

HPLC 测定小槐花药材中山柰酚的含量

成林¹, 刘吉成^{2*}, 卢森华², 卢文杰³, 蒋受军²

(1. 广西南宁市红十字会医院, 南宁 530012; 2. 广西玉林食品药品检验所, 广西 玉林 537000;
3. 广西中医药研究院, 南宁 530022)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法测定小槐花药材中山柰酚的含量的方法。方法: 样品用甲醇-25% 盐酸(4:1) 混合溶液回流提取 1.5 h, 用 Thermo BDS Hyperl C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱分离, 以乙腈-0.2% 磷酸溶液(30:70) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 检测波长 368 nm, 进样量 10 μL, 以外标法定量。结果: 山柰酚进样量在 18.94 ~ 189.4 ng 与峰面积值呈现良好的线性关系($r=0.9996$), 平均回收率为 105.5%, RSD 1.2% ($n=6$)。结论: 该法操作简便, 结果准确可靠, 重复性及稳定性良好, 可作为控制小槐花药材质量的方法。

[关键词] 小槐花; 山柰酚; 高效液相色谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0092-03

[doi] 10.11653/syjf2013150092

Determination of Kaempferol in *Desmodium caudatum* by HPLC

CHENG Lin¹, LIU Ji-cheng^{2*}, LU Sen-hua², LU Wen-jie³, JIANG Shou-jun²

(1. Guangxi Nanning Red Cross Hospital, Nanning 530012, China;

2. Guangxi Yulin Institute for Food and Drug Control, Yulin 537000, China;

3. Guangxi Institute of Chinese Medicine and Pharmaceutical Science, Nanning 530022, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for determination of kaempferol in *D. caudatum*. **Method:** *D. caudatum* was extracted by reflux with the mixed solution of methanol 25% hydrochloric acid (4:1) for 1.5 hours. The chromatographic column was ThermoBDS Hyperl C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), and the mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% phosphoric acid (30:70) with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 368 nm, and the column temperature was kept at 30 ℃; the inject volume was 10 μL. The content of kaempferol in *D. caudatum* was determined by external standard method. **Result:** Kaempferol was linear in the concentration range of 18.94-189.4 ng ($r=0.9996$), and the average recovery of kaempferol was 105.5% (RSD 1.2%). **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible with good stability, which can be used as quality control method for *D. caudatum*.

[Key words] *Desmodium caudatum*; kaempferol; HPLC; determination

小槐花为豆科山蚂蝗属植物小槐花的全株, 又名清酒缸、草鞋板、味噌草、拿身草等^[1], 分布于广

西、广东、浙江、湖北等地^[1-2]。全株均可作药用, 具有清热利湿、消积散瘀功效, 主治劳伤咳嗽、吐血、水肿、小儿疳积、痈疮溃疡、跌打损伤等症^[1-2], 为广西民间常用中草药^[3]。吴瑶等^[4]已经从该药材的 60% 乙醇提取物中分离得到 15 个化合物, 其中有甾醇、柠檬酚、黄槿酮 D、山柰酚等化合物。为了有效控制小槐花药材的质量, 本文建立 HPLC 测定小槐花药材中山柰酚含量的方法, 为小槐花药材的深度学习提供科学依据。

[收稿日期] 20130311(024)

[基金项目] 广西自然科学基金项目(2012GXNSFAA053175)

[第一作者] 成林, 主管药师, 从事医院药学研究, Tel: 13597118881, E-mail: 809433745@qq.com

[通讯作者] * 刘吉成, 硕士, 主管药师, 从事食品药品分析与药品质量标准研究, Tel: 13877502503, E-mail: liujichenggood@126.com

