

苗族药夜关门的质量标准

刘亮¹, 冯华^{2*}, 刘英波¹, 潘年松¹, 周德权³

(1. 遵义医药高等专科学校, 贵州 遵义 563000; 2. 遵义市食品药品检验所, 贵州 遵义 563002;
3. 遵义绿普森农业有限公司, 贵州 遵义 563003)

[摘要] 目的:建立苗族药夜关门的薄层鉴别与含量测定方法。方法:采用薄层色谱法,以甲苯-甲酸乙酯-甲酸(10:8:1)为展开剂,建立了其定性鉴别方法;采用高效液相色谱法,以槲皮素为对照, Hypersil ODS2 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.20% 磷酸溶液(20:80),二极管矩阵检测器,建立了其含量测定方法。结果:建立的 TLC 能很好分离各成分,HPLC 能够准确测定苗药夜关门中槲皮素的含量。结论:该文所建立的 TLC,HPLC 方法可用于苗药夜关门质量检测。

[关键词] 夜关门; 槲皮素; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)06-0058-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016060058

TLC Identification and Determination of Quercetin in *Lespedeza cuneata*

LIU Liang¹, FENG Hua^{2*}, LIU Ying-bo¹, PAN Nian-song¹, ZHOU De-quan³

(1. Zunyi Medical and Pharmaceutical College, Zunyi 563000, China;

2. Zunyi Institute for Food & Drug Control, Zunyi 563002, China;

3. Zunyi Green and Sampson Agricultural Limited Company, Zunyi 563003, China)

[Abstract] **Objective:** To establish methods of thin layer chromatography (TLC) identification and content determination of *Lespedeza cuneata*. **Method:** Quality differentiation method was developed using TLC and with toluene-ethyl formate-formic acid (10:8:1) as the developing solvent. Using high performance liquid chromatography (HPLC), content determination of quercetin was carried on Hypersil ODS2 C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) column eluted with a mixture of acetonitrile-0.2% phosphate (20:80) as the mobile phase, and diodematrix detector was used as the detector. **Result:** The established TLC method could effectively isolate each component, and the established HPLC method could accurately determine the content of quercetin in *L. cuneata*.

Conclusion: The established methods of TLC and HPLC can be used to detect the quality of *L. cuneata*.

[Key words] *Lespedeza cuneata*; quercetin; HPLC

苗族药夜关门又名截叶铁扫帚、苍蝇翼、铁马鞭等,具有补肝肾、益肺阴、散瘀消肿的功效,主治遗精、遗尿、白浊、白带、哮喘、胃痛、劳伤、小儿疳积、泻痢、跌打损伤、视力减退、目赤、乳痈^[1-2]。作为食品原料,董酒生产中将其作为酒曲的重要原料,江南一带生产黄酒也用其做酒曲。查阅文献,夜关门中主要含有槲皮素、山柰酚、山柰酚-3-O-β-D-葡萄糖苷、

异荭草素、异牡荆素、三叶豆苷、胡桃苷等黄酮类成分,水杨酸、香草酸等酚类成分,鞣质及多聚酚类成分,还含有 *n*-十六酸、亚油酸甲酯、亚油酸等挥发油类成分^[3-5]。国内对其研究重点在药理、临床、成分等方面,而在鉴别及含量测定方面报道较少^[6]。因此,笔者对苗药夜关门中槲皮素的薄层鉴别及含量测定进行研究,以期对夜关门药材质量和开发利用

[收稿日期] 20150206(013)

[基金项目] 贵州省科技厅中药现代化项目(黔科合 SY 字[2014]3034-16 号)

[第一作者] 刘亮,硕士,副教授,从事中药、民族药化学成分及质量研究,E-mail:jikman1@163.com

[通讯作者] *冯华,硕士,主管药师,从事药品检验及新药研究,E-mail:fenghua781014@163.com

提供一定的科学依据。

1 材料

LC-1260 系列高效液相色谱仪(包括四元泵, DAD, 柱温箱, 自动进样器, 工作站, 美国 Agilent), AB204-S 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多), DHG 90AOA 型电热恒温鼓风干燥箱(宁波江南仪器厂), DKS-26 型电热恒温水浴锅(宁波江南仪器厂), ZF-2 型三用紫外仪(上海安亭仪器有限公司), 预制硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂分厂)。

槲皮素对照品(中国食品药品生物研究院, 批号 0081-9304)。苗族药夜关门样品分别采自贵州遵义(1 号), 贵州贵阳(2 号), 贵州毕节(3 号), 贵州铜仁(4 号), 贵州六盘水(5 号), 贵州黔西南(6 号), 经遵义市食品药品检验所邓顺超副主任中药师鉴定为豆科植物夜关门 *Lespedeza cuneata* 的干燥地上部分。乙腈为色谱纯, 其他均为分析纯, 水为娃哈哈纯净水。

