

HPLC法同时测定蒙药菟丝草中3种成分的含量

娜仁高娃^{1*},王青虎^{2#},那音台²,吉日嘎拉图²(1.锡林郭勒热电公司卫生所,内蒙古锡林浩特 026000;2.内蒙古民族大学蒙医药学院,内蒙古通辽 028000)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)07-0649-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.07.25

摘要 目的:建立同时测定蒙药菟丝草中槲皮素、金丝桃苷和山柰酚3种成分含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Hypersil ODS-2(300 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-水(58:42, V/V),检测波长为281 nm,柱温为30℃,流速为1.0 ml/min。结果:槲皮素、金丝桃苷和山柰酚的质量浓度分别在10~50、2.5~30、2.5~30 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(r 分别为0.999 7、0.999 5、0.999 6);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2%;平均加样回收率分别为98.90%、97.60%、97.39%,RSD分别为1.23%、1.37%、1.40%(n 均为6)。结论:该方法简便、快速、准确,可为蒙药菟丝草的质量评价提供依据。

关键词 高效液相色谱法;菟丝草;槲皮素;金丝桃苷;山柰酚;含量测定

Simultaneous Determination of 3 Components in *Cuscuta chinensis* by HPLC

Narengaowa¹, WANG Qing-hu², Nayintai², Jirigalatu²(1.Health Center, Xilin Gol ThermoElectron Enterprise, Inner Mongolia Xilin Hot 026000, China; 2.College of Traditional Mongolian Medicine, Inner Mongolia University for Nationalities, Inner Mongolia Tongliao 028000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of quercetin, hyperoside and kaempferol from *Cuscuta chinensis*. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on Hypersil ODS-2(300 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-water (58:42, V/V). The detection wavelength was set at 281 nm and column temperature was 30 °C. The flow rate was 1.0 ml/min. RESULTS: The linear ranges of quercetin, hyperoside and kaempferol were 10-50 μg/ml($r=0.999\ 7$), 2.5-30 μg/ml($r=0.999\ 5$), 2.5-30 μg/ml($r=0.999\ 6$), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. The average recoveries of three active compounds were 98.90% (RSD=1.23%, $n=6$), 97.60% (RSD=1.37%, $n=6$) and 97.39% (RSD=1.40%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and accurate, and provides reference for quality evaluation of *C. chinensis*.

KEYWORDS HPLC; *Cuscuta chinensis*; Quercetin; Hyperoside; Kaempferol; Content determination

菟丝草,蒙药名为沙日敖日贵,别名色日古德,系旋花科植物菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam的干燥全草,具有补肝肾、益精、强筋骨、明目、止泻的功效,临床广泛用于治疗肾弱、遗精、流产、遗尿、腰痛等^[1]。菟丝子的中药药用部位为种子,而蒙药药用部位为全草。由于菟丝草的寄生性,寄主植物种类和生态环境的不同对其化学成分及药效均有影响,同时对其质量的评价也带来较多难题。菟丝草的化学成分主要为槲皮素、金丝桃苷和山柰酚^[2],这些化合物对小鼠免疫功能具有调节作用;不同质量浓度的金丝桃苷具有双向调节作用^[3],这与菟丝草的蒙药临床用药比较一致,故槲皮素、金丝桃苷和山柰酚是蒙药菟丝草的主要有效成分。目前,有关菟丝草含量测定的文献已有发表^[4-6],但尚未见到采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定蒙药菟丝草中槲皮素、金丝桃苷和山柰酚含量的方法,故笔者通过本试验建立了该含量测定方法。

1 材料

1.1 仪器

AUW220D型电子天平、UV-2501PC型分光光度计、HPLC

* 主管药师。研究方向:蒙药质量控制。E-mail:274998315@qq.com

通信作者:教授,博士。研究方向:蒙药有效成分的提取分离鉴定及其质量标准。E-mail:wqh196812@163.com

仪,包括LC10-ATvp型输液泵、SPD-M10Avp型检测器、SCL-10Avp型工作站、DGU-12A型脱气机(日本岛津公司);HH-S26S型水浴锅(金坛市大地自动化仪器厂);RE52-2型旋转蒸发器(上海沪西分析仪器厂);KQ-100型系列超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药材