1 材料

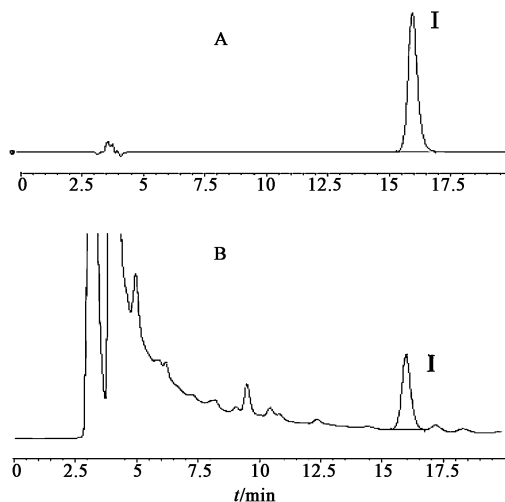
Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),HH-S₀ 型数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂),Millipore Simplicity-UV 型超纯水机(美国密里博公司),SB2200-T 型超声波清洗器(上海必能信公司),XS-205Du 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司)。

小槐花药材采集于广西来宾、南宁、鹿寨、南丹、平南、宁明、钟山、平果、马山等地,经广西中医药研究院卢文杰教授鉴定为豆科山蚂蝗属植物小槐花 *Desmodium caudatum* (Thunb.) DC. 的地上部分的茎和枝,使用前粉碎过 2 号筛。

山奈酚对照品(批号 110861-200304,供含量测定用,中国药品生物制品检定所提供),甲醇、乙腈均为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性试验 ThermoBDS Hyperl C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.2% 磷酸溶液(30:70),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 368 nm,进样量 10 μL。在此条件下,理论塔板数以山奈酚峰计算不低于 5 000。见图 1。



A. 对照品; B. 样品; I. 山奈酚

图 1 对照品及小槐花药材的 HPLC

2.2 对照品溶液制备 精密取干燥至恒重的山奈酚对照品,称定质量为 9.47 mg,置 25 mL 量瓶中,加适量甲醇超声使溶解,放冷,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液。精密量取 5 mL 贮备液置 100 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。(山奈酚对照品溶液质量浓度 18.94 mg·L⁻¹)。

2.3 供试品溶液制备 取粉碎的小槐花药材约 5 g,精密称定,置于锥形瓶中,精密加入甲醇-25%

盐酸(4:1)混合溶液^[5] 25 mL,称定质量,加热回流 1.5 h,放冷,用甲醇-25% 盐酸(4:1)混合溶液补足损失质量,过滤,取续滤液,即得。

2.4 测定方法 分别精密吸取上述对照品溶液和供试品溶液各 10 μL,在 2.1 项下的色谱条件下,供试品中山奈酚色谱峰与对照品色谱峰保留时间一致,并与其他共存成分分离度 > 1.5。见图 1。

2.5 线性关系考察 分别精密吸取上述山奈酚对照品溶液(18.94 mg·L⁻¹) 1, 2, 3, 4, 5, 10 mL 置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,分别取上述 6 个不同浓度的对照品溶液 10 μL,注入高效液相色谱仪,以进样量(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得山奈酚的线性方程为 $Y = 4.8385X + 2.1817$ ($r = 0.9996$)。结果表明山奈酚对照品溶液在质量为 18.94 ~ 189.4 ng 与峰面积值呈现良好的线性关系。

2.6 精密度试验 精密吸取山奈酚对照品溶液(18.94 mg·L⁻¹) 10 μL,注入高效液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,测定峰面积,结果山奈酚平均峰面积 RSD 1.2%,表明所用液相色谱仪精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一批小槐花粗粉 6 份(产地为来宾),每份约 5 g,精密称定,按 2.3 项方法制备,精密吸取 10 μL,注入高效液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件测定其峰面积并计算山奈酚含量,结果平均值为 0.050 mg·g⁻¹,RSD 1.6%。表明本法重复性良好。

2.8 稳定性试验 取一份上述供试品溶液,每次精密吸取 10 μL,注入高效液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件,分别于 1, 2, 4, 6, 12, 24 h 进样,测定其峰面积值,RSD 0.9%,表明供试品溶液在 24 h 内保持稳定。

