

HPLC 法同时测定护肝颗粒中的槲皮素、山柰素和异鼠李素的含量

王建平 汪铜芳 陈晓峰 张咏梅 王建春 蒋志涛

(张家港市中医医院,江苏省企业研究生工作站,张家港,215600)

摘要 目的:建立护肝颗粒中槲皮素、山柰素、异鼠李素的含量测定方法。方法:采用高效液相色谱法测定护肝颗粒中槲皮素、山柰素、异鼠李素的含量,色谱柱 Hadera ODS-2 柱(4.6 mm×200 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.4% 磷酸,梯度洗脱,流速 1 mL/min,检测波长 360 nm,柱温为 35 ℃。结果:槲皮素、山柰素、异鼠李素分别在 0.0768~1.92 μg,0.02004~0.501 μg,0.021~0.525 μg 范围内进样量与峰面积积分值线性关系良好, r 分别为 0.9999、0.9998、0.9999,加样回收率分别为 97.4%、98.1%、97.9%, RSD 分别为 1.4%、1.8%、1.3%。结论:该方法准确、稳定,可以用来同时测定护肝颗粒中槲皮素、山柰素、异鼠李素的含量。

关键词 护肝颗粒;HPLC;槲皮素;山柰素;异鼠李素

Determination of Quercetin, Kaempferide and Isorhamnetin in Hupan Granules by HPLC

Wang Jianping, Wang Tongfang, Chen Xiaofeng, Zhang Yongmei, Wang Jianchun, Jiang Zhitao

(Zhangjiagang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhangjiagang 215600, China)

Abstract Objective: To develop method for determining quercetin, kaempferide and isorhamnetin in hupan granules by HPLC. **Methods:** HPLC was used for the determination of quercetin, kaempferide and isorhamnetin. The column was set as Hadera ODS-2 (4.6 mm×200 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol-0.4% phosphoric acid, and the gradient elution was used. The detection wavelength was set at 360 nm and the flow rate was 1.0 mL·min. **Results:** quercetin, kaempferide and isorhamnetin showed a good linear relationship in the range of 0.0768~1.92 μg ($r=0.9999$), 0.02004~0.501 μg ($r=0.9998$) and 0.021~0.525 μg ($r=0.9999$). The average recovery of quercetin was 98.1% with RSD of 1.4%, the average recovery of kaempferide was 98.1% with RSD of 1.8%, and the average recovery of isorhamnetin was 97.9% with RSD of 1.3%. **Conclusion:** The method is accurate and stable, which can be used for the determination of quercetin, kaempferide and isorhamnetin in hupan granules.

Key Words Hupan granules; HPLC; Quercetin; Kaempferide; Isorhamnetin

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.04.049

护肝颗粒由垂盆草、虎杖、茵陈、黄柏、金钱草等七味中药组成,是根据我院名中医长期的临床经验方制备而成的复方中药制剂。具有清热利湿、益肝化痰、疏肝止痛的功效,临床常用于治疗急慢性肝炎,疗效确切。处方中君药垂盆草具有清热解毒、清热利湿的功效,是本制剂发挥其保肝降酶临床疗效的重要组成部分,化学成分研究表明,垂盆草中主要有效成分是以槲皮素、山柰素、异鼠李素等为代表的各种黄酮类成分及蛋白质、氨基酸、糖类、皂苷类、生物碱类和甾苷类成分^[1-2]。护肝颗粒在我院生产及临床应用中,质量控制方面只做了粒度及装量差

异等方面的要求,未对其有效成分进行含量测定及限度要求,为确保临床使用中安全有效,提高制剂质量,本文参考有关文献,建立使用高效液相色谱仪同时测定护肝颗粒中的槲皮素、山柰素、异鼠李素 3 种主要的黄酮类成分的含量测定的方法,为全面控制药品质量,也为我院该医院制剂的质量控制及质量标准的制定和提高提供一定的参考依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2998 紫外检测器, Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司)、AG135 型电子天平(瑞士梅特勒公司)。

基金项目:苏州市科技发展计划(应用基础研究—医药卫生)项目(编号:SYSD2015162)

作者简介:王建平(1973.01—),男,学士,副主任中药师,研究方向:中药药剂及调剂工作, Tel: (0512) 56380621, E-mail: wushuang232@sohu.com