3批菟丝草于不同时间采集于内蒙古通辽市科左后旗沙漠地带,寄主植物为蒺藜,并经内蒙古民族大学蒙医药学院蒙药生药教研室布和巴特尔教授鉴定为旋花科植物菟丝子 *C. chinensis* Lam的干燥全草。

1.3 试剂

槲皮素、金丝桃苷和山柰酚均由笔者自制并用HPLC测定其纯度均高于98.0%;甲醇(色谱纯,天津市光复精细化工研究所);水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果^[7-9]

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:大连依利特Hypersil ODS2(300 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(58:42, V/V);柱温:30℃;检测波长:281 nm;流速:1.0 ml/min。在该色谱条件下,槲皮素、金丝桃苷和山柰酚均能达到基线分离($R>1.0$),理论板数均不低于4 000。色谱见图1。

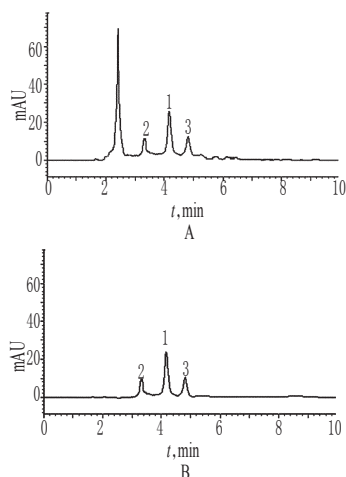


图1 高效液相色谱图

A.供试品;B.混合对照品;1.槲皮素;2.金丝桃苷;3.山柰酚

Fig 1 HPLC chromatograms

A.test samples;B.mixed control;1.quercetin;2.hyperoside;3.kaempferol

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取槲皮素、金丝桃苷和山柰酚对照品各适量,精密称定,加甲醇溶解,分别制成质量浓度为1.0 mg/ml的对照品贮备液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取菟丝草研细,称取粗粉0.2 g,精密称定,加入石油醚10 ml,超声(功率:600 W,频率:40 kHz)20 min,滤过,药渣挥去石油醚后精密加甲醇20 ml,称定质量,超声(功率:600 W,频率:40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,滤过,滤液回收至干,用甲醇定容至10 ml,即得。

2.3 检测波长的选择

分别吸取3种对照品贮备液适量,在200~400 nm波长范围内进行扫描。结果显示,槲皮素、金丝桃苷和山柰酚的最大吸收波长均为281 nm,故检测波长定为281 nm。

2.4 线性关系考察

精密吸取槲皮素、金丝桃苷和山柰酚对照品贮备液各适量,加甲醇制备成5个不同质量浓度的系列混合对照品溶液。分别吸取上述溶液5 μl,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度(x)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性关系考察,结果见表1。

表1 槲皮素、金丝桃苷和山柰酚的线性关系考察结果(n=5)

Tab 1 Linear range curves for quercetin, hyperoside and kaempferol(n=5)

化合物	回归方程	r	线性范围, μg/ml
槲皮素	$y=12\,470.0x-8\,214.1$	0.999 7	10~50
金丝桃苷	$y=9\,742.8x+3\,228.4$	0.999 5	2.5~30
山柰酚	$y=5\,140.6x-25\,173.0$	0.999 6	2.5~30

2.5 精密度试验

取同一混合对照品溶液适量,按上述色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,槲皮素、金丝桃苷和山柰酚的RSD分别为1.25%、1.31%、1.23%(n均为6),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液(采集时间:2009-06-20)适量,分别于制备后0、4、6、8、12 h按上述色谱条件进样测定,记录峰面

积。结果显示,槲皮素、金丝桃苷和山柰酚的RSD分别为1.71%、1.57%和1.43%(n均为5),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.7 重复性试验