2.9 加样回收试验 取已知含量(产地为来宾,0.050 mg·g⁻¹)的粉碎的小槐花药材 6 份,每份约 2.5 g,精密称定,分别加入一定量的山奈酚对照品,按 2.3 项方法处理,精密吸取 10 μL,注入高效液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件测定山奈酚含量,计算回收率,平均回收率为 105.5%,RSD 1.2%,表明该方法准确性高。结果见表 1。

2.10 样品含量测定 分别取不同产地小槐花药材,粉碎,取粉末约 5 g,精密称定,按 2.3 项方法制备,精密吸取 10 μL,注入高效液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件测定峰面积,计算山奈酚的含量。结果见表 2。

表 1 小槐花药材山柰酚加样回收试验

No.	样品量 /g	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	2.529 4	0.259	106.48	105.5	1.2
2	2.500 1	0.253	103.16		
3	2.514 4	0.258	106.11		
4	2.501 4	0.257	106.05		
5	2.529 8	0.259	106.21		
6	2.510 1	0.256	105.24		

注:加入量均为 0.124 mg。

表 2 各产地小槐花药材山柰酚的含量 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

No.	产地	山柰酚含量
1	来宾	0.050
2	南宁 I	0.050
3	鹿寨	0.049
4	南丹	0.036
5	平南	0.054
6	宁明	0.052
7	钟山	0.045
8	苹果	0.050
9	马山	0.047
10	南宁 II	0.051

3 讨论

采用水、甲醇、甲醇-25% 盐酸(4:1) 混合溶液^[5]等溶剂进行加热回流提取,发现只有用甲醇-25% 盐酸(4:1) 混合溶液回流提取测得是山柰酚,用甲醇、水等其他溶剂提取测定的是山柰酚的糖苷化合物;还比较了回流提取与超声提取的效率,发现回流提取比超声提取测的山柰酚含量要高;对加热回流提取时间(0.5,1,1.5,2 h) 进行考察,以回流提取 1.5 h 测得的山柰酚含量最高,故选择甲醇-25% 盐酸(4:1) 混合溶液回流提取 1.5 h。

曾考虑用甲醇-0.1% 磷酸(65:35)^[6]、甲醇-0.2% 磷酸(60:40)^[7]、甲醇-0.4% 磷酸(55:45)^[8-9]、甲醇-0.6% 磷酸(52:48)^[10]、乙腈-0.2% 冰乙酸(27:73)^[11]、乙腈-0.1% 磷酸

(27:73)^[12]、乙腈-0.2% 磷酸(30:70) 等流动相,发现用甲醇与不同浓度的磷酸作为流动相时,样品杂质太多,山柰酚与旁边的杂质分离的不是很好,而且峰型较宽;用乙腈-0.2% 磷酸(30:70) 作为流动相时,样品分离好,峰型很好,故选择了乙腈-0.2% 磷酸(30:70) 作为流动相。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 4 册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:444.
- [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,1977:3147.
- [3] 吴怀恩,甄汉深,陆海琳,等. 清酒缸的生药学研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(10):2689.
- [4] 吴瑶,罗强,孙翠玲,等. 小槐花的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(12):1788.
- [5] 孙莲,严雷,石晓呢,等. RP-HPLC 测定桑叶、桑枝和桑花中槲皮素和山柰酚的含量[J]. 药物分析杂志,2005,10:1230.
- [6] 李宏霞,韦志疆,覃忠干. HPLC 法测定四季青片中山柰素的含量[J]. 药物分析杂志,2010,30(11):2178.
- [7] 黄志勤,程齐来,李洪亮. RP-HPLC 测定细梗胡枝子中 3 种黄酮类有效成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(4):70.
- [8] 鞠成国,王巍,赵焕君,等. HPLC 测定急性子中总黄酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):77.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:296.
- [10] 张可锋,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.
- [11] 田振坤,顾媛媛,宋成贵,等. HPLC 测定凤仙透骨草中的芦丁、槲皮素和山柰酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):106.
- [12] 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柰酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(8):41.

[责任编辑 顾雪竹]