

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)06-0088-03
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.06.019



高效液相色谱法测定家种连翘中山柰酚含量*

周 灿^{1,2}, 刘忍阳², 柯 静^{1,2}, 石金敏^{1,2}, 赵利军^{1,2,Δ}, 秦瑜蓉², 张玲玲³

(1. 湖北医药学院附属人民医院药学部, 湖北 十堰 442000; 2. 湖北医药学院药学院, 湖北 十堰 442000;
3. 湖北省十堰市郧西县楸树垭药材种植专业合作社, 湖北 十堰 442600)

摘要:目的 建立测定家种连翘中山柰酚含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Shim-pack VP-ODS 柱(250 mm×4.6 mm, 4.6 μm), 流动相为甲醇-0.4% 磷酸水溶液(50:50, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 365 nm, 柱温为 30℃, 进样量为 10 μL。结果 山柰酚质量浓度在 0.01~0.5 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好; 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 5%; 平均加样回收率为 97.30%, RSD 为 2.13% (n=6); 湖北省十堰市郧西县 8 个村家种连翘中山柰酚含量为 0.037 7~1.088 7 mg/g。结论 该方法灵敏、可重复, 测定结果准确, 可用于家种连翘中山柰酚含量的测定。

关键词: 湖北省; 十堰市; 郧西县; 家种连翘; 山柰酚; 含量测定; 高效液相色谱法

Determination of Kaempferol in Domesticated Forsythiae Fructus by HPLC

ZHOU Can^{1,2}, LIU Renyang², KE Jing^{1,2}, SHI Jinmin^{1,2}, ZHAO Lijun^{1,2}, QIN Yurong², ZHANG Lingling³

(1. Department of Pharmacy, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei, China 442000; 2. School of Pharmacy, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei, China 442000; 3. Yunxi County Duanshuya Medical Herb Planting Cooperative, Shiyan, Hubei, China 442600)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for content determination of kaempferol in domesticated Forsythiae Fructus. **Methods** The chromatographic column was Shim-pack VP-ODS column (250 mm×4.6 mm, 4.6 μm), the mobile phase was methanol-0.4% phosphoric acid aqueous solution (50:50, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 365 nm, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear range of kaempferol was 0.01-0.5 mg/mL. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 5%. The average recovery rates of kaempferol was 97.30%, with the RSD of 2.13% (n=6). The content of kaempferol in domesticated Forsythiae Fructus from eight villages of Yunxi County, Shiyan City, Hubei Province was in the range of 0.037 7 to 1.088 7 mg/g. **Conclusion** This method is sensitive, repeatable and accurate, which can be used for the content determination of kaempferol in domesticated Forsythiae Fructus.

Key words: Hubei Province; Shiyan City; Yunxi County; domesticated Forsythiae Fructus; kaempferol; content determination; HPLC

连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实, 秋季果实初熟尚带绿色时采收, 除去杂质, 蒸熟, 晒干, 习称“青翘”; 果实熟透时采收, 晒干, 除去杂质, 习称“老翘”; 有清热解毒、消肿散结、疏散风热功效^[1]177-178。连翘中目前已分离鉴定的成分主要有苯乙醇苷类、木质素类、酚酸类及其衍生物、黄酮类、萜类及挥发油类、C6-C2 天然醇及其苷类等, 其中黄酮类成分包括山柰酚、槲皮素、异鼠李素、芦丁、金丝桃苷、紫云英苷、橙皮苷、黄芩苷等, 具有抗炎、抗氧化、抗病毒等药理作用^[2]。本研究中拟建立测定家种连翘中山柰酚含量的高效液相色谱(HPLC)法, 以期为进一步控制家种连翘的内在质量及开发利用其药用价值提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪, 含 CMB-20A 型控制器、DGU-20A5R 型在线脱气机、进样泵、SIL-20A 型自动进样器、CTO-20A 型柱温箱、SPD-M20A 型紫外检测器(日本 Shimadzu 公司); FA2004 型电子分析天平(上海天平仪器厂, 精度为 0.1 mg); HH-S 型数显恒温水浴锅(常州智伯瑞仪器制造有限公司); H1650-W 型高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); GM-0.33A 型隔膜真空泵(天津市津腾实验设备有限公司)。

