

HPLC 法同时测定照山白浸膏片中金丝桃苷、槲皮素和山柰素的含量

王志轩 崔小丽 王世权 姚宝林

承德市食品药品检验检测中心 河北承德 067000

[摘要] 目的 建立高效液相色谱法同时测定照山白浸膏片中金丝桃苷、槲皮素和山柰素含量的方法。方法 采用 C_{18} 色谱柱；乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱；流速 1.0 ml/min；检测波长 366 nm。结果 金丝桃苷、槲皮素、山柰素分别在 201.24 ~ 2012.36 ng、21.09 ~ 210.92 ng、12.57 ~ 125.71 ng 范围内线性关系良好；平均加样回收率分别为 95.20%、96.64%、95.06%。结论 建立的方法简便、准确、重复性好，可用于照山白浸膏片的质量控制。

[关键词] 照山白浸膏片；金丝桃苷；槲皮素；山柰素；HPLC

[中图分类号] R284

[文献标识码] A

[文章编号] 1674-9561 (2018) 02-002-02

照山白浸膏片是由 7% 照山白细粉和 93% 照山白经水煎煮的浸膏混合制成的片剂，为照山白单方制剂，其主要药用有效成分为挥发油类物质^[1-2]、酚酸类物质^[3]和黄酮类物质^[4-6]，其中又以金丝桃苷、槲皮素和山柰素等黄酮类物质含量较高。近些年的研究表明，金丝桃苷、槲皮素和山柰素具有抗炎镇痛、祛痰止咳、抗氧化等多种药效^[7-9]。

照山白浸膏片的现行质量标准只有显微和理化鉴别，指标单一，专属性差，不能有效控制产品质量。目前，已有文献报道照山白浸膏片中金丝桃苷的含量测定方法^[10]，但未有同时测定其中金丝桃苷、槲皮素、山柰素含量的报道。本实验采用高效液相色谱法同时测定照山白浸膏片中三种黄酮类成分的含量，可以用来控制其质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪；电子分析天平（METTLER TOLEDO XPE26DR）

1.2 试剂

对照品：金丝桃苷（批号 111521-201507 含量 94.3%）、槲皮素（批号 100081-201509 含量 98.1%）、山柰素（批号 110861-201310 含量 93.2%），均购自中国食品药品检定研究院，供含量测定用；照山白浸膏片，共 10 批（承德燕峰药业有限责任公司）；乙腈（色谱纯，Fisher Scientific，美国）；甲醇（分析纯，天津市康科德科技有限公司）；磷酸（分析纯，天津佳兴化工玻璃仪器工贸有限公司）；水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱采用 SHISEIDO CAPCELL PAK C_{18} (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m)，流动相：[乙腈为 A，0.1% 磷酸为 B，梯度洗脱（0 ~ 13 min, 8%A；13 ~ 28 min, 8% → 21%A；28 ~ 46 min, 21%A；46 ~ 60 min, 21% → 40%A；60 ~ 77 min, 40%A；77 ~ 80 min, 8%A），流速 1.0 ml/min，检测波长为 366 nm，进样量为 10 μ l。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的制备

精密称取槲皮素对照品 10.75 mg、山柰素对照品 11.24 mg 分别置于 50 mL 的容量瓶中，加甲醇适量使溶解，定容至刻度，摇匀；精密称取金丝桃苷对照品 10.67 mg 置 50 mL 的容量瓶中，加甲醇适量使溶解，精密量取槲皮素对照品溶液 5 mL、山柰素对照品溶液 3 mL，置同一 50 mL 的容量瓶中，加甲醇定容至刻度，摇匀，即得到金丝桃苷浓度为 201.24 μ g/mL，槲皮素浓度为 21.09 μ g/mL，山柰素浓度为 12.57 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备

取照山白浸膏片 10 片，去除糖衣，精密称定，研细，精密称取 0.3 g，置于锥形瓶内，精密加入 70% 乙醇 20 mL，称定重量，超声处理 30 min，用 70% 乙醇补足减失的重量，滤过，取续滤液用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过，作为供试品溶液。