通信作者:蒋志涛(1988.06—),男,硕士,药师,研究方向:中药药剂及质量分析工作, E-mail: 253170992@qq.com

1.2 试剂 甲醇为色谱纯(德国默克);水为娃哈哈纯净水;盐酸为分析纯。

1.3 分析样品 槲皮素对照品(批号 13122506),山柰素对照品(批号 14010701),异鼠李素对照品(批号 13053007),均购于成都曼斯特科技发展有限公司;护肝颗粒由本院制剂室自制(批号:150323、150408、150612)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,色谱柱为 Hedera ODS-2 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm);以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,选用不同比例的 0.4% 磷酸溶液(A):甲醇(B)为流动相,梯度洗脱^[3]。条件见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

T(min)	V(mL · min ⁻¹)	A(%)	B(%)
0 ~ 12	1	45	55
14 ~ 24	1	50	50
26 ~ 36	1	20	80
38 ~ 48	1	45	55

2.2 对照品溶液的制备 精密称取槲皮素、山柰素、异鼠李素 19.20 mg、5.01 mg、5.25 mg,分别置于不同的 10 mL 容量瓶中,加适量甲醇溶解,并用甲醇定容至刻度,摇匀备用。分别取 1 mL 上述对照品溶液置于 25 mL 容量瓶中,用甲醇稀释定容至刻度,制成每 1 mL 分别含槲皮素、山柰素、异鼠李素分别为 0.076 8 mg、0.020 04 mg、0.021 mg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备取本品颗粒适量,研细,精密称取约 3.0 g,置于具塞锥形瓶中,精密量取甲醇-25% 盐酸溶液(4:1)混合溶液 25 mL,称定重量,加热回流 1 h,放冷,用上述混合溶液补足重量,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.4 专属性试验 分别吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照液各 10 μL,注入液相色谱仪,按上述“2.2”项下色谱条件分别进行测定,结果发现槲皮素、山柰素、异鼠李素三者分离度良好,符合分析要求;在供试品溶液中槲皮素、山柰素、异鼠李素与对照品有相同的保留时间,与供试品中其他成分的分度度较好,阴性对照对槲皮素、山柰素、异鼠李素均无干扰。色谱图见图 1。

2.5 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液各 1、2、4、6、10、12 μL 进样,测定峰面积,以槲皮素、山柰素、异鼠李素的进样量(μg)为横坐标 X,以三者峰面积为纵坐标 Y,各自进行线性回归,槲皮素线性

回归方程为: $Y = 3073029.8X - 13394.3$, $r = 0.9999$; 山柰素的线性回归方程为 $Y = 3063630.5X - 6196.7$, $r = 0.9998$; 异鼠李素的线性回归方程为: $Y = 2594632.9X - 9285.8$, $r = 0.9999$ 。结果表明槲皮素、山柰素、异鼠李素分别在 0.0768 ~ 1.92 μg, 0.02004 ~ 0.501 μg, 0.021 ~ 0.525 μg 线性范围内,线性关系良好。

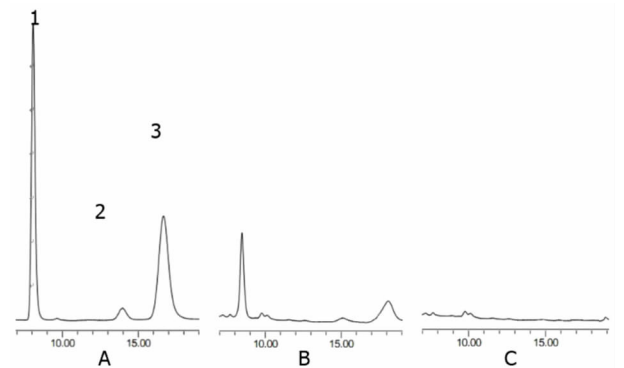


图 1 对照品、供试品、阴性对照溶液的 HPLC 图

注:A 混合对照品;B 供试品;C 阴性样品(1 槲皮素;2 山柰素;3 异鼠李素)。

2.6 中间精密度试验 精密吸取每 1 mL 分别含槲皮素、山柰素、异鼠李素分别为 0.076 8 mg、0.020 04 mg、0.021 mg 的混合对照品溶液按照上述“2.2”项下色谱条件,重复进样 6 次进行分析测定,进样量均为 10 μL。分别测定槲皮素、山柰素、异鼠李素峰面积,结果计算得出槲皮素、山柰素、异鼠李素的峰面积的 RSD 分别为 0.6%、0.9%、1.1%,该试验结果表明精密仪器的精密度良好,可用于进一步试验分析。

