

HPLC 测定截叶铁扫帚不同药用部位中槲皮素、山奈酚的含量

朱晓勤¹, 彭水梅², 吴锦忠^{1*}

(1. 福建中医药大学中西医结合研究院, 福州 350108;
2. 福建中医药大学药学院, 福州 350108)

[摘要] 目的:建立高效液相色谱法同时测定截叶铁扫帚不同药用部位中槲皮素、山奈酚含量的方法。方法:采用 Daisogel Sp-ODS-BP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.2% 磷酸(63:37),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25℃,检测波长 360 nm。结果:槲皮素在 6.25~100 mg·L⁻¹呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$),加样回收率 100.75%,RSD 1.92%,山奈酚在 0.638~20.4 mg·L⁻¹呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$),加样回收率为 99.76%,RSD 1.99%。根、枝、叶部位槲皮素的平均质量分数分别为 9.00,41.79,221.86 μg·g⁻¹,山奈酚的平均质量分数分别为 3.09,7.52,40.72 μg·g⁻¹。结论:该方法简便快速,结果准确可靠,可作为截叶铁扫帚不同药用部位的含量测定方法,为合理开发利用截叶铁扫帚资源提供理论依据。

[关键词] 截叶铁扫帚;槲皮素;山奈酚;含量测定;药用部位

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0080-04

Determination of the Content of Quercetin and Kaempferol from Different Medicinal Parts of *Lespedeza cuneata* by HPLC

ZHU Xiao-qin¹, PENG Shui-mei², WU Jin-zhong^{1*}

(1. Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350108, China;
2. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350108, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC method for the determination of the content of quercetin and Kaempferol from different medicinal parts of *Lespedeza cuneata*. **Method:** Samples were analyzed on Daisogel Sp-ODS-BP C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase consisted of methanol-0.20% phosphoric acid

[收稿日期] 20110707(003)

[基金项目] 福建中医学院服务海西建设重点项目;福建省教育厅科技项目(JA10167)

[第一作者] 朱晓勤,实验师,中药学硕士,从事中药化学成分提取分离及活性筛选研究,Tel:0591-22861586,15880106281,E-mail:zxq198338@163.com

[通讯作者] * 吴锦忠,教授,从事复方中药天然药物物质基础研究,E-mail:jinzhongfj@126.com,Tel:0591-22861611

“灯盏花素”项下测试含量,其野黄芩苷含量均>90.0%。通过指纹图谱控制各批原料基本含有相同的其他少量未知化学成分,以达到控制原料质量的目的。

[参考文献]

[1] 杨丽梅,顾军,林明建.灯盏花素的研究进展[J].天津药学,2010,22(1):56.

[2] 巢艳红,徐希明,余江南.灯盏花素新剂型及其质量控制的研究进展[J].中国药事,2010,24(7):711.

[3] 丁润芳,李正翔.灯盏花素制剂的临床应用[J].天津药学,2009,21(2):61.

[4] 高帅荣,万屏.灯盏花素临床应用进展[J].云南中医中药杂志,2009,30(3):67.

[5] 中国药典.一部[S].2010:378.

[6] 范莉,濮润,赵海誉,等.红花药材的 HPLC 指纹图谱及质量研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(1):37.

[7] 袁强,李兰,毛蕾,等.复方降糖滴丸 HPLC 指纹图谱的研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(8):79.

[责任编辑 蔡仲德]

solution (63:37). The flow rate was $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, column temperature was at $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. The UV wavelength was set at 360 nm . **Result:** The linear range of quercetin was $6.25\text{-}100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The average recovery was 100.75% and RSD was 1.92% . The linear range of kaempferol was $0.638\text{-}20.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The average recovery was 99.76% and RSD was 1.99% . The content of quercetin in root, branch and leaf was $9.00, 41.79, 221.86 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. The content of kaempferol was $3.09, 7.52, 40.72 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. **Conclusion:** The method is simple, rapid, accurate and reliable. It can be used as a content determination method for the medicinal parts of *L. cuneata*. It can provide evidence for the rational development and utilization of *L. cuneata*.