1.2 试药

山柰酚对照品(四川省维克奇生物科技有限公司, 批号为 wkq17032203, 含量≥98%); 连翘药材, 于 2022 年

* 基金项目: 湖北省重点研发计划项目[2021BBA246]; 湖北医药学院“十四五”省级校优势特色学科群(生物与医药)资助项目[2022BMXKQT5]。

第一作者: 周灿, 男, 硕士, 主管药师, 研究方向为中药资源开发及中药种植质量控制, (电子信箱)327412800@qq.com。

Δ 通信作者: 赵利军, 男, 硕士, 副主任药师, 研究方向为中药资源开发, (电子信箱)791511650@qq.com。

7月16日分别采自十堰市郧西县三官洞林区、上津镇的8个行政村(包括何家井村、三官洞村、蒿坪河村、马家坪村、祖师殿村、孙家湾村、绞肠关村、伍峪坪村,各1批,编号为S1-S8),经湖北医药学院中药学教研室张晓燕教授鉴定为正品;甲醇为色谱纯,盐酸、磷酸为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Shim-pack VP-ODS柱(250 mm×4.6 mm, 4.6 μm);流动相:甲醇-0.4%磷酸水溶液(50:50, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:365 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

取山柰酚对照品12.5 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成每1 mL含0.5 mg山柰酚的对照品溶液。取蒸锅,加水至约10 cm深,加热至沸并达圆气状态^[3];取药材样品500 g,置蒸锅内,再次达到圆气状态后蒸制15 min,快速移出,沥干水分,于50℃烘箱干燥36 h,取出,碾压成粉,制成药材样品粉末,过2号筛;取约5.0 g,各4份,精密称定,精密加入甲醇-25%盐酸溶液(4:1, V/V)混合溶液25 mL,称定质量,水浴回流1 h,冷却至室温,再次称定质量,用甲醇-25%盐酸溶液(4:1, V/V)补足减失的质量,摇匀,离心,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

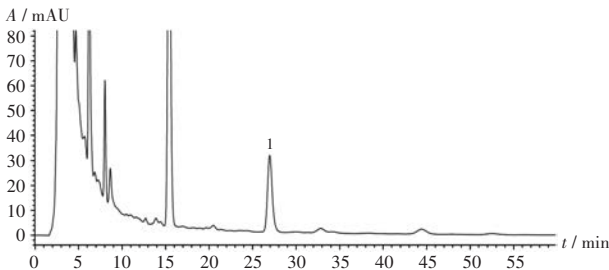
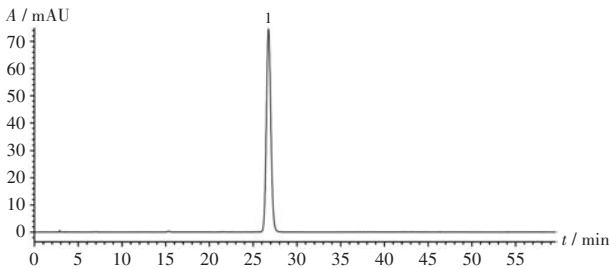
系统适用性试验:精密吸取2.2项下2种溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置有吸收峰。理论板数按山柰酚峰计不低于3 000,分离度大于1.5,基线分离良好。详见图1。

线性关系考察:精密量取2.2项下对照品溶液0.2, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mL,置10 mL棕色容量瓶中,加甲醇定容,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 5\,355.5X + 5\,380.3$ ($R^2 = 0.999\,9$, $n = 7$)。结果表明,山柰酚质量浓度在0.01~0.5 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取供试品溶液(编号S5)适量,按2.1项下色谱条件连续进样定6次,记录峰面积。结果的 RSD 为0.41% ($n = 6$),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液(编号S8),分别于室温下放置2, 4, 6, 8, 10, 12 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 为2.54% ($n = 6$),表明供试品溶液室温下放置12 h内较稳定。

