doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.01.020

# 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*

周　峰,江　勋△,彭婷婷

(湖南省衡阳市市场监督检验检测中心,湖南 衡阳　421001)

**摘要:目的**　建立同时测定海珠喘息定片中主药胡颓子叶的指标性成分槲皮素和山柰酚含量的高效液相色谱法。**方法**　色谱柱为 Shimadzu Shim - pack GIST - $C_{18}$ 柱(250 mm × 4.6 mm,5 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,柱温为 30 ℃,检测波长为 360 nm,进样量为 20 μL。**结果**　槲皮素和山柰酚的质量浓度分别在 0.43 ~ 8.59 μg / mL($R^2$ = 0.999 7,*n* = 9),0.30 ~ 5.91 μg / mL($R^2$ = 0.999 7,*n* = 9)范围内与峰面积线性关系良好;检测限分别为 0.43 ng 和 0.59 ng,定量限分别为 1.29 ng 和 1.77 ng;精密度、稳定性、重复性试验的 *RSD* 均小于 2.0%;平均加样回收率分别为 101.67% 和 101.36%,*RSD* 分别为 1.54% 和 1.99%(*n* = 9)。**结论**　该方法操作简便,结果准确,专属性强,重复性和稳定性均良好,可用于同时测定海珠喘息定片中槲皮素和山柰酚的含量。

**关键词:**海珠喘息定片;高效液相色谱法;槲皮素;山柰酚;胡颓子叶;含量测定

**中图分类号:R932;R284.1;R286.0**　　**文献标志码:A**　　**文章编号:1006 - 4931(2022)01 - 0077 - 04**

## Simultaneous Determination of Quercetin and Kaempferol in Haizhu Chuanxiding Tablets by HPLC

*ZHOU Feng, JIANG Xun, PENG Tingting*

*(Inspection and Testing Center, Hengyang Market Supervision, Hengyang, Hunan, China　421001)*

**Abstract: Objective**　To establish a high - performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of quercetin and kaempferol in Haizhu Chuanxiding Tablets. **Methods**　The chromatographic column was Shimadzu Shim - pack GIST - $C_{18}$ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol - 0.4% phosphoric acid solution (50 ∶ 50, *V* / *V*), the flow rate was 1.0 mL / min, the column temperature was 30 ℃, the detection wavelength was 360 nm, and the injection volume was 20 μL. **Results**　The linear ranges of quercetin and kaempferol were 0.43 - 8.59 μg / mL($R^2$ = 0.999 7, *n* = 9) and 0.30 - 5.91 μg / mL ($R^2$ = 0.999 7, *n* = 9), respectively. The limits of detection (LOD) were 0.43 ng and 0.59 ng, respectively, and the limits of quantitation (LOQ) were 1.29 ng and 1.77 ng, respectively. The *RSD*s of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0%. The average recoveries of quercetin and kaempferol were 101.67% and 101.36% with *RSD*s of 1.54% and 1.99%(*n* = 9), respectively. **Conclusion**　The method is simple, accurate, specific, reproducible and stable, which can be used for the simultaneous determination of quercetin and kaempferol in Haizhu Chuangxiding Tablets.

**Key words:** Haizhu Chuanxiding Tablets; HPLC; quercetin; kaempferol; Elaeagnus Pungens Folium; content determination

海珠喘息定片由珍珠层粉、胡颓子叶、天花粉、蝉蜕、防风、冰片、甘草、盐酸氯丙那林、盐酸去氯羟嗪制成,具有平喘、祛痰、镇静、止咳功效,也用于治疗支气管哮喘、慢性气管炎[1],可改善慢性喘息性支气管炎平稳期的咳喘症状[2-3]。现有标准收载于 1994 年版《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第九册)》,另有国家食品药品监督管理局标准 YBZ02382007,二者内容一致,但均无定量测定方法,文献[4 - 6]仅涉及方中冰片、盐酸氯丙那林、盐酸去氯羟嗪等成分的定量分析。胡颓子叶为海珠喘息定片方中的主药,是胡颓子科植物胡颓子 *Elaeagnus pungens* Thunb. 的干燥叶,主治肺虚咳嗽、气喘、咳血、吐血、痈疽、痔疮、肿痛等症,其提取物具有止咳、祛痰、平喘、广谱抗菌等作用[7-11]。原质量标准收载于 1977 年版《中国药典(一部)》含量控制项。参考文献[12 - 17]和前期样品分析结果,本研究中建立了测定海珠喘息定片中主药胡颓子叶的指标性成分槲皮素和山柰酚含量的高效液相色谱法,为提升该制剂的质量标准提供依据。现报道如下。

