

HPLC 测定鱼腥草配方颗粒中槲皮素含量

梁洁*, 柳贤福, 孙正伊, 余靓
(广西中医学院药学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 建立测定鱼腥草配方颗粒中槲皮素含量的 HPLC 方法。方法: 采用正交试验优化鱼腥草配方颗粒的提取工艺, 用 HPLC 测定鱼腥草配方颗粒中槲皮素的含量。色谱柱为 Hypersil ODS C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.2% 磷酸 (45:55), 检测波长 372 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃。结果: 槲皮素在 0.09 ~ 1.44 μg 线性关系良好 ($r = 0.9999$), 平均加样回收率为 100.6%, RSD 1.68% ($n = 6$)。结论: 该方法简便、快速、重复性好, 可作为鱼腥草配方颗粒中槲皮素的含量测定方法。

[关键词] 鱼腥草配方颗粒; 高效液相色谱法; 槲皮素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0140-04

Determination of Quercetin in Yuxingcao Dispensing Granule by HPLC

LIANG Jie*, LIU Xian-fu, SUN Zheng-yi, YU Jing

(Faculty of Pharmacy, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for determination of quercetin in Yuxingcao dispensing granules. **Method:** Orthogonal experiments were used to optimize extraction technology. The samples were separated on the 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 372 nm and flow rate at 1 mL·min⁻¹, column temperature at 30 ℃. **Result:** The method had good linear relationship within the range of 0.09-1.44 μg ($r = 0.9999$) for quercetin. The average recovery rate was 100.6% with RSD of 1.68%. **Conclusion:** The method is simple, rapid and reliable which can be used to determine quercetin in Yuxingcao dispensing granules.

[Key words] Yuxingcao dispensing granules; quercetin; HPLC; determination

鱼腥草为三白草科蕺菜属蕺菜的全草或干燥地上部分。其茎叶有鱼腥味,故名鱼腥草。其性味辛、寒,具有清热解毒、消肿排脓、利尿通淋的功效,临床主要用于治疗肺痈吐脓、痰热喘咳、热痢热淋、痈肿疮毒等病证^[1]。鱼腥草配方颗粒是鱼腥草饮片经水提、浓缩、干燥、制粒等工序制成的单味中药配方颗粒剂。鱼腥草的主要成分为挥发油,挥发油中的主要成分则为鱼腥草素(癸酰乙醛)、2-十一烷酮(甲基正壬酮)、蕺菜碱等^[2]。鱼腥草中除含挥发油成分外,还含有大量槲皮素、槲皮苷、异槲皮苷等,其中槲皮素是鱼腥草活性成分,具有祛痰止咳平喘、抗

炎、抗过敏、降血脂、抗氧化、抗肿瘤等广泛的药理作用^[3-5]。《中国药典》2010年版仅有药材性状和鉴别,未对鱼腥草规定含量测定项目。本实验运用正交试验确定鱼腥草配方颗粒中槲皮素的最佳提取工艺,并采用 HPLC 测定制剂中槲皮素含量,为鱼腥草配方颗粒的质量控制提供科学依据。

1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(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 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)。

槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100081-200406);鱼腥草配方颗粒(江阴天江药业有限公司,批号 1106024,1101104,1102091),鱼

[收稿日期] 20111028(007)

[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

腥草(3批,产于广西),购自南宁医药有限责任公司,经广西中医学院中药鉴定教研室滕建北副教授鉴定为三白草科蕺菜属蕺菜 *Houttuynia cordata* Thunb.的全草。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 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 372 nm,流速为 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,进样量为 10 μL。

2.2 溶液制备 精密称取 105 ℃ 干燥至恒重的槲皮素对照品 9.00 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇适量使溶解并定容至刻度,摇匀,即得质量浓度为 0.09 g·L⁻¹ 的槲皮素对照品溶液。分别取鱼腥草配方颗粒和鱼腥草饮片各 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇-盐酸(4:1) 10 mL,密塞,称定质量,超声提取 50 min,放冷,用甲醇-盐酸(4:1)补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液作为鱼腥草配方颗粒供试品溶液和鱼腥草药材供试品溶液。取鱼腥草配方颗粒的辅料交联淀粉适量,按供试品溶液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、鱼腥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。槲皮素的保留时间为 12.1 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。

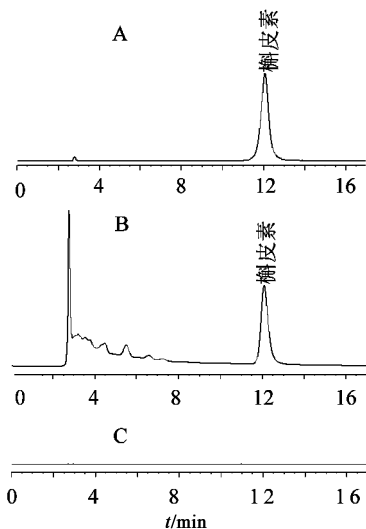


图 1 槲皮素对照品 (A)、样品 (B) 和阴性对照样品 (C) 的 HPLC

2.4 供试品处理的正交试验 根据槲皮素的性质及初步预试验结果,采用正交试验 L₉(3⁴) 进行鱼腥草配方颗粒的甲醇超声提取工艺研究,以槲皮

素的含量为评价指标,选择甲醇体积分数(80%, 90%, 100%)、甲醇用量(10, 15, 20 mL)、提取时间(30, 40, 50 min) 3 个因素,每个因素设 3 个水平。正交设计表及分析结果见表 1~3。

