

HPLC 测定复方肝炎颗粒中槲皮素和山奈素的含量

梁国华^{1*}, 梁晓琪²

(1. 广西北海食品药品检验所, 广西 北海 536000;

2. 广西北海市国发海洋生物产业股份有限公司制药厂, 广西 北海 536000)

[摘要] 目的: 高效液相法测定复方肝炎颗粒中槲皮素和山奈素的含量。方法: 采用 HPLC, 样品经 80% 甲醇超声、酸水解后, 采用色谱柱 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 甲醇-0.4% 磷酸 (50:50) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 360 nm, 柱温 30 ℃。结果: 槲皮素在 0.050 1~0.501 μg ($r=0.999\ 9$) 和山奈素在 0.024 2~0.242 μg ($r=0.999\ 5$) 均呈良好线性关系; 槲皮素和山奈素加样回收率分别为 99.69% (RSD 0.22%), 99.30% (RSD 0.82%) ($n=9$)。结论: 该法操作简便、结果准确、重复性好、结果准确可靠, 可用于复方肝炎颗粒的质量控制要求。

[关键词] 复方肝炎颗粒; 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(2013)24-0090-03

[doi] 10.11653/syjf2013240090

Determination of Content of Quercetin and Kaempferol in Compound Ganyan Granules by HPLC

LIANG Guo-hua^{1*}, LIANG Xiao-qi²

(1. Beihai Institute for Food and Drug Control, Beihai 536000, China;

2. Guangxi Guofa Marine Biological Industry Limited Company Pharmaceutical Factory, Beihai 536000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for quantification of quercetin and kaempferol in compound Ganyan granules. **Method:** Samples were extracted in 80% methanol with ultrasonic process and hydrolyzed for 1 h. The HPLC was performed on an ODS-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with methanol-0.4% H₃PO₄ (50:50) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was kept at 30 ℃. The eluate was detected at 360 nm. **Result:** The linear ranges of quercetin and kaempferol were 0.050 1-0.501 μg ($r=0.999\ 9$) and 0.024 2-0.242 μg ($r=0.999\ 5$) respectively. The average recoveries of quercetin and kaempferol were 99.69% (RSD 0.22%) and 99.30% (RSD 0.82%). **Conclusion:** The method can be used for quality control of Ganyan granules. It is simple, rapid and accurate for simultaneous determination of two constituents in compound Ganyan granules.

[Key words] compound Ganyan granules; HPLC; quercetin; kaempferol

复方肝炎颗粒由金钱草、田基黄、茵陈、蒲公英、甘草、柴胡组成, 具有清肝利湿之功效, 用于急性黄疸型、无黄疸型、迁延性肝炎及胆囊炎等。金钱草是

方中君药, 药典品种为报春花科植物过路黄的干燥全草。金钱草主要含有槲皮素和山奈素等多种黄酮类化合物成分。槲皮素是一种黄酮类化合物, 具有清除氧自由基、抗炎、调节免疫功能、降血压、减轻心肌缺血/再灌注损伤、钙拮抗和蛋白激酶 C 抑制等多种生物学活性^[2]。山奈素能够激活 melan-黑素细胞酪氨酸酶的活性, 促进黑素细胞增殖, 使黑素合成量增加等作用^[3], 原标准中无含量测定项。本文采用高效液相色谱法测定复方肝炎颗粒中槲

[收稿日期] 20120207(007)

[基金项目] 广西不良反应药物质量考察项目(桂科攻10124001A-66)

[通讯作者] * 梁国华, 副主任药师, 从事药品和食品及保健品检验工作, Tel: 0779-6803559, E-mail: lgh1280@sina.com

皮素和山奈素的含量,为复方肝炎颗粒的质量标准提供参考。

1 材料

LC-2010AHT型高效液相色谱仪(包括在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、VWD检测器,日本岛津),SK5200H型超声波清洗器(功率150 W,频率20 kHz,上海科导仪器有限公司)。AE-240型电子天平(上海梅特勒仪器有限公司)。

槲皮素对照品(批号100081-200406,供含量测定用,含量为97.3%),山奈素对照品(批号110861-200808,供含量测定用,含量95.9%)均购于中国药品生物制品检定所。复方肝炎颗粒(陕西康惠制药有限公司,批号20100901,20100702,20100502,20110302,20110502,20110702,20120102,20120503,20121003)。甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Shimadzu VP-ODS色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,流动相乙腈-0.4%磷酸(50:50),检测波长360 nm,柱温35℃,流速1.0 mL·min⁻¹,进样量10 μL,理论板数按槲皮素计算不低于3 500,槲皮素和山奈素的分离度>1.5。