## 1　仪器与试药

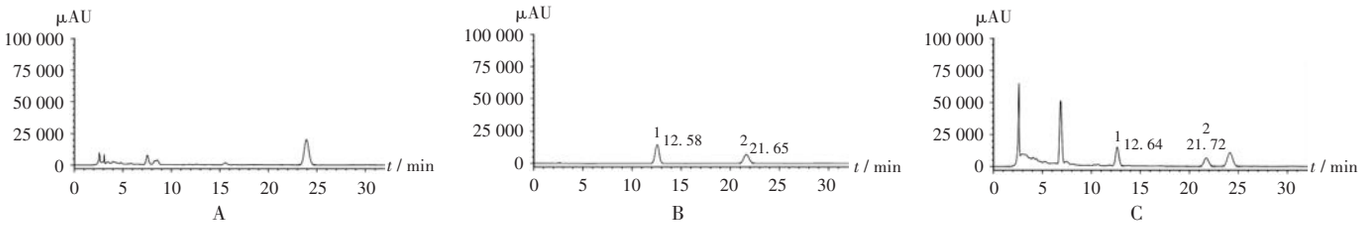
### 1.1　仪器

SHIMADZU LC - 20AT 型液相色谱仪(日本岛津公司),配有 SPD - M20A 型检测器;AE240S 型电子分析天平(瑞士梅特勒 - 托利多集团公司,精度为十万分之一);XMTD - 4000 型八孔电热恒温水浴锅(北京永光明医疗器械厂)。

*基金项目:湖南省自然科学基金[2020JJ9024]。

第一作者:周峰,男,大学本科,主管药师,研究方向为食品、药品检测及生产质量管理,(电话)0734 - 8197121(电子信箱)893032246@qq.com。

△通信作者:江勋,男,大学本科,副主任药师,研究方向为药品质量管理,(电子信箱)86072360@qq.com。




1. 槲皮素 2. 山柰酚

A. 阴性对照品溶液 B. 混合对照品溶液 C. 供试品溶液

**图1 高效液相色谱图**

1. Quercetin 2. Kaempferol

A. Negative reference solution B. Mixed reference solution C. Test solution

**Fig. 1 HPLC chromatograms**

### 1.2 试药

槲皮素对照品(中国食品药品检定研究院,批号为100081-201610,纯度为99.1%);山柰酚对照品(乐美天医药德斯特生物技术有限公司,批号为DST200829-056,纯度为98%);乙腈(批号为N9CA1H)、甲醇(批号为T3AG1H)均为色谱纯,购自美国Honey Well公司;实验用水为屈臣氏蒸馏水(批号为20190910C),其他试剂均为分析纯;海珠喘息定片(沈阳红药集团股份有限公司,批号分别为190201,190501,180701;洛阳天生药业有限责任公司,批号分别为190402,190102;江西南昌桑海制药有限责任公司,批号为190359;厦门中药厂有限公司,批号分别为191017,181226,191106,190601,181207,181208)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Shimadzu Shim-pack GIST-$C_{18}$柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.4%磷酸水溶液(50∶50,*V*/*V*);流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:360 nm;进样量:20 μL。

### 2.2 溶液制备

分别取槲皮素、山柰酚对照品各适量,精密称定,分别加甲醇制成每1 mL含429.4 μg槲皮素和295.7 μg山柰酚的对照品贮备液;分别精密量取对照品贮备液各适量,置同一50 mL容量瓶中,加甲醇制成每1 mL含槲皮素、山柰酚分别为8.588 0,5.913 3 μg的混合对照品溶液。

取样品10片,研细,取粉末1.5 g,精密称定,至带塞锥形瓶中,加甲醇-25%盐酸溶液(4∶1,*V*/*V*)的混合溶液50 mL,加热回流30 min,放冷,转移至100 mL容量瓶中,并加甲醇至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

按海珠喘息定片处方工艺制备缺胡颓子叶的阴性对照样品,并依法制备阴性对照品溶液。

### 2.3 方法学考察

专属性试验:取2.2项下3种溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,色谱图见图1。结果显示,阴性对照品溶液在对照品溶液色谱峰相应位置上无吸收峰,表明样品中其他物质不影响样品的测定结果,方法专属性强。在该色谱条件下,各成分可达到基线分离,分离度均大于1.5。

