

双柏散中槲皮苷与薄荷脑的含量测定研究

刘东辉^{1*}, 陈慕媛¹, 黄月纯², 魏 刚¹

(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

[摘要] 目的: 建立双柏散中槲皮苷和薄荷脑的含量测定方法, 为双柏制剂的质量控制与化学物质基础研究提供分析手段。方法: 采用 HPLC 法测定槲皮苷含量。采用 Eclipse XDB C₁₈ 为色谱柱; 流动相为乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液-冰醋酸 (16:84:2.1); 检测波长为 352 nm; 流速为 1 mL·min⁻¹; 柱温为 40 ℃。以水杨酸甲酯为内标物, 采用 GC 法测定薄荷脑的含量。以 HP-5 为色谱柱, 进样口温度为 210 ℃; FID 检测器, 检测器温度为 280 ℃, 程序升温: 初始温度 50 ℃, 保持 2 min 后, 以 60 ℃·min⁻¹ 升至 120 ℃后保持 5 min, 再以 10 ℃·min⁻¹ 升至 150 ℃后, 再以 60 ℃·min⁻¹ 升至 235 ℃后保持 10 min; 流速为 1.1 mL·min⁻¹, 分流比为 1:1。结果: 槲皮苷在 0.020 48~1.228 8 μg 范围内线性关系良好 ($r=0.999\ 9$), 平均加样回收率为 97.20% (RSD=1.75%); 薄荷脑在 0.002 73~0.087 36 μg 范围内线性关系良好 ($r=0.999\ 5$), 平均加样回收率为 99.97% (RSD=2.88%)。双柏散中槲皮苷、薄荷脑含量分别为 0.851 9~1.286 3 mg·g⁻¹、0.068 3~0.855 6 mg·g⁻¹。结论 方法简便、重复性好, 为双柏制剂的质量控制与化学物质基础研究提供了一定的分析手段。

[关键词] 双柏散; 槲皮苷; 薄荷脑; 高效液相色谱法; 气相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)12-0004-04

Determination of Quercitrin and Menthol in Shuangbaisan

LIU Dong-hui¹, CHEN Mu-yuan¹, HUANG Yue-chun², WEI Gang¹

(1. The University of TCM, Guangzhou 510006, China;

2. The first Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of quercitrin and menthol in Shuangbaisan, and provide a reference for quality control and the chemical material foundation of Shuangbai preparations. **Methods:** The content of the quercitrin was determined by HPLC. Eclipse XDB C₁₈ was used, with acetonitrile - 0.01 mol·L⁻¹

[收稿日期] 2009-04-08

[基金项目] “十一五”国家支撑计划项目(2008BA153B074)

[通讯作者] * 刘东辉, Tel: (020) 39358462; E-mail: vip.zyjsxy1@gzhtcm.edu.cn。

potassium dihydrogen phosphate-acetic acid(16: 84: 2.1) as a mobile phase, detection wavelength at 352nm, flow rate at $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, and column temperature at $40\text{ }^\circ\text{C}$. With Borneolum syntheticum as the internal standard, GC with HP-5 column was used, sampling temperature at $210\text{ }^\circ\text{C}$, FID detector temperature at $280\text{ }^\circ\text{C}$, temperature programming started at $50\text{ }^\circ\text{C}$, held for 2 min, increased at a rate of $60\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ to $120\text{ }^\circ\text{C}$, held for 5 min, increased at a rate of $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ to $150\text{ }^\circ\text{C}$, then increased at a rate of $60\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ to $235\text{ }^\circ\text{C}$ and kept it for 10 min, low rate at $1.1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, split ratio was 1: 1. **Results:** Good linearity for Quercitrin and Menthol were in the rang of 0.020 48~ 1.228 8 μg ($r = 0.999\ 9$) and 0.002 73~ 0.087 36 μg ($r = 0.999\ 5$), respectively. The average recoveries were 97.20% (RSD= 1.75 %) for quercitrin and 99.97% (RSD= 2.88% [0]) for menthol. The contents of quercitrin and menthol in Shuangbaisan were 0.851 9~ 1.286 3 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、0.068 3~ 0.855 6 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** This method is reliable and simple, which provides a reference for the quality control of Shuangbaisan.

