

HPLC法测定不同产地凤仙花饮片中山奈素的含量

李瑞生*,曹军华*(襄阳市中心医院药学部,湖北 襄阳 441021)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)47-4473-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.47.19

摘要 目的:建立测定不同产地凤仙花饮片中山奈素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.2%磷酸溶液(35:65, V/V),检测波长为 360 nm,流速为 1.0 ml/min,柱温为 40 ℃,进样量为 5 μl。结果:山奈素的质量浓度在 8.16~81.60 μg/ml 范围内与峰面积积分值呈良好线性关系($r=0.9996$);精密性、重复性、稳定性试验的 RSD<2%;平均加样回收率为 99.68%,RSD=1.9%($n=9$)。结论:湖北宜昌所产的凤仙花饮片中的山奈素含量最高。该方法操作简便,结果准确、可靠,可用于凤仙花饮片的质量控制。

关键词 凤仙花;产地;山奈素;高效液相色谱法;含量测定

Content Determination of Kaempferol in *Impatiens balsamina* Decoction Pieces from Different Producing Areas

LI Rui-sheng, CAO Jun-hua (Dept. of Pharmacy, Xiangyang Central Hospital, Hubei Xiangyang 441021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine the content of kaempferol in *Impatiens balsamina* decoction pieces from different producing areas. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% phosphoric acid (35:65, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 360 nm, column temperature was 40 ℃, and sample size was 5 μl. RESULTS: The linear range of kaempferol were 8.16-81.60 μg/ml ($r=0.9996$) with an average recovery of 99.68% (RSD=1.9%, $n=9$). RSDs of precision, reproducibility and stability tests were all lower than 2%. CONCLUSIONS: The content of kaempferol in *I. balsamina* decoction pieces from Hubei Yichang is the highest. The method is accurate and reliable, and can be used for the quality control of *I. balsamina* decoction pieces. The method is accurate and reliable, and can be used for the quality control of *I. balsamina* decoction pieces.

KEYWORDS *Impatiens balsamina*; Producing areas; Kaempferol; HPLC; Content determination

凤仙花为凤仙花科植物凤仙 *Impatiens balsamina* L.的花,夏、秋季花开放时采收,具有祛风、活血、消肿、止痛的功效,临床用于治疗风湿偏废、腰肋疼痛、妇女经闭腹痛、产后瘀血未尽、跌打损伤、痈疽、疔疮、鹅掌风、灰指甲等^[1]。凤仙花的主要活性成分属黄酮类,其中山奈素是其主要药效成分,其含量的高低与治疗效果有直接关系,而山奈素的含量高低则与凤仙花的产地及生长环境密切相关。笔者收集了不同产地的凤仙花饮片,并采用高效液相色谱(HPLC)法测定其山奈素的含量^[2],并进行比较分析,以为合理开发凤仙花药用资源提供依据,也为建立其质量标准提供参考文献^[3-6]。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT型HPLC仪,配有二极管阵列检测器(日本岛津公司);AB204-N型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 试剂

山奈素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110201-2001004);甲醇、乙腈为色谱纯;水为纯化水;其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

所用4批药材分别采自(2009年7月)湖北仙桃、湖北荆

门、湖北宜昌、安徽亳州,其中仙桃、荆门、宜昌的饮片为自然生长环境下6、7月份花期时采集,然后按规定的炮制方法晒干、去除杂质得到;安徽亳州的饮片则购买自安徽亳州市场(康材医药公司,批号:20090109),经湖北中医药大学中药鉴定教研室陈科力教授鉴定为凤仙花科植物凤仙 *I. balsamina* L.的干燥花瓣。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);检测波长:360 nm;流动相:乙腈-0.2%磷酸(35:65, V/V);流速:1.0 ml/min;柱温:40 ℃;进样量:5 μl。理论板数按山奈素峰应不低于2000;分离度应不小于2.0。色谱见图1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取山奈素对照品10.2 mg,置50 ml量瓶中,用甲醇溶解并制成质量浓度为0.204 mg/ml的对照品贮备液。精密量取对照品贮备液1 ml,置10 ml量瓶中,加甲醇定容至刻度,制成每1 ml含山奈素20.4 μg的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取凤仙花样品适量,剪碎,取约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 ml,称定质量,加热回流30 min,放冷,再次精密称定,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液5 ml,置平底烧瓶中,加稀盐酸溶液5 ml,摇匀,置80 ℃水浴中加热水解30 min,立即冷却,转移至25 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