线性关系考察、检测限和定量限确定:取2.2项下混合对照品溶0.50,1.25,2.50,3.50,5.00,6.00,7.50,9.00,10.00 mL,分别置10 mL容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制成系列质量浓度的标准溶液,分别进样测定,以峰面积(*Y*)为纵坐标、质量浓度(*X*,μg/mL)为横坐标进行线性回归。以信噪比(*S*/*N*)为3∶1时的含量为检测限,以信噪比为10∶1时的含量为定量限。结果见表1。

**表1 槲皮素和山柰酚线性关系考察结果及检测限和定量限**

**Tab. 1 Results of linear relation test, LOD and LOQ**

| 化合物 | 线性回归方程 | $R^2$ | 线性范围(μg/mL) | 检测限(ng) | 定量限(ng) |
|---|---|---|---|---|---|
| 槲皮素 | $Y$=96 951.8$X$+2 944.1 | 0.999 7 | 0.43~8.59 | 0.43 | 1.29 |
| 山柰酚 | $Y$=89 847.4$X$-1 548.6 | 0.999 9 | 0.30~5.91 | 0.59 | 1.77 |

精密度试验:精密吸取混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定5次,记录色谱图。结果槲皮素和山柰酚峰面积的*RSD*分别为0.64%和1.01%($n$=5),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为190359)样品,研细,平行6份,并按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。结果样品中槲皮素和山柰酚的含量分别为0.225 2 mg/g和0.154 5 mg/g,*RSD*分别为1.11%和1.96%($n$=6)。

稳定性试验:取重复性试验项下制备的供试品溶液适量,分别于0,3,8,12,18,24 h时进样测定。结果槲皮素和山柰酚含量的*RSD*分别为1.41%和1.28%($n$=6),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为190359)1.5 g,精密称定,共9份,置带塞锥形瓶中,分别精密加

表 2　样品中槲皮素和山柰酚加样回收试验结果（$n = 9$）

Tab. 2　Results of the recovery test of quercetin and kaempferol in the samples（$n = 9$）

| 取样量 | 样品含量(mg) | | 加入量(mg) | | 测得量(mg) | | 回收率(%) | | $\bar{X}$(%) | | *RSD*(%) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (g) | Q | K | Q | K | Q | K | Q | K | Q | K | Q | K |
| 1.507 5 | 0.339 5 | 0.232 9 | 0.214 7 | 0.147 8 | 0.559 7 | 0.383 4 | 102.56 | 101.83 | | | | |
| 1.483 9 | 0.334 2 | 0.229 3 | 0.214 7 | 0.147 8 | 0.547 4 | 0.375 2 | 99.31 | 98.71 | | | | |
| 1.481 0 | 0.333 5 | 0.228 8 | 0.214 7 | 0.147 8 | 0.546 4 | 0.374 4 | 99.16 | 98.51 | | | | |
| 1.486 3 | 0.334 7 | 0.229 6 | 0.337 4 | 0.232 3 | 0.675 0 | 0.459 5 | 100.86 | 98.97 | | | | |
| 1.496 0 | 0.336 9 | 0.231 1 | 0.337 4 | 0.232 3 | 0.679 7 | 0.469 5 | 101.60 | 102.63 | 101.67 | 101.36 | 1.54 | 1.99 |
| 1.494 8 | 0.336 6 | 0.230 9 | 0.337 4 | 0.232 3 | 0.684 9 | 0.470 7 | 103.23 | 103.23 | | | | |
| 1.479 6 | 0.333 2 | 0.228 6 | 0.429 4 | 0.295 7 | 0.773 6 | 0.532 8 | 102.56 | 102.87 | | | | |
| 1.483 5 | 0.334 1 | 0.229 2 | 0.429 4 | 0.295 7 | 0.776 8 | 0.533 5 | 103.10 | 102.91 | | | | |
| 1.468 2 | 0.330 6 | 0.226 8 | 0.429 4 | 0.295 7 | 0.771 3 | 0.530 2 | 102.63 | 102.60 | | | | |

注：Q 为槲皮素，K 为山柰酚。表 3 同。

Note: Q is quercetin and K is kaempferol (for Tab. 2 and Tab. 3).

