

HPLC 测定不同产地辣蓼中槲皮素的含量

高雅¹,张可锋²,朱华^{3*}

(1. 桂林医学院附属医院,广西 桂林 541001; 2. 桂林医学院,广西 桂林 541004;
3. 广西中医药大学,南宁 530001)

[摘要] 目的:建立 RP-HPLC 测定辣蓼药材中槲皮素的的含量,测定 10 个产地辣蓼中槲皮素的含量。方法:Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.4% 磷酸(50:50)等度洗脱,流速 1 mL·min⁻¹,室温,检测波长 365 nm,进样量 20 μL。结果:槲皮素标准曲线回归方程为 $A = 73\,185C - 21.47$ ($r = 0.999\,5$),在 0.004~0.014 g·L⁻¹ 线性关系良好,平均回收率为 99.29%,RSD 1.30%。结论:所用方法分离效果好,简便、准确,可用于辣蓼药材的质量控制。

[关键词] 辣蓼;槲皮素;高效液相色谱法;不同产地

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)21-0089-03

HPLC Determination of Quercetin in *Polygonum flaccidum* from Different Growing Areas

GAO Ya¹, ZHANG Ke-feng², ZHU Hua^{3*}

(1. Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, China;

[收稿日期] 20110919(001)

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科能 10100027-1)

[第一作者] 高雅,硕士,从事生药质量及活性成分药效研究,Tel:13977314085,E-mail:svidy@163.com

[通讯作者] *朱华,教授,博士,博士生导师,从事生药质量与开发,E-mail:xueshengcailiao@163.com

成与含量的关系,应该遵从中药的道地性。

本实验对于取样问题尤其注意,认为每一次实验的样品来源尤其重要,样品的处理更是重中之重。在实验过程中发现在一株黄芩中分成上中下三段后取样,得到的结果有很大的差异,认为不同取样部位对试验的影响较大,所以本实验在处理样品时采取整根研磨后取样的方法,而且每批样品选取 20 株测定后取平均值,这就保证了取样的均衡性,使得得到的数据更加可靠。

不同采收期的黄芩药材的化学组成与量的关系有一定的差异,通过多种黄酮类成分含量的比例对不同采收期黄芩药材进行综合宏观分析,有利于全面控制药材质量,促进黄芩药材及临床用药质量控制的全面提高,为区分道地黄芩与非道地黄芩做好了准备。

[参考文献]

[1] 沈红,段金廛,钱大玮,等. 黄芩及复方野马追胶囊中

黄酮类成分的 LC-MS/MS 分析[J]. 药物分析杂志, 2009,29(9):1425.

[2] Emika Ohkoshi, Tomomi Nagashima, Hiroyasu Sato, et al. Simple preparation of baicalin from Scutellariae Radix [J]. J Chromatography A,2009,1216(11):2192.

[3] Shang Xiao fei, He Xi-rui, He Xiao-ying, et al. The genus Scutellaria an ethnopharmacological and phytochemical review[J]. J Ethnopharmacol, 2010,128(2):279.

[4] Jian Han, Min Ye, Man Xu, et al. Characterization of flavonoids in the traditional Chinese herbal medicine-Huangqin by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. J Chromatography B,2007,848(2):355.

[5] 徐丹洋,陈佩东,张丽,等. 黄芩的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):78.

[责任编辑 顾雪竹]

2. Guilin Medical University, Guilin 541004, China;
3. Guangxi Traditional Chinese Medicine University, Nanning 530001, China)

[Abstract] Objective: To determine the quercetin content of *Polygonum flaccidum* from different growing areas. Method: The chromatographic column was Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol-0.4% phosphoric acid (50:50). The flow rate was 1 mL · min⁻¹, the detection wavelength was at 365 nm. The column temperature was at room temperature. The sample volume was 20 μL. Result: The standard curve regression equation was $A = 73\,185C - 21.47$ ($r = 0.999\,5$). It showed a good linear relationship between 0.004-0.014 g · L⁻¹, and average recovery was 99.29%, RSD 1.30%. Conclusion: The method is simple and reliable, could be used to control the quality of these medicinal materials.