取同一采集时间(采集时间:2009-06-20)的菟丝草样品适量,共6份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,样品中槲皮素、金丝桃苷和山柰酚的平均含量分别为1.109 7、0.225 8、0.456 1 mg/g,RSD分别为1.66%、1.62%、1.84%(n均为6),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取同一采集时间(采集时间:2009-06-20)的菟丝草样品0.10 g,共6份,分别精密加入槲皮素、金丝桃苷和山柰酚对照品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery test(n=6)

成分	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
槲皮素	99.72	100.00	198.60	98.88	98.90	1.23
	101.80	100.00	200.80	99.00		
	100.80	100.00	198.50	97.70		
	99.06	100.00	198.20	99.14		
	100.10	100.00	197.80	97.70		
	100.80	100.00	201.80	101.00		
金丝桃苷	20.77	20.00	40.33	97.80	97.60	1.37
	21.20	20.00	41.00	99.00		
	20.99	20.00	40.20	96.05		
	20.63	20.00	39.81	95.90		
	20.86	20.00	40.62	98.80		
	20.99	20.00	40.61	98.10		
山柰酚	42.09	42.00	82.79	96.90	97.39	1.40
	42.96	42.00	83.79	97.21		
	42.55	42.00	82.74	95.69		
	41.82	42.00	82.46	96.76		
	42.27	42.00	84.14	99.69		
	42.55	42.00	83.74	98.07		

2.9 样品含量测定

精密称取3个不同采集时间的样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,以峰面积计算样品中槲皮素、金丝桃苷和山柰酚的含量,重复3次,取平均含量,结果见表3。

表3 菟丝草中槲皮素、金丝桃苷和山柰酚的含量测定结果(mg/g, $\bar{x} \pm s$, n=3)

Tab 3 Results of content determination of quercetin, hyperoside and kaempferol in *C. chinensis*(mg/g, $\bar{x} \pm s$, n=3)

采集时间	槲皮素含量	金丝桃苷含量	山柰酚含量
2008-06-28	1.578 ± 0.013	0.244 ± 0.002	0.489 ± 0.005
2009-06-20	1.085 ± 0.012	0.226 ± 0.003	0.458 ± 0.003
2010-06-12	1.438 ± 0.032	0.202 ± 0.004	0.390 ± 0.004

3 讨论

在流动相的选择中,笔者曾采用甲醇-水的不同比例洗脱系统进行比较,结果以甲醇-水(58:42, V/V)作流动相的分离效果和重复性较好,且各成分均能达到基线分离,故选其作为流动相。

据菟丝草的化学成分前期研究结果^[2],槲皮素、金丝桃苷和山柰酚均分离于乙酸乙酯层,故提取样品时,先用石油醚脱

333 例儿童临床使用痰热清注射液的安全性分析^Δ

张 丽^{1*},方 芳²,李百强³,李嗣东⁴,张 嫣¹,杨欣燕¹,梁 喆¹,赵红丽¹,于晓华¹(1.哈尔滨市儿童医院,哈尔滨 150010;2.佳木斯大学第一附属医院,黑龙江 佳木斯 154003;3.黑龙江省药品不良反应监测中心,哈尔滨 150076;4.哈尔滨市食品药品监督管理局,哈尔滨 150020)

中图分类号 R283.611;R969;R985 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)07-0651-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.07.26

摘 要 目的:了解痰热清注射液儿科临床使用的安全性。方法:用 SPSS13.0 软件统计分析哈尔滨市儿童医院 2011 年 1 月至 2012 年 9 月使用痰热清注射液的儿科住院患儿临床使用该药品安全性的主动集中监测数据。结果:使用痰热清注射液的 333 例患儿均有合并用药现象,其中 98% 与抗菌药合并使用。痰热清注射液的不良反应均发生在 3 岁以下的儿童,发生率为 1.2%,未见与其不良反应肯定的关联性。结论:3 岁以下患儿临床使用痰热清注射液应慎重。

