

RP-HPLC 法测定普乐安片中槲皮素和山柰素

郑国平

浙江省舟山市食品药品检验所, 浙江 舟山 316000

摘要: 目的 建立 RP-HPLC 法测定普乐安片中槲皮素和山柰素的方法。方法 色谱柱为 Hypersil ODS2 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.4%磷酸溶液 (49:51), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 360 nm, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL。结果 槲皮素和山柰素分别在 1.526~305.300 μg/mL ($r=1.000\ 0$)、2.26~451.90 μg/mL ($r=1.000\ 0$) 线性关系良好; 平均回收率分别为 98.05% (RSD=1.72%) 和 99.82% (RSD=1.23%)。结论 方法操作简便、准确, 重现性好, 可用于普乐安片的质量控制。

关键词: 普乐安片; 槲皮素; 山柰素; 反相高效液相色谱; 质量控制

中图分类号: R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)04-0719-03

RP-HPLC determination of quercetin and kaempferol in Pule'an Tablets

ZHENG Guo-ping

Zhoushan Municipal Institute for Food and Drug Control of Zhejiang Province, Zhoushan 316000, China

Key words: Pule'an Tablets; quercetin; kaempferol; RP-HPLC; quality control

普乐安片收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》中药成方制剂第十四册, 由油菜花粉经适宜加工制成, 具补肾固本的功效, 用于治疗肾气不固、腰膝酸软、尿后余沥或失禁, 及慢性前列腺炎、前列腺增生具有上述症候者。原标准中的质控方法为氮测定法。油菜花粉中含有丰富的黄酮类化合物, 以山柰素和槲皮素及其葡萄糖苷为主^[1]; 黄酮苷类化合物是油菜花粉的主要活性成分之一^[2], 具有缓解动脉粥样硬化和前列腺异常、降低胆固醇、调节内分泌的作用^[3-4]。曾有文献报道采用 HPLC 法对普乐安片中槲皮素^[5]和芦丁^[6]进行测定。本实验建立了 RP-HPLC 法同时测定普乐安片中槲皮素和山柰素^[7]的方法, 为有效控制该药品质量提供依据。

1 仪器与材料

Agilent 1200 高效液相色谱系统 (四元泵、自动进样器、DAD 检测器, 安捷伦科技有限公司); Agilent-Chemstation 色谱工作站。Sartorius ME235P 电子天平 (感量 0.1 mg; 0.01 mg, 上海三踏生物科技有限公司); USC—502 超声处理器 (上海波龙电子设备有限公司)。

槲皮素 (批号 100081-200907, 质量分数 96.5%) 和山柰素 (批号 110801-200808, 质量分数 95.9%) 对照品购自中国药品生物制品检定所; 普乐安片为市售, 来源于浙江康恩贝制药股份有限公司 (批号 0906042、0911104、1002065) 和楚雄老拨云堂药业有限公司 (批号 0907010); 甲醇为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

依利特 Hypersil ODS2 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.4%磷酸溶液 (49:51); 检测波长 360 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取槲皮素对照品 15.82 mg、山柰素对照品 11.78 mg, 分别置 25 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 分别得槲皮素、山柰素对照品储备液。精密吸取槲皮素对照品储备液 1 mL、山柰素对照品储备液 2 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 作为混合

收稿日期: 2010-08-31

作者简介: 郑国平 (1964—), 男, 浙江舟山人, 副主任中药师, 从事中药质量分析和质量标准研究工作。

Tel: (0580)2044948 E-mail: zgp0580@126.com

对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取普乐安片 10 片,精密称定,除去包衣,研细;取约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 20 mL,密塞,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 10 mL,置 100 mL 锥形瓶中,加甲醇 10 mL、25%盐酸溶液 5 mL,摇匀,置水浴中加热回流 30 min,迅速冷却至室温,转移至 50 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 阴性对照液的制备 按处方组成,取除花粉外的糊精适量,按照普乐安片的制备工艺和供试品溶液的制备方法制成阴性对照液。

2.3 专属性考察

按上述色谱条件分别取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照液进样分析,结果阴性无干扰。见图 1。

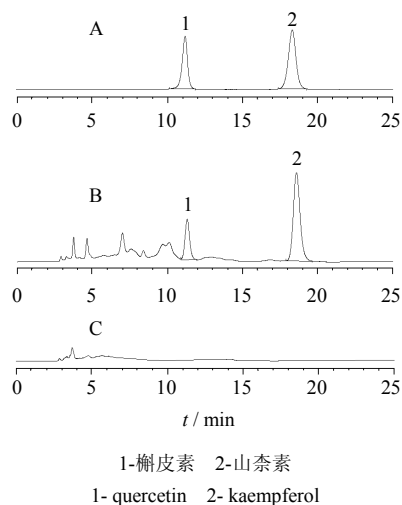


图 1 混合对照品 (A)、供试品 (B) 和阴性样品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), sample (B), and negative sample (C)

2.4 线性关系考察

精密吸取槲皮素对照品储备液,用甲醇稀释成 1.526、7.632、38.162、76.325、152.650、305.300 $\mu\text{g/mL}$ 的槲皮素系列对照品溶液;同法制备 2.260、11.298、56.488、112.975、225.960、451.900 $\mu\text{g/mL}$ 的山柰素系列对照品溶液;分别进样测定,记录峰面积;以峰面积对相应成分的质量浓度进行线性回归,得回归方程分别为:槲皮素 $Y=39.6117X-42.4858$, $r=1.0000$,表明槲皮素在 1.526~305.300 $\mu\text{g/mL}$ 与

