以苷类的形式存在于药材中,需将其水解后才能检测,笔者参考 2015 年版《中国药典》(一部)红花药材中山柰素含量测定的样品处理方法^[12],加适量的 25% 盐酸溶液于提取液中,热水解 30 min 即可。流动相采用甲醇-0.4% 磷酸溶液 (50:50),山柰素的出峰时间适中,峰形较好,能够较好的用于山柰中山柰素的含量测定。

实验结果表明,不同产地山柰药材中山柰素含量差异较大,可能与药材的生长环境(土壤、气候、光照等)和加工处理有较大的相关性。因而为保证药材的质量,可在山柰药材的道地产区建立 GAP 种植基地,实施规范化的种植与管理,同时,应建立专属性强、回收率高、重复性好的有效成分含量测定方法,以便能够快速、准确测定山柰药材中山柰素的含量,控制药材的质量,以便能够保障临床安全用药。

[参考文献]

[1] 陈福北,陈少东,罗少华,等. 山柰的研究进展[J]. 广西轻工业, 2008, 14(10): 14-15.

[2] 张桂芝,顾玲燕,孟庆华. 山柰饮片挥发油的 GC-MS 特征成分和指纹图谱研究[J]. 中成药, 2009, 31(7): 985-988.

- [3] 刘彦芳,魏品康. 山柰挥发油提取物对裸鼠原位移植人胃癌组织的影响[J]. 临床肿瘤学杂志, 2005, 10(5):486-489.
- [4] 李慧,许亮,徐保利,等. HPLC测定地锦草中没食子酸、槲皮素及山柰素含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7):100-102.
- [5] 谭雄斯. HPLC-UV-ELSD法测定益肝乐颗粒中槲皮素、山柰素、柴胡皂苷a和柴胡皂苷d[J]. 中成药, 2014, 36(3):531-535.
- [6] 白吉庆,王小平,孙涛,等. 高效液相色谱法测定窝儿七中槲皮素、鬼臼毒素、山柰素[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(1):69-71.
- [7] 石晓峰,刘东彦,李爽,等. RP-HPLC法同时测定雪松松针中杨梅素、槲皮素和山柰酚的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9):1550-1553.
- [8] 陈晖,黄燕,瞿继兰. 甘肃省不同产地萱草花蕾中芦丁、槲皮素、山柰酚的测定[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9):1574-1577.
- [9] 覃冬杰,梁永红,黄瑞松,等. 壮药柿叶槲皮素和山柰素含量测定方法的建立[J]. 广西医学, 2012, 34(9):1133-1136.
- [10] 姚令文,陈晓虎,石岩,等. HPLC法测定柘木中槲皮素、染料木素和山柰素的研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(3):415-417.
- [11] 于雷,严铭铭,杨智,等. HPLC同时测定蚊子草药材槲皮苷、山柰酚含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(14):1985-1987.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:236.
- [责任编辑 顾雪竹]

《中国实验方剂学杂志》简介

《中国实验方剂学杂志》主编为吴以岭院士,由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中华中医药学会共同主办。以报道、介绍中医药研究为主旨的专业性学术期刊,创刊于1995年10月,目前为半月刊。

随着中医药政策扶持力度的加大和中医药科技创新的振兴,在中医药事业蓬勃发展的进程中,《中国实验方剂学杂志》也进入快速发展阶段! 以下是本刊在各权威数据库中的最新评价数据及收录情况:

①中国知网《中国学术期刊影响年报》(2016年版):影响力指数(CI)学科排序3/122(中医药类122本期刊中排第3名);复合影响因子1.319,学科排序9/122;

②万方数据《中国科技期刊引证报告(扩刊版)》:H指标为16,总被引频次15664,复合影响因子1.620,在中医药类122本期刊中排序分别为第2,2,11名;

③入选“中国科学引文数据库来源期刊”(CSCD 2015—2016);

④入选最新版《北大中文核心期刊要目总览》(2014年版);

⑤入选“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊2016年版);

⑥入选“RCCSE中国核心学术期刊”(2015—2016)。