2.7 供试品溶液稳定性试验 取同一批样品,按“2.1”项下供试品溶液的制备方法制成供试品溶液,于室温下放置,分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 后吸取 10 μL 进样分析测定,在“2.2”项下色谱条件进行测定供试品中槲皮素、山柰素、异鼠李素峰面积,结果槲皮素、山柰素、异鼠李素峰面积的 RSD 分别为 0.8%、1.2%、1.3%,试验结果表明,按此方法制备的供试品溶液稳定性良好。

2.8 重复性试验 取同一批样品,平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项下供试品溶液的制备方法,精密吸取供试品溶液 10 μL 进样,在“2.2”项下色谱条件进行分析测定,结果槲皮素、山柰素、异鼠李素的平均含量分别为 1.15 mg/g、0.31 mg/g、0.47 mg/g,各成分含量的 RSD 分别为 1.3%、1.0%、1.2%,均符合要求,试验结果表明该方法重复性良好。

2.9 回收率试验 取已知含量样品(批号为 140408,槲皮素、山柰素、异鼠李素的含量分别为

1. 15 mg/g、0. 31 mg/g、0. 47 mg/g)6 份,分别精密加入一定量的槲皮素对照品溶液(1. 92 mg/mL)、山柰素对照品溶液(0. 501 mg/mL)、异鼠李素对照品溶液(0. 525 mg/mL),上述溶液按“2. 1”项下供试品溶液的制备方法分别制备 6 份供试品溶液,按“2. 2”项下色谱条件进样,分析测定,测定方法的回收率。测定结果见表 2、表 3、表 4。

表 2 槲皮素的加样回收率试验结果(n=6)

取样量 /g	原有量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 %	平均值 /%	RSD /%
1. 5321	1. 7619	1. 92	3. 6290	97. 0	97. 4	1. 4
1. 5326	1. 7625	1. 92	3. 6843	100. 1		
1. 4998	1. 7248	1. 92	3. 6001	97. 4		
1. 5151	1. 7424	1. 92	3. 5944	96. 1		
1. 5143	1. 7414	1. 92	3. 6126	97. 2		
1. 5434	1. 7749	1. 92	3. 6363	96. 7		

表 3 山柰素的加样回收率试验结果(n=6)

取样量 /g	原有量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 %	平均值 /%	RSD /%
1. 5321	0. 4750	0. 501	0. 9656	97. 8	98. 1	1. 8
1. 5326	0. 4751	0. 501	0. 9547	95. 5		
1. 4998	0. 4649	0. 501	0. 9589	98. 5		
1. 5151	0. 4697	0. 501	0. 9613	98. 0		
1. 5143	0. 4694	0. 501	0. 9605	97. 9		
1. 5434	0. 4784	0. 501	0. 9847	101. 1		

表 4 异鼠李素的加样回收率试验结果(n=6)

取样量 /g	原有量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 %	平均值 /%	RSD /%
1. 5321	0. 7201	0. 525	1. 2293	97. 8	97. 9	1. 3
1. 5326	0. 7203	0. 525	1. 2179	96. 2		
1. 4998	0. 7049	0. 525	1. 2200	98. 6		
1. 5151	0. 7121	0. 525	1. 2286	98. 8		
1. 5143	0. 7117	0. 525	1. 2317	99. 3		
1. 5434	0. 7254	0. 525	1. 2243	96. 4		

2. 10 样品测定结果 分别取 3 个批号(150323、150408、150612)的护肝颗粒,按“2. 1”项下的供试品溶液的制备方法,分别制得 3 批供试品溶液。各精密吸取 10 μL 溶液,分别进样,进而计算槲皮素、山柰素、异鼠李素的含量,槲皮素、山柰素、异鼠李素的平均含量分别为 1. 15、0. 31、0. 47 mg/g,结果见表 5。

表 5 样品测定结果

批号	槲皮素(mg/g)	山柰素(mg/g)	异鼠李素(mg/g)
150323	1. 1565	0. 3156	0. 4743
150408	1. 1543	0. 3121	0. 4721
150612	1. 1618	0. 3169	0. 4806
平均值(mg/g)	1. 1575	0. 3147	0. 4757

3 讨论

通过比较不同的提取方式发现,相同的提取时间,回流提取的提取率高于超声提取法,且回流提取的方法重复性高,所以本文采取回流法提取样品。通过比较不同的回流提取时间,结果发现,回流 1 h 后 3 种成分的总含量较高,继续增加回流时间 3 种成分的总量不再增加,反而有所减少,可能是因为持续加热对黄酮类成分的稳定性有影响,因此最终选择回流 1 h 提取^[4-6]。