峰面积呈良好线性关系;山柰素 $Y=40.5365X-24.0396$, $r=1.0000$,表明山柰素在 2.260~451.900 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

取批号为 1002065 的样品制备供试品溶液,连续进样 6 次,测定,计算槲皮素峰面积的 RSD 为 0.82%,山柰素峰面积的 RSD 为 0.58%。

2.6 稳定性试验

取同一样品(批号 1002065)溶液,分别于第 0、2、4、6、8、10、13、16 h 进样测定,计算槲皮素峰面积的 RSD 为 1.02%,山柰素峰面积的 RSD 为 0.98%,表明样品溶液在 16 h 内稳定。

2.7 重现性试验

取供试样品(批号 1002065)6 份,每份 1.0 g,精密称定,制备供试品溶液,进样测定,计算槲皮素质量分数的 RSD 为 1.58%,山柰素质量分数的 RSD 为 1.41%。

2.8 回收率试验

精密称取样品(批号 100265)6 份,每份 0.5 g,精密称定,分别精密加入槲皮素对照品储备液 0.8 mL 和山柰素对照品储备液 3.0 mL,制备供试品溶液,依法测定,计算得槲皮素和山柰素的平均回收率分别为 98.05% (RSD=1.72%)、99.82% (RSD=1.23%)。

2.9 样品测定

取市售的 2 个厂家共 4 个批号的普乐安片,制备供试品溶液,测定,结果见表 1。

表 1 样品测定结果 ($n=2$)

Table 1 Determination of sample ($n=2$)

批 号	槲皮素/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	山柰素/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
0906042	0.723	2.171
0911104	0.773	2.387
1002065	0.825	2.375
0907010	0.702	2.015

3 讨论

据文献报道,槲皮素、山柰素在油菜花粉中主要以苷的形式存在,须经过水解以后才能检测^[1]。比较了甲醇-酸水直接回流提取(A法)和先甲醇提取再用甲醇-酸水回流水解(B法)2种提取方法,结果显示A法提取液中杂质太多,影响槲皮素、山柰素的分离,而B法提取完全,除杂效果较好,故确定采用B法。

考虑到槲皮素和山柰素在高温、高酸下易分解氧化,本研究以回流时间(20、30、40 min)、水解温度(80、100 ℃)、酸度[甲醇-25%盐酸(4:1)、甲醇-25%盐酸(2:1)、甲醇-盐酸(4:1)、甲醇-20%盐酸(4:1)、甲醇-20%盐酸(2:1)]为考察指标进行试验,结果在酸度为甲醇-25%盐酸(4:1),水解温度 100 ℃,回流 30 min 的提取效果最好。

柱温对分离效果有一定的影响,经比较发现柱温 25 ℃时,槲皮素和山柰素的出峰效果较好。

该药品原标准定量测定项下控制其氮的量,专属性不强。本实验采用 HPLC 法同时测定该药品中槲皮素和山柰素的量,结果表明该方法简便,结果准确,重现性好。建议标准增加此方法作为该药品的质量控制标准。

参考文献

- [1] 郭娟丽,张培成,张智武.油菜花粉的化学成分研究[J].中国中药杂志,2009,34(10):1235-1237.
- [2] 杨必成,杨义芳.花粉治疗前列腺疾病的物质基础研究进展[J].中草药,2009,40(1):144-149.
- [3] 胡东辉.油菜花粉对前列腺增生的临床治疗[J].中国医药导报,2009,6(13):251.
- [4] 李坤,杨义芳,李永辉.油菜花粉抗前列腺增生与炎症的活性部位研究[J].中草药,2010,41(5):798-802.
- [5] 周利章,韩静.HPLC 法测定普乐安片中槲皮素的含量[J].中国药品标准,2007,8(1):53-55.
- [6] 王勤,冯高平,陈小琴.HPLC 法测定普乐安片中芦丁的含量[J].西北药学杂志,2006,21(1):5-6.
- [7] 刘素香.HPLC 法测定金刚藤颗粒中山柰素的含量[J].中草药,2004,35(3):284-285.

天津中草药杂志社开通网上在线投稿系统

天津中草药杂志社编辑出版的 4 种期刊《中草药》、*Chinese Herbal Medicines* (CHM, 中草药英文版)、《现代药物与临床》(原刊名《国外医药·植物药分册》)、《药物评价研究》(原刊名《中文科技资料目录·中草药》),为提高稿件处理效率,更好地为广大读者和作者服务,中草药杂志社开通网上在线投稿系统。

1. 在线投稿请登陆天津中草药杂志社网站: <http://www.中草药杂志社.中国> 或 www.tiprpress.com 点击进入 4 刊网页,在页面左侧有“作者登录”链接,第一次登陆按操作说明注册后进行在线投稿;作者可通过点击“作者登录”进行稿件查询。

2. 原则上不再采用电子邮件、纸质投稿。

衷心感谢广大读者、作者和编委对本刊长期以来的关心和支持!

天津中草药杂志社