[**Key words**] *Lespedeza cuneata*; quercetin; kaempferol; content determination; medicinal part

截叶铁扫帚为豆科一年生草本植物,全草或带根全草入药,中药材为夜关门,具有清热利湿、消食除积、祛痰止咳、散瘀消肿的作用^[1]。文献报道截叶铁扫帚中含有黄酮类、萜类、 β -谷甾醇、多糖等多种化学成分,尤其含有丰富的黄酮类化合物,如异荭草素、异牡荆素、槲皮素、山奈酚、三叶豆苷、胡桃苷等^[1-3]。黄酮类化合物是天然植物药物中的有效成分而且药理作用广泛,具有抗氧化、抗肿瘤、抗病毒及抗炎等作用^[4]。截叶铁扫帚中的黄酮类化合物具有止咳、祛痰、平喘、抗氧化、抗菌等药理作用,具有很好的研究和开发价值^[1]。目前,尚未见到有关截叶铁扫帚中黄酮类成分定量分析的报道。为了充分利用截叶铁扫帚资源,合理采集药用部位,建立不同药用部位的质量控制方法,本文采用高效液相色谱法,对截叶铁扫帚根、枝、叶中的槲皮素、山奈酚进行了含量测定。

1 材料

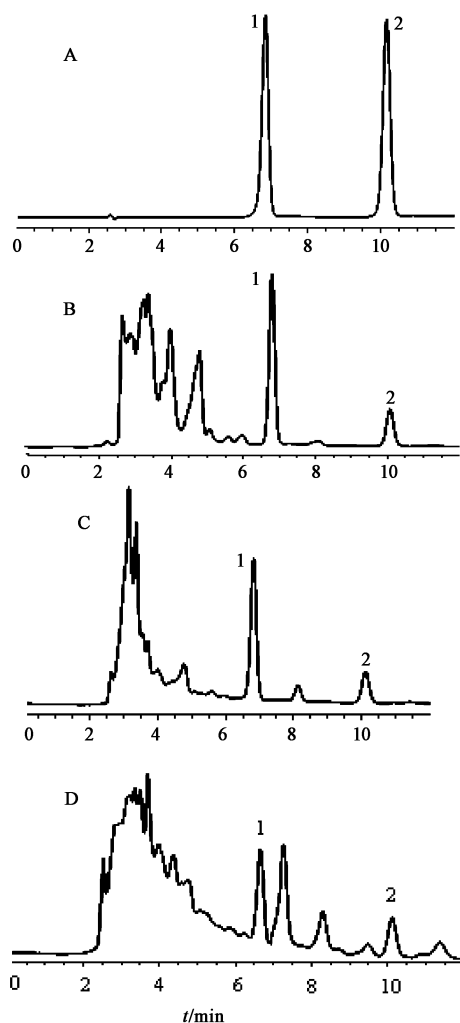
1.1 仪器 美国安捷伦 1200 型高效液相色谱仪, G1311A 四元泵, G1329A 自动进样器, G1315D DAD 检测器, ChemStation 色谱工作站, RE-52 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), CP225D 型赛多利斯电子天平。

1.2 试药 槲皮素(批号 100081-200907), 山奈酚(批号 110861-200808)均购自中国药品生物制品检定所。截叶铁扫帚样品采自福建省永春县,经福建中医学院杨成梓副教授鉴定为豆科植物截叶铁扫帚 *Lespedeza cuneata* (Dum. Cours.) G. Don。甲醇为色谱纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 通过预实验及参考相关文献^[4,6], 确定色谱条件为 Daisogel Sp-ODS-BP C_{18} 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$), 流动相甲醇- 0.2% 磷酸 (63:37), 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 360 nm , 柱温 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样量 $10 \mu\text{L}$ 。在此色谱条件下,槲皮素的保留时间为 6.9 min , RSD 0.24% , 山奈酚的保留

时间为 9.9 min , RSD 0.61% 。色谱峰达到基线分离,槲皮素、山奈酚能与其他成分有较好的分离,分离度均大于 1.5,理论塔板数不低于 3 000。结果见图 1。



A. 对照品; B. 叶部位; C. 枝部位;

D. 根部位; 1. 槲皮素; 2. 山奈酚

图 1 截叶铁扫帚不同药用部位 HPLC

2.2 对照品溶液的制备 精密称取槲皮素对照品 15.63 mg , 用甲醇定容至 25 mL 量瓶中, 从中吸取 5.0 mL 置于 25 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 作