[Key words] *Polygonum flaccidum*; quercetin; HPLC

辣蓼为蓼属植物辣蓼,以全草入药,具有祛风利湿、散瘀止痛、解毒消肿、杀虫止痒的功效。用于痢疾,胃肠炎,腹泻,风湿关节痛,跌打肿痛,功能性子宫出血;外用治毒蛇咬伤,皮肤湿疹等,主要化学成分有黄酮类、鞣质类、苷类,其中黄酮化合物含有槲皮素及其苷类等^[1-2]。目前,辣蓼药材尚无适用的定量控制方法,本研究采用 RP-HPLC 测定其化学成分槲皮素的含量,为其质量标准的建立提供参考依据。

1 仪器与试剂

Agilent1100 型高效液相色谱仪, G1314A 型紫外检测器, G1310A 型高压泵(美国安捷伦科技有限公司); UV2550 紫外分光光度计(日本岛津公司), B2200S-T 型超声仪(上海必能信超声有限公司), BT224S 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), 单道微量可调移液枪(芬兰 Thermo Finnpiptette), R-200 型旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司)。

槲皮素对照品(批号 10081-9905, 中国药品生物制品检定所), 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

10 种辣蓼(7~8 月份采收)采于广西、广东、云南等省, 经桂林医学院杜泽乡副教授鉴定为蓼属植物辣蓼 *Polygonum flaccidum* Meism. 的干燥全草。样品低温干燥后, 粉碎成粗粉, 过 80 目筛, 备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性试验^[3] Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.4% 磷酸(50:50), 流速 1 mL · min⁻¹, 柱温室温, 检测波长 365 nm, 洗脱时间 20 min, 进样量 20 μL。在此条件下, 槲皮素峰和供试品中其他相邻组分色谱峰的分离度较好; 按槲皮素峰计算, 理论塔板数不小

于 5 000。(见图 1)

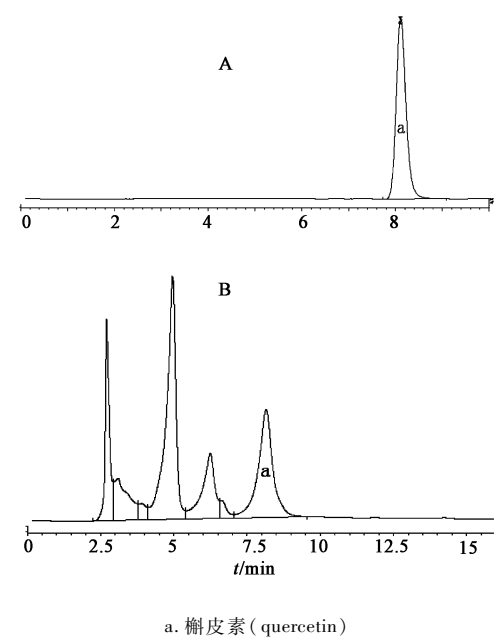


图 1 对照品(A)与样品(B)色谱

2.2 线性关系考察 精密称定槲皮素对照品 25.0 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得浓度为 1.0 g · L⁻¹ 的对照品溶液。精密吸取取对照品溶液 4, 6, 8, 10, 12, 14 μL, 分别加甲醇定容至 1 mL。分别依法进样分析, 以峰面积(A)为纵坐标、质量浓度(C)为横坐标绘制标准曲线。回归方程为 $A = 73\,185C - 21.47$ ($r = 0.999\,5$), 在 0.004~0.014 g · L⁻¹ 线性关系良好。

