

HPLC 同时测定小蓟配方颗粒中蒙花苷和芹菜素的含量

何冬黎, 张晓春, 李倩(湖北医药学院附属随州医院药学部, 湖北 随州 441300)

摘要: 目的 建立 HPLC 同时测定小蓟配方颗粒中蒙花苷和芹菜素含量的方法。方法 采用 Diamonsil-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱, 以乙腈-1%冰醋酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长: 335 nm, 柱温: 30 ℃。结果 蒙花苷和芹菜素进样量分别在 0.3~1.5 μg ($r=0.999\ 4$)和 0.075~0.375 μg ($r=0.999\ 7$)内与峰面积呈良好的线性关系; 加样回收率分别为 99.19%和 99.12%, RSD 分别为 1.27%和 1.26%。结论 该方法操作简便, 重复性好, 可用于小蓟配方颗粒中蒙花苷和芹菜素的含量测定。

关键词: 小蓟配方颗粒; 蒙花苷; 芹菜素; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)03-0410-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.03.024

Determination of Linarin and Apigenin in Cirsii Herba Dispensing Granule by HPLC

HE Dongli, ZHANG Xiaochun, LI Qian(Department of Pharmacy, Suizhou Hospital, Hubei University of Medicine, Suizhou 441300, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a method for content determination of linarin and apigenin in Cirsii Herba Dispensing Granule by HPLC. **METHODS** The separation was carried out on Diamonsil-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) under gradient elution with acetonitrile-1% glacial acetic as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 335 nm and the column temperature was maintained at 30 ℃. **RESULTS** There were good linear relationships between the masses and the peak areas of linarin and apigenin in the ranges of 0.3–1.5 μg ($r=0.999\ 4$) and 0.075–0.375 μg ($r=0.999\ 7$), respectively. The average recoveries were 99.19% and 99.12%, and RSDs were 1.27% and 1.26%. **CONCLUSION** The method is simple and reliable for the determination of linarin and apigenin in Cirsii Herba Dispensing Granule.

KEY WORDS: Cirsii Herba Dispensing Granule; linarin; apigenin; HPLC

小蓟为菊科植物刺儿菜 *Cirsium setosum* (Willd.) MB 的干燥地上部分, 气微, 味微苦, 分布于全国大部分地区, 具有凉血止血、祛瘀消肿的攻效, 用于衄血、吐血、便血、尿血、崩漏下血、外伤出血、痈肿疮毒, 为治疗血症要方“小蓟饮子”之君药。现代研究发现小蓟还具有降血压、抗菌、抗肿瘤、抗氧化等多种药理活性^[1-4]。中药配方颗粒是以符合炮制规范的优质中药饮片为原料, 采用现代高新技术提取浓缩而成的单味颗粒。其性味、攻效与原生药一致, 且具有不需煎煮、直接冲服、服用量少等优点, 已在中医临床中广泛使用。但至今关于中药配方颗粒的质量标准并未正式颁布, 让部分患者在用药时对产品的质量和疗效产生质疑。现有研究多以蒙花苷为指标成分对小蓟药材进行质量控制, 而对小蓟配方颗粒的研究未见报道。本实验采用 HPLC 同时测定小蓟配方颗粒中蒙花苷和芹菜素的含量, 为其质量控制和医院临床用药提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

ULTIMATE 3000 型高效液相色谱仪(美国 DIONEX 公司); Diamonsil-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱; ABBS-S 型十万分之一分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司); UP5200H 超声波清洗仪(熊猫集团)。

1.2 试药

小蓟配方颗粒(广东一方制药有限公司, 批号: 407205L, 412328L, 503117L, 规格: 每袋 1.5 g, 相当于原药材 15 g); 蒙花苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 11528-201308, 含量以 97.5%计); 芹菜素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 111901-201102, 纯度≥98.754%); 甲醇、乙腈为色谱纯; 水为三蒸水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取对照品蒙花苷、芹菜素适量, 置于

作者简介: 何冬黎, 女, 硕士, 药师

Tel: (0722)3228401

E-mail: cordyceps.1986@163.com

25 mL 量瓶中,加 80%甲醇溶解制成每 1 mL 含蒙花苷 100 μg , 含芹菜素 25 μg 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取小蓟配方颗粒适量,研磨成细粉,精密称定 0.15 g, 置具塞锥形瓶中,精密加入 80%甲醇 50 mL, 密塞,称定质量,超声提取 35 min, 放冷,再称定质量,用 80%甲醇补足减失的质量,摇匀,0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液即得供试品溶液。

