

HPLC 测定刺梨中杨梅素和槲皮素的含量

王慧¹, 黄聪², 刘思源¹, 杜薇^{2*}

(1. 解放军第四十四医院药剂科, 贵阳 550009; 2. 贵阳中医学院药理学系 550002)

[摘要] 目的: 建立同时测定中药刺梨中杨梅素和槲皮素含量的 HPLC 分析方法。方法: 采用 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 以甲醇-0.4% 磷酸溶液为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 368 nm。结果: 杨梅素和槲皮素分别在 0.036 2 ~ 0.253 7 μg, 0.056 ~ 0.196 μg 峰面积与浓度呈良好的线性关系 ($r = 0.999 9$); 平均加样回收率分别为 98.32%, 98.84%, RSD 分别为 2.18%, 1.78%。结论: 该方法简便、准确、重现性好, 可用于中药刺梨的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱; 刺梨; 杨梅素; 槲皮素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0109-03

Determination of Myricetin and Quercetin in *Rose roxburghii* by HPLC

WANG Hui¹, HUANG Cong², LIU Si-yuan¹, DU Wei^{2*}

(1. PLA Forty-fourth Hospital Pharmacy, Guiyang 550009, China;

2. Department of Pharmacy, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of myricetin and quercetin in *Rose roxburghii*. **Method:** The optimized method was achieved for the separation and detection of myricetin and quercetin using Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) as the stationary phase, methanol-0.4% aqueous phosphoric acid solution (65:35) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, 368 nm as the detection wavelength. **Result:** Myricetin and quercetin showed good relationship in the range of 0.036 2-0.253 7 μg and 0.056-0.196 μg, respectively. The average recoveries of myricetin and quercetin were 98.32% and 98.84% with relative standard derivation (RSD) of 2.18% and 1.78%. **Conclusion:** The results showed that the method is simple, accurate and repeatable and it is suitable for quality control of *R. roxburghii*.

[Key words] high performance liquid chromatography; *Rose roxburghii*; myricetin; quercetin

刺梨为蔷薇科植物,产于云贵山区及江浙丘陵地带,尤其在贵州山区更为广见。过去民间以果实和根入药,具有消食健脾、收敛止泻与解毒的功效^[1]。刺梨果实中含有大量总黄酮、维生素、SOD、

多种微量元素、刺梨多糖等药理成分^[2],具有消除自由基、降低脂质过氧化损伤,提高免疫功能等作用;现代研究发现刺梨提取物还具有抗人子宫内膜腺癌作用^[3],抗人胃癌细胞系(SGC-7901和MKN-45)和人肝癌细胞SMMC-7721的作用^[4-5];同时刺梨还具有对肝损伤有保护作用^[6]。刺梨中含有杨梅素、槲皮素、少量的山柰素等黄酮类化合物,目前杨梅素、槲皮素、山柰素等的含量尚未见报道。为了提高刺梨的质量标准,更好地控制药材质量,该试验建立了刺梨中杨梅素和槲皮素的高效液相色谱含量测定方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, AG135 型电子分

[收稿日期] 20120806(011)

[基金项目] 贵州省中药现代化专项项目(黔科合中药字[2010]5024号)

[第一作者] 王慧, 中药师, 硕士, 从事中药化学成分及新药开发, Tel: 0851-5723193, E-mail: wanghui-706@163.com

[通讯作者] * 杜薇, 教授, 硕士生导师, 从事中药化学成分及新药开发, Tel: 0851-7953257, E-mail: duwei-h@163.com

