

HPLC法测定山柰药材中山柰素的含量

李刚*,封传华,张静,徐兰,陶晓璇(解放军第94医院,南昌 330002)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)18-2558-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.18.37

摘要 目的:建立测定山柰药材中山柰素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Diamonsil ODS2 C₁₈,流动相为甲醇-0.4%磷酸溶液,流速为1 ml/min,检测波长为367 nm,柱温为30℃,进样量为10 μl。结果:山柰素的检测质量浓度线性范围为0.001 58~0.158 mg/ml;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<3%;加样回收率为95.52%~99.32%,RSD=1.47%(n=6)。结论:该方法操作简单、结果准确、重复性较好,可用于山柰药材中山柰素的含量测定。

关键词 高效液相色谱法;山柰;山柰素

Content Determination of Kaempferol in *Kaempferia galanga* by HPLC

LI Gang, FENG Chuanhua, ZHANG Jing, XU Lan, TAO Xiaoxuan(No.94 Hospital of PLA, Nanchang 330002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of kaempferol in *Kaempferia galanga*. METHODS: HPLC was performed on the column of Diamonsil ODS2 C₁₈ with mobile phase of methanol-0.4% Phosphoric acid solution at a flow rate of 1 ml/min, detection wavelength was 367 nm, column temperature was 30℃, and injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range of kaempferol was 0.001 58-0.158 mg/ml; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3%; recovery was 95.52%-99.32% (RSD=1.47%, n=6). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the content determination of kaempferol in *K. galanga*.

KEYWORDS HPLC; *Kaempferia galanga*; Kaempferol

山柰 *Kaempferia galanga* L.又名沙姜、三柰、山辣,具有行气温中、消食、止痛等功效,临床主要用于胸膈胀满、脘腹冷痛、饮食不消等证的治疗。现有关山柰的研究主要集中于山柰挥发油的提取、化学成分分析、生物活性等方面,而关于山柰素的报道相对较少^[1-3]。山柰素为山柰药材中的一种重要的黄酮醇类化合物,因具有平喘、止咳、降血压、降血脂、增强冠状动脉血流量等药理活性,故有必要将其纳入山柰药材质量控制的标准^[4-7]。为此,笔者采用高效液相色谱(HPLC)法测定山柰药材中山柰素的含量,以为山柰的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-15C型HPLC仪,包括CTO-15C型柱温箱、SIL-10AF型自动进样器、LC-15C型泵、SPD-15C型紫外检测器(日本岛津公司);AUW-120D型分析天平(日本岛津公司);HH-S8型电热恒温水浴锅(上海医疗器械五厂);KQ3200E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:150 W,频率:40 kHz);DFT-50型手提式高速万能粉碎机(温岭市林大机械有限公司)。

1.2 试剂

山柰素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110861-201310,纯度:93.2%);甲醇(天津市大茂化学试剂厂,批号:20140318)为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

山柰饮片(江西敦寿堂国药有限公司,批号:1401009、1402008、1402014)经江西中医药大学褚小兰教授鉴定为姜科植物山柰。

* 副主任医师。研究方向:药物制剂、临床药学。电话:0791-88848181

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[8]

色谱柱:Diamonsil ODS2 C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.4%磷酸(50:50, V/V);流速:1 ml/min;检测波长:367 nm,柱温:30℃;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取山柰素对照品3.95 mg,置于25 ml量瓶中,加适量甲醇,溶解并定容,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品适量,烘干、粉碎、过筛,取粉末(过65目筛)约0.5 g,精密称定,置于50 ml具塞锥形瓶中,精密加入25 ml甲醇,称定质量,超声处理30 min,放冷,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过;精密量取续滤液15 ml,置于25 ml烧瓶中,加15%盐酸溶液5 ml,摇匀,置于65℃水浴中30 min后迅速置于15℃的水中冷却,冷却后转移至25 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 系统适用性试验

分别精密吸取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,山柰素峰可与杂质达到基线分离,分离度>1.5,理论板数以山柰素峰计≥3 000。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下对照品溶液0.1、0.2、0.5、1、2、5 ml,分别置于10 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得系列对照品贮备液。精密量取上述系列对照品贮备液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度(x, mg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得山柰素的回归方程为 $y=7 \times 10^7 x - 53\,245$ ($r=0.999\,6$)。结果表明,山柰素的检测质量浓度线性范围为0.001 58~0.158 mg/ml。

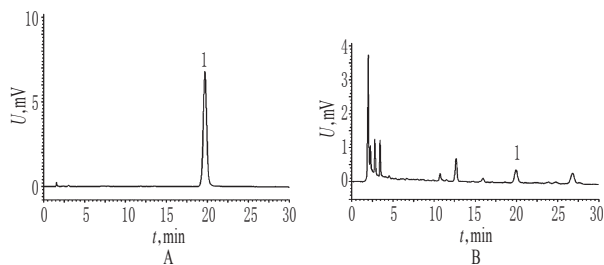


图1 高效液相色谱图

A.对照品; B.供试品; 1.山奈素

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance; B.test sample; 1.kaempferol