本实验最初考察了不同流动相进行液相试验,先参考了《中华人民共和国药典》一部中垂盆草药材项下的含量测定方法,采用流动相条件为甲醇-0. 4% 磷酸溶液(45: 55)进行试验研究,结果发现,该液相条件下,异鼠李素色谱峰的保留时间太长,因此,笔者考察了其他流动相系统。在流动相的选择中,笔者分别考察了甲醇-磷酸溶液系统、乙腈-磷酸溶液系统及各种系统不同比例的流动相,结果发现使用甲醇-0. 4% 磷酸为流动相时,槲皮素、山柰素、异鼠李素能与溶液中其他组分色谱峰较好地分开,但山柰素和异鼠李素两者的峰相聚太近,因此 12 min 后增加磷酸的比例^[7],增加洗脱极性,调整后结果显示山柰素和异鼠李素色谱峰能够较好地分开,且峰形较好。

经化学研究表明,垂盆草中主要有效成分是以槲皮素、山柰素、异鼠李素为代表的各种黄酮类成分及蛋白质、氨基酸、糖类、皂苷类、生物碱类和氰苷类等成分^[8]。黄酮类成分是垂盆草发挥临床疗效的主要活性成分^[9-11],其中黄酮类成分主要包括槲皮素、山柰素和异鼠李素等。因此,试验研究中选择垂盆草中的槲皮素等 3 种主要的黄酮类成分作为质量控制的指标成分^[12]。

本实验通过比较不同的提取方法、时间及提取溶剂,最终选择最佳的回流提取方法,参考相关文献采用甲醇-磷酸按不同比例梯度洗脱的方法建立高效液相色谱同时测定护肝颗粒中 3 种主要的黄酮类成分槲皮素、山柰素、异鼠李素的含量的方法。槲皮素、山柰素、异鼠李素分别在 0. 076 8 ~ 1. 92 μg, 0. 020 04 ~ 0. 501 μg, 0. 021 ~ 0. 525 μg 范围内进样量与峰面积积分值线性关系良好,r 分别为 0. 9999、0. 9998、0. 9999,加样回收率分别为 97. 4%、98. 1%、97. 9%,RSD 分别为 1. 4%、1. 8%、1. 3%。表明该方法线性关系良好。仪器的精密度、方法重复性、样品稳定性、加样回收率等均符合相关要求,该方法可为

(下接第 908 页)

中医学中无胃肠功能障碍的名称,但根据其临床表现,可归属于中医学“肠痹”“腹痛”“腹胀”“痞满”“呕吐”等范畴。腹部手术患者因禁食、灌肠、麻醉、腹腔脏器暴露等,导致脾胃功能障碍,升降失常,气机紊乱,气血生化乏源,肠失温煦濡养,运化传导无力,腑内浊气壅滞,有形之邪阻塞,腑气不通。脾失健运,清阳不升,浊阴不降,水湿内阻,气机不畅。加之手术损伤,致血溢脉外,古人谓“离经之血便是瘀”,瘀血内停。因此,本病主要的病机为气滞血瘀。故方中选用辛、温之木香、厚朴行气宽中,开郁导滞,消胀除满,使清阳得升,浊阴得降,二药共为君药。臣药选用桃仁、乌药、莱菔子,桃仁不仅活血祛瘀,又能润肠通便,使肠中糟粕得泄,积滞得除。木香、厚朴配桃仁,气行则血行,瘀血去则气机运行无阻。乌药行气止痛,且与厚朴合用以散寒除湿。莱菔子配木香以健脾消食除胀,配厚朴以燥湿消痰,降气除满。佐以赤芍、番泻叶,赤芍活血化瘀止痛,番泻叶泻下通便。诸药合用,具有行气止痛、活血祛瘀、降气除满的功效,使气血运行正常,腑气通,积滞除。