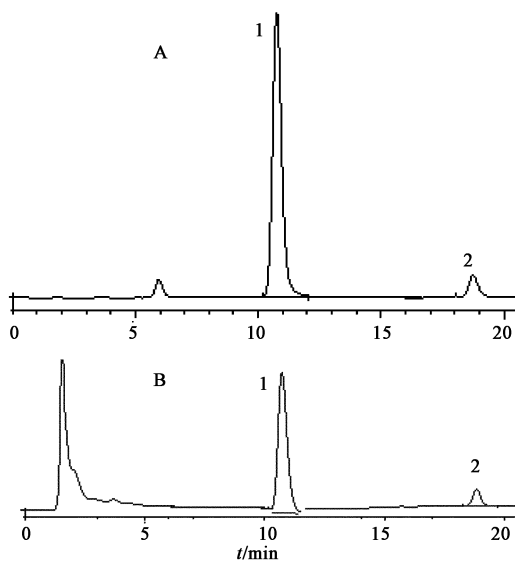
析天平,索氏提取器;对照品槲皮素由中国药品生物制品检定所提供,批号 100081-200406,纯度 97.3%;杨梅素由四川明波药业提供,纯度 97.5%;石油醚、甲醇、磷酸、盐酸、色谱甲醇均为分析纯、纯净水;刺梨果实于 2007 年 8 月采自贵州贵阳高坡,经贵阳中医学院董立莎教授鉴定为刺梨 *Rosroxburghii* Tratt. f. *normalis* Rehd. et Wils 的果实。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相 MeOH-0.4% H₃PO₄,梯度洗脱见表 1,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 368 nm。柱温 30 °C,进样量为 10 μL。在此色谱条件下,各成分之间分离情况良好,见图 1。

表 1 流动相的组成

t/min	MeOH/%	0.4% H ₃ PO ₄ /%
10	39	61
15	45	55
20	48	52



A. 对照品; B. 样品; 1. 杨梅素; 2. 槲皮素

图 1 刺梨 HPLC

2.2 检测波长的选择 在 200~400 nm 扫描,槲皮素和杨梅素在 265,368 nm 处均有最大吸收,在 265 nm 处干扰比较大,故选择检测波长为 368 nm。

2.3 标准品储备液的制备 精密称取杨梅素对照品 4.53 mg,槲皮素对照品 0.35 mg,分别置于 25 mL

量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,分别作为杨梅素和槲皮素对照品贮备溶液。

2.4 供试品溶液的制备 精密称取不同批号刺梨粉约 2.5 g,各 3 份,置索氏提取器中,用石油醚(90 °C)回流提取至无色,挥干石油醚,加甲醇 50 mL 回流提取 3 次,每次 1 h(90 °C),将提取液转移至 100 mL 量瓶中,用甲醇定容,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤。精密吸取滤液 16 mL,加入 0.4 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 4 mL,90 °C 水浴回流 1 h,取出,立即冰水冷却 5 min,放置至室温,转移至 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,即得滤液。

2.5 线性关系的考察 分别精密吸取杨梅素 1,2,3,4,5,6,7 μL 槲皮素 4,6,8,12,14 μL 注入高效液相色谱仪,分别测定杨梅素和槲皮素的峰面积值。以峰面积值(Y)为纵坐标,对照品质量浓度(X, mg·L⁻¹)为横坐标,绘制标准曲线,得杨梅素回归方程为 $Y = 14\ 014.718\ 6X - 8.072\ 9$ ($r = 0.999\ 9$),槲皮素回归方程 $Y = 2\ 067.808\ 4X + 1.956\ 8$ ($r = 0.999\ 9$)。结果表明,杨梅素和槲皮素分别在 0.036 2~0.253 7 μg,0.056~0.196 μg 峰面积值与进样浓度有良好的线性关系。

2.6 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液(杨梅素 0.181 2 g·L⁻¹,槲皮素 0.014 g·L⁻¹)10 μL,重复进样 5 次,测定峰面积,求得杨梅素和槲皮素 RSD 分别为 1.06%,2.21%,表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一批号的供试品刺梨粉约 2.5 g,置索氏提取器中,精密称定,共 6 份,按 2.4 项下方法制备供试品溶液,精密吸取 10 mL,进样测定含量。结果杨梅素和槲皮素平均含量分别为 0.28%,0.15%,RSD 分别为 1.1%,0.8%。