2.3 系统适应性试验

分别取上述两种溶液，按 2.1 项下色谱条件试验，结果见图 1，结果表明在此条件下三种成分可以得到很好的分离，理论板数均不低

于 5000。

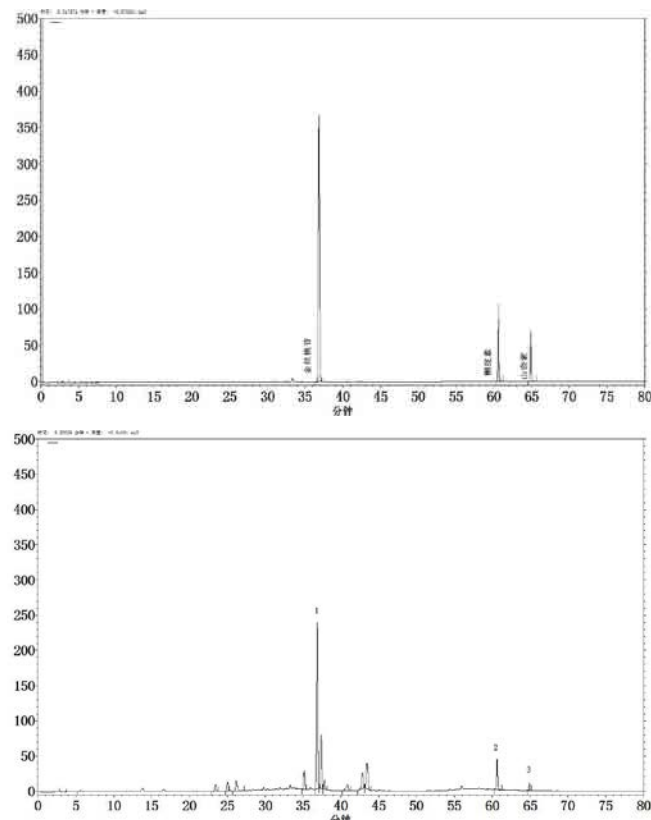


图 1：混合对照品和供试品的 HPLC 色谱图

1. 金丝桃苷 2. 槲皮素 3. 山柰素

2.4 线性关系考察

分别精密量取对照品混合溶液 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0, 10.0 mL 至 10 mL 容量瓶内，加甲醇定容至刻度，摇匀，得到系列浓度的对照品溶液，按 2.1 项下色谱条件进行测定，以峰面积为纵坐标，以进样量为横坐标，计算三种对照品的线性回归方程如下。

金丝桃苷 $Y=272254.96X-43327.37$, $r=0.9998$, $n=6$

槲皮素 $Y=561992.72X-3045026.09$, $r=0.9993$, $n=6$

山柰素 $Y=572272.42X-398303.86$, $r=0.9998$, $n=6$

结果表明，金丝桃苷、槲皮素、山柰素分别在 201.24 ~ 2012.36, 21.09 ~ 210.92, 12.57 ~ 125.71 ng 范围内线性关系良好。

2.5 精密度的试验

取 2.2.1 项下溶液，按 2.1 项下色谱条件，重复进样 6 次，计算三种成分的峰面积 RSD 分别为 0.20%, 0.14%, 0.10%，结果表明仪器的精密性良好。

2.6 重复性试验

取照山白浸膏片 6 份，每份 0.3 g，按 2.2.2 项下的制备方法制备，

按 2.1 方法测定,测得其中金丝桃苷、槲皮素、山柰素的平均含量分别为 8.51、0.63、0.13 (mg/g), RSD 分别为 0.10%, 0.62%, 0.62%, 结果表明重复性良好。

2.7 稳定性试验

取照山白浸膏片供试品溶液分别于 0、2、6、12、24、48h 进样, 计算三种成分的 RSD 分别为 0.51%, 0.40%, 0.42%, 结果表明在 48h 内稳定。

2.8 回收率试验

精密称取照山白浸膏片 9 份, 每份约 0.15g, 分别加入一定量的对照品溶液, 按 2.2.2 项下方法制备, 按 2.1 项下条件检测, 计算三种成分的回收率, 结果见表 1~表 3。

表 1: 金丝桃苷回收率试验结果

编号	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD/ %
1	1.3615	1.0562	2.3485	93.45	95.20	1.32
2	1.3368	1.0562	2.3612	96.99		
3	1.3581	1.0562	2.3665	95.47		
4	1.3589	1.3203	2.5898	93.23		
5	1.3572	1.3203	2.6160	95.34		
6	1.3487	1.3203	2.6104	95.56		
7	1.3419	1.5844	2.8679	96.31		
8	1.3606	1.5844	2.8801	95.90		
9	1.3606	1.5844	2.8587	94.55		

表 2: 槲皮素回收率试验结果

编号	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.1007	0.0684	0.1673	97.48	96.64	2.38
2	0.0988	0.0684	0.1659	98.02		
3	0.1004	0.0684	0.1652	94.64		
4	0.1005	0.0855	0.1794	92.32		
5	0.1004	0.0855	0.1842	98.06		
6	0.0997	0.0855	0.1844	99.00		
7	0.0992	0.1026	0.1968	95.08		
8	0.1006	0.1026	0.1990	95.94		
9	0.1006	0.1026	0.2024	99.22		