[**Key words**] Shuangbaisan; quercitrin; menthol; HPLC; GC

双柏散是广州中医药大学用于外科、骨伤科的经验方,由大黄、侧柏叶、黄柏、泽兰、薄荷五味药组成,常用比列为 2: 2: 1: 1: 1,具有活血化瘀、清热解毒、消肿止痛等功效,用于治疗跌打损伤早期、急性软组织损伤、急性踝关节扭伤、疮疡肿毒等有显著疗效^[1]。近年来,双柏散除在传统的骨伤科、外科广泛使用外,在妇科、肿瘤科、内科中的应用也相当广泛,用于治疗盆腔炎、急性阑尾炎、急性胰腺炎、胸膜炎、腹腔癌肿(肝癌、胃癌、胰腺癌等)疼痛等^[1]。因此,本研究为探讨双柏制剂的化学物质基础和提高其质量控制水平,对双柏散中主要有效成分进行多指标含量测定,并结合指纹图谱进行系统研究。课题组在首次研究报道了双柏散中 5 种游离蒽醌、2 种生物碱与没食子酸的含量测定方法基础上,本文继续首次报道双柏散中槲皮苷和薄荷脑含量测定方法。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(HP-1100,安捷伦),二极管阵列检测器(DAD);气相色谱仪(6890N,安捷伦),FID

检测器;SGH-300 高纯氢发生器(北京东方精华苑科技有限公司);SGK-2LB 低噪音空气泵(北京东方精华苑科技有限公司);高纯氮(纯度 99.999% 以上);槲皮苷(批号 111538-200403,含量测定用)、薄荷脑(批号 110728-200005,含量测定用)、水杨酸甲酯(批号 110707-200607,含量测定用)对照品均购自中国药品生物制品检定所;双柏散与阴性对照样品,由课题组自制;液相用乙腈为色谱纯,液相用水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 槲皮苷含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液-冰醋酸(16: 84: 2.1);检测波长为 352 nm;流速为 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;柱温为 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 。分离度大于 1.5,理论板数按槲皮苷峰计大于 12 000,阴性对照无干扰,结果见图 1。

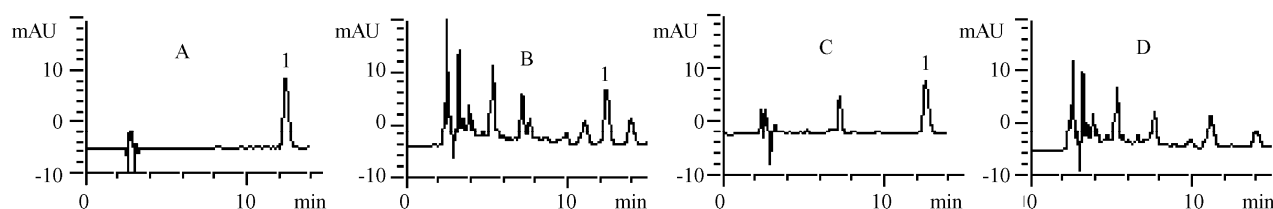


图 1 双柏散中槲皮苷含量测定的 HPLC 图谱

A. 对照品; B. 双柏散; C. 侧柏叶; D. 缺侧柏叶阴性对照; 1. 槲皮苷峰

2.1.2 对照品溶液的制备 取槲皮苷对照品适量,精密称定,用 60% 甲醇溶解配制成每 1 mL 含 0.02 mg 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取双柏散 0.35 g、侧柏叶粉末 0.1 g,精密称定,分别置于具塞三角瓶中,精

