

HPLC 测定芒萁中槲皮素和山柰素的含量

李彩丽, 平欲晖*

(江西中医药大学, 南昌 330004)

[摘要] 目的:建立 HPLC 测定芒萁中槲皮素和山柰素含量的方法,并测定不同产地芒萁中槲皮素和山柰素含量。方法:分别用不同体积分数的甲醇和乙醇做为槲皮素和山柰素的提取溶剂,采用超声、回流两种方法提取槲皮素和山柰素,采用高效液相色谱法, Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×200 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1% 磷酸水(54:46), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 检测波长 366 nm。结果:槲皮素和山柰素用 80% 甲醇回流提取率较高,江西鹰潭的芒萁中槲皮素和山柰素含量较高。芒萁中槲皮素、山柰素分离效果良好,线性范围分别为 1.051~16.24, 0.505~8.08 μg。结论:该法准确灵敏、稳定可靠,可用于芒萁的质量控制,不同产地芒萁中槲皮素及山柰素含量差别较大。

[关键词] 芒萁; 槲皮素; 山柰素; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)19-0064-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015190064

Determination of Quercetin and Kaempferol in *Dicranopiers dichotoma* LI Cai-li, PING Yu-hui*
(*Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China*)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the determination of quercetin and kaempferol in *Dicranopiers dichotoma*, and to determine the content of quercetin and kaempferol in *D. dichotoma* from different areas. **Method:** Different volume fractions of methanol and ethanol were chosen as the extraction solvents for quercetin and kaempferol. They were extracted by ultrasonic extraction and refluxing process and determined by HPLC. Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm×200 mm, 5 μm) was adopted, with the mixture of methanol-0.1% H₃PO₄ water (54:46) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the column temperature at 30 ℃, the detection wavelength was set at 366 nm. **Result:** Refluxing process with 80% methanol was proved to be the optimal extraction method for quercetin and kaempferol, and the content of quercetin and kaempferol in *D. dichotoma* from Yingtan of Jiangxi Province was more than that from other areas. This method had a good separation performance for quercetin and kaempferol in *D. dichotoma*, and the linear range were 1.051-16.24, 0.505-8.08 μg, respectively. **Conclusion:** This method is accurate, sensitive, stable and reliable, and can be used in the quality control of *D. dichotoma*. The contents of quercetin and kaempferol in *D. dichotoma* of different origins were significantly different.

[Key words] *Dicranopiers dichotoma*; quercetin; kaempferol; HPLC

芒萁广泛分布于我国长江以南各省区,为典型的酸性土壤指示植物^[1]。全草入药,有清热、化湿利尿、去瘀止血的功效,具有较高的实际应用价值^[2-4]。芒萁中黄酮类化合物含量高,而且具有很好的抗菌、抗氧化作用^[5-7],芒萁黄酮提取物是一种很好的功能性食品添加剂,可以作为一些降血压、降血脂、抗衰老等功能保健食品的有效成分^[8]。近年

来有学者发现芒萁还具有抗癌^[9-10],抗 HIV-1^[11]的作用。

目前,国内外主要从医药卫生、农业科学、生物科学、环境科学几个方面对芒萁展开研究^[12-14],有在芒萁中提取出了黄酮类、酚类、生物碱类、甾体及萜类等^[15-17]多种化学成分。HPLC 测定芒萁中槲皮素和山柰素含量的方法尚未见报道,作者以槲皮素

[收稿日期] 20141027(006)

[基金项目] 校重点学科青年教师培养计划项目(2012jzdxk051)

[第一作者] 李彩丽,在读硕士,从事药物成分分析和质量控制研究, Tel:18582080856, E-mail:987339674@qq.com

[通讯作者] *平欲晖,副教授,从事药物成分及质量控制研究, Tel:13677090003, E-mail:pingyh@163.com

和山柰素为指标性成分,建立了其含量测定方法,并对江西省境内10个不同地区的芒萁样品进行了测定,对芒萁的质量控制和开发利用具有重要的意义。

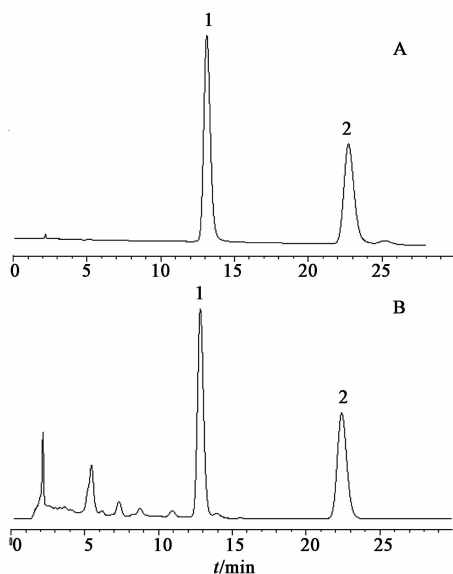
1 材料

1200系列高效液相色谱仪(VWD检测器、四元泵、自动进样器、柱温箱、在线真空脱气机,美国安捷伦公司),AE-240型1/10万天平(瑞士梅特勒公司),SZ-97A型自动三重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