表 3: 山柰素回收率试验结果

编号	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.0192	0.01608	0.0344	94.96	95.06	2.92
2	0.0188	0.01608	0.0343	96.03		
3	0.0191	0.01608	0.0334	88.72		
4	0.0191	0.0201	0.0388	97.81		
5	0.0191	0.0201	0.0383	95.44		
6	0.0190	0.0201	0.0388	98.49		
7	0.0189	0.02412	0.0416	94.21		
8	0.0192	0.02412	0.0420	94.59		
9	0.0192	0.02412	0.0421	95.27		

2.9 供试品含量测定

取 10 批不同批号照山白浸膏片, 每批各 3 份, 按 2.2.2 项下方法制备, 按 2.1 项下色谱条件测定, 外标法计算, 结果见表 4。

表 4: 样品测定结果

样品	金丝桃苷 (mg/片)	槲皮素 (mg/片)	山柰素 (mg/片)	总量 (mg/片)
S1	2.983	0.225	0.045	3.253
S2	2.985	0.230	0.046	3.261
S3	2.983	0.226	0.045	3.254
S4	2.983	0.225	0.045	3.253
S5	2.982	0.227	0.046	3.255
S6	2.983	0.225	0.045	3.253
S7	2.981	0.224	0.045	3.250
S8	2.985	0.226	0.045	3.256
S9	2.986	0.226	0.046	3.258
S10	2.983	0.226	0.045	3.254

3 讨论

3.1 流动相选择

照山白浸膏片中成分较为复杂, 为达到较好的分离效果, 实验中曾选择过不同比例的甲醇(或乙腈)与 0.1% 磷酸(或冰醋酸溶液)作为流动相, 其中以乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱分离效果最为良好, 故选择该流动相体系。

3.2 提取方法选择

在供试品制备时分别考察了不同的提取溶剂, 结果发现 70% 乙醇提取效果较好, 又考察了不同的提取方法, 结果发现超声提取即可提取完全; 同时对超声处理的时间进行了考察, 发现超声处理 30 分钟即可提取完全。

3.3 检测波长选择

分别取三种对照品溶液, 在 200~400nm 范围内进行光谱扫描。结果表明金丝桃苷在 361nm 波长处有最大吸收, 槲皮素在 371nm 波长处有最大吸收, 山柰素在 366nm 波长处有最大吸收。综合考虑各吸收峰情况及杂质干扰选择 366nm 作为测定波长。

[参考文献]

[1] 陈萌, 郭伟, 郭庆梅, 等. 蒙药照山白挥发油化学成分的研究[J]. 现代中药研究与实践, 2013, 27(5): 28-30
[2] 常国栋, 罗都强. 照山白的化学成分研究[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(4): 39-40
[3] 夏重道, 杜安全, 王红萍, 等. 照山白有效成分的化学研究[J]. 中国药科大学学报, 1999, 30(4): 314-315
[4] 王先荣, 杜安全, 王红萍. 照山白中黄酮醇类成分的提取分离和鉴定[J]. 安徽医药, 1997, 1(4): 17-18
[5] 张孟科, 詹冠群, 雷亮, 等. 照山白枝叶化学成分研究[J]. 中国科技论文在线精品论文, 2015, 8(17): 1861-1865
[6] 杨秀岭, 袁志芳, 许慧君, 等. 照山白黄酮类化学成分的研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(9): 1750-1752
[7] 林萍, 易宏伟, 张斐. 金丝桃苷药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2012, 14(10): 23-26
[8] 孙涓, 余世春. 槲皮素的研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(3): 85-88
[9] 陈育华, 周克元, 袁汉尧. 山柰酚药效的研究进展[J]. 广东医学, 2010, 31(8): 1064-1066
[10] 赵艳普. HPLC 测定照山白浸膏片中金丝桃苷的含量[J]. 中成药, 2008, 30(3): 456-457

(上接第 1 页)

评价[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(8):1598-1599.
[2] 马凯蕾. 不同麻醉方法在妇科腹腔镜手术中的应用[J]. 内蒙古中医药, 2012, 31(10):74-75.
[3] 高载歌. 比较不同麻醉方式在妇科腹腔镜手术中的应用[J]. 内

蒙古中医药, 2013, 32(35):97-98.
[4] 徐海文. 不同麻醉给药方式对腹腔镜手术患者术后疼痛及麻醉复苏的影响[J]. 临床医学研究与实践, 2017, 2(31):62-63.
[5] 崔玉沛, 刘静. 地佐辛复合咪达唑仑在腰-硬联合麻醉下妇科不孕症腹腔镜手术中的应用[J]. 中国继续医学教育, 2016, 8(27):43-44.