* 副主任药师。研究方向:医院药学。电话:0710-3521157。E-mail:lrs620909@126.com

通信作者:副主任药师。研究方向:临床药学。电话:0710-3520943。E-mail:4184128@qq.com

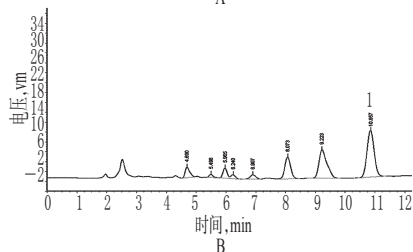
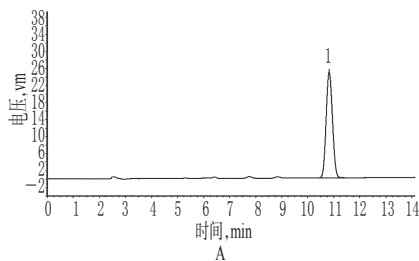


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;1.山奈素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. test samples; 1. Kaempferol

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests (n=9)

编号	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
1	0.455	0.204	0.657	99.02		
2	0.455	0.204	0.655	98.04		
3	0.455	0.204	0.661	100.98		
4	0.455	0.408	0.851	97.06	99.68	1.9
5	0.455	0.408	0.857	98.52		
6	0.455	0.408	0.858	98.77		
7	0.455	0.612	1.079	101.96		
8	0.455	0.612	1.083	102.61		
9	0.455	0.612	1.068	100.16		

表2 样品含量测定结果

Tab 2 Results of content determination of samples

产地	质量分数,%	产地	质量分数,%
湖北仙桃	0.091	安徽亳州	0.121
湖北荆门	0.082	湖北宜昌	0.137

预试验中,笔者曾尝试不同的流动相体系^[7-8],结果发现采用乙腈-磷酸作流动相,山奈素与其他成分能较好分离,且干扰较少,故最终选择了乙腈-0.2%磷酸(35:65,V/V)作为流动相。在提取山奈素的过程中,也尝试了采用不同的溶剂,结果发现采用稀盐酸作溶剂,山奈素的分离提取效果较好。

凤仙花的产地很多,湖北地区是其主要产地之一。本研究中收集的样品也主要以湖北地区为主,由含量测定结果可以发现,湖北宜昌地区的山奈素含量较高,而平原地区采摘的凤仙花,如湖北仙桃、湖北荆门,山奈素的含量偏低。期待在全国各地收集样品,在更大范围内比较凤仙花饮片中山奈素含量的差异。

综上所述,本方法操作简便,结果准确、可靠,可用于凤仙花饮片的质量控制。

参考文献

- [1] 徐国均. 中国药理学[M].北京:中国医药科技出版社,1996:826-827.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:526.
- [3] 胡喜兰,程青芳,尹福军.边红玲凤仙花中山萘酚的提取、分离与纯化[J].时珍国医国药,2010,21(4):251.
- [4] 胡喜兰,朱慧,刘存瑞.屠鹏飞凤仙花的化学成分研究[J].中成药,2003,25(10):581.
- [5] 危建安,黄兆胜,黄永焯,等.苏丹凤仙草不同提取物对3种皮肤真菌抑制作用的实验研究[J].中国中医药科技,2001,8(5):22.
- [6] 曹明成.百蕊草提取工艺研究[J].现代中药研究与实践,2004,18(1):121.
- [7] 连桂香,刘玉芬,李滨.凤仙花中总黄酮的含量测定[J].化工时刊,2006,20(12):34.
- [8] 臧亚茹,陈四平.RP-HPLC法测定山楂叶提取物中槲皮素的含量[J].中国药房,2008,19(15):48.

(收稿日期:2013-10-30 修回日期:2014-02-21)

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2”项下的山奈素对照品贮备液1、2、4、8、10 ml,分别置25 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积积分值(y)为纵坐标,山奈素的质量浓度(x, $\mu\text{g/ml}$)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $y=58\ 876x+22.3$ ($r=0.999\ 6, n=5$)。结果表明,山奈素的质量浓度在8.16~81.60 $\mu\text{g/ml}$ 范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

精密量取“2.2”项下的对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定,重复6次,记录峰面积。结果,RSD=1.22%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一批样品(湖北仙桃)5份,每份约0.5 g,按“2.3”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,记录色谱峰。结果,山奈素的平均质量分数为0.091%,RSD=0.9%($n=5$),表明本方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一份供试品溶液,于制备0、1、2、4、8 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,RSD=1.33%($n=5$),表明供试品溶液在8 h内稳定。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的凤仙花样品细粉0.5 g,共9份,分别加入适量的山奈素对照品溶液,按“2.3”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,计算加样回收率,结果见表1。

2.9 样品含量测定

取不同产地的4批样品各适量,每批2份,精密称定,按“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,计算山奈素的质量分数,结果见表2。

3 讨论