

# HPLC 测定艾蒿黄酮乳膏中槲皮素和柚皮素的含量

丁洁<sup>1</sup>, 王爱霞<sup>2</sup>, 高志莹<sup>1</sup>, 刘琦<sup>1</sup>, 牛犇<sup>1\*</sup>, 梁宁<sup>1</sup>, 高俊<sup>2</sup>

(1. 甘肃省商业科技研究所, 兰州 730020; 2. 甘肃省人民医院, 兰州 730000)

**[摘要]** 目的: 建立以高效液相色谱法测定艾蒿黄酮乳膏中槲皮素和柚皮素含量的方法。方法: Gemini C<sub>18</sub>反相色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 25 °C, 检测波长 330 nm, 进样量 10 μL, 流动相 0.5% 乙酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱。结果: 槲皮素在 0.010 26 ~ 0.307 8 μg ( $r = 0.999 9$ ) 线性关系良好, 平均回收率为 97.32%, RSD 3.3%; 柚皮素在 0.009 87 ~ 0.296 1 μg ( $r = 1$ ) 线性关系良好, 平均回收率为 97.22%, RSD 2.7%。结论: 该方法简便、快速、重复性好, 可用于艾蒿黄酮乳膏的质量控制。

**[关键词]** 艾蒿黄酮乳膏; 槲皮素; 柚皮素

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0086-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160086

## HPLC Determination of Quercetin and Naringenin in Moxa Flavone Cream

DING Jie<sup>1</sup>, WANG Ai-xia<sup>2</sup>, GAO Zhi-ying<sup>1</sup>, LIU Qi<sup>1</sup>, NIU Ben<sup>1\*</sup>, LIANG Ning<sup>1</sup>, GAO Jun<sup>2</sup>

(1. Commercial Technology Institute of Gansu Province, Lanzhou 730020, China;

2. The People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

**[Abstract]** **Objective:** The study was conducted to establish an HPLC method for the determination of quercetin and naringenin in the moxa flavone cream. **Method:** Quercetin and naringenin were separated on Gemini C<sub>18</sub> RP-column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, column temperature was 25 °C, and the detection wavelength was 330 nm, the injection volume was 10 μL, with 0.5% aqueous acetic acid as the mobile phase A was and acetonitrile as B for gradient elution. **Result:** Quercetin and naringenin showed good linear relationship in the range of 0.010 26 to 0.307 8 μg ( $r = 0.999 9$ ), 0.009 87 to 0.296 1 μg ( $r = 1$ ) respectively. Their average recovery rates were 97.32% with RSD of 3.3% and 97.22% with RSD of 2.7%, respectively. **Conclusion:** The method is simple, rapid, reproducible, and it can be used for the quality of control moxa flavone cream.

**[Key words]** determination; naringenin; moxa flavone cream; quercetin

艾蒿为菊科多年生草本植物, 全国到处都有分布, 尤以西北寒旱地区生长的有效成分高, 品质优良药用价值高<sup>[1]</sup>。本研究发现艾蒿黄酮具有很强的抗菌、活血化瘀, 消肿止痛、抗睾酮雄激素样和免疫抑制作用<sup>[2]</sup>, 开发的艾蒿黄酮乳膏对痤疮疗效显著, 已通过了安全性评价<sup>[3]</sup>, 药用价值和市场前景广阔。据文献报道<sup>[4-5]</sup>, 艾蒿中的化学成分主要有

黄酮、三萜、挥发油类, 黄酮中含有槲皮素和柚皮素成分。槲皮素和柚皮素除有抗菌、消炎作用外, 槲皮素联合放射线有显著减少瘢痕疙瘩成纤维细胞的胶原合成作用, 槲皮素和柚皮素均对皮肤具有保护作用<sup>[6-8]</sup>。

本研究以槲皮素和柚皮素为检测指标之一, 建立艾蒿黄酮乳膏中黄酮含量的测定方法为艾蒿黄酮

**[收稿日期]** 20131220(008)

**[基金项目]** 甘肃省科技厅科技开发项目(0805TCYA042)

**[第一作者]** 丁洁, 助理工程师, 硕士, 从事天然产物的研究与开发工作, Tel: 13609304019, E-mail: dingjie860118@163.com

**[通讯作者]** \* 牛犇, 高级工程师, 从事天然产物的研究与开发工作, Tel: 0931-8276512, E-mail: lzniuben@163.com

乳膏的进一步开发提供质量控制依据。

## 1 材料

艾蒿黄酮粉(自制,黄酮总含量 30.9%),纯水(自制,pH 6.82,电导率  $15 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),乙腈、甲醇(色谱纯,Amethyst Chemicals,LCB0M02,批号 L160M20),槲皮素、柚皮素(ChromaDex,美国,批号 00017030-566,批号 00014205-603),其他试剂为分析纯。