2 方法和结果

2.1 薄层色谱鉴别^[7-9]

2.1.1 供试品溶液的制备 称取苗族药夜关门药材粉末(过三号筛)1.5 g, 加提取溶液(甲醇-25% 盐酸 4:1)20 mL, 水浴回流 1 h, 过滤, 滤液浓缩至干, 立即加水 10 mL 溶解, 水溶液先用乙酸乙酯萃取 2 次, 每次 20 mL, 乙酸乙酯萃取液再用水 30 mL 萃取 1 次, 将乙酸乙酯萃取液浓缩至干, 冷却后加甲醇 1 mL 溶解, 作为供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取槲皮素 14.8 mg 溶解于甲醇 25 mL 中, 作为对照品溶液。

2.1.3 薄层鉴别 将不同产地的夜关门药材烘干后, 粉碎成粗粉(过三号筛), 按 2.1.1 项下操作制备成供试品溶液。分别吸取对照品溶液与供试品溶液适量, 点样于硅胶薄层板上, 置于展开缸中, 以甲苯-甲酸乙酯-甲酸(10:8:1)上行展开(展距约 8 cm), 取出喷雾 3% 三氯化铝乙醇液, 105 °C 加热显色 5 min, 于 366 nm 紫外灯下观察现象。在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。

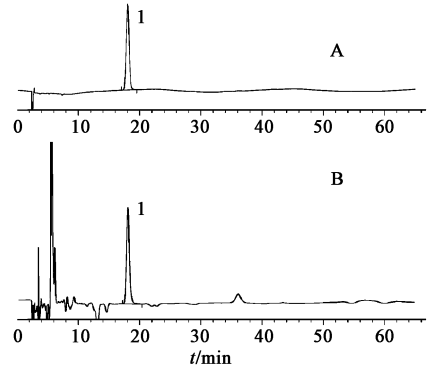
2.2 含量测定^[10-12]

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取槲皮素对照品适量, 加甲醇配制成质量浓度为 0.064 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.2.2 检测波长确定 按照紫外-可见分光光度法, 取对照品溶液和供试品溶液适量, 在 200~400 nm 处进行紫外扫描, 结果在 262, 282 和 360 nm 波长处有最大吸收。通过试验研究, 在 360 nm 波长处

各峰完全达到分离, 因此, 选择波长为 360 nm。

2.2.3 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 流动相乙腈-0.25% 磷酸溶液(25:75), 检测波长 360 nm, 柱温 25 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹。理论塔板数按槲皮素峰计算不低于 3 000。在此条件下对槲皮素对照品溶液和供试品溶液进行测定, 结果符合要求, 见图 1。



A. 对照品溶液; B. 供试品溶液; 1. 槲皮素

图 1 夜关门 HPLC 色谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Lespedeza cuneata*

2.2.4 供试品溶液的制备 精密称取夜关门药材粉末(过三号筛)约 1.6 g, 置于具塞锥形瓶中, 加甲醇-25% 盐酸溶液(4:1)20 mL, 密塞, 称定质量, 回流提取 1 h, 取出, 放置至室温, 再次称定质量, 用甲醇-25% 盐酸溶液(4:1)补足质量, 过滤, 取续滤液, 即得。

2.2.5 线性关系考察 分别精密吸取槲皮素对照品溶液 2, 6, 10, 14, 20 μL, 按 2.2.3 项下色谱条件测定峰面积, 以槲皮素进样量(X)为横坐标, 峰面积积分值(Y)为纵坐标, 得回归方程为 $Y = 1\ 114.5X + 3.507\ 2$ ($r = 0.999\ 9$)。槲皮素进样量在 0.128~1.280 μg 呈线性关系。

2.2.6 精密度试验 取同一槲皮素对照品溶液, 按 2.2.3 项下色谱条件, 连续进样 6 次, 结果槲皮素峰面积的 RSD 0.1%, 表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一批样品供试品溶液, 按 2.2.3 项下色谱条件, 分别在 0, 2, 4, 8, 12 h 测定, 结果槲皮素峰面积的 RSD 0.4%, 表明在 12 h 内供试品稳定性良好。

2.2.8 重复性试验 取同一批样品, 共 6 份, 按 2.2.3 项下色谱条件测定峰面积并计算含量, 结果槲皮素含量的 RSD 1.0%, 表明此方法的重复性良好。

2.2.9 回收率试验 取同一批样品(含量为 0.434 mg·g⁻¹)约 0.8 g, 共 6 份, 按 2.2.4 项下方法

制备成供试品溶液,分别加入对照品溶液(0.380 g·L⁻¹)1 mL,按 2.2.3 项下色谱条件测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 槲皮素加样回收率试验