重复性试验:取同一批样品(编号S8)6份,各5.0 g,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下



1. 山柰酚

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Kaempferol

A. Reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果的 RSD 为4.32% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的同一批样品(编号S8)6份,各5.0 g,精密称定,分别精密加入山柰酚对照品1.4 g,按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,并计算加样回收率^[4]。结果见表1。

表1 加样回收试验结果($n = 6$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n = 6$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
1.463 0	1.400 0	2.859 1	99.72	97.30	2.13
1.454 0	1.400 0	2.853 9	99.99		
1.457 5	1.400 0	2.803 3	96.13		
1.453 0	1.400 0	2.811 8	97.06		
1.451 0	1.400 0	2.789 1	95.58		
1.500 5	1.400 0	2.834 8	95.31		

2.4 样品含量测定

取样品S1-S8各5.0 g,平行4份,精密称定,按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,并计算含量。结果含量分别为0.448 7, 0.209 2, 0.037 7, 0.229 4, 0.410 3, 1.088 7, 0.359 8, 0.292 6 mg/g。

3 讨论

3.1 检测波长选择

预试验对山柰酚的光谱吸收进行全波段扫描,结

果显示,山柰酚在199,365,265,511,715 nm波长处均呈最大吸收,且其吸收强度大小为199 nm > 365 nm > 265 nm > 715 nm $\approx$ 511 nm;分别采用前3个波长对对照品和样品进行检测,结果以365 nm为检测波长时目标峰峰形更好、分离度均更高且符合药典标准。因此,本研究中采用365 nm作为检测波长。

3.2 样品制备研究

预试验中,取同一采收期内的连翘,分别采用蒸法和煮法加工,适宜温度干燥后分别测定挥发油、连翘苷、连翘酯苷A含量及蒸液和煮制液中连翘苷和连翘酯苷A的含量,结果,蒸法样品的各指标均合格;而煮法样品的挥发油含量不合格,连翘苷和连翘酯苷A含量虽合格但低于蒸法样品;且蒸液中连翘苷和连翘酯苷A的含量均低于煮制液。再对煮法工艺和蒸法工艺分别进行研究,以煮制时间、煮制加水量、干燥温度及蒸制时间、干燥温度为指标进行工艺考察,结果煮制品挥发油含量均不合格,而蒸制最佳工艺为蒸15 min,50℃干燥36 h。因此,本研究中采用上述最佳蒸制工艺进行样品制备。

3.3 样品质量评价

预试验中对样品进行质量考察时发现,样品间的杂质、水分、总灰分及浸出物含量差异均无统计学意义($P > 0.05$),说明其符合药典标准,具有均一性,且不影响山柰酚含量的检测;各样品的挥发油、连翘苷及连翘酯苷A含量差异较大($P < 0.05$),且与山柰酚含量呈同向变化趋势,推测其可能与产地、海拔及采收期的影响有关,影响机制有待进一步研究。

3.4 试验设计分析

结合2020年版《中国药典(一部)》^{[1]223}及其他文献^[5-9]报道,本试验原计划采用HPLC法同时测定连翘中黄酮类成分槲皮素、异鼠李素和山柰酚的含量,但结果欠佳。一方面,异鼠李素含量太低(1.3 kg连翘浸膏中仅含3.4 mg^[10]),低于本研究中所用仪器的检测限;另一方面,槲皮素的供试品溶液稳定性很差,室温静置12 h后峰面积减少了30.3%,这与文献^[11]报道结果不一致,即使采用了相同的供试品溶液制备方法,即甲醇-25%盐酸溶液(4:1, V/V)混合溶液加热回流提取效果仍未提升;推测其可能与连翘组分性质或pH^[12]有关,或需采用超声^[13]、醇提酸水解^{[1]230}等方法提取才能保证槲皮素含量的稳定。