经过前期香朴顺气颗粒中每个药进行筛选,本文确定选用赤芍、厚朴进行定性鉴别,结果显示该方法稳定可靠,重现性好,与对照品在相同位置有相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰。本实验仅对药材进行了定性鉴别,应当建立定量分析方法,测定主药含量,更好地控制药品质量,但由于条件所限,定量分析方法有待于进一步的探讨和研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015 版)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 熊辉,石金敏,周灿,等. 复方肤清洗剂中赤芍的定性鉴别和定量分析[J]. 中国药师,2016,19(3):616-617.
- [3] 吴金萍,刘志军. 赤芍六味退黄颗粒的薄层色谱定性鉴别[J]. 内蒙古医学杂志,2015,47(1):72-73.
- [4] 徐庆仪,徐济恒. 清瘀颗粒中赤芍、金银花、甘草的薄层色谱鉴别[J]. 内蒙古中医药,2011,37(5):87.
- [5] 刘燕,郑笑为,姚令文,等. 止痛紫金丸质量标准的研究[J]. 中国药事,2010,24(6):573-581.
- [6] 谢艳,朱太咏,秦娜. 益气生骨颗粒剂的质量标准研究[J]. 世界中医药,2012,7(1):77-78.
- [7] 丁曼,华洁,周福军. 等. 和胃颗粒质量标准研究[J]. 西北药学杂志,2016,31(1):18-22.
- [8] 罗海东,李智勇. 健脾和中颗粒的质量控制方法研究[J]. 今日药学,2016,26(1):42-45.
- [9] 陈锦,倪立坚,何琳俐. 胃得安胶囊的鉴别方法研究[J]. 海峡药学,2015,27(12):77-79.
- [10] 公国睿,赵新华,李学辉. 中西医结合治疗腹部术后腹胀的疗效观察[J]. 四川中医,2011,29(8):107-108.
- [11] 刘子冬,王芳,王芳,等. 清胃理肠胶囊质量标准的研究[J]. 环球中医药,2014,7(5):359-361.
- [12] 邹常林,于向阳. 中医药对术后胃肠功能恢复的研究进展[J]. 天津中医药大学学报,2016,35(4):284-288.
- [13] 刘峰,高士杰. 大黄治疗休克后胃肠功能障碍的临床研究[J]. 中国急救医学,2003,23(1):38-39.
- [14] 陈俊霞,李淑然,王希琴. 九味承气口服液对开腹术后肠蠕动功能恢复的影响[J]. 临床合理用药,2011,4(1A):57-58.
- [15] 李泽平,王运生. 加减四磨汤对腹部手术后肠功能恢复的疗效观察[J]. 武警医学院学报,2004,13(4):316-317.

(2016-04-06 收稿 责任编辑:徐颖)

(上接第 905 页)

该制剂的质量控制提供一定的依据。

参考文献

- [1] 袁杰,程志清. HPLC 法测定垂盆草颗粒中槲皮素的含量[J]. 中国药事,2009,23(5):467-468,471.
- [2] 宋玉华,李春雨,郑燕,等. 垂盆草的研究进展[J]. 中药材,2010,33(12):1973-1975.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015 年版)一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [4] 潘志文,莫结丽. 垂盆草配方颗粒的质量标准研究[J]. 现代中药研究与实践,2013,27(4):56-58.
- [5] 叶立红,李鹏,彭小燕. HPLC 法测定垂盆草配方颗粒中黄酮类成分的含量[J]. 中国药师,2013,16(8):1161-1163.
- [6] 谭雄斯. HPLC-UV-ELSD 法测定益肝乐颗粒中槲皮素、山柰素、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d[J]. 中成药,2014,36(3):531-535.
- [7] 刘知远,沈廷明,吴仲玉. RP-HPLC 法同时测定福建产金线莲中

槲皮素、山柰素、异鼠李素的量[J]. 中草药,2015,46(3):432-434.

- [8] 蒋俊春,孟建升,杨文文. HPLC 法测定八味接骨胶囊中山柰素的含量[J]. 中国药事,2012,26(12):1374-1376.
- [9] 梁大连,杨民生,李宁,等. HPLC 测定过山厥提取物中山柰素含量[J]. 食品与药品,2013,15(1):45-47.
- [10] 秦洁,马果玉,马剑平. 垂盆草颗粒质量标准研究[J]. 中成药,2010,32(1):168-170.
- [11] 杨娉娉,陆红,吴莲凤,等. 垂盆草提取物对 TGF- β 1 诱导的肾小管上皮细胞-肌成纤维细胞分化和基质累积的影响[J]. 温州医科大学学报,2015,45(4):243-247.
- [12] 曾军英,李胜华,伍贤进,等. 垂盆草醇提物抑制 HepG2 细胞 STAT-3 信号通路诱导细胞凋亡的研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(17):3349-3352.

(2015-12-14 收稿 责任编辑:王明)