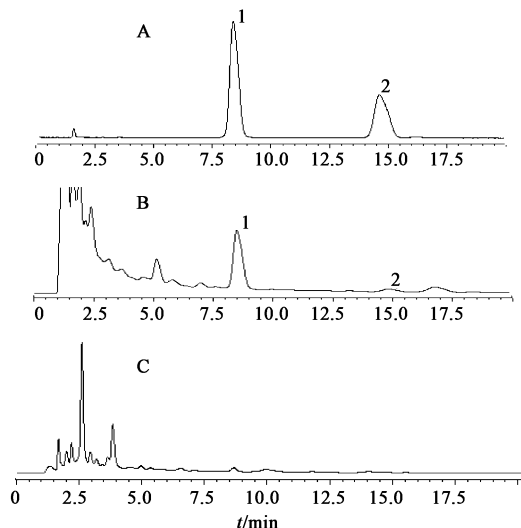
2.2 对照品混合液的制备 分别精密称取经五氧化二磷干燥的槲皮素和山奈素对照品12.86,6.31 mg,分别置25 mL量瓶,用80%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得对照品溶液(槲皮素0.501 g·L⁻¹,山奈素0.242 g·L⁻¹)。分别精密量取1 mL置25 mL量瓶中,用80%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品混合液(槲皮素20.04 mg·L⁻¹,山奈素9.68 mg·L⁻¹)。

2.3 供试品溶液的制备 分别精密称取供试品约3.0 g,置具塞锥形瓶中,精密加入80%甲醇溶液50 mL,密塞,称定质量,超声30 min,放冷,再称定质量,用80%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密吸取续滤液25 mL,精密加入盐酸5 mL,置90℃水浴中加热水解1 h,取出,迅速冷却,加80%甲醇稀释至50 mL,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液待测。

2.4 空白对照溶液的制备 按处方中药味的比例,自配不含金钱草的空白处方,按其工艺制成空白制剂,按2.3制成空白对照溶液。

2.5 专属性试验 取对照品溶液、空白对照溶液、供试品溶液进样,表明空白对照溶液在槲皮素和山

奈素峰位置处无相应峰出现,理论板数均>3 500,山奈素和槲皮素的分离度为8.75,见图1。



A. 对照品;B. 样品;C. 阴性供试品;1. 槲皮素;2. 山奈素

图1 复方肝炎颗粒 HPLC

2.6 线性关系考察试验 精密吸取对照品混合液(槲皮素质量浓度为51.4 mg·L⁻¹,山奈素质量浓度为25.2 mg·L⁻¹)2.5,5,10,15,20,25 μL,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,以对照品进行量(X, μg)为横坐标,峰面积值(Y, A)为纵坐标,得回归方程。 $Y = 4.953 \times 10^3 X + 7.771 \times 10^6$ ($r = 0.9999$),槲皮素在0.0501~0.501 μg线性关系良好, $Y = 5.25 \times 10^3 X + 8.17 \times 10^6$ ($r = 0.9999$),山奈素在0.0242~0.242 μg线性关系良好。

2.7 精密度试验 精密吸取槲皮素和山奈素对照品混合液10 μL,重复进6次,分别测其峰面积,槲皮素RSD 0.25%,山奈素RSD 0.35%。

2.8 稳定性试验 取同一批供试品(批号20100901)溶液,按2.1色谱条件分别在供试品溶液制备后0,4,8,12,16,20,24 h进样10 μL,测定槲皮素和山奈素峰面积,RSD分别为0.45%,0.47%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.9 重复性试验 取同一批样品6份,按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1色谱条件进样分析,计算槲皮素和山奈素含量的平均值分别为0.398 mg·g⁻¹,RSD 0.75%;0.095 mg·g⁻¹,RSD 0.82%,表明分析方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验 精密量取已知含量的样品9份,分别精密加入槲皮素和山奈素对照品适量,按2.3项下方法制备,按2.1色谱条件测定,计算回收率和RSD。表明样品加样回收率良好,对照品无参与水解反应。见表1~2。

表 1 复方肝炎颗粒槲皮素加样回收率试验

取样量 /mg	样品含量 /mg	加样量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
2.137 1	0.827	0.257	1.083	99.61		
2.142 3	0.829	0.257	1.084	99.22		
2.213 2	0.856	0.257	1.112	99.61		
2.220 2	0.859	0.514	1.372	99.81		
2.073 1	0.802	0.514	1.316	100.00	99.69	0.22
2.051 6	0.794	0.514	1.306	99.61		
2.105 7	0.815	1.028	1.841	99.81		
2.078 9	0.805	1.028	1.830	99.71		
2.081 5	0.806	1.028	1.832	99.81		