入槲皮素和山柰酚对照品，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，进样测定，并计算回收率。结果见表 2。

耐用性试验：选取不同厂家的色谱柱（Shimadzu Shim - pack GIST - $C_{18}$ 柱、Phenomenex Kinetex $C_{18}$ 柱、Agela Venusi MP $C_{18}$ 柱）及不同厂家和型号的高效液相色谱仪（Shimadzu LC - 20AT 型、Waters 2695 型）测定供试品溶液，结果不同厂家色谱柱和不同型号仪器均能较好地分离样品，耐用性良好。

### 2.4　样品含量测定

取样品 1.5 g，精密称定，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，分别平行测定 2 次，并计算槲皮素和山柰酚的含量。结果见表 3。

表 3　样品中槲皮素和山柰酚含量测定结果（mg / g，$n = 2$）

Tab. 3　Results of content determination of quercetin and kaempferol in the samples（mg / g，$n = 2$）

| 批号 | 生产厂家 | Q | K | 批号 | 生产厂家 | Q | K |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 190201 | 沈阳红药 | 0.298 5 | 0.262 3 | 190601 | 厦门中药 | 0.041 6 | 0.046 4 |
| 190501 | 沈阳红药 | 0.326 6 | 0.311 3 | 191017 | 厦门中药 | 0.045 9 | 0.050 8 |
| 180701 | 沈阳红药 | 0.230 1 | 0.321 6 | 191106 | 厦门中药 | 0.047 5 | 0.069 5 |
| 190102 | 洛阳天生 | 0.004 6 | 0.028 4 | 181226 | 厦门中药 | 0.049 3 | 0.078 7 |
| 190402 | 洛阳天生 | * | 0.022 5 | 181207 | 厦门中药 | 0.061 8 | 0.102 4 |
| 190359 | 南昌桑海 | 0.225 2 | 0.154 5 | 181208 | 厦门中药 | 0.061 6 | 0.102 4 |

注：*指低于定量限。

Note: * indicates that the content of quercetin is lower than LOQ.

## 3　讨论

### 3.1　指标性成分选择

目前，从胡颓子叶中分离出的化学成分包括黄酮类、生物碱类、挥发油类、三萜类等，其中黄酮类化合物最多。胡颓子叶中总黄酮可舒张小鼠气管平滑肌，其舒张作用机制与阻断 L 型钙通道电流有关[11]。因此，可以推断海珠喘息定片中黄酮类化合物为其功效成分。但难以直接测定胡颓子叶中各种黄酮苷的含量，黄酮苷经水解发现，其苷元主要为山柰酚、槲皮素和异鼠李素[9,18]，故选择测定水解后产生的槲皮素与山柰酚代表成分的含量。

### 3.2　提取溶液体积选择

考察了甲醇 - 25% 盐酸溶液（4∶1，*V* / *V*）混合溶液不同体积（30，40，50，60，70 mL），加入提取溶剂 50 mL 后，再增加体积，样品溶液中提取的槲皮素和山柰酚的量无显著差异，故选择 50 mL 甲醇 - 25% 盐酸溶液（4∶1，*V* / *V*）作为提取溶液。

### 3.3　色谱条件选择

比较了不同系统和比例的流动相，如乙腈 - 0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱、甲醇 - 0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱、甲醇 - 0.4% 磷酸水溶液（52∶48，*V* / *V*）等度洗脱等[13,15,19]，考虑到梯度洗脱较复杂，且分析时间过长，选择甲醇 - 0.4% 磷酸水溶液（52∶48，*V* / *V*）等度洗脱为初始色谱条件，但试验过程中发现山柰酚与后面的峰分离效果不佳，经反复摸索，调整为甲醇 - 0.4% 磷酸水溶液（50∶50，*V* / *V*）。结果槲皮素、山柰酚与相邻峰分离度均良好，且供试品溶液的分析时间控制也较合理。

### 3.4　样品含量测定结果分析

由表 3 可知，不同生产厂家样品间槲皮素和山柰酚的含量差异较大，同一生产厂家、不同批号间的差异较小，可能与不同生产厂家间胡颓子叶药材的质量差异及生产工艺有关。现有研究表明，不同产地胡颓子叶中槲皮素和山柰酚的含量存在差异[16]。

### 3.5　方法评价

本研究中建立的高效液相色谱法操作简便，结果准确，专属性强，重复性和稳定性均良好，可用于海珠喘息定片的质量控制。