2.3 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Diamonsil- C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-1%冰醋酸水溶液(B); 梯度洗脱: 0~10 min, A18% $\rightarrow$ 33%, 10~17 min, A 33% $\rightarrow$ 35%, 17~40 min, A35% $\rightarrow$ 55%。检测波长: 335 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量 20 μL 。按蒙花苷和芹菜素计算理论板数均 $\geq$ 3 500, 与相邻色谱峰均基线分离, 对称因子符合要求, 色谱图见图 1。

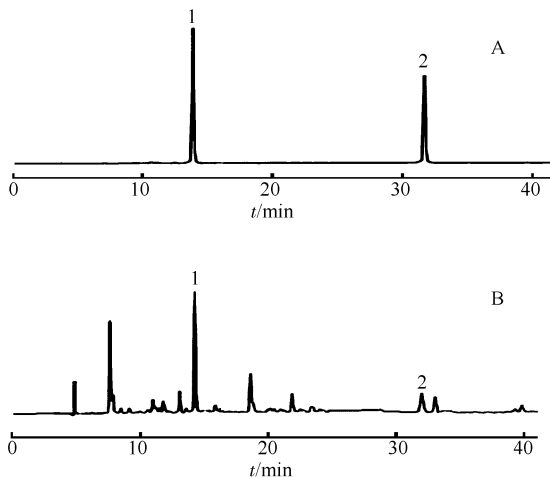


图 1 高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液; 1-蒙花苷; 2-芹菜素。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-sample solution; B-standard solution; 1-linarin; 2-apigenin.

2.4 线性关系的考察

取“2.1”项下混合对照品溶液, 分别精密吸取 3, 6, 9, 12, 15 μL 进样测定, 记录峰面积, 以进样量 $X(\mu\text{g})$ 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得蒙花苷和芹菜素的标准曲线回归方程分别为: $Y=30.191\ 4X+0.427\ 4$, $r=0.999\ 4$; $Y=53.447\ 2X+0.106\ 9$, $r=0.999\ 7$ 。

结果表明, 蒙花苷和芹菜素的进样量分别在 0.3~1.5 μg 和 0.075~0.375 μg 内与其峰面积呈良好的线性关系。

2.5 仪器精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 20 μL , 连续进样 6 次, 按“2.3”项下色谱条件测定峰面积, 结果显示, 蒙花苷、芹菜素峰面积的 RSD($n=6$)分别为 0.52%和 0.84%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 按“2.3”项下色谱条件测定峰面积, 结果蒙花苷、芹菜素峰面积的 RSD($n=6$)分别为 0.57%和 0.76%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取同一批(批号: 407205L)小蓟配方颗粒, 按“2.2”项下方法平行制备 6 份, 依法测定含量, 结果显示样品中蒙花苷、芹菜素含量的 RSD($n=6$)分别为 1.04%和 1.56%, 表明方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验^[5-6]

取已知含量的同一批号小蓟配方颗粒(批号: 407205L, 含蒙花苷 1.56%, 含芹菜素 0.48%)9 份, 每份 0.075 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入蒙花苷对照品 0.585, 1.17, 1.755 mg, 芹菜素对照品 0.18, 0.36, 0.54 mg, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件测定含量, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab. 1 Results of recovery tests($n=9$)

成分	样品含量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
蒙花苷	1.1684	0.5851	1.7492	99.26	99.19	1.27
	1.1668	0.5849	1.7419	98.32		
	1.1715	0.5852	1.7516	99.13		
	1.1700	1.1701	2.3080	97.26		
	1.1668	1.1703	2.3243	98.91		
	1.1731	1.1700	2.3611	101.54		
	1.1715	1.7551	2.9226	99.77		
	1.1746	1.7550	2.9351	100.31		
	1.1653	1.7553	2.8892	98.21		
芹菜素	0.3595	0.1802	0.5381	99.11	99.12	1.26
	0.3590	0.1803	0.5366	98.56		
	0.3604	0.1800	0.5426	101.22		
	0.3600	0.3601	0.7157	98.78		
	0.3590	0.3600	0.7183	99.80		
	0.3609	0.3604	0.7116	97.31		
	0.3604	0.5400	0.9022	100.33		
	0.3614	0.5403	0.8982	99.35		
	0.3585	0.5401	0.8856	97.59		

