

高效液相色谱法测定广西壮药金花茶叶中的山奈素*

Determination of Kaempferol in *Camellia petelotii* by HPLC

覃兰芳¹, 赖茂祥^{1,2**}, 梁冰¹, 屈信成¹, 黄云峰¹, 胡琦敏¹

QIN Lan-fang¹, LAI Mao-xiang^{1,2}, LIANG Bing¹, QU Xin-cheng¹, HUANG Yun-feng¹, HU Qi-ming¹

(1. 广西中医药研究院, 广西南宁 530022; 2. 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022)

(1. Guangxi Institute of Chinese Medicine and Pharmaceutical Sciences, Nanning, Guangxi, 530022, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Traditional China Medicine Quality Standards, Nanning, Guangxi, 530022, China)

摘要:采用 Ultimate(XB-C₁₈) 色谱柱, 以甲醇-0.4%磷酸(55:45)为流动相, 流速 1.0 ml/min, 检测波长 360nm, 柱温为室温, 建立高效液相色谱法(HPLC)测定广西壮药金花茶叶中山奈素含量的方法。结果, 山奈素在 0.1~0.5μg 范围内峰面积与其浓度呈良好线性关系($r=0.9998$), 平均回收率为 96.36%, $RSD=3.07\%$ ($n=6$)。该方法准确, 快速, 重现性好, 可以作为广西壮药材金花茶叶中山奈素含量的测定方法。

关键词:含量测定 山奈素 金花茶 HPLC

中图分类号: O657.72 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2012)04-0345-03

Abstract: A HPLC method was established to determine kaempferol in *Camellia petelotii* (Merrill) Sealy. Ultimate(XB-C₁₈) column was used as chromatographic column; The mobile phase was methanol-0.4% phosphoric acid solution (55:45); The flow rate was 1.0 ml·min⁻¹ and the detector wavelength was set at 360 nm; The column temperature was maintained at room temperature. The calibration curve of kaempferol was in good linearity over the range of 0.1~0.5μg ($r=0.9998$). The average recovery was 96.36%, $RSD=3.07\%$ ($n=6$). This method is convenient, sensitive, reliable and suitable for determination of kaempferol in *Camellia petelotii* (Merrill) Sealy.

Key words: content determination, kaempferol, *Camellia petelotii*, HPLC

金花茶叶是壮族人常用的药物之一, 收载于《广西壮族自治区壮药质量标准》第 2 卷。金花茶叶是山茶科山茶属植物金花茶[*Camellia petelotii* (Merr.) Sealy] 的干燥叶。仅广西南部南宁、邕宁、防城、扶绥、隆安等县有金花茶植物分布。金花茶叶具有清热解毒、利尿利湿等功效, 常用于咽喉炎、痢疾、肾炎、水肿、尿路感染、黄疸型肝炎、肝硬化腹水、高血压、疮疡、预防肿瘤^[1]。近年来研究发现, 金花茶还具有降

脂、抗氧化活性、抑制肝癌等作用^[2~6]。经查阅文献, 有关壮药材金花茶叶中山奈素的测定方法未见有报道。陈薇^[7]和郭美玲^[8]等分别采用高效液相色谱法(HPLC)测定白花蛇舌草和北合欢中的山奈素含量。据此, 我们采用 HPLC 测定金花茶叶中山奈素含量, 并进行了方法学研究, 优选出较好的提取方法和分离条件, 建立一种新的 HPLC 测定金花茶叶中山奈素含量的方法。该方法简便、快捷、准确, 重现性好, 可以用于考察研究金花茶叶药材的质量, 为进一步制定金花茶叶药材质量标准提供科学依据。

1 实验仪器与试剂

日本岛津 10A 高效液相色谱仪(LC 10AT VP 泵, SPD-10AVP 检测器)。山奈素(kaempferol)对照

收稿日期: 2012-07-16

修回日期: 2012-08-13

作者简介: 覃兰芳(1967-), 女, 助理研究员, 主要从事中药化学分析研究。

* 广西壮药质量标准研究项目(编号: MZY2010048)资助。

** 通讯作者。

品(批号 110861-200808)供含量测定用,由中国药品生物制品检定所提供。金花茶药材分别采自广西境内不同产地,经广西中医药研究院赖茂祥研究员鉴定为山茶科山茶属植物金花茶[*Camellia petelotii* (Merr.) Sealy]的干燥叶,标本存于广西中医药研究院标本馆。甲醇为色谱纯,水为纯净水,其它试剂均为分析纯。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Ultimate 柱(XB-C₁₈)(4.6mm×250mm,5μm);检测波长 360nm;流动相为甲醇-0.4%磷酸(55:45);流速 1.0 ml/min;柱温为室温。理论塔板数以山奈素峰计应不低于 2000。

