

HPLC 同时测定肝尔舒微丸中 3 种有效成分的含量

毛敏珏, 严国俊, 侯振山, 蒋志涛, 张婷, 潘金火*

(南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 同时测定肝尔舒微丸中的槲皮素、山奈素和异鼠李素含量的方法。方法: 色谱柱为 Heder ODS-2 柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相 0.4% 磷酸溶液(A)-甲醇(B)梯度洗脱, 检测波长 360 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C。结果槲皮素、山奈素和异鼠李素分别在 0.042 8~0.428, 0.003 49~0.034 9, 0.041 8~0.418 μg 呈良好的线性关系, *r* 分别为 0.999 8, 0.999 1, 0.999 2; 平均加样回收率槲皮素 99.88%, RSD 0.77% (*n* = 6); 山奈素为 99.44%, RSD 1.2%; 异鼠李素为 97.50%, RSD 1.5% (*n* = 6)。结论: 该法结果准确, 重复性好, 可用于肝尔舒微丸的质量控制。

[关键词] 肝尔舒微丸, 槲皮素, 山奈素, 异鼠李素, 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)24-0107-03

HPLC Simultaneous Determination of Three Active Components in Ganershu Pellets

MAO Min-jue, YAN Guo-jun, HOU Zhen-shan, JIANG Zhi-tao, ZHANG Ting, PAN Jin-huo*

(School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method of determining quercetin, kaempferide and isorhamnetin in Ganershu pellets by HPLC. **Method:** An Heder ODS-2 column (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) was used at 30 °C with the mobile phase of 0.4% phosphate (A) and methanol (B) by gradient elution. The detection wavelength was set at 360 nm and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** The quercetin, kaempferide and isorhamnetin had good linear relationship within the ranges of 0.042 8-0.42 8 μg (*r* = 0.999 8), 0.003 49-0.034 9 μg (*r* = 0.999 1), 0.041 8-0.418 μg (*r* = 0.999 2). The average recoveries were 99.88%, 99.44% and 97.50% with RSD 0.77% (*n* = 6), 1.2% (*n* = 6), 1.5% (*n* = 6) respectively. **Conclusion:** The method was accurate and reproducibility was good. The method can be used for the quality control of Ganershu pellets.

[Key words] Ganershu pellets; quercetin; kaempferide; isorhamnetin; HPLC

肝尔舒微丸由垂盆草、绞股蓝、黄精、枳壳、陈皮等共 14 味中药组成, 并对其中的有效部位群进行富集, 流化床制成微丸, 然后分装胶囊的中药六类新药, 具有疏肝健脾、清化湿热之效, 对急、慢性肝炎肝郁脾虚, 湿热结证具有十分显著的治疗作用^[1-3]。方中垂盆草为君药, 含有黄酮类及垂盆草苷等。文献^[4]多报道垂盆草苷为垂盆草的主要活性成分。

具有明显的保肝作用, 但是研究表明垂盆草苷不稳定, 受热或遇碱易分解, 贮藏过程中也可酶解, 以其为指标来评价制剂质量很难保证方法的重复性和稳定性^[5]。由于垂盆草中富含黄酮类化合物^[6], 且黄酮类成分化学性质较为稳定、药理作用明确, 因此为了更好的控制制剂质量, 保证垂盆草药用疗效, 本实验建立了 HPLC 同时测定槲皮素、山奈素和异鼠李素 3 种有效成分含量的方法, 并且为垂盆草及其肝尔舒微丸的质量评价提供一种方法。

1 材料

Waters515 高效液相色谱仪, 717 自动进样器, Water-2996 紫外检测器, Empower 色谱工作站, AG135 型电子天平(瑞士梅特勒)。

[收稿日期] 20120114(001)

[基金项目] 江苏省科技支撑计划项目(BE2009682)

[第一作者] 毛敏珏, 硕士, 从事药物新剂型及新技术研究, Tel: 15996255143, E-mail: wjmj@ yahoo. com. cn

[通讯作者] * 潘金火, 硕士生导师, 博士后, Tel: 025-85811517, E-mail: panjinhua@163. com

槲皮素对照品(批号 10081-9905)、山奈素对照品(批号 110861-200303)、异鼠李素对照品(批号 110860-200204)均来自中国药品生物制品检定所;肝尔舒微丸(批号 20110901,20110902,20110910)实验室自制,甲醇、磷酸为色谱纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Hedera ODS-2 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相 0.4% 磷酸溶液(A)-甲醇(B)梯度洗脱见表 1。检测波长 360 nm,柱温 30 °C,流速 1 mL·min⁻¹。