1260 系列高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司,德国),XS225A 型 1/万电子分析天平(普利塞斯公司,瑞士)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Gemini  $\text{C}_{18}$  反相色谱柱( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$ ),流速  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,柱温  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,检测波长  $330 \text{ nm}$ ,进样量  $10 \mu\text{L}$ ,流动相 0.5% 乙酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(表 1),在以上色谱条件下槲皮素和柚皮素的色谱峰分离良好,见图 1。

表 1 高效液相色谱洗脱梯度

$t/\text{min}$	A/%	B/%
0	80	20
20	50	50
35	20	80
40	0	100
50	80	20

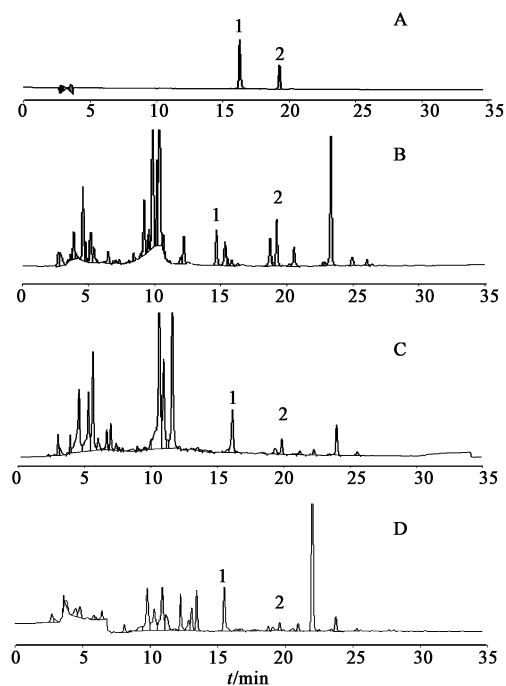
## 2.2 溶液制备

**2.2.1 对照品溶液制备** 精密称取槲皮素、柚皮素对照品 0.005 4,0.005 0 g,分别置于 5 mL 量瓶中,加入甲醇定容制成含槲皮素  $1.026 0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,柚皮素  $0.987 0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的储备液溶液。准确取槲皮素、柚皮素对照品储备溶液各 0.020 0 mL 置于同一 1 mL 量瓶中,加甲醇定容摇匀,即得槲皮素、柚皮素混合对照品溶液。

**2.2.2 艾蒿叶甲醇提取溶液** 艾蒿叶干燥粉碎,准确称取 1.000 0 g,用石油醚前期预处理去除挥发油和烷烃类化合物,加 50 mL 石油醚回流提取 2 h,过滤石油醚,滤渣加 50 mL 甲醇回流提取 2 h,冷却后补加甲醇至原体积,摇匀,过滤,滤液过  $0.45 \mu\text{m}$  有机膜,备用。

**2.2.3 艾蒿黄酮粉溶液** 准确称取艾蒿黄酮粉 0.100 8 g,加甲醇定容于 50 mL 量瓶中,超声 30 min,过滤,滤液过  $0.45 \mu\text{m}$  有机膜,备用。

**2.2.4 艾蒿黄酮乳膏溶液** 准确称取艾蒿黄酮乳膏 1.012 0 g,加甲醇定容于 10 mL 量瓶中,超声 30



A. 对照品;B. 艾蒿叶甲醇提取液;C. 艾蒿黄酮粉;  
D. 艾蒿黄酮乳膏;1. 槲皮素;2. 柚皮素

图 1 艾蒿黄酮乳膏 HPLC

min,过滤,滤液过  $0.45 \mu\text{m}$  有机膜,备用。

**2.3 线性关系考察** 精密吸取 2.2.1 项下槲皮素对照品溶液 0.1 mL,用甲醇定容于 10 mL 量瓶,得槲皮素  $0.010 26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  稀释溶液,精密吸取稀释溶液 1,5,10,20,30  $\mu\text{L}$  进样,精密吸取 2.2.1 项下柚皮素对照品溶液 0.1 mL,用甲醇定容于 10 mL 量瓶,得柚皮素  $0.009 87 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  稀释溶液,精密吸取稀释溶液 1,5,10,20,30  $\mu\text{L}$  进样。以进样量( $\mu\text{g}$ )对峰面积(A)进行线性回归,得槲皮素回归方程  $Y = 18.561X - 25.41$  ( $r = 0.999 9$ );表明槲皮素在  $0.010 26 \sim 0.307 8 \mu\text{g}$  线性关系良好。柚皮素的回归方程为  $Y = 7.595 2X + 1.100 8$  ( $r = 1$ );表明柚皮素在  $0.009 87 \sim 0.296 1 \mu\text{g}$  线性关系良好。