密加入 60% 甲醇 25 mL,称定重量,超声处理 40 min,取出,放凉,再称定重量,用 60% 甲醇补足减失的重量,摇匀,取续滤液,即得。

2.1.4 线性关系考察 取槲皮苷对照品适量,精密称定,用 60% 甲醇溶解配制成每 1 mL 含 0.204 8 mg

的对照品储备液。分别精密吸取槲皮苷对照品储备液各 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 6 mL 至 10 mL 量瓶中, 加 60% 甲醇稀释至刻度, 得系列浓度的对照品溶液。精密吸取各浓度的对照品溶液 10 μ L, 按上述色谱条件测定峰面积, 以进样量 (μ g) 为横坐标, 以峰面积 (A) 为纵坐标, 求得槲皮苷的回归方程为 $Y = 1905.075X - 4.4764$, 在 0.020 48 ~ 1.228 8 μ g 范围内, 线性关系良好, $r = 0.9999$ 。

2.1.5 仪器精密度试验 精密吸取同一对照品溶液各 10 μ L, 重复进样 5 次, 测定峰面积, 槲皮苷峰面积的 RSD 为 1.00%, 表示仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取双柏散供试品溶液各 10 μ L, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样, 按上述色谱条件测定峰面积, 结果表明槲皮苷峰面积的 RSD 为 0.52%, 表明在 12 h 内较稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一批双柏散 (批号 081229) 6 份, 按 2.1.3 项下的方法制备, 并测定峰面积, 结果双柏散中槲皮苷的平均含量为 1.242 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD = 1.62%), 表明双柏散的重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 分别取 6 份已知含量的双柏散 (批号 081229) 0.18 g, 精密称定, 精密加入槲皮苷对照品溶液 ($0.04536 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 5 mL, 按双柏散供试品溶液的制备与样品的测定同法操作, 结果槲皮苷的加样回收率为 97.20%, RSD 为 1.75%。

表 1 槲皮苷加样回收率试验 ($n = 6$)

编号	取样量 (g)	样品量 (mg)	对照品加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.1827	0.2269	0.2268	0.4479	97.44	97.20	1.75
2	0.1826	0.2268	0.2268	0.4463	96.78		
3	0.1824	0.2266	0.2268	0.4435	95.61		
4	0.1816	0.2256	0.2268	0.4518	99.71		
5	0.1824	0.2266	0.2268	0.4449	96.26		
6	0.1826	0.2268	0.2268	0.4477	97.41		

2.1.9 样品的测定 分别精密吸取对照品溶液、双柏散供试品溶液、侧柏叶供试品溶液 10 μ L, 注入液

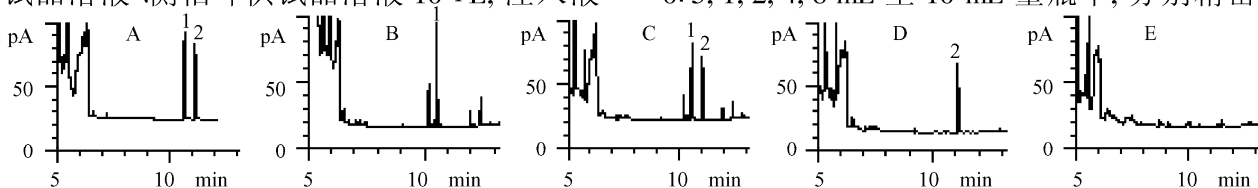


图 2 双柏散中薄荷脑含量测定的 GC 图谱

A. 对照品+ 内标物, B. 双柏散, C. 双柏散+ 内标物, D. 缺薄荷阴性对照+ 内标物
E. 缺薄荷阴性对照, 1. 薄荷脑峰, 2. 水杨酸甲酯内标物峰

相色谱仪中, 测定峰面积, 按外标法计算中各供试品溶液的含 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 结果见表 2。

表 2 双柏散及药材中槲皮苷含量测定 ($n = 2$)