关键词 痰热清注射液;儿童;安全性;临床用药

Analysis of the Safety of Tanreqing Injection in 333 Children Cases

ZHANG Li¹, FANG Fang², LI Bai-qiang³, LI Si-dong⁴, ZHANG Yan¹, YANG Xin-yan¹, LIANG Zhe¹, ZHAO Hong-li¹, YU Xiao-hua¹(1.Harbin Children's Hospital, Harbin 150010, China; 2.The First Affiliated Hospital of Jamusi University, Heilongjiang Jiamusi 154003, China; 3.Heilongjiang Center for ADR Monitoring, Harbin 150076, China; 4.Harbin Food and Drug Administration, Harbin 150020, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To understand the safety of Tanreqing injection in pediatric department. METHODS: The active centralized monitoring data of the safety of Tanreqing injection in the inpatients of pediatric department in Harbin Children's Hospital during Jan. 2011-Sept. 2012 was analyzed by SPSS13.0 statistical analysis software. RESULTS: All of 333 patients receiving Tanreqing injection were treated by drug combination, in which, 98% cases had combined with antibiotics. ADR of Tareqing injection occurred in children under 3 years old with the incidence of 1.2%, of which the affirmative relevance to ADR was not found. CONCLUSIONS: To the children patients under 3 years old, the clinical use of Tanreqing injection needs to be cautious.

KEYWORDS Tanreqing injection; Children; Safety; Clinical use

痰热清注射液是由黄芩、熊胆粉等 5 味药材制成的纯中药注射剂,具有清热、解毒、化痰的功效,自 2003 年上市后被广泛

用于临床相关疾病和其他组织感染的治疗^[1],但临床上也时有不良反应(ADR)的发生^[2-3]。随着我国药品研制和生产技术

脂,药渣再加甲醇超声提取。经分析可知,所得提取液在上述色谱条件下分离效果好。

据含量测定结果可知,采集时间和气候不同,即使采集地点和寄主植物相同,菟丝草药材中槲皮素、金丝桃苷和山柰酚的含量也会不同。提示在对菟丝草进行质量评价时有必要考虑采集时间和生态环境。

综上,本方法简便、快速、准确,可用于蒙药菟丝草的质量评价。

参考文献

[1] 内蒙古自治区革命委员会卫生局.内蒙古中草药[M].呼和浩特:内蒙古人民出版社,1973:681.

[2] 王青虎,武晓兰,温永顺.蒙药菟儿丝的化学成分研究[J].中国药学杂志,2012,47(1):23.

[3] 顾立刚,叶敏,阎玉凝,等.菟丝子金丝桃苷体内对外对小鼠

免疫功能的影响[J].中国中医药信息杂志,2001,8(10):42.

[4] 李继红,李秋红,郭倩倩,等.HPLC法测定菟丝子炮制前后化学成分含量[J].中兽医医药杂志,2009,28(5):37.

[5] 胡丽萍,王跃飞,宋殿荣,等.HPLC-UV-MS法同时测定菟丝子中3种成分的含量[J].中药材,2010,33(8):1 277.

[6] 李秋红,王晓蕾,李延利,等.HPLC测定菟丝子炮制前后金丝桃苷和槲皮素的含量[J].中成药,2009,31(9):1 394.

[7] 李爱红,胡文军.HPLC法测定复方银杏叶胶囊中总黄酮的含量[J].中国药房,2008,19(12):927.

[8] 石继亮,单玉,张振秋,等.HPLC法同时测定黄芪中槲皮素、山柰酚、芒柄花素的含量[J].药物分析杂志,2010,30(1):114.

[9] 李玉兰,高美华.HPLC测定不同产地连翘中连翘苷和连翘酯苷的含量[J].中国医学工程,2010,18(2):46.

(收稿日期:2013-03-19 修回日期:2013-07-15)

Δ 基金项目:黑龙江省卫生厅科研课题(No.2011-463)

* 主任药师,硕士。研究方向:药品不良反应监测。电话:0451-84881210。E-mail:menzhenyao@sohu.com