2.3 供试品溶液的制备^[4-5] 取辣蓼药材粉末约 1 g, 精密称定, 置于索氏提取器中用石油醚脱脂 2 h, 脱脂后药粉转移至置于圆底烧瓶中, 加 0.1% 盐酸甲醇 25 mL 回流 2 次, 每次 1.5 h, 合并滤液, 挥干溶剂, 放冷, 甲醇定容至 50 mL。0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度考察 取同一供试品溶液连续进样 6 次,测定峰面积,测得 RSD 0.05%。表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性考察 取同一供试品溶液于 0,2,4,6,8,10,12 h 各进样 1 次,测定峰面积,测得 RSD 1.00%。表明在 12 h 内样品稳定性良好。

2.4.3 重复性考察 取同一药材粉末约 1 g,精密称定,按 2.3 项下方法平行制备 6 份,依法测定各峰面积,计算出槲皮素的含量,得 RSD 1.46%。表明该方法重复性良好。

2.4.4 加样回收率试验 取已知含量的辣蓼粉末约 0.5 g,精密称定 6 份,均加入已知含量(1.0 g·L⁻¹)的槲皮素对照品溶液各 0.3 mL,依法测定各份样品中槲皮素的含量,计算得本法平均回收率 99.29%,RSD 1.30%(表 1)。

表 1 样品中槲皮素加样回收率试验(n=6)							
No.	称样量 /g	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	0.500 2	0.343 7	0.3	0.64	98.77	99.29	1.30
2	0.499 5	0.343 2	0.3	0.64	98.90		
3	0.501 1	0.344 3	0.3	0.65	101.9		
4	0.500 8	0.344 0	0.3	0.64	98.67		
5	0.499 6	0.343 3	0.3	0.64	98.90		
6	0.501 2	0.344 4	0.3	0.64	98.53		

2.5 样品含量测定 各样品按照 2.3 项下方法平行制备 3 份,依法测定各供试品溶液的峰面积,计算槲皮素的含量,求得各样品含量的平均值。结果见表 2。

3 讨论

辣蓼药用资源丰富,为民间常用中草药,然而利用现代医药学技术手段对其进行研究的报道较少,不利于辣蓼的进一步应用和开发。目前,已有辣蓼

表 2 不同产地辣蓼槲皮素含量的测定 %

No.	产地	含量	No.	产地	含量
1	广西桂林	0.321 8	6	广西靖西	0.400 0
2	广西南宁	0.400 1	7	广东佛山	0.299 8
3	广西梧州	0.375 5	8	广东肇庆	0.564 1
4	广西柳州	0.377 8	9	广西贺州	0.469 6
5	广西玉林	0.687 1	10	云南昆明	0.546 4

中芦丁的定性鉴别和总黄酮含量的测定方法,较为简单和不够精确;本研究组实验中发现辣蓼中槲皮素的含量较高,且不同产地含量有别,以槲皮素为指标成分评价辣蓼药材质量较佳。

本研究曾选用超声提取法和回流提取法,发现回流提取法明显优于超声提取法。用甲醇-0.1%磷酸水溶液(50:50)、甲醇-0.4%磷酸水溶液(50:50)和甲醇-0.4%磷酸水溶液(52:48)等不同极性与酸度的体系进行洗脱,发现流动相为甲醇-0.4%磷酸(50:50)得到的色谱峰形较好,且较稳定。对于不同酸浓度的水解效果,考察了 0.05%,0.1%和 0.2%盐酸甲醇液,发现 0.1%盐酸甲醇液水解 2 次,每次 1.5 h,水解完全,杂质含量低,故选此。

[参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 2 卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:666.

[2] 王开金,张颖君,杨崇仁. 蓼属植物的化学成分与生物活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2006,18(1):151.

[3] 邹亮,王战国,胡慧玲,等. 苦荞提取物中芦丁和槲皮素的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):60.

[4] 危华玲,杨青,韦红音. 高效液相色谱法测定山楂叶提取物中槲皮素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(8):10.

[5] 刘燕,唐铁鑫. 野牡丹中槲皮素的测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):85.

[责任编辑 顾雪竹]