

HPLC 法测定北合欢中槲皮素和山奈素的含量

郭美玲, 孙佳玲, 孙公国 (吉林省食品药品检验所, 长春 130033)

摘要: 目的 建立 HPLC 法测定北合欢中槲皮素和山奈素的含量。方法 采用 Diamonsil C18 色谱柱; 甲醇-0.4% 磷酸溶液 (50:50) 为流动相; 检测波长为 360nm; 柱温 35℃。结果 槲皮素在 0.0088~0.5262μg 范围内呈良好的线性关系, $r=0.9997$; 平均回收率 ($n=6$) 为 98.8%, RSD=3.0%。山奈素在 0.0242~1.4496μg 范围内呈良好的线性关系, $r=0.9999$; 平均回收率 ($n=6$) 为 100.5%, RSD=2.0%。结论 本法简便, 准确, 重现性好, 可作评价北合欢的质控方法。

关键词: 北合欢; 槲皮素; 山奈素; HPLC

中图分类号: R284; R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777 (2011) 07-0647-03

Determination of Quercetin and Kaempferide in *Celatrus orbiculatus* Thunb. by HPLC

Guo Meiling, Sun Jialing and Sun Gongguo (Jilin Provincial Institute of Food and Drug Control, Changchun 130033)

ABSTRACT: **Objective** To establish a method for the determination of quercetin and kaempferide in *Celatrus orbiculatus* Thunb. **Methods** A column of Diamonsil C18 was adopted, and the mobile phase was the mixture of methanol-0.4% phosphoric acid (50:50) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The wavelength was set at 360nm. **Results** There was a good linear relationship of quercetin in the concentration range of 0.0088~0.5262μg ($r=0.9997$). The average recoverise ($n=6$) were 98.8% (RSD=3.0%). There was a good linear relationship of kaempferide in the concentration range of 0.0242~1.4496μg ($r=0.9999$). The average recoverise ($n=6$) were 100.5% (RSD=2.0%). **Conclusion** The method is simple and accurate. It can be used for the quantitative analysis of *Celatrus orbiculatus* Thunb.

KEY WORDS: *Celatrus orbiculatus* Thunb; quercetin; kaempferide; determination; HPLC

北合欢为卫矛科植物南蛇藤 (*Celatrus orbiculatus* Thunb.) 的干燥成熟果实。其主要含有槲皮素和山奈素等多种黄酮类化合物成分。具有多种药理活性^[1]。山奈素能够激活 melan-a 黑素细胞酪氨酸酶的活性, 促进黑素细胞增殖, 使黑素合成量增加等作用^[2]。目前北合欢研究的报道少见, 且易与豆科植物合欢花混淆。目前对北合欢成分研究的报道少见。为进一步控制北合欢的质量, 本研究采用 HPLC 法测定了北合欢全草中槲皮素和山奈素的含量, 为北合欢的进一步研究提供依据^[3-6]。

1 仪器与试剂

Agilent 1100series 高效液相色谱仪。

槲皮素对照品 (批号: 10008+200406, 中国药品生物制品检定所); 山奈素对照品 (批号: 110861-200304, 中国药品生物制品检定所)。北合欢 (长春中医药研究院)。经吉林省食品药品检验所研究室孙玉斌主任药师鉴定, 为卫矛科植物南蛇藤的干燥成熟果实, 做为本实验方法研究的样品。见图 1~3。

试剂均为色谱纯及分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液

分别精密称取槲皮素和山奈素对照品适量, 加甲醇制成每 1mL 分别含 90、30μg 的混合溶液, 即得。

基金项目: 吉林省科技厅发展计划重点资助项目 (编号 20070902-01)

作者简介: 郭美玲, 主管药师; 主要从事药学研究; Tel: (0431) 87913255; E-mail: leesci@126.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

2.2 供试品溶液

取本品, 粉碎, 过 3 号筛, 混匀, 取 0.5g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇-25% 盐酸 (4:1) 混合液 25mL, 称定重量, 加热回流提取 30min, 滤过, 取续滤液, 即得。

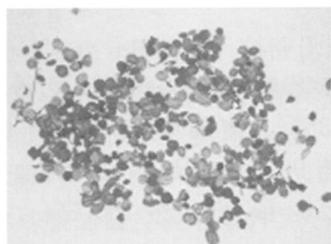


图 1 北合欢 (南蛇藤干燥成熟果实)

