

◇ 药物分析 ◇

超高效液相色谱法测定垂盆草颗粒中 3 种黄酮成分的含量

华燕青¹, 张楠²

(1. 杨凌职业技术学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 西安市食品药品检验所, 陕西 西安 710065)

摘要:目的 建立超高效液相色谱法(UPLC)同时测定垂盆草颗粒中槲皮素、山柰素与异鼠李素的含量。方法 色谱柱 Thermo Scientific Acclaim™ RSLC 120 C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 2.2 μm), 流动相为甲醇-0.4% 磷酸(50:50), 柱温为 30℃, 流速为 0.3 mL · min⁻¹, 检测波长为 360 nm, 进样量 1 μL。结果 槲皮素、山柰素与异鼠李素的线性范围分别为: 50~1 000 μg, 20~400 μg, 20~400 μg, 且与峰面积呈良好线性关系($r=0.999\ 9, 0.999\ 9, 0.999\ 6$), 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均 < 2%, 平均加样回收率($n=9$)分别为 99.35%, 99.38%, 98.91%, RSD 分别为 1.04%、0.98%、1.01%。结论 该法高效、准确、灵敏, 可作为测定垂盆草颗粒中槲皮素、山柰素与异鼠李素含量的有效方法。

关键词:超高效液相色谱法; 垂盆草颗粒; 含量测定; 槲皮素; 山柰素; 异鼠李素

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.08.007

Determination of three flavonoids components in chuipencaokeli by UPLC

HUA Yanqing¹, ZHANG Nan²

(1. Yangling Vocational & Technical College, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi 710065, China)

Abstract: Objective To develop a method for the determination of three flavonoids components in chuipencaokeli by UPLC. Methods

Thermo Scientific Acclaim™ RSLC 120 C₁₈ chromatographic column (2.1 mm × 100 mm, 2.2 μm) was used, with methanol-0.4% phosphoric acid (50:50) as the mobile phase with the flow rate of 0.3 mL · min⁻¹. Detection wavelength was 360 nm, column temperature was 30℃ and injection volume was 1 μL. Results The linear range was 50-1 000 μg for meletin, 20-400 μg for kaempferide, 20-400 μg for isorhamnetin. There was a good linear relationship. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0% respectively. The average recovery was 99.35%, 99.38%, 98.19% (RSD < 2%). Conclusion The method is rapid, accurate and effective. It is reliable method for determination of three flavonoids in chuipencaokeli, which provide a basis for quality standards.

Key words: UPLC; Chuipencaokeli; Content; Determination; Meletin; Kaempferide isorhamnetin

垂盆草(*Sedum sarmentosum Bunge*)为景天科植物,全草入药,具有清热解毒,活血利湿的功效,可用于治疗带状疱疹,毒蛇咬伤、烫伤、烧伤及急性肝炎湿热淤结症^[1]。垂盆草中富含垂盆草苷、黄酮类、三萜类、生物碱等多种化学成分^[2]。研究表明^[3-4],垂盆草总黄酮是垂盆草中重要的保肝降酶作用的活性成分之一,垂盆草总黄酮中含有槲皮素、山柰素、木犀草素、苜蓿苷、槲皮苷、金丝桃苷、木犀草苷、异鼠李素等多种黄酮类化合物。垂盆草颗粒为现行 2015 年版药典一部收载品种^[5],其含量测定采用紫外-可见分光光度法,以芦丁为对照测定了垂盆草颗粒中总黄酮含量。未分别对各成分进行定量分析。为了客观评价药品的质量,本研究自 2015 年 12 月至 2016 年 6 月建立了一种超高效液相色谱方法,同时测定垂盆草颗粒中三种黄酮类成分的含量,该方法高效准确灵敏,可为提升垂盆草颗粒质量

标准提供参考。

1 仪器与试剂

DIONEX UltiMate3000 超高效液相色谱仪,四元分析泵,全自动进样器,柱温箱,UV 检测器,Chromeleon7.2 工作站,BT124S 型电子天平(德国赛多利斯),1 号垂盆草颗粒(杭州华东医药集团康润制药有限公司)批号:150303,150502,2 号垂盆草颗粒(上海静安制药有限公司)批号:150915-2,150409-2。对照品:槲皮素(批号 100081-201408),山柰素(批号 110861-201310),异鼠李素(批号 110860-201109),对照品均购于中国药品生物制品检定所,供含量测定使用,甲醇为色谱纯,水为双蒸水,其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Thermo Scientific Acclaim™ RSLC 120 C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 2.2 μm), 流动相: 甲醇-0.4% 磷酸(50:50); 流速: 0.3 mL · min⁻¹; 柱温:

30 ℃;检测波长:360 nm;进样量:1 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取对照品槲皮素、山柰素、异鼠李素适量,分别置于 10 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,即得对照品储备液,分别精密量取上述储备液适量,置于同一 25 mL 量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 约含 0.513 0 mg 的槲皮素,0.254 5 mg 的山柰素,0.260 5 mg 的异鼠李素的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液 精密称取垂盆草颗粒 2.0 g,置索氏提取器中,精密加入甲醇-25% 盐酸溶液(4:1)的混合溶液 25 mL,称定质量,加热回流提取 1 h,取出放冷后,再称定质量,用甲醇-25% 盐酸溶液(4:1)的混合溶液补足减失重量,摇匀,滤过,取续滤液,用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按垂盆草颗粒制剂工艺方法,制备缺垂盆草的阴性样品,按“2.2.2”项下制备方法,制成阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验 分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 1 μL,在“2.1”色谱条件下测定,理论板数分别以槲皮素、山柰素、异鼠李素计为 18 000、10 015、9 800,各相邻色谱峰之间的分离度均大于 1.5,拖尾因子在 0.95~1.05 之间,阴性样品对 3 个黄酮类成分的测定无干扰。各组分基线分离良好。色谱图见图 1。

2.4 线性范围、最低检测限和定量限 分别精密量取“2.2.1”项下的混合对照品溶液 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 μL,置于 1 mL 量瓶中,加入甲醇定容,摇匀,作为系列对照溶液,按照“2.1”项下的色谱条件

进样测定各成分的峰面积积分值,以对照品的进样量(μg)为横坐标,对应的峰面积积分值为纵坐标进行线性回归,槲皮素、山柰素、异鼠李素回归方程及相关系数等见表 1,三种成分峰面积与进样量的线性良好。以 3 倍噪声(S/N≥3)计算检测限(LOD),以 10 倍噪声(S/N≥10)计算最小定量限(LOQ),结果见表 1。

2.5 精密度试验 取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下的色谱条件连续进样 6 次,测定峰面积,结果槲皮素、山柰素、异鼠李素峰面积的 RSD 分别为 0.14%、0.32%、0.75%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取 1 号垂盆草颗粒,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于放置 0、2、4、8、12、16、20、24 h 时进样测定,记录色谱峰面积,结果槲皮素、山柰素、异鼠李素峰面积的 RSD 分别为 0.17%、0.43%、0.82%(n=6),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 精密称取 1 号垂盆草颗粒,按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱峰。结果槲皮素、山柰素、异鼠李素峰面积的 RSD 分别为 1.24%、1.8%、0.96%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取已测知含量的 1 号垂盆草颗粒样品 9 份,每 3 份为一组,每份约 1.0 g,精密称定,按样品含量的 80%、100% 和 120% 分别精密加入槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下