3.5 产地对山柰酚含量的影响

十堰市郧西县处于华北自然区域和华中自然区域之间,属副热带北界大陆性季风气候,四季分明,雨量适中,日照充足,无霜期长,气候温和,特别适合人类居住和动植物生长^[14]。但由于东西部跨度115 km,县域内错综分布有众多山、丘、谷、坝,局部地方还有岩溶(喀

斯特)地貌,海拔落差大(1.57~1 853 m^[15]),因此全县气候不均衡,特别是春季,虽气温回升快,但降水少,气温起伏不定,冷空气活动频繁。本研究中的药材样品采自十堰市郧西县三官洞林区及上津镇,两地相隔约50 km,南北跨度约30 km,产地海拔426~1 246 m,同时受“倒春寒”天气影响,各产地家种连翘的山柰酚含量存在一定差异。

3.6 方法评价

本研究中建立了测定湖北省十堰市郧西县不同产地家种连翘中山柰酚含量的HPLC法,该方法灵敏、可重复,测定结果准确,可用于家种连翘中山柰酚含量的测定,并为连翘质量控制方法的优化提供了参考;但需注意,该县不同产地家种连翘中山柰酚含量差异较大。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] 郭宝, 朱向东. 中药连翘化学成分及药理活性最新进展[J]. 化工管理, 2022(30): 59-61.
- [3] 刘铭, 贾东升, 谢晓亮, 等. 河北太行山区青翘产地初加工方法研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(7): 1627-1629.
- [4] 周峰, 江勋, 彭婷婷. 高效液相色谱法同时测定海珠喘息定片中槲皮素和山柰酚含量[J]. 中国药业, 2022, 31(1): 77-80.
- [5] 任梅娟, 卢永昌, 辛青霞, 等. HPLC法测定沙棘籽粕中槲皮素、山柰酚和异鼠李素的含量[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2018, 39(1): 1-4.
- [6] 张东, 付铭哲, 邹国栋. HPLC法同时测定沙棘黄酮中槲皮素、山柰酚和异鼠李素的含量[J]. 中国民族医药杂志, 2019, 25(12): 35-37.
- [7] 张莉霞, 刘东彦, 石晓峰, 等. HPLC法同时测定雪松果中槲皮素、山柰酚和异鼠李素的含量[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1540-1542.
- [8] 钟爱清, 翁琳琳, 雷丽丽, 等. 禽药锦鸡儿不同部位槲皮素、山柰酚、异鼠李素含量测定[J]. 农业科技通讯, 2019(10): 121-123.
- [9] 曹学松, 王锦军, 黄兆文. 车前子中槲皮素、木犀草素、山柰酚、芹菜素的含量测定[J]. 中国药业, 2009, 18(12): 32-34.
- [10] 王福男. 中药连翘的化学成分研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2009.
- [11] 李雨生, 王祥培, 万德光, 等. HPLC法测定头花蓼中槲皮素与山柰酚的含量[J]. 中药与临床, 2011, 2(3): 24-26.
- [12] 孟宪昉, 陆兰丽. 香椿叶中提取槲皮素的稳定性研究[J]. 食品研究与开发, 2007(1): 46-48.
- [13] 典灵辉, 吴铁, 吕应年. HPLC法测定黄芪中槲皮素和山柰酚的含量[J]. 现代医药卫生, 2007, 23(17): 2550-2551.
- [14] 许红霞. 郧西县气候对小麦生长发育的影响[J]. 现代农业科技, 2016(12): 235-236.
- [15] 湖北省郧西县地方志编纂委员会办公室. 郧西县志[M]. 武汉: 武汉测绘科学技术大学出版社, 1995: 7.

(收稿日期: 2023-05-10; 修回日期: 2023-10-26)