芒萁药材分别采于江西多个地区,经江西中医药大学付小梅老师鉴定为里白科植物芒萁 *Dicranopteris dichotoma* 的全草。槲皮素对照品(江西品正贸易有限公司,批号1166-101216),山柰素对照品(上海永恒生物科技有限公司,批号201000924),甲醇为色谱纯,水为三蒸水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1% 磷酸水(54:46),流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长366 nm,柱温30℃。见图1。



A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 槲皮素; 2. 山柰素

图1 芒萁的HPLC

Fig.1 HPLC chromatography of *Dicranopteris dichotoma*

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取槲皮素对照品11.98 mg和山柰素对照品11.84 mg,置25 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得每1 mL含槲皮素0.479 2 mg,山柰素0.473 6 mg的对照品储备液。分别吸取一定量的对照品储备液制成槲皮素

(0.287 5 g·L⁻¹)山柰素(0.142 1 g·L⁻¹)的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 称取芒萁药材粉末(过60目筛)1 g,精密称定,置150 mL圆底烧瓶中,加80%甲醇20 mL,盐酸1 mL,在80℃回流提取1 h,放冷,过滤,取续滤液,过0.45 μm微孔滤膜,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密移取槲皮素和山柰素对照品母液一定体积,用甲醇稀释成含槲皮素50.75,101.5,305.5,710.5,812 mg·L⁻¹,山柰素为25.25,50.5,151.5,353.5,404 mg·L⁻¹的系列对照品溶液。分别进样,以进样量(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程,槲皮素 $Y = 2\,095.6X + 2\,104.1$ ($r = 0.999\,5$),山柰素 $Y = 2\,058.1X + 970.1$ ($r = 0.999\,5$)。结果表明槲皮素和山柰素分别在1.015~16.24,0.505~8.08 μg,进样量与峰面积呈良好线性关系。

2.4.2 精密度试验 精密吸取槲皮素(0.287 5 g·L⁻¹)山柰素(0.142 1 g·L⁻¹)的混合对照品溶液20 μL,按照上述色谱条件,连续进样6次。测得槲皮素山柰素峰峰面积的RSD分别为1.6%,1.5%。结果表明,所用仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 精密称取芒萁粉末6份,按2.3项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样分析,测得槲皮素和山柰素的质量分数分别为4.723 1,3.497 5 mg·g⁻¹,RSD分别为1.3%,1.2%,表明该试验重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取供试品溶液,分别于配制后0,2,4,6,8,10 h进样20 μL,记录峰面积,结果槲皮素和山柰素的RSD分别为1.1%,1.3%,表明供试品溶液在10 h内稳定。

2.4.5 加样回收率试验 准确称取已知含量的芒萁样品6份,每份约0.5 g,分别加入槲皮素和山柰素对照品适量,按2.3项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样分析,计算回收率,结果见表1。

2.5 样品含量测定 取不同产地芒萁粉末各1 g,精密称定,按2.3项下方法制备供试品溶液,分别进样20 μL,按上述色谱条件测定,计算槲皮素和山柰素的含量,结果见表2。

3 讨论

通过全波长扫描,发现槲皮素和山柰素在366 nm处都基本达到最大吸收,故采用366 nm作为检测波长。再考察不同色谱柱温度(25,30,35,40℃)和流动相比例(甲醇-0.1%磷酸水60:40,56:44,

表 1 芒萁中槲皮素和山柰素的加样回收率

Table 1 Recovery test of *Dicranopteris dichotoma*

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
槲皮素	0.500 3	2.363 0	2.381 3	4.764 4	100.85	101.37	0.5
	0.500 7	2.364 9	2.381 3	4.766 8	100.87		
	0.500 1	2.362 0	2.381 3	4.775 4	101.35		
	0.500 5	2.363 9	2.381 3	4.791 5	101.94		
	0.500 4	2.363 4	2.381 3	4.790 5	101.92		
	0.500 1	2.362 0	2.381 3	4.774 4	101.31		
山柰素	0.500 3	1.749 8	1.705 0	3.434 4	98.80	100.37	1.2
	0.500 7	1.751 2	1.705 0	3.440 8	99.10		
	0.500 1	1.749 1	1.705 0	3.464 4	100.60		
	0.500 5	1.750 5	1.705 0	3.471 0	100.91		
	0.500 4	1.750 1	1.705 0	3.468 1	100.76		
	0.500 1	1.749 1	1.705 0	3.488 9	102.04		

表 2 不同产地芒萁样品槲皮素和山柰素含量测定

Table 2 Content determination of *Dicranopteris dichotoma* mg·g⁻¹

No.	产地	槲皮素	山柰素
1	江西中医药大学湾里校区	4.52	2.99
2	江西吉安吉安县	4.55	2.98
3	江西萍乡	3.90	3.34
4	江西赣州银坑	8.18	5.63
5	江西上饶万年	5.23	4.87
6	江西宜春	2.66	4.28
7	江西鹰潭	12.45	5.86
8	江西吉安泰和县	3.68	3.90
9	江西九江彭泽	1.65	1.96
10	江西上饶余干	8.91	2.68