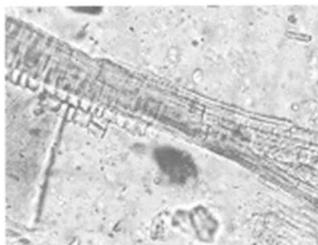


图 2 晶纤维

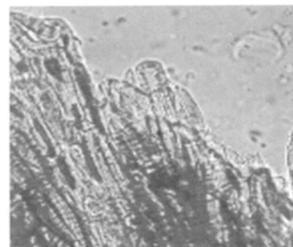


图 3 果梗石细胞群

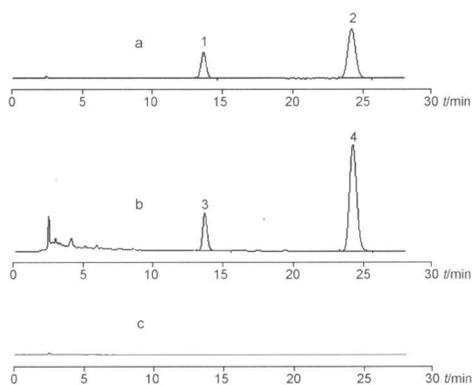


图 4 北合欢 HPLC 色谱图

图 4 北合欢 HPLC 色谱图

2.4 线性关系考察

精密吸取槲皮素 ($0.0175\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和山奈素 ($0.0483\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 混合对照品溶液 0.5、2.0、10.0、20.0、30.0 μL 分别进样, 测定峰面积。以对照品进样量 (μg) 为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归, 得槲皮素、回归方程:

$$Y_{\text{槲皮素}} = 3.7 \times 10^3 X + 9.1638 \quad r = 0.9997$$

$$Y_{\text{山奈素}} = 3.8 \times 10^3 X + 9.730 \times 10^1 \quad r = 0.9999$$

结果表明槲皮素和山奈素分别在 $0.0088 \sim 0.5262\mu\text{g}$ 和 $0.0242 \sim 1.4496\mu\text{g}$ 范围内呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 计算, 槲皮素峰面积平均值为 444.34, 其 RSD ($n=6$) 为 0.2%, 山奈素峰面积平均值为 1382.14, 其 RSD 为 0.6%, 表明精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液, 分别在 0、4、8、12、16h 进样测定, 计算, 槲皮素与山奈素峰面积平均值分别为 437.21 和 1374.64, 其 RSD ($n=5$) 分

2.3 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C18 ($4.6\text{mm} \times 250\text{mm}$, $5\mu\text{m}$); 流动相甲醇-0.4% 磷酸溶液 (50:50); 流速: $1.0\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 360nm; 柱温 35°C ; 进样量: $10\mu\text{L}$ 。色谱图见图 4。

别为 0.7% 和 1.9%, 结果表明供试品溶液中槲皮素与山奈素在 16h 内基本稳定。

2.7 重复性试验

取样品, 照“2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份, 按上述色谱条件测定, 计算槲皮素、山奈素的平均含量 ($n=6$) 分别为 0.065% 和 0.191%, RSD 分别为 1.9% 和 1.5%, 表明方法重复性好。

2.8 加样回收率试验

取经同法测定的已知含量的样品 (含槲皮素为 0.065%, 山奈素为 0.191%) 6 份, 每份 0.25g, 精密称定, 分别精密加入槲皮素对照品 0.1424mg 和山奈素对照品 0.4003mg, 照“2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算槲皮素和山奈素的平均加样回收率, 结果见表 1~2。

表 1 槲皮素回收率试验结果

样品中已知量 (mg)	对照品加入量 (mg)	测得总量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.1596	0.1424	0.2992	98.46		
0.1606	0.1424	0.2996	100.77		
0.1732	0.1424	0.3107	100.00	100.00	1.14
0.1725	0.1424	0.3089	98.97		
0.1665	0.1424	0.3129	101.54		
0.1656	0.1424	0.3112	100.26		

表 2 山奈素回收率试验结果

样品中已知量 (mg)	对照品加入量 (mg)	测得总量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.4691	0.4003	0.8663	99.23		
0.4720	0.4003	0.8677	98.85		
0.4899	0.4003	0.8914	100.30	99.48	0.50
0.4878	0.4003	0.8864	99.58		
0.4892	0.4003	0.8882	99.68		
0.4867	0.4003	0.8839	99.23		

2.9 样品的含量测定

比较其他不同企业提供的样品粉末(过 3 号筛),分别按“2.1”和“2.2”项下的方法制备供试品溶液和对照品溶液。分别精密吸取供试品溶液和对照品溶液各 10 μ L,注入液相色谱仪,记录色谱图,根据峰面积采用外标法计算含量,北合欢药材的含量测定结果见表 3。