2.8 稳定性试验 取同一批号的供试品溶液,室温下放置,分别于 0,2,4,6,8 h 进样,相同色谱条件下进样测定,杨梅素和槲皮素含量的 RSD 分别为 1.25%,1.5%,结果表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验 取已知含量刺梨粉水解样品 6 份,分别加入一定量对照品溶液,相同色谱条件测定,回收率测定结果见表 2。其平均回收率为:杨梅素为 98.32%,RSD 2.18%,槲皮素为 98.84%,RSD 1.78%。

2.10 样品含量测定 分别精密吸取上述供试品溶液 10 μL,按相同色谱条件下测定,利用标准曲线,计算杨梅素、槲皮素的含量,测定结果见表 3。

表2 杨梅素和槲皮素回收率试验

化合物	称样量 /mg	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
杨梅素	1.251 0	0.100 4	0.111 2	0.208 0	96.76	98.32	2.18
	1.250 9	0.100 4	0.111 2	0.209 6	98.20		
	1.252 2	0.100 5	0.111 2	0.213 4	101.53		
	1.252 5	0.100 5	0.111 2	0.221 20	100.27		
	1.251 8	0.100 5	0.111 2	0.208 3	96.94		
	1.252 2	0.100 5	0.111 2	0.207 5	96.22		
槲皮素	1.251 0	0.045 6	0.042 0	0.086 2	96.72	98.84	1.78
	1.250 9	0.045 6	0.042 0	0.086 9	98.25		
	1.252 2	0.045 6	0.042 0	0.087 7	100.14		
	1.252 5	0.045 6	0.042 0	0.086 7	97.76		
	1.251 8	0.045 6	0.042 0	0.088 3	101.61		
	1.252 2	0.045 6	0.042 0	0.087 0	98.57		

表3 刺梨样品中杨梅素、槲皮素含量($n=3$) %

批号	杨梅素	RSD	槲皮素	RSD
200801	0.634	1.10	0.292	0.91
200802	0.548	1.62	0.333	1.77
200803	0.541	2.42	0.294	1.70
200804	0.395	1.08	0.353	0.30
200805	0.592	1.39	0.402	1.68

3 讨论

黄酮类化合物分离时甲醇和水的比例是否恰当

十分重要,本试验确定了梯度洗脱条件,可将各成分较好分离,而峰形较好。

黄酮类化合物一般在 368,254,265,280 nm 处均具有较好吸收,本试验在 200~400 nm 进行扫描,槲皮素和杨梅素在 265,368 nm 处均有最大吸收,但在 254,265,280 nm 处受到其他杂质的影响,实验中发现由于杂质含量较高,使样品中黄酮峰的分辨率下降,选择368 nm杂质吸收峰明显变小,提高了分辨率,并且基线平稳。

[参考文献]

- [1] 赵学敏.本草纲目拾遗[M].北京:人民卫生出版社,1983:295.
- [2] 董李娜,潘苏华.刺梨的研究进展[J].江苏中医药,2007,39(8):78.
- [3] 戴支凯,余丽梅,杨小生,等.刺梨三萜化合物 CL1 体外抗人子宫内膜腺癌作用[J].时珍国医国药,2011,22(7):1656.
- [4] 戴支凯,余丽梅,杨小生.刺梨提取物(CL)抗肿瘤作用[J].中国中药杂志,2007,32(14):1453.
- [5] 戴支凯,杨小生,余丽梅.刺梨提取物与氟尿嘧啶协同抗人肝癌细胞 SMMC-7721 的作用研究[J].肿瘤,2009,29(10):955.
- [6] 于丽伟,王聪智,何蓉蓉.刺梨果汁对拘束负荷诱发小鼠肝损伤的保护作用[J].食品与生物技术学报,2010,29(5):730.

[责任编辑 顾雪竹]