54:46, 52:48), 发现当柱温 30 ℃, 流动相甲醇-0.1% 磷酸水(54:46)时芒萁中山柰素和槲皮素的分离度较好, 保留时间也适宜。

考察了提取溶剂(甲醇、乙醇、乙酸乙酯、甲醇-盐酸、乙醇-盐酸)及回流、超声两种提取方法, 结果发现甲醇-盐酸回流提取的有效成分含量较高。回流提取时主要考察了提取溶剂(50%, 70%, 80%, 90%, 100%的甲醇)、溶剂用量(甲醇 10, 15, 20, 30, 40, 50 mL, 盐酸 1 mL)、提取时间(30, 60, 90, 120 min)、提取温度(70, 80, 90 ℃), 鉴于节约溶剂、时间及有效成分含量考虑, 本实验采用的最佳提取工艺为芒萁 1 g 加入到 80% 的甲醇-盐酸提取液 20 mL 中在 80 ℃ 条件下回流 1 h。

本实验结果表明不同地区生长的芒萁中槲皮素和山柰素含量不尽相同, 其中以江西鹰潭的槲皮素和山柰素含量最高。

[参考文献]

[1] 卢海生, 庄惠如. 福建福州鼓山药用蕨类植物资源调查[J]. 亚热带通讯, 1999, 28(2): 42-46.
[2] 曾伟. 芒萁黄酮的纯化分离及抗氧化活性研究[D]. 广州: 广东工业大学, 2013.
[3] Zainul A Z, Zuleen D F A G, et al. Antinociceptive and

anti-inflammatory activities of *Dicranopteris linearis* Leaves chloroform experimental animals[J]. Yakugaku Zasshi, 2006, 126(11): 1197-1203.

[4] Zainul A Z, Zuleen D F A G, et al. Antinociceptive, anti-inflammatory, and antipyretic properties of an aqueous extract of *Dicranopteris linearis* leaves in experimental animal models[J]. J Nat Med, 2008, 62(2): 179-187.
[5] 曾伟, 丁利君, 黄聪华, 等. 黑曲霉发酵法辅助提取芒萁黄酮及其抗氧化研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(3): 115-118.
[6] How Y L, Yau Y L, Shiau P T. Antioxidative, tyrosinase inhibiting and antibacterial activities of leaf extracts from medicinal ferns[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2009, 73(6), 1362-1366.
[7] 余姣, 丁利君, 李嘉琪. 大孔树脂纯化芒萁总皂苷及其抗氧化活性的研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(1): 40-43.
[8] 丁利君, 周圳辉, 林燕如. 芒萁中黄酮物质的提取及其抗氧化研究[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 77-82.
[9] 丁利君, 曾伟, 郑希, 等. 一种具有抗胃癌作用的芒萁提取物及其制备方法: 中国, CN103263446A [P]. 2013-08-28.
[10] 丁利君, 余姣, 黄聪华, 等. 一种具有抗前列腺癌作用的芒萁提取物及其制备方法: 中国, CN103263447A [P]. 2013-08-28.
[11] Li X L, Yang L M, Zhao Y, et al. Tetranorclerodanes and clerodane-type diterpene glycosides from *Dicranopteris dichotoma*[J]. J Nat Prod, 2007, 70(2): 265-268.
[12] Liu Z, Wu J, Zhou L, et al. Effect of understory fern (*Dicranopteris dichotoma*) removal on substrate utilization patterns of culturable soil bacterial communities in subtropical *Eucalyptus plantations*[J]. Pedobiologia, 2012, 55(1): 7-13.
[13] 杨龙, 王俊, 黄钰辉, 等. 南亚热带人工林林下芒萁层的凋落物拦截[J]. 热带地理, 2014, 34(2): 165-167.
[14] 康根丽, 杨玉盛, 司友涛, 等. 马尾松与芒萁鲜叶及凋落物水溶性有机物的溶解特征和光谱学特征[J]. 热带亚热带植物学报, 2014, 22(4): 357-360.
[15] Diraviam P R, Visuvasam S M, et al. Chemical and chemotaxonomical studies on *dicranopteris* species[J]. Chem Pharm Bull, 1995, 43(10): 1800-1803.
[16] Li X L, Tu L, Zhao Y, et al. Terpenoids from two *Dicranopteris* species[J]. Helvetica Chimica Acta, 2008, 91(5): 856-861.
[17] Li X L, Yang L M, Zhao Y, et al. Tetranorclerodanes and clerodane-type diterpene glycosides from *Dicranopteris dichotoma*[J]. J Nat Prod, 2007, 70(2): 265-268.

[责任编辑 顾雪竹]