名称	批号	含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) ($\bar{x} \pm s$)	名称	批号	含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) ($\bar{x} \pm s$)
双柏散	081229	1.2863 \pm 0.012	侧柏叶	安徽 080801	4.4824 \pm 0.090
双柏散	081230	1.1383 \pm 0.007	侧柏叶	安徽 080901	3.8871 \pm 0.020
双柏散	081231	0.8519 \pm 0.011	侧柏叶	广东 080801	2.9381 \pm 0.025

2.2 薄荷脑含量测定

2.2.1 色谱条件 以交联 5% 苯基甲基聚硅氧烷为固定相, HP-5 毛细管柱 (30 m \times 320 μ m, 0.25 μ m)。载气 N_2 : 25 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; H_2 : 40 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Air: 350 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样口温度: 210 $^\circ\text{C}$, FID 检测器温度为 280 $^\circ\text{C}$; 程序升温: 初始温度 50 $^\circ\text{C}$ 保持 2 min, 以 60 $^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 120 $^\circ\text{C}$ 后保持 5 min, 以 10 $^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 150 $^\circ\text{C}$, 再以 60 $^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 235 $^\circ\text{C}$ 后保持 10 min; 柱流量: 1.1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 分流比为 1:1, 进样量 1 μ L。

2.2.2 对照品溶液和内标溶液的制备

2.2.2.1 对照品溶液的制备 取薄荷脑对照品适量, 精密称定, 加无水乙醇溶解, 制成每 1 mL 含薄荷脑 0.02 mg 的对照品溶液。

2.2.2.2 内标溶液的制备 取水杨酸甲酯对照品适量, 精密称定, 加无水乙醇稀释成每 1 mL 含水杨酸甲酯 0.24 mg。

2.2.3 供试品溶液的制备 取双柏散 2.5 g, 薄荷粉末 0.5 g, 精密称定, 精密加入无水乙醇 25 mL, 称定重量, 浸泡过夜, 振摇 20 min, 再称定重量, 用无水乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过。精密吸取续滤液 5 mL 于 10 mL 量瓶中, 精密加入内标溶液 1 mL, 加无水乙醇至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 精密称取薄荷脑对照品 5.46 mg 于 50 mL 量瓶中, 加无水乙醇溶解, 定容至刻度, 摇匀, 得每 1 mL 含薄荷脑 0.1092 mg 的对照品储备液。分别精密吸取薄荷脑对照品溶液各 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 mL 至 10 mL 量瓶中, 分别精密加入内

标溶液 1 mL, 加无水乙醇至刻度, 摇匀, 得系列浓度的对照品溶液。精密吸取各浓度的对照品溶液 1 μL 注入气相色谱仪, 以薄荷脑进样量和薄荷脑与内标峰面积之比作线性回归, 结果, 薄荷脑回归方程为 $Y = 55.887X - 0.070$, 进样量在 0.002 73~ 0.087 36 μg 范围内呈良好线性, $r = 0.999 5$ 。

2.2.5 仪器精密度试验 精密吸取同一对照品溶液各 1 μL, 重复进样 5 次, 测定峰面积, 结果 RSD 为 0.84%, 表示仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取双柏散供试品溶液各 1 μL, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样, 按上述色谱条件测定峰面积, 计算 RSD 为 1.65%, 表明在 24 h 内较稳定。

2.2.7 重复性试验 取同一批双柏散(批号 081229) 6 份, 按 2.2.3 项下的方法制备, 测定薄荷脑与内标的峰面积比值, 计算薄荷脑的平均含量为 $0.421 8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD= 1.07%), 表明双柏散的重复性良好。

2.4.8 加样回收率试验 取 6 份已知含量的双柏散 081227(含量为 $0.342 3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 1.25 g, 精密称定, 精密加入薄荷脑对照品溶液 ($0.085 2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 5 mL, 按双柏散供试品溶液的制备与样品的测定同法操作, 结果薄荷脑的加样回收率为 99.97%, RSD 为 2.88%。见表 3。