表 1 正交设计因素水平

水平	甲醇体积分数/%	甲醇用量/mL	提取时间/min
1	80	10	30
2	90	15	40
3	100	20	50

表 2 L₉(3⁴) 正交试验

No.	A	B	C	D/误差	槲皮素/mg·g ⁻¹
1	1	1	1	1	0.567 8
2	1	2	2	2	0.392 4
3	1	3	3	3	0.283 2
4	2	1	2	3	1.095 8
5	2	2	3	1	0.807 6
6	2	3	1	2	0.288 4
7	3	1	3	2	1.788 1
8	3	2	1	3	1.370 6
9	3	3	2	1	1.322 8
K ₁	0.414	1.151	0.742	0.899	
K ₂	0.731	0.857	0.937	0.823	
K ₃	1.494	0.631	0.960	0.917	
R	1.080	0.520	0.218	0.094	

表 3 方差分析

方差来源	离差平方和	f	方差	F	P
A	1.847	2	123.13	19.000	<0.05
B	0.407	2	27.133	19.000	<0.05
C	0.086	2	5.733	19.000	>0.05
误差	0.01	2			

因素极差 R 越大,说明因素的水平改变对实验结果影响也越大。由实验结果的直观分析及方差分析可知,影响槲皮素提取效果的因素大小顺序为 A > B > C,即甲醇体积分数 > 甲醇用量 > 提取时间,其中甲醇体积分数和甲醇用量对试验结果有显著性影响,根据实验结果确定最佳提取方法为 A₃B₁C₃,即用 10 mL 的 100% 甲醇超声处理 50 min。

为了进一步考察优选工艺的可靠性和稳定性,取 3 份鱼腥草配方颗粒按上述最优工艺条件 A₃B₁C₃ 进行验证试验,按 2.1 项下所述方法进行

测定, 结果槲皮素体积分数为 1.795 2, 1.773 8, 1.799 8 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。平均含量 1.789 6 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 0.78%。与正交试验方案中的最高值相同, 说明优化成功。

2.5 线性关系考察 精密吸取槲皮素对照品溶液 1, 4, 8, 12, 16 μL 注入液相色谱仪进行分析, 以进样量 X (μg) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线, 得槲皮素回归方程 $Y = 3\ 838.95 X + 8.28$ ($r = 0.999\ 9$)。结果表明在 0.09 ~ 1.44 μg 进样量与峰面积呈良好线性关系。

2.6 精密度试验 精密吸取 0.09 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 槲皮素对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 计算得峰面积 RSD 0.48% ($n = 6$)。表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一批样品 (批号 1102091), 按 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含量。结果平均含量为 1.784 6 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 1.17% ($n = 6$)。表明方法重复性良好。

2.8 稳定性试验 取同一份供试品 (批号 1102091), 按 2.1 项下色谱条件分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样 10 μL , 测定槲皮素的峰面积, RSD 0.74% ($n = 6$)。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验 取同批号 (批号 1102091) 已知含量的样品 6 份, 分别精密加入一定量的槲皮素对照品, 按 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 , 测定槲皮素的含量。

平均回收率为 100.6%, RSD 1.68%, 表明该方法可靠, 准确度高。结果见表 4。

表 4 槲皮素加样回收率的试验 ($n = 6$)

No.	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.355 7	0.360	0.711 9	98.94	100.6	1.68
2	0.356 7	0.360	0.715 6	99.69		
3	0.357 6	0.360	0.717 4	99.94		
4	0.361 1	0.360	0.726 7	101.56		
5	0.358 2	0.360	0.718 5	100.08		
6	0.360 5	0.360	0.733 5	103.61		

2.10 样品的测定 取 3 批鱼腥草配方颗粒 (1 g, 相当于饮片 15 g), 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定其中槲皮素的含量, 结果见表 5。

表 5 鱼腥草配方颗粒槲皮素含量测定 ($n = 3$)

批号	槲皮素/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD/%
1106024	1.388 6	0.84
1101104	1.982 9	0.24
1102091	1.791 7	0.51

2.11 药材中槲皮素的含量测定及转移率计算 取 3 批鱼腥草药材粉末, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定其中槲皮素的含量。根据测定结果, 计算鱼腥草配方颗粒样品中槲皮素相对于鱼腥草含量的转移率, 结果见表 6。

表 6 3 批样品槲皮素转移率的测定 ($n = 3$)