2.5 检测限与定量限考察

精密量取“2.2.1”项下对照品溶液适量,用甲醇逐级稀释,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,当信噪比为3:1时,山奈素的检测限为0.000 32 mg/ml;当信噪比为10:1时,山奈素的定量限为0.008 6 mg/ml。

2.6 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,山奈素峰面积的RSD=1.67%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

精密量取同一供试品溶液(批号:1401009)适量,分别于室温(25℃)下放置0、2、4、6、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,山奈素峰面积的RSD=2.14%(n=7),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同一批(批号:1401009)样品粉末(过65目筛)适量,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,记录峰面积。结果,山奈素峰面积的RSD=1.32%(n=6),表明本方法重复性较好。

2.9 加样回收率试验

取同一批(批号:1401009)样品粉末(过65目筛)适量,共6份,每份约0.2 g,精密称定,分别加入“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery test(n=6)

取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.205 9	0.300 2	0.31	0.596 3	95.52		
0.210 4	0.310 8	0.31	0.618 3	99.19		
0.203 6	0.302 6	0.31	0.607 5	98.35	97.76	1.47
0.207 8	0.301 4	0.31	0.609 3	99.32		
0.209 8	0.313 7	0.31	0.614 1	96.90		
0.208 4	0.311 9	0.31	0.613 5	97.29		

2.10 样品含量测定

取3批样品粉末(过65目筛)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,3批样品(批号:1401009、1402008、1402014)中山奈素的含量分别为0.16%、0.15%、0.18%(n=6)。

3 讨论

3.1 山奈素测定的重要性

山奈具有多种药理活性,据文献报道,山奈中所含有的挥

发油可显著抑制胃癌细胞的增殖和转移,能够使人胃癌裸鼠原位移植瘤缩小;山奈的甲醇提取物具有较强的杀线虫能力,山奈的水提取物具有明显的镇痛、抗炎作用,且山奈叶的水提取物的作用效果优于山奈根茎的水提取物^[9-10]。由此可见,山奈是一种极具发展潜力的药材;且山奈素系山奈提取物中黄酮醇类化合物。因此,本文建立山奈药材中山奈素含量测定的方法对于控制药材的质量具有十分重要的意义^[11]。

3.2 提取方式的考察

笔者考察了加热回流提取法和超声提取法的提取效果。结果显示,两种方法测得的提取物中山奈素的含量未出现较大差异,但加热回流提取法的出膏率较大,且液相色谱图杂质峰略有增加,从而影响了山奈素的分离,故选用超声提取法提取山奈素。

3.3 提取时间的考察

笔者对提取时间也进行了考察,分别比较了15、30、45、60 min的提取效果。结果显示,山奈素在30 min内可基本提取完全,随着时间延长,山奈素的含量未出现显著性的提高,故采用超声提取30 min。

综上所述,本方法操作简单、结果准确、重复性较好,可用于山奈药材中山奈素的含量测定。

参考文献

- [1] 张桂芝,顾玲燕.山奈挥发油的红外光谱法与气相色谱质谱分析[J].时珍国医国药,2008,19(9):2 252.
- [2] 李慧,许亮,徐保利,等.HPLC测定地锦草中没食子酸、槲皮素及山奈素含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(7):100.
- [3] 谭雄斯.HPLC-UV-ELSD法测定益肝乐颗粒中槲皮素、山奈素、柴胡皂苷a和柴胡皂苷d[J].中成药,2014,36(3):531.
- [4] 白吉庆,王小平,孙涛,等.高效液相色谱法测定窝儿七中槲皮素、鬼臼毒素、山奈素[J].中国药学杂志,2012,47(1):69.
- [5] 石晓峰,刘东彦,李爽,等.RP-HPLC法同时测定雪松松针中杨梅素、槲皮素和山奈素的含量[J].药物分析杂志,2012,32(9):1 550
- [6] 覃冬杰,梁永红,黄瑞松,等.壮药柿叶槲皮素和山奈素含量测定方法的建立[J].广西医学,2012,34(9):1 133.
- [7] 姚令文,陈晓虎,石岩,等.HPLC法测定柘木中槲皮素、染料木素和山奈素的研究[J].药物分析杂志,2014,34(3):415.
- [8] 于雷,严铭铭,杨智,等.HPLC同时测定蚊子草药材槲皮素、山奈酚含量[J].中国中药杂志,2011,36(14):1 985.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:29.
- [10] 单丽芳,孙锦帆,曾鑫,等.HPLC法同时测定普乐安片中槲皮素和山奈素含量[J].亚太传统医药,2015,11(20):17.
- [11] 吴怀恩,甄汉深,韦志英,等.RP-HPLC法同时测定侧柏叶炭中槲皮素和山奈素的含量[J].中国药房,2009,20(12):934.

(收稿日期:2015-07-30 修回日期:2016-03-15)

(编辑:刘柳)