**2.4 精密度试验** 精密吸取槲皮素、柚皮素对照品溶液各 10  $\mu\text{L}$ ,连续进样 6 次,计算槲皮素和柚皮素峰面积的 RSD 分别为 0.25%,0.26%。

**2.5 稳定性试验** 取同一样品溶液,分别在 0,2,4,6,8 h 各进样 10  $\mu\text{L}$ ,槲皮素和柚皮素的峰面积 RSD 分别为 0.75%,1.1%,表明样品溶液在 8 h 内基本稳定。

**2.6 重复性试验** 取同一批艾蒿乳膏样品 6 份,按 2.2.2 项方法制备样品溶液,测定,槲皮素和柚皮素分别为  $0.233 9, 0.181 8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,RSD 分别为 1.85%,1.3%。

**2.7 加样回收试验** 取同一批艾蒿黄酮乳膏(槲皮素含量为  $0.2339 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 柚皮素含量  $0.1818 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )约 0.5 g, 精密称定, 共 6 份。分别精密加

入  $0.1026 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  槲皮素对照品溶液 1.1 mL,  $0.09870 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  柚皮素对照品溶液 0.9 mL, 按 2.2.3 项下方法制备, 测定。见表 2。

表 2 艾蒿乳膏中槲皮素、柚皮素加样回收率

化合物	称样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
槲皮素	0.5042	0.1179	0.1129	0.2237	93.71	97.32	3.3
	0.5086	0.1190	0.1129	0.2346	102.3		
	0.5013	0.1173	0.1129	0.2268	96.99		
	0.5022	0.1175	0.1129	0.2281	95.48		
	0.5050	0.1181	0.1129	0.2279	97.25		
	0.5033	0.1177	0.1129	0.2262	98.21		
柚皮素	0.5042	0.0917	0.0888	0.1773	96.40	97.22	2.7
	0.5086	0.0925	0.0888	0.1832	102.1		
	0.5013	0.0911	0.0888	0.1764	96.06		
	0.5022	0.0913	0.0888	0.1770	96.51		
	0.5050	0.0918	0.0888	0.1769	95.83		
	0.5033	0.0915	0.0888	0.1771	96.40		

## 2.8 样品测定

**2.8.1 测定艾蒿叶中槲皮素和柚皮素含量** 平行测定 3 份艾蒿叶, 按 2.2.1 项方法制备样品溶液, 按 2.1 项色谱条件进行测定, 艾蒿叶中槲皮素和柚皮素的平均质量分数分别为  $0.1109, 0.5306 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

**2.8.2 测定艾蒿黄酮粉中槲皮素和柚皮素含量** 平行测定 3 份艾蒿黄酮粉, 按 2.2.2 项下方法制备样品溶液, 按 2.1 项色谱条件进行测定, 艾蒿黄酮粉中槲皮素和柚皮素平均质量分数分别为  $13.1879, 4.1452 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

**2.8.3 测定艾蒿黄酮乳膏中槲皮素和柚皮素含量** 取不同批次乳膏, 每批 3 份, 分别按 2.2.3 项下方法制备样品溶液, 按 2.1 项色谱条件进行测定, 见表 3。

表 3 不同批次艾蒿黄酮乳膏中

槲皮素和柚皮素含量

$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

No.	槲皮素	平均值	柚皮素	平均值
1	0.2453	0.2449	0.1973	0.1973
1	0.2444		0.1964	
1	0.2449		0.1981	
2	0.2254	0.2267	0.1702	0.1716
2	0.2278		0.1714	
2	0.2270		0.1732	
3	0.2344	0.2337	0.1833	0.1820
3	0.2338		0.1816	
3	0.2329		0.1811	

## 3 讨论

槲皮素和柚皮素对照品混合液在  $200 \sim 500 \text{ nm}$  扫描, 结果显示  $330 \text{ nm}$  处有较强吸收峰。

对流动相的系统组成进行考察, 参照文献<sup>[9-12]</sup>, 分别用 0.5% 乙酸-甲醇(6:4) 等度洗脱、水-乙腈(7:3), 梯度洗脱、0.5% 乙酸水-乙腈(63:37) 梯度洗脱。根据分离谱图情况分析, 以 0.5% 乙酸水-乙腈作为流动相, 梯度洗脱, 分离效果良好。

文献报道<sup>[4-5]</sup>, 除槲皮素和柚皮素外, 艾蒿中具有代表性的黄酮 5, 7-二羟基-6, 3, 4-三甲氧基黄酮, 5-羟基-6, 7, 3, 4-四甲氧基黄酮, 由于未能购得标准品, 未做检测, 将在后续的实验中进行进一步检测分析。