表 3 薄荷脑加样回收率试验 ($n = 6$)

编 号	取样量 (g)	样品量 (mg)	对照品 加入量(mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率(%)	RSD (%)
1	1.250 1	0.427 9	0.426 0	0.871 6	104.14	99.97	2.88
2	1.249 7	0.427 8	0.426 0	0.849 3	98.94		
3	1.250 3	0.428 0	0.426 0	0.863 8	102.30		
4	1.249 7	0.427 8	0.426 0	0.840 4	96.85		
5	1.249 9	0.427 8	0.426 0	0.841 9	97.20		
6	1.250 0	0.427 9	0.426 0	0.855 6	100.40		

2.4.9 样品的测定 分别精密吸取对照品溶液、双柏散供试品溶液、薄荷供试品溶液 1 μL, 注入气相色谱仪中, 测定峰面积, 按内标法计算中各供试品溶液的含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 结果见表 4。

3 讨论

试验曾采用《中国药典》2005 版一部侧柏叶项下的槲皮苷含量测定的流动相甲醇-0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液-冰醋酸 (38: 62: 1.55)^[2], 结果峰形不

表 4 双柏散及药材中薄荷脑含量测定 ($n = 2$)

名称	批号	含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) ($\bar{x} \pm s$)	名称	批号	含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) ($\bar{x} \pm s$)
双柏散	081229	0.420 8 ± 0.005	薄荷	安徽 080716	1.871 5 ± 0.03
双柏散	081230	0.068 3 ± 0.000	薄荷	江西 080725	0.301 8 ± 0.005
双柏散	081231	0.855 6 ± 0.008	薄荷	安徽 080730	5.156 0 ± 0.06

尖锐, 阴性有干扰, 参考文献方法^[3]以乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液-冰醋酸 (18: 82: 2) 为流动相, 阴性无干扰, 且峰形尖锐对称, 故选择乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液-冰醋酸的流动相系统。

槲皮苷在 254 nm 和 352 nm 处有最大吸收, 254 nm 灵敏度较高, 但在 254 nm 波长下, 槲皮苷测定杂质峰干扰大, 而采用 352 nm 作为检测波长则可避免此干扰, 故选择 352 nm 作为检测波长。

侧柏叶中槲皮苷含量测定多采用甲醇、含水的甲醇或乙醇作为提取溶媒, 经试验以 60%~80% 甲醇和 50%~70% 乙醇为提取溶媒的提取效果较好, 含水甲醇为溶媒制备的供试液的槲皮苷 HPLC 色谱峰峰型较好, 因此本研究选用 60% 甲醇为提取溶媒。曾试验比较超声处理、回流提取的提取效果, 结果超声处理法效果优于回流提取法, 且超声处理 40 min 即可提取完全, 故采用简便的超声处理方法。

薄荷脑具有良好的促透性能, 是本制剂的促透的有效成分。文献报道^[4]薄荷脑在 150 °C 出峰达到良好的基线分离, 经试验表明, 该方法适用于本制剂薄荷脑的含量测定。预试验比较无水乙醇、乙醚为提取溶媒, 浸泡、超声处理、浸泡振摇、浸泡超声处理对薄荷脑的提取率, 结果表明无水乙醇浸泡过夜, 振摇 20 min, 该方法操作简单, 制得溶液薄荷脑的含量较高。

[参考文献]

- [1] 魏 刚. 双柏散临床应用与研究进展[J]. 广州中医药大学学报, 1998, (15): 60-62.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005: 149.
- [3] 谢文健, 黄月纯. HPLC 法测定阳春砂仁中槲皮苷的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 4(18): 310-311.
- [4] 曾惠芳, 黄耀海, 李湘力, 等. 百草油中薄荷脑、肉桂醛、丁香酚的含量测定[J]. 中成药, 2007, 4(29): 558-560.