表 3 样品槲皮素和山奈素测定结果

序号	企业	槲皮素含量(%)	山奈素含量(%)
1	长春本草堂药业	0.055	0.248
2	长春中医药研究院	0.062	0.194
3	长春中医药大学	0.054	0.153
4	长春北方生化制药	0.057	0.158

3 讨论

3.1 北合欢的药材确定

合欢花系豆科植物合欢的干燥花序,而北合欢为卫矛科植物南蛇藤的干燥成熟果实。目前,国内有些地方对合欢的研究比较混乱,误将合欢花与北合欢混淆应用。为明确北和欢基源,本研究所指的合欢系北合欢,有别于豆科植物合欢,并为北合欢的进一步研究提供了依据。

3.2 对供试品提取溶剂的研究

本实验对供试品的提取溶剂进行了考察:分别

以盐酸(3 \rightarrow 10)和 25% 盐酸-甲醇(1:4)混合溶液为提取溶剂,所测有效成分含量相差不大;参考《中国药典》2005 年版一部“银杏叶”项下的方法,故以 25% 盐酸-甲醇(1:4)混合溶液作为提取溶剂。

3.3 对不同厂家色谱柱的考察

通过对色谱柱 Diamonsil C18(4.6mm \times 250mm, 5 μ m); Agilent-TC C18(4.6mm \times 250mm, 5 μ m); Apollo C18(250mm \times 4.6mm, 5 μ)的研究比较,三者峰形均正态,分离良好。择优后选择 Diamonsil C18 作为系统条件色谱柱。

参考文献:

- [1] 吕蔡,张杰. 128 槲皮素的药理作用[J]. 国外医药(植物药分册), 2005, 3: 20-24
- [2] 谭城,朱文元,鲁严. 山奈素对 melan-a 黑色素细胞株黑素生成的影响[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2006, 9: 26-28
- [3] 何羽,薛朝金. 高效液相色谱法测定金钱草颗粒中槲皮素和山奈素的含量[J]. 时珍国医国药, 2006, 6: 67-68
- [4] 陈薇,罗昱澜,杨寒艳. HPLC 法测定白花蛇舌草中槲皮素和山奈素的含量[J]. 华夏医学, 2008, 5: 13-14
- [5] 中国药典[S]. 一部, 2005: 220-222
- [6] 楼之岑,秦波,主编. 常用中药材品种整理和质量研究(北方篇,第一册)[M]. 北京:北京大学医学出版社, 1995: 659-660

(上接第 631 页)逾期不履行处罚决定,又不申请复议或起诉的,将申请法院强制执行。这既是当事人享有救济权期限的知情,也是对当事人自动履行处罚决定的忠告。救济权期限不是决定当事人执行处罚决定的时间限定,显然不是确定是否结案的时限,而复议期间或诉讼期间对当事人的处罚决定也可能执行或者不执行。

3.3 行政救济不是处罚决定执行方式

复议机关或法院对药品监管部门作出的罚没款行政处罚决定是否合法与适当进行审查或审理,其结果是作出维持、撤销、变更等的决定或判决,对行政处罚决定的执行结果不作决定或判决,对行政处罚决定是否自动履行还是强制执行也不作审理、不下结论,对行政处罚案件是否结案也不作约束。而且执法实践中,还有复议和诉讼结束后再申请强制执行的案例,所以行政复议、行政诉讼不是处罚决定的执行方式,不能以当事人的法定诉讼期限的届满为结案时限

综上所述,药品监督行政处罚案件罚没款处罚决定内容全部履行或执行的终结时间为案件结案时限,而行政处罚案件的结案不影响行政复议的审查和决定、不影响行政诉讼的审理和判决,行政处罚决定不能因申请行政复议或提起行政诉讼而停止执行。因此,药品监督罚没款行政处罚案件的“结案时限”应以罚没款处罚决定“执行完毕”为准,而不应以“法定诉讼期限”为准。

参考文献:

- [1] 行政处罚法[S]. 中华人民共和国主席令第 63 号, 1996
- [2] 药品监督行政处罚程序规定[S]. 国家食品药品监督管理局令第 1 号, 2003.
- [3] 最高人民法院. 关于执行《中华人民共和国民事诉讼法》若干问题的解释[S]. 法释[2000] 8 号, 2000
- [4] 郑志耿主编. 行政执法教程[M]. 杭州:浙江人民出版社, 2007: 176-178
- [5] 行政复议法[S]. 中华人民共和国主席令第 16 号, 1999
- [6] 行政诉讼法[S]. 中华人民共和国主席令第 16 号, 1990