

HPLC 法测定脑心清片中槲皮素的含量

江维克¹, 王 丽², 周 涛¹

(1 贵州省贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002; 2 贵州省益康制药有限公司, 贵州 贵阳 550002)

摘要: 目的: 建立脑心清片中槲皮素的高效液相色谱测定方法。方法: 采用 Diamonsil C₁₈ 柱, 甲醇-4g·L⁻¹ 磷酸(55:45) 为流动相, 检测波长 360nm。结果: 该法回收率为 102.8%。结论: 本测定方法为脑心清片的质量评价提供了可靠的依据。

关键词: 槲皮素; 高效液相色谱法; 脑心清片

中图分类号: R284.2 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)05-0012-02

脑心清片是以天然植物柿 (*Diospyros kaki* Thunb.) 叶为原料, 用现代科技手段提炼有效成分制成的主治心脑血管系统疾病的中药制剂。收载于卫生部药品标准《中成药成方制剂》第 20 册 (WS₃-B-3974-99)。柿叶含黄酮苷类、有机酸及香豆素类等多种活性成分。其制剂具有活血化瘀, 通络止痛, 除痰降浊, 清热利尿之功效, 临床用于冠心病心绞痛, 脑动脉硬化, 缺血性脑血管病等症。我们采用高效液相色谱法对脑心清片中的槲皮素含量进行测定, 获得较理想的结果。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪: 岛津 LC-10ATVP, SCL-10ACP (ver5.5) 色谱工作站; SPD-10AVP 紫外检测器; CTO-10AVP 柱温箱; CH-150 型超声清洗机。槲皮素对照品 (批号: 1537-200201, 中国药品生物制品检定所); 甲醇为色谱纯; 磷酸、磷酸二氢钾为分析纯; 水为重蒸馏水。脑心清片: 市售, 广州白云山中药厂生产。

2 实验方法和结果

2.1 对照品溶液的制备 取槲皮素对照品 10.28mg, 置 50mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得槲皮素对照品储备液 (0.2056mg/mL)。取储备液 5mL, 置 100mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得槲皮素对照品溶液 (每 1mL 含槲皮素 0.01028mg)。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取样品 0.5g, 置具塞烧瓶中, 加甲醇 20mL、25% 盐酸 5mL, 称定重量。水浴回流 30min, 冷却后称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 混匀, 滤过, 再用 0.45μm 的滤膜过滤, 即得。

2.3 色谱条件 色谱柱: Diamonsil (钻石) C₁₈, 5μm,

250mm × 4.6mm, 流动相: 甲醇-4g·L⁻¹ 磷酸(55:45); 流速: 1.0mL/min; 检测波长: 370nm; 柱温: 30℃; 理论塔板数按槲皮素峰计算不应低于 4500。在此条件下槲皮素与其它成分达到良好的分离, 且阴性对照液无影响 (图 1~3)。