表 1 梯度洗脱程序

t/min	A/%	B/%
0~12	45	55
12~24	50	50
24~36	20	80
36~48	45	55

2.2 溶液的配置

2.2.1 混合对照品溶液 分别称取槲皮素、山奈素、异鼠李素对照品适量,精密称定,加甲醇溶解制成每 1 mL 含槲皮素 0.042 8 mg,山奈素 0.003 49 mg,异鼠李素 0.041 8 mg 的混合对照品溶液。

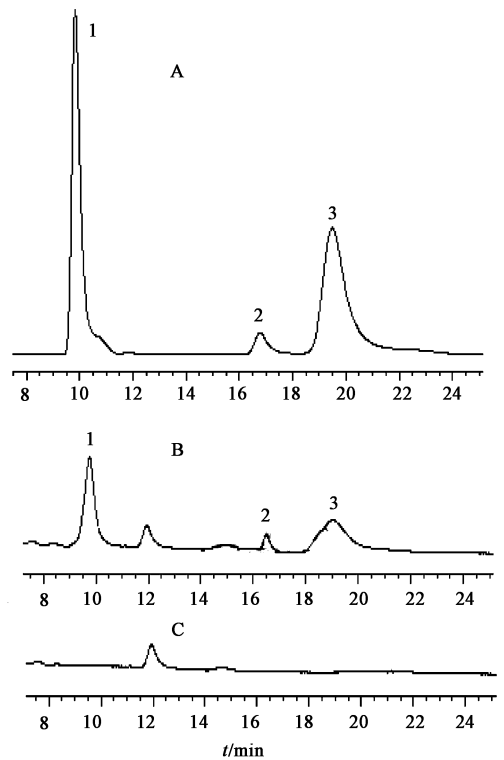
2.2.2 供试品溶液^[7-9] 取本品微丸,研细,取约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇-25% 盐酸溶液(4:1)混合溶液 25 mL,称定质量,加热回流 1 h,放冷,再称定质量,用甲醇-25% 盐酸溶液(4:1)混合溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按照肝尔舒生产工艺、处方比例,制得缺垂盆草的阴性微丸,照供试品溶液的制备方法制备,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 精密吸取上述混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL,按照 2.1 项色谱条件进行测定。供试品溶液色谱图中,呈现与对照品保留时间相同的峰,并且能达到基线分离;阴性对照溶液在对应的保留时间处无吸收峰,表明其他几味药对槲皮素、山奈素和异鼠李素的测定无干扰,见图 1。

2.3.2 线性关系考察 精密吸取上述混合对照品溶液 1,2,4,6,8,10 μL 进样,按照 2.1 项色谱条件进行测定。以各对照品进样量(μg)为横坐标(X),相应的对照品峰面积积分为纵坐标(Y),进行回归处理得回归方程 $Y_{\text{槲皮素}} = 3\ 717\ 853X - 7\ 994.01$



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性对照液;
1. 槲皮素;2. 山奈素;3. 异鼠李素

图 1 对照品,供试品,阴性对照液的 HPLC

($r = 0.999\ 8$); $Y_{\text{山奈素}} = 3\ 557\ 073.4X - 2\ 193.3$ ($r = 0.999\ 1$); $Y_{\text{异鼠李素}} = 3\ 569\ 200.3X - 19\ 137.4$ ($r = 0.999\ 2$),结果表明,槲皮素在 0.042 8 ~ 0.428 μg、山奈素 0.003 49 ~ 0.034 9 μg、异鼠李素 0.041 8 ~ 0.418 μg 线性关系良好。

2.3.3 精密度试验 精密吸取上述混合对照品溶液重复测定 6 次,按照上述色谱条件进行测定,进样量 6 μL。槲皮素、山奈素、异鼠李素的峰面积的 RSD 值分别为 1.0%,1.2%,1.7%,表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取上述供试品溶液(批号 20110901)分别于配制后的 0,2,4,6,8,12 h 测定槲皮素、山奈素、异鼠李素的峰面积,进样量 10 μL。相应的 3 种成分峰面积的 RSD 分别为 1.8%,1.2%,1.9%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 取同一批次肝尔舒微丸(批号 20110901),共 6 份,分别按上述供试品的制备方法制得供试品溶液,按照上述色谱条件进行测定,进样量 10 μL。制剂中槲皮素、山奈素、异鼠李素的平均质量分数分别为 2.383,0.306 0,2.114 mg·g⁻¹,RSD 分别为 1.0%,1.2%,1.5%,表明方法重复性