Table 1 Quercetin recovery tests of *Lespedeza cuneata*

称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.808 4	0.351	0.738	101.84	100.37	2.7
0.815 0	0.354	0.729	98.68		
0.807 6	0.351	0.719	96.68		
0.808 0	0.350	0.726	98.95		
0.825 2	0.358	0.752	103.68		
0.827 1	0.359	0.748	102.37		

注:加入量均为 0.380 mg。

2.2.10 样品的含量测定 分别精密称取不同采集地夜关门样品约 1.6 g,按 2.2.4 项下操作制备供试品溶液,按 2.2.3 项下色谱条件测定,并按干燥品计算槲皮素的含量,结果见表 2。

表 2 夜关门不同采集地的槲皮素含量测定

Table 2 Determination results of quercetin in *Lespedeza cuneata* from different sources

No.	采集地	取样量/g	质量分数/%
1	贵州遵义	1.613 1	0.070
2	贵州贵阳	1.631 0	0.091
3	贵州毕节	1.627 3	0.104
4	贵州铜仁	1.622 3	0.090
5	贵州六盘水	1.687 7	0.094
6	贵州黔西南	1.646 5	0.088

3 讨论

根据《贵州省中药材、民族药材质量标准》2003 年版要求,选用硅胶为吸附材料。对展开剂的溶剂比例进行了研究,最终以甲苯-甲酸乙酯-甲酸(10:8:1)为展开剂,展开得到的薄层色谱图分离较好;试验对供试品溶液的 3 种提取条件进行了考察,结果表明水解后不萃取的供试品溶液色谱斑点与对照品溶液色谱斑点位置一致,但颜色不同,水解并萃取后的供试品溶液色谱斑点与对照品溶液色谱斑点位置一致,颜色也一致,故提取条件中必须先进行萃取,再点样进行薄层色谱鉴别;试验还对温湿度的影响进行了考察,在高温、室温、低温和高湿、低湿下薄层影响不大。

选用不同比例的甲醇-25% 盐酸溶液(6:1,5:1,4:1,3:1,2:1)作为提取溶剂,回流提取时间分别为 20,40,60,80,100 min,结果选择甲醇-25% 盐酸溶液(4:1)20 mL 回流提取 60 min,药材中槲皮素提取完

全;对流动相甲醇-水、甲醇-0.2% 磷酸溶液、乙腈-水和乙腈-0.2% 磷酸溶液进行选择,以乙腈-0.2% 磷酸溶液(20:80)各组分峰达到完全分离。对不同生产厂家色谱柱考察(Hypersil ODS2 C₁₈ 色谱柱, Dimaonsil C₁₈ 色谱柱及 Lichrospher C₁₈ 色谱柱),结果不同色谱柱保留时间有差异,但均能获得良好的分离效果;不同柱温考察(25,30,40 ℃),结果表明,柱温变化对结果没有影响。本法简便、快速,准确度高,重复性好,可用于苗药夜关门药材的质量控制。

[参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 卷十一[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999: 546-548.

[2] 马骥,邓虹珠,何兰,等. 甘肃胡枝子属药用植物资源[J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(6):22-24.

[3] 王威,闫喜英,王永奇,等. 胡枝子属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药, 2000, 31(2): 144-146.

[4] 张芳,张维民,邱丽筠. 铁扫帚化学成分研究[J]. 中国实用医药, 2008, 3(30):53-55.

[5] 朱晓勤,曾建伟,邹秀红,等. 截叶铁扫帚挥发油化学成分分析[J]. 福建中医学院学报, 2010, 20(2):24-27.

[6] 朱晓勤,彭水梅,吴锦忠. HPLC 测定截叶铁扫帚不同药用部位中槲皮素、山奈酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10):80-83.

[7] 陈燕,德吉,黄志芳,等. 藏药全缘绿绒蒿的薄层色谱鉴别与含量测定[J]. 中药材, 2009, 32(8): 1218-1220.

[8] 程静,侯小涛,戴航,等. 鸡骨草肝炎颗粒的薄层鉴别和绿原酸、槲皮素的测定[J]. 华西药学杂志, 2009, 24(4):409-411.

[9] 杨天寿,肖新月,安瑜,等. 金莲花的薄层鉴别与含量测定研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(10): 1878-1882.

[10] 王祥培,许士娜,吴红梅,等. 天胡荽药材中槲皮素的薄层鉴别与含量测定[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(1):44-45.

[11] 郭力城,腾红丽,梅之南. 铁包金药材中槲皮素的薄层鉴别与含量测定研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(12):2983-2985.

[12] 李旻,王砚,余弦,等. 竹叶柴胡根中皂苷类成分的薄层鉴别及含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4):74-77.

[责任编辑 顾雪竹]