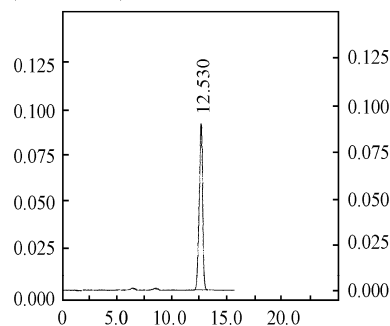


图 1 对照品图谱

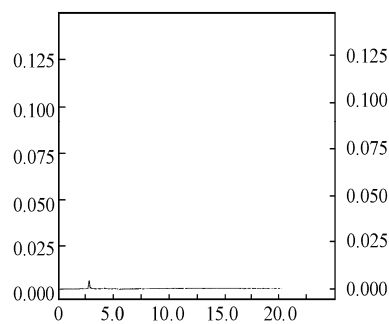


图 2 阴性样品图谱

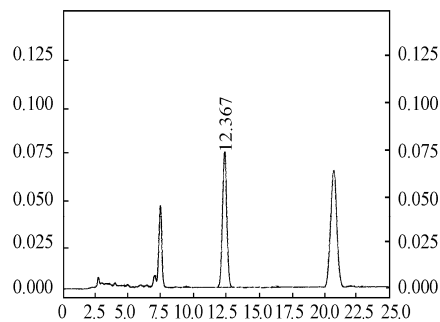


图 3 样品图谱

2.4 线性关系考察 取槲皮素对照品储备液 0.2056mg/mL, 分别配制成 0.00514、0.01028、0.02056、0.04112、0.06168、0.1028mg/mL 浓度的溶液, 各吸取 10 μ L 注入色谱仪, 按上述色谱条件进行测定, 以峰面积积分值 *A* 为纵坐标, 进样量(μ g) 为横坐标绘制标准曲线。得回归方程为 $Y = 10454388X - 102771.4$, $r = 0.9990$, 结果表明: 槲皮素在 0.0514 ~ 1.0290 μ g 范围内具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密称取样品 0.5010g, 依上述供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 吸取供试品溶液 10 μ L 注入色谱仪中测定峰面积, 重复测定 5 次, $RSD = 0.28\%$, 表明精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密称取样品 0.5037g, 依上述制备供试品方法制备供试品溶液, 每隔不同时间: 0、1、2、4、6、8, 吸取 10 μ L 注入色谱仪中测定峰面积, $RSD = 1.35\%$, 表明供试品溶液在 8h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 精密称取供试品 5 份, 分别为 0.5022、0.4981、0.5008、0.5084、0.5067g, 依次制备供试品溶液, 分别吸取供试品溶液 10 μ L 注入色谱仪中测定, 平均含量为 4.2265mg/g, $RSD = 0.68\%$, 表明本法的重复性良好。

2.8 回收率试验 采用加样回收法, 精密称取已知含量的样品(含量为 4.2265mg/g) 6 份, 每份重量为 0.2528、0.2500、0.2587、0.2537、0.2532、0.2530g, 分别置于具塞烧瓶中, 分别加入对照品溶液(0.2056mg/mL) 适量, 使加入的对照品量分别为样品中槲皮素量的 80、100、120%, 再加入一定量的甲醇, 按照供试品制备法制备供试品溶液, 分别吸取供试品溶液 10 μ L 注入色谱仪中测定, 结果如表 1。

平均回收率为 98.02%, $RSD = 1.89$ ($n = 6$)。结果表明, 本法具有良好的回收率。

2.9 样品测定 测试了 5 批样品, 结果如表 2。

3 讨论

3.1 本品系单味柿叶经用醋酸乙酯特殊工艺制成的纯中药制剂, 具有增加冠脉和脑部血流量, 改善

心、脑组织的供血供氧状态, 增加红细胞电泳率等作用。有效成分是以槲皮素为主的黄酮类成分。采用高效液相测定槲皮素含量, 将有利于产品质量控制。

表 1 槲皮素加样回收率试验结果

编号	称样量 (g)	样品中含 的量(mg)	加入量 (mg)	总量 (mg)	回收率 (%)	平均 回收率 (%)	RSD (%)
1	0.2528	1.0684	0.8224	1.8594	96.18	98.02	1.89
2	0.2500	1.0566		1.8397	95.22		
3	0.2587	1.0934	1.028	2.1189	99.76		
4	0.2537	1.0723		2.0889	98.89		
5	0.2532	1.0701	1.2338	2.2927	99.11		
6	0.2520	1.0651		2.2859	98.96		

表 2 样品测定结果

批号	编号	取样量(g)	含量(mg/g)	平均含量(mg/g)
021001	1	0.5318	3.2022	3.2032
	2	0.5209	3.2042	
030101	1	0.5489	3.2042	3.2401
	2	0.5302	3.2400	
021101	1	0.5233	4.1663	4.1736
	2	0.5204	4.1808	
030202	1	0.5216	4.1204	4.2265
	2	0.5267	4.1508	

3.2 研究中对回流提取、索氏提取等多种提取方法进行了试验, 结果以加 25% 盐酸超声提取效果最好。从色谱图看, 本品色谱峰较少, 经精密度、稳定性、重复性、回收率试验, 表明本法操作简单、准确性好, 可作为脑心清片的含量测定方法。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 173.
- [2] 郭澄, 张纯, 邵元福. HPLC 法测定南方菟丝子中槲皮素和山萘酚含量[J]. 中国药学杂志, 1999, 34(2): 113.
- [3] 仲黄, 张立立. HPLC 法测定侧柏叶中槲皮素含量[J]. 时珍国医国药, 1999, 10(7): 505.
- [4] 张敏, 张英, 李晨燕. HPLC 法测定贯叶连翘中槲皮素含量[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(11): 981.