良好。

2.3.6 加样回收试验 取已知含量的肝尔舒微丸,共6份,各约0.50 g,精密称定,分别精密加入一定质量浓度的槲皮素($0.2412\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)、山奈素对照品溶液($0.02754\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)、异鼠李素对照品溶液($0.1976\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)各5 mL,各精密加甲醇5 mL和25%盐酸溶液5 mL,即配制成甲醇-25%盐酸溶液(4:1)混合溶液各25 mL,分别按上述供试品的制备方法制得供试品溶液,照上述色谱条件进行测定,分别进样10 μL ,计算加样回收率,结果见表2。

表2 肝尔舒中3种成分加样回收率试验($n=6$)

成分	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
槲皮素	1.191	1.206	2.404	101.1	99.88	0.77
	1.173	1.206	2.372	99.91		
	1.189	1.206	2.383	99.48		
	1.210	1.206	2.395	98.78		
	1.197	1.206	2.399	100.2		
	1.185	1.206	2.383	99.80		
山奈素	0.1530	0.1377	0.2883	98.29	99.44	1.2
	0.1493	0.1377	0.2852	98.67		
	0.1607	0.1377	0.2972	99.12		
	0.1524	0.1377	0.2885	98.87		
	0.1710	0.1377	0.3089	100.1		
	0.1613	0.1377	0.3011	101.6		
异鼠李素	1.057	0.998	2.021	96.57	97.50	1.5
	1.064	0.998	2.031	96.84		
	1.048	0.998	2.019	97.35		
	1.055	0.998	2.015	96.20		
	1.079	0.998	2.053	97.65		
	1.081	0.998	2.083	100.4		

2.4 样品含量测定 取3批样品按供试品溶液制备方法制得供试品溶液,并按上述色谱条件进行测定,见表3。

3 讨论

参考2010年版《中国药典》,以甲醇-0.4%磷酸不同比例为流动相进行等度、梯度洗脱实验,由于异

鼠李素、山奈素在等度洗脱时分离度不好,为简便检测,节约时间,着重考察了梯度洗脱,并优化了梯度洗脱程序。

表3 3种成分的样品含量测定($n=3$)

批号	槲皮素 /mg·g ⁻¹	RSD /%	山奈素 /mg·g ⁻¹	RSD /%	异鼠李素 /mg·g ⁻¹	RSD /%
20110901	2.383		0.3060		2.114	
20110902	2.359	0.85	0.3041	0.98	2.108	0.26
20110910	2.399		0.3100		2.119	

分别取槲皮素、山奈素、异鼠李素的对照品溶液,在200~400 nm进行扫描,结果槲皮素在255,371 nm处有吸收峰,山奈素在266,324,365 nm处有吸收峰,异鼠李素在254,307,370 nm处有吸收峰。根据各成分的吸收情况,发现在360 nm处3种成分均表现较好的色谱峰形和检测灵敏度,且杂质干扰较少。

[参考文献]

- [1] 谭勇,杨静,赵宁,等.利用文本挖掘技术探索中药治疗慢性乙型肝炎的用药规律[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(24):232.
- [2] 萧焕明,谢玉宝,池晓玲,等.池晓玲论肝功能季节性变化的临证经验[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(15):280.
- [3] 曹敏玲.乙型肝炎病毒基因水平研究进展及治疗动态[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(12):220.
- [4] 魏大明,阎玉凝,关昕璐,等.垂盆草的化学成分研究[J].北京中医药大学学报,2003,26(4):59.
- [5] 潘金火,罗兰,何满堂,等.垂盆草药材质量控制方法研究[J].成都中医药大学学报,2002,25(1):44.
- [6] 张洪超,兰天,张晓辉.垂盆草化学成分与药理作用研究进展[J].中成药,2005,27(10):1201.
- [7] 燕成英.HPLC测定脉通颗粒中异鼠李素的含量[J].中国中药杂志,2008,33(18):2149.
- [8] 张可峰,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.
- [9] 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):84.

[责任编辑 顾雪竹]