供试品	槲皮素 ¹⁾ / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$			转移率/%		
	样品 1	样品 2	样品 3	样品 1	样品 2	样品 3
鱼腥草药材	0.594 8	0.603 2	0.631 6	100	100	100
鱼腥草配方颗粒	0.092 6	0.132 2	0.119 4	15.57	21.92	18.90

注: ¹⁾ 相当于 1.0 g 鱼腥草药材中所含槲皮素质量。

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。在提取溶剂方面考察了甲醇和乙醇, 经 HPLC 测定, 比较其色谱图, 结果表明以甲醇作为提取溶剂提取率较高, 且干扰少, 故选用甲醇作为提取溶剂。在 200 ~ 400 nm 波长测定槲皮素的吸收曲线, 在 372 nm 波长处为最大吸收, 灵敏度最高, 因此采用 372 nm 作为检测波长。

曾考察过乙腈-0.4% 磷酸溶液、甲醇-0.4% 磷

酸溶液、乙腈-水、甲醇-水等为流动相^[6-9], 以甲醇-0.4% 磷酸溶液 (45:55) 为流动相, 分离度较好 ($R > 1.5$), 保留时间适中, 峰形亦较好, 但考虑到 pH 过低对柱子的损坏, 所以选用甲醇-0.2% 磷酸溶液 (45:55) 为流动相。

本文建立的槲皮素含量测定方法, 可以较好地反映鱼腥草配方颗粒中槲皮素的含量, 结果准确, 重复性良好, 对鱼腥草配方颗粒的质量控制有一定意义。样品测定结果表明, 同一厂家不同批号鱼腥草配方颗粒的含量, 其结果存在一定差异, 这可能与

不同板蓝根制剂腺苷含量测定及其抗炎作用比较

令红艳*

(乐山职业技术学院药学系,四川乐山 614000)

[摘要] 目的:研究板蓝根不同剂型中腺苷的含量,并比较不同制剂间的抗炎作用。方法:采用 HPLC 测定板蓝根糖浆、板蓝根颗粒、板蓝根软胶囊、板蓝根片、板蓝根滴丸等剂型中腺苷含量,色谱柱为 Dia-monsil C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm),检测波长 260 nm,流动相甲醇-水 (10:90),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃。另将给药后的小鼠,耳廓涂二甲苯致肿胀,比较各组肿胀度差异。结果:腺苷在 0.016 0~0.160 0 g 线性关系良好($r=0.999 7$),平均回收率为 98.7%,RSD 0.79% ($n=9$)。其中板蓝根软胶囊中腺苷含量最高,其他依次为板蓝根颗粒、板蓝根片、板蓝根滴丸、板蓝根糖浆。在二甲苯致小鼠耳廓肿胀的抗炎模型中,板蓝根颗粒抗炎效果最好,其他依次为板蓝根软胶囊、板蓝根滴丸、板蓝根片、板蓝根糖浆。结论:所用方法精密、重复性良好,结果准确,腺苷含量与药效具有一定的相关性但并不绝对,可能制剂中其他抗炎成分产生了协同作用,应采用多成分指标加以测定或以药效学指标加以控制更为合理。

[关键词] 板蓝根制剂;腺苷;抗炎

[中图分类号] R 284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0143-03

Determination of Different Radix and its Preparations Adenosine Correlation with Anti-inflammatory Effect

LING Hong-yan*

(Department of Pharmacy, Leshan Vocational & Technical College, Leshan 614000, China)

[Abstract] **Objective:** To study Banlangen levels of adenosine in different dosage forms, and compare

[收稿日期] 20120229(007)

[通讯作者] *令红艳, Tel:15854715028, E-mail:745380869@qq.com

鱼腥草的采收季节、用药部位、来源^[9-10]及加工过程有关。另外,按药材中槲皮素含量折算,配方颗粒槲皮素的转移率较低,只有 15.57%~21.92%,因此建议厂家进一步完善鱼腥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] 中国药典.一部[S]. 2010:208.
[2] 江苏新医学院.中药大词典.上册[M].上海:上海人民出版社,1977:1439.
[3] 叶春,阚建全,谭书明,等.鱼腥草叶总黄酮的提取分离[J].农业工程学报,2008,24(10):227.
[4] 伍贤进,李胜华,李爱明,等.鱼腥草化学成分研究[J].中药材,2008,31(8):1168.

[5] 崔山风.槲皮素的研究进展[J].西北药学杂志,2006,21(6):23.
[6] 刘燕,唐铁鑫.野牡丹中槲皮素的测定[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(12):85.
[7] 邹亮,王战国,胡慧玲,等.苦荞提取物中芦丁和槲皮素的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(17):60.
[8] 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.
[9] 陈黎,郑有良,吴卫,等.不同来源鱼腥草中槲皮素含量差异比较研究[J].药物分析杂志,2007,27(8):1232.
[10] 胡凤莲,倪细炉,刘文哲.鱼腥草中总黄酮和槲皮素含量的动态变化[J].安徽农业科学,2008,36(10):4128.

[责任编辑 蔡仲德]