表 2 山奈素加样回收率试验

取样量 /mg	样品含量 /mg	加样量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
2.137 1	0.197	0.063	0.259	98.41		
2.142 3	0.197	0.063	0.260	100.00		
2.213 2	0.204	0.063	0.266	98.41		
2.220 2	0.204	0.126	0.328	98.41		
2.073 1	0.191	0.126	0.318	100.79	99.30	0.82
2.051 6	0.189	0.126	0.314	99.21		
2.105 7	0.194	0.252	0.445	99.60		
2.078 9	0.191	0.252	0.442	99.60		
2.081 5	0.191	0.252	0.441	99.21		

2.11 样品测定 取样品 9 批,按 2.3 项下制样方法制备供试品溶液,按 2.1 色谱条件,注入高效液相色谱仪,将所得测定槲皮素和山奈素峰面积代入标准曲线,各样品两组分含量见表 3。

表 3 槲皮素和山奈素含量测定 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

批号	槲皮素	山奈素
20100901	0.399	0.089
20100702	0.387	0.092
20100502	0.397	0.095
20110302	0.401	0.097
20110502	0.411	0.099
20110702	0.403	0.091
20120102	0.401	0.092
20120503	0.395	0.090
20121003	0.392	0.089

3 讨论

3.1 波长选择 分别取槲皮素和山奈素对照品溶液,在 190 ~ 450 nm 进行扫描,结果槲皮素在 360 nm 波长处有最大吸收,山奈素在 366 nm 波长处有最大吸收,根据 2 种成分吸收情况并参考文献^[5-7],以 360 nm 作为检测波长。

3.2 流动相选择 用不同比例的乙腈-0.4% 甲酸(50:50)、乙腈-0.4% 磷酸(50:50)、乙腈-0.4% 磷酸(50:50),前 2 种比例的流动相中槲皮素和山奈素

的分离度达不到 1.5,而乙腈-0.4% 磷酸(50:50)的流动相分离度 > 8,故选择乙腈-0.4% 磷酸(50:50)为流动相。

3.3 色谱柱的考察 考察 Diamonsil C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Agilent-TC C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Shimadzu VP-ODS(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),三者峰形均正态,分离良好。择优后选择 Shimadzu VP-ODS 作为系统条件色谱柱。

3.4 提取条件的选择 参考文献[8-9],精密加入盐酸 5 mL,置 90 °C 水浴中加热水解 1 h 和加入甲醇-25% 盐酸(4:2)的混合液 15 mL,85 °C 水浴中回流提取 2 h 比较,以峰面积为测定指标,发现加入盐酸 5 mL,置 90 °C 水浴中加热水解 1 h 提取效果好。

药方原标准^[4]中仅有鉴别,而无含量测定项。由本方法考察结果可见,线性关系、重复性、稳定性好,回收率高,结果准确可靠,可用于该制剂中槲皮素和山奈素的含量测定和不良反应药物质量考察。

[参考文献]

- [1] 张月丽,胡整. 金钱草及其易混淆品的鉴别[J]. 海峡药学, 2013, 25(3):33.
- [2] 宋传旺,刘佳佳,段承刚,等. 槲皮素对 LPS 延迟中性粒细胞自发性凋亡效应的抑制作用[J]. 中国免疫学杂志, 2005, 21(1):13.
- [3] 郭美玲,孙佳玲,孙公国. HPLC 法测定北合欢中槲皮素和山奈素的含量[J]. 中国药事, 2011, 25(7):647.
- [4] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂). 第 11 册[S]. 北京:中国医药科技出版社, 1996:135.
- [5] 徐飞,陆兔林,谢辉,等. HPLC 测定复方银杏颗粒中槲皮素、山奈素、异鼠李素及总黄酮醇苷的含量[J]. 中成药, 2007, 29(11):1617.
- [6] 温梅云,钟球,钟鸣. HPLC 法测定通淋颗粒中槲皮素和山奈素的含量[J]. 国际医药卫生导报, 2007, 13(4):86.
- [7] 蒙大平,黄雪梅,邓玉庄. 苦丁茶老中槲皮素和山奈素的含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(2):135.
- [8] 李洪,张静,高玉梅,等. 高效液相色谱法测定消浊通淋颗粒中槲皮素和山奈素的含量[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(22):13378.
- [9] 梁洁,柳贤福,孙正伊,等. HPLC 测定白花蛇舌草配方颗粒中槲皮素和山奈素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 24(18):149.

[责任编辑 顾雪竹]