2.2 对照品溶液制备

取山奈素对照品约 13.5mg 精密称定,置 25ml 棕色容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制成每 1ml 含山奈素 0.51786mg 作为山奈素对照品储备液。精密吸取 0.2ml 山奈素对照品储备液,置 5ml 棕色容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制成每 1ml 含山奈素 20.7144μg 的山奈素对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备

取金花茶样品粉末(过 2 号筛)约 1.0g,精密称定,精密加入甲醇-25%盐酸(4:1)混合溶液 25ml,称定重量,加热回流 100min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察

取山奈素对照品分别制成浓度梯度系列的对照品溶液,进样检测,记录山奈素峰面积值。以对照品峰面积(Y)为纵坐标,以进样量(X)为横坐标,绘制标准曲线,计算得其线性回归方程为 $Y = 2.96 \times 10^6 X - 4.62 \times 10^3$ (X 为进样浓度,μg),相关系数 $r = 0.9998$ 。在 0.1~0.5μg 范围内,对照品溶液进样量与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度考察

取 2.2 项下的对照品溶液 10μl,按 2.1 项色谱条件,连续进样 6 次,分析山奈素峰面积值,其 RSD 为 1.88%,仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一份供试品溶液,于制备后 0h、1h、2h、4h、6h、8h 注入高效液相色谱仪,进样 10μl,对峰面积进行考察,峰面积的 RSD = 1.24% (n = 6),说明供试品溶液在 8 h 内保持稳定。

2.7 重复性试验

取同一金花茶药材(批号:10111201)样品细粉 6

份,精密称定,分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液,在 2.1 项色谱条件下分别进行测定,并计算山奈素的含量。结果 RSD = 2.69%,说明方法的重复性较好。

2.8 加样回收率试验

取金花茶药材细粉(批号:10111201,已知含山奈素 0.038%)约 0.5g,共 6 份,精密称定,每份精密加入山奈素对照品 0.2589mg,再精密加入甲醇-25%盐酸(4:1)混合溶液 25ml,称定重量,加热回流 100min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,经 0.45μm 滤膜滤过,取续滤液各进样 10μl,测定,按测得山奈素峰面积值计算含量。计算回收率为 93.55%~99.42%(表 1),平均回收率为 96.36%,RSD = 3.07%,说明加样回收良好,可以满足测定要求。

表 1 加样回收率试验结果(n=6)

Table 1 Recovery of sample (n=6)

序号 No.	样品含量 Sample contents(mg)	加入量 Addition amount (mg)	测得量 Observation(mg)	回收率 Recovery (%)
1	0.1902	0.2589	0.4437	97.91
2	0.1925	0.2589	0.4505	99.65
3	0.1902	0.2589	0.4325	93.59
4	0.1903	0.2589	0.4325	93.55
5	0.1920	0.2589	0.4354	94.01
6	0.1921	0.2589	0.4495	99.42

2.9 样品测定

取不同批号的 10 批样品,每批 2 份,精密称定,制备供试品溶液。精密吸取供试液 10μl,按 2.1 项色谱条件测定。10 批样品测定结果(表 2)表明,本方法重现性好,可以作为金花茶叶中山奈素含量测定方法。

表 2 样品中的山奈素测定结果(n=2)

Table 2 The content of kaempferol in samples(n=2)

产地 Growing areas	山奈素含量 Content of kaempferol(%)		平均含量 Average content (%)
	1	2	
广西药用植物园	0.037	0.036	0.037
南宁市金花茶公园	0.017	0.017	0.017
南宁市四塘同仁村	0.066	0.066	0.066
防城洞中镇	0.034	0.035	0.035
防城区那良镇	0.110	0.110	0.110
防城十万大山	0.038	0.038	0.038
上思县十万大山魔石谷	0.037	0.037	0.037
南宁西郊良凤江	0.053	0.053	0.053
桂人堂金花茶栽培基地	0.036	0.036	0.036
桂人堂金花茶栽培基地	0.083	0.084	0.084