2.9 样品测定

取3批(批号: 407205L, 412328L, 503117L)小蓟配方颗粒各0.15 g, 依法制备供试品溶液, 每批平行制备3份, 按“2.3”项下色谱条件测定, 用外标法计算样品中蒙花苷和芹菜素的含量, 结果测得蒙花苷的含量分别为1.56%, 1.52%和1.58%; 芹菜素的含量分别为0.48%, 0.49%和0.41%。

3 讨论

3.1 指标成分的选择

现代研究发现小蓟中含有黄酮类、三萜类和有机酸类等成分, 其中黄酮类成分为其止血、抗炎的主要活性成分^[7-8]。蒙花苷和芹菜素为小蓟中黄酮类化合物, 且蒙花苷含量较高, 芹菜素性质稳定, 具有降血压、抗菌、抗氧化等多方面的药理活性^[9]。为了更全面地评价小蓟配方颗粒的质量, 本实验选择同时测定这2个成分的含量作为质量控制的指标。

3.2 检测波长的选择

根据文献报道, 蒙花苷和芹菜素紫外光谱最大吸收波长分别为334 nm^[10]和337 nm^[11], 将样品在300~360 nm内进行紫外扫描, 在335 nm处得到的图谱较为稳定, 故确定检测波长为335 nm。

3.3 流动相的选择

蒙花苷和芹菜素极性相差较大, 采用梯度洗脱, 能使色谱峰分离度较好, 曾对甲醇-水、乙腈-水、0.05%磷酸水溶液-甲醇等流动相进行考察, 采用乙腈-1%冰醋酸水溶液进行梯度洗脱时, 蒙花苷和芹菜素峰易分离且峰形好。

本实验测定小蓟配方颗粒中蒙花苷的含量>1.5%, 符合小蓟质量标准研究中蒙花苷的含量应≥1%的要求^[10], 表明小蓟经现代高新技术提取浓缩后, 其主要成分的含量并未受到影响。本研

究采用HPLC对小蓟配方颗粒中蒙花苷和芹菜素同时测定, 该方法操作简便, 重复性和稳定性好, 可作为其质量控制的依据, 并为将来配方颗粒质量标准的建立提供参考。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 86-87.
- [2] CHEN Y, DING A W, YANG X H, et al. Brief on study of chemical components, pharmacological effect and clinical application of Herba Cephalanoploris [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中医药学刊), 2005, 23(4): 614-615.
- [3] FENG Z, YANG Y N, JIANG J S, et al. Chemical constituents from *Cirsium setosum* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(6): 87-89.
- [4] LI P F, MIAO M S. Modern research and application analysis of *Cirsium setosum* [J]. China J Chin Med(中医学报), 2014, 29(3): 381-383.
- [5] WANG Y, DU J. Study on simultaneous determination of three main marker components in Xuanfeizhike mixture by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(5): 599-601.
- [6] ZHOU Y, XUE L B, JIN P F. Determination of naringin and neohesperidin in Aurantii Fructus and its Preparation Xuefu Zhuyu capsules [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(6): 778-780.
- [7] 周文序, 田珍. 中药大小蓟的黄酮类成分的分离和鉴定[J]. 北京医科大学学报, 1994, 26(4): 309.
- [8] YANG X H, CUI J H, DING A W. Impact of Herba Cirsii extracts on hemorrhage, blood coagulation and experimental inflammation in rats [J]. J Sichuan Tradit Chin Med(四川中医), 2006, 24(1): 17-19.
- [9] WANG H D, LIU A L, DU G H. New progress in the pharmacology of apigenin [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2008, 17(18): 1561-1565.
- [10] KE R, ZHU E Y, CHOU G X. Study on the quality standard of Herba Cirsii [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2010, 21(7): 1662-1663.
- [11] LIN Z T, LIANG Y, LIU S J, et al. HPLC determination of luteolin and apigenin in *Siphonostegia chinensis* [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2011, 31(9): 1689-1692.

收稿日期: 2016-08-19

(本文责编: 曹粤锋)