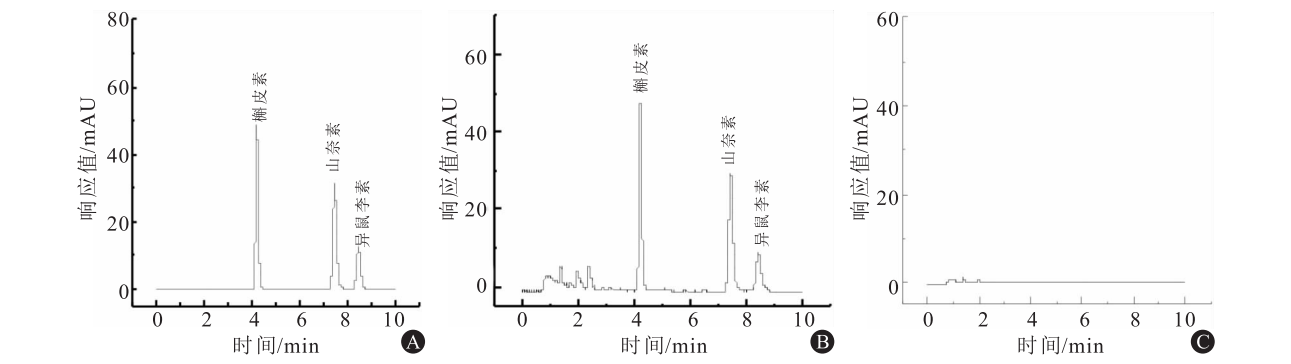


图1 超高效液相色谱图

表1 3种成分线性范围结果及检测限和定量限

成分	回归方程	R 值	线性范围/μg	LOD/μg	LOQ/μg
槲皮素	$Y = 465.858X + 0.080$	0.999 9	50 ~ 1 000	0.38	1.21
山柰素	$Y = 432.942X - 0.300$	0.999 9	20 ~ 400	0.46	1.26
异鼠李素	$Y = 204.272X - 2.771$	0.999 6	20 ~ 400	0.75	1.52

色谱条件进行测定,记录峰面积并计算槲皮素、山柰素、异鼠李素的平均回收率,结果见表2。

2.9 样品含量测定 分别称取两个厂家各2批样品适量,精密称定,分别按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品中槲皮素、山柰素、异鼠李素的含量,结果见表3。

3 讨论

目前文献已报道的垂盆草颗粒中黄酮类成分的测定方法有高效液相色谱法^[6-8]和紫外-可见分光光度法^[3]。超高效液相色谱法^[9]是一种采用亚2 μm小颗粒填料的液相色谱技术,根据范德米特方

程理论,通过降低颗粒度提高柱效和分析速度,增加分析的通量、灵敏度及色谱峰容量,与HPLC简单方便的方法转换,可弥补传统高效液相系统的不足。本实验采用超高效液相色谱法进行含量测定,在10 min以内即完成三种黄酮类成分的分离及检测,分析时间缩短了5倍,同时该法的流速仅为0.3 mL·min⁻¹,进样体积为1 μL,流动相用量仅约为28 mL,而高效液相色谱法流速多为1.0 mL·min⁻¹,进样量为10 μL或20 μL,流动相用量较多。因此采取超高效液相色谱法进行测定可节约分析时间,减少溶剂消耗,极大地降低分析成本,提高了检验效率。

表2 加样回收实验(n=9)

	取样量/g	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	1.0015	0.7615	0.5130	1.2722	99.56	99.35	1.04
	1.0082	0.7607	0.5130	1.2608	97.49		
	1.0021	0.7626	0.5130	1.2801	100.88		
	1.0011	0.7621	0.7160	1.4763	99.75		
	1.0036	0.7610	0.7160	1.4632	98.07		
	1.0029	0.7661	0.7160	1.4785	99.50		
	1.0015	0.7547	0.8910	1.6423	99.62		
	1.0082	0.7608	0.8910	1.6521	100.03		
	1.0021	0.7558	0.8910	1.6405	99.29		
山柰素	1.0011	0.2518	0.2050	0.4549	99.07	99.38	0.98
	1.0036	0.2515	0.2050	0.4605	102.01		
	1.0029	0.2521	0.2050	0.4592	101.02		
	1.0015	0.2520	0.2545	0.4986	96.91		
	1.0082	0.2516	0.2545	0.5019	98.35		
	1.0021	0.2533	0.2545	0.4988	96.47		
	1.0011	0.2518	0.2980	0.5438	97.99		
	1.0036	0.2524	0.2980	0.5491	99.56		
	1.0029	0.2536	0.2980	0.5609	103.12		
异鼠李素	1.0021	0.2612	0.1912	0.4509	99.22	98.91	1.01
	1.0025	0.2629	0.1912	0.4491	97.38		
	1.0039	0.2611	0.1912	0.4517	99.68		
	1.0023	0.2617	0.2605	0.5169	97.96		
	1.0068	0.2616	0.2605	0.5172	98.15		
	1.0042	0.2614	0.2605	0.5222	100.12		
	1.0031	0.2610	0.3120	0.5692	98.78		
	1.0056	0.2623	0.3120	0.5715	99.10		
	1.0079	0.2618	0.3120	0.5732	99.81		

表3 样品含量测定结果(n=2)

样品	批号	槲皮素/mg·g ⁻¹	山柰素/mg·g ⁻¹	异鼠李素/mg·g ⁻¹	总含量/mg·g ⁻¹
垂盆草颗粒1号	150303	0.8237	0.2616	0.2831	1.3684
	150502	0.7940	0.2730	0.2926	1.3596
垂盆草颗粒2号	150915-2	0.7728	0.2457	0.2148	1.2333
	150409-2	0.7636	0.2561	0.2254	1.2451