3 结束语

本次实验前,我们对金花茶叶中的没食子酸、儿茶素、表儿茶素、槲皮素、山奈素进行过含量测定,结果只有山奈素峰响应值高,峰面积重现性好,可以达到基线分离。在样品提取时,我们考察了超声、80℃水浴回流、加热回流3种提取方法,以及加热回流60min、80min、100min、120min的提取效果,结果采用加热回流提取100min的效果最好。所以,我们对金花茶叶样品用加热回流提取100min的方法提取后,用Ultimate(XB-C₁₈)色谱柱,以甲醇-0.4%磷酸(55:45)为流动相,流速1.0 ml/min,检测波长360nm,柱温为室温,建立高效液相色谱法测定金花茶叶的山奈素含量。该方法结果准确,重复性良好,对广西壮药材金花茶的质量控制有实际的应用意义,为进一步制定金花茶的质量标准提供科学依据。

参考文献:

[1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准:第2册[M].

南宁:广西人民出版社,1996:157-161.

- [2] 宁恩创,秦小明,杨宏. 金花茶叶水提物的降脂功能试验研究[J]. 广西大学学报:自然科学版,2004(4):350-354.
- [3] 李仁菊. 广西金花茶中多酚的提取和抗氧化性能研究[D]. 南宁:广西大学,2007.
- [4] 陈全斌,湛志华,义祥辉,等. 金花茶抗氧化活性成分提取及其含量测定[J]. 广西热带农业,2005(3):1-2.
- [5] 段小娴,唐小岚,苏建家,等. 金花茶对二乙基亚硝酸致大鼠肝癌抑制作用研究[J]. 医学研究杂志,2006,35(6):14-16.
- [6] 李翠云,段小娴,苏建家,等. 金花茶对二乙基亚硝酸致大鼠肝癌前病变及肝癌细胞株作用的影响[J]. 广西医科大学学报,2007,24(5):660-663.
- [7] 陈薇,罗昱澜,杨寒艳. HPLC法测定白花蛇舌草中槲皮素和山奈素的含量[J]. 华夏医学,2008,5:13-14.
- [8] 郭美玲,孙佳玲,孙公国. HPLC法测定北合欢中槲皮素和山奈素的含量[J]. 中国药事,2011,25(7):647-649.

(责任编辑:邓大玉)

瘙痒“传染性”原因被揭开

一个世纪以来,很多科学家都认为痒是疼痛的一种比较微弱的表现方式。但是,这并不能解释为什么当我们感到痒和痛的时候,会有截然不同的身体反应。当我们碰到热痛、机械痛和化学刺激的时候,我们的肢体会本能的躲避以保护我们的身体不受伤害,这就是痛的反应;而当我们感到痒时,却会伸手去搔痒而非躲避,所以痒和疼痛是完全不同的两种感觉。要解释痒是一种完全不同的感觉,就需要解析产生瘙痒过程中的神经反射应答过程,从而能指出这种神经过程的特异性,并揭示为何瘙痒容易传染,而疼痛却不会。最近英国研究人员召集了多位健康志愿者,首先让他们填写表格,回答一些性格问题,然后在看过其他人碰触或者搔抓手臂和胸部时的短视频后,进行功能性磁共振成像(fMRI)扫描。结果发现,大部分志愿者都会被传染瘙痒的感觉,只有约三分之二的志愿者会在观看视频后实际做出搔抓的动作,这部分人群负面情绪更多,因此也更容易被传染。研究人员将这种行为与几个大脑区域联系在一起,这些区域被称为“痒基质(itch matrix)”。研究人员将瘙痒的倾向与“痒基质”联系在了一起,发现左BA44、BA6和主要躯体感觉皮层的活动可能与痒度的主观评级有联系。这些发现可能会帮助揭示出没有潜在皮肤病的人们持久而强迫性地感到痒的神经基础。

(据科学网)