## [参考文献]

- [1] 江苏新医学院编. 中药大辞典. 上册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 560.
- [2] 牛犇. 艾蒿黄酮的提取工艺及其应用: 中国, ZL 2008 1 0018036. 7[P]. 2010-8-11.
- [3] 高俊, 王爱霞, 牛犇, 等. 艾蒿黄酮动物(大鼠)长期毒性试验[J]. 兰州大学学报: 医学版, 2012, 38(1): 39.
- [4] Renxiang Tan, Zhongjian Jia. Eudesmanolides and other constituents from *Artemisia argyi* [J]. *Plant Medica*, 1992, 58(4): 370.
- [5] 王晓琴, 周成江, 张娜. 野艾蒿化学成分研究[J]. 中药材, 2011, 34(2): 234.

## PITC 柱前衍生反相高效液相法 测定生制仙茅中氨基酸的含量

周远征<sup>1,2</sup>, 张凡<sup>1,2</sup>, 鞠成国<sup>1,2</sup>, 贾天柱<sup>1,2\*</sup>

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600;

2. 国家中医药管理局重点研究室, 辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁 大连 116600)

**[摘要]** 目的: 考察生制仙茅中氨基酸含量的变化情况。方法: 以异硫氰酸苯酯(PITC)为衍生化试剂衍生后进行 HPLC 分析。采用 Ecosil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 41 °C, 检测波长 254 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 二元梯度洗脱, 测定仙茅酒炙前后氨基酸的含量。结果: 17 种氨基酸在 7.51 ~ 144.96 mg·L<sup>-1</sup> 呈良好的线性关系( $r = 0.9967 \sim 0.9996$ ); 平均回收率在 95.3% ~ 104.8%, RSD 均 < 3.0%; 仙茅酒炙后 17 种氨基酸总量增加 23.39%, 其中人体必需的 7 种氨基酸总量酒炙后增加 36.19%。结论: 酒制可使仙茅氨基酸含量增加, 并增强滋补作用。

**[关键词]** 仙茅; 柱前衍生; 氨基酸; 异硫氰酸苯酯(PITC)

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0089-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160089

## Amino Acid Content of A Measurement System in Curculigo by HPLC With Pre-column PITC Derivation

ZHOU Yuan-zheng<sup>1,2</sup>, ZHANG Fan<sup>1,2</sup>, JU Cheng-guo<sup>1,2</sup>, JIA Tian-zhu<sup>1,2\*</sup>

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. The Key Unit of State Administration of Traditional Chinese Medicine of the Peoples' s Republic of China, Chinese Materia Medica Processing Engineering Center of Liaoning Province, Dalian 116600, China)

**[收稿日期]** 20131106(007)

**[第一作者]** 周远征, 从事中药炮制研究, E-mail: zhouyuanzheng88@126.com

**[通讯作者]** \* 贾天柱, 教授, 从事中药炮制研究, Tel: 0411-87586114, E-mail: jiatz@lnutcm.edu.cn

- [6] Loke W M, Proudfoot J M, Stewart S. Metabolic transformation has a profound effect on anti-inflammatory activity of flavonoids such as quercetin; lack of association between antioxidant and lipoygenase inhibitory activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 7 (5):1045.
- [7] 龙笑, 曾莹, 张福泉, 等. 槲皮素联合放射线抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞胶原合成[J]. *基础医学与临床*, 2007, 27(3):248.
- [8] Burger A R, Granger S P, Scott I R. Skin care compositons containing naringenin and/or quercetin and a retinoid; US, 5665367 [P]. 1997-09-09.
- [9] Xixiang Ying, Rongxiang Wang, Jing Xu. HPLC determination of eight polyphenols in the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. major [J]. *J Chromatographic Sci*, 2009, 47(3):201.
- [10] 黄兴富, 黎其万, 刘宏程. 高效液相色谱法同时测定苦荞中芦丁、槲皮素和山柰酚的含量[J]. *中成药*, 2011, 33(2):345.
- [11] Xianyin Lai, Hong Liang, Yuying Zhao. Simultaneous determination of seven active flavonols in the flowers of *Abelmoschus manihot* by HPLC [J]. *J Chromatographic Sci*, 2009, 47(3):206.
- [12] Xiuling Yang, Xiaowei Zhang, Zhifang Yuan. Simultaneous determination of myricitrin, hyperin, quercitroside, and quercetin in *Folium Rhododendri Micranthi* by RP-HPLC [J]. *J Chromatographic Sci*, 2009, 47(9):714.

[责任编辑 顾雪竹]