为对照品溶液(125.0 mg·L⁻¹)。精密称取山奈酚对照品对照品 15.94 mg,用甲醇定容至 25 mL 量瓶中,从中吸取 2.0 mL 置 50 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,作为对照品溶液(25.5 mg·L⁻¹)。

2.3 供试品溶液的制备 分别取截叶铁扫帚根、枝、叶干燥粗粉各 2.0 g,精密称定,各加 40 mL 的石油醚加热回流提取 1 h 后,弃去石油醚液,残渣挥干石油醚,加入 50% 乙醇 40 mL,加热回流提取,连续提取 3 次,每次 1 h,滤过,减压回收至约 30 mL,往浓缩液中加入 1 mL 稀 HCl 并置于水浴锅上加热蒸发至约 10 mL,加纯水 10 mL,用二氯甲烷萃取 2 次,每次 20 mL,弃去二氯甲烷液,再用醋酸乙酯提取 3 次,每次 20 mL,合并醋酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇使溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察 精密吸取 125.0 mg·L⁻¹ 槲皮素对照品溶液 0.5,1.0,2.0,4.0,6.0,8.0 mL,25.5 mg·L⁻¹ 山奈酚对照品溶液 0.25,0.5,1.0,2.0,4.0,8.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加流动相至刻度,摇匀,按上述色谱条件分别进样 10 μL,测定色谱峰面积,以峰面积(*Y*)对对照品浓度(*X*)进行回归分析。槲皮素的对照品的线性回归方程为 $Y = 33.847X - 8.6907 (r = 0.9999)$; 山奈酚对照品线性回归方程 $Y = 51.397X - 7.3264 (r = 0.9999)$ 。表明槲皮素在 6.25 ~ 100 mg·L⁻¹、山奈酚在

0.638 ~ 20.4 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取质量浓度为 25.0 mg·L⁻¹ 的槲皮素对照品溶液、2.55 mg·L⁻¹ 的山奈酚对照品溶液各 10 μL,在上述色谱条件下连续进样 6 次,结果槲皮素的平均峰面积 RSD 0.28%; 山奈酚平均峰面积 RSD 0.16%。表明精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取截叶铁扫帚叶供试品溶液 10 μL 在上述色谱条件下分别于 0,2,4,6,8,10 h 进样测定,结果槲皮素平均峰面积 RSD 1.70%,山奈酚平均峰面积 RSD 0.27%。表明在 10 h 内样品溶液中的槲皮素、山奈酚稳定。

2.7 重复性试验 取截叶铁扫帚叶干燥粗粉 6 份,每份约 2.0 g,精密称定,按照 2.3 项下的方法制备供试品溶液,精密吸取 10 μL 在上述色谱条件下进行测定,测得样品中槲皮素的平均质量分数为 220.90 μg·g⁻¹, RSD 2.00%; 山奈酚平均质量分数为 40.50 μg·g⁻¹, RSD 1.45%。表明本方法的重复性较好。

2.8 加样回收率 取已知含量的截叶铁扫帚叶干燥粗粉 6 份,每份约 1.0 g,精密称定,分别精密加入 225.0 mg·L⁻¹ 槲皮素对照品溶液 1 mL、38.25 mg·L⁻¹ 山奈酚对照品溶液 1 mL,按照 2.3 项下的方法制备供试品溶液,精密吸取各供试品溶液 10 μL 在上述色谱条件下进行测定,结果槲皮素平均回收率为 100.8%, RSD 1.92%; 山奈酚平均回收率为 99.76%, RSD 1.99%。结果见表 1。

表 1 截叶铁扫帚中成分加样回收率试验(*n* = 6)

成分	取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
槲皮素	1.010 5	0.222 3	0.225 0	0.455 7	103.73	100.8	1.92
	1.023 3	0.225 2	0.225 0	0.449 9	99.87		
	1.008 7	0.221 9	0.225 0	0.447 3	100.18		
	1.013 5	0.223 0	0.225 0	0.445 2	98.77		
	1.026 6	0.225 9	0.225 0	0.449 7	99.46		
	1.005 6	0.221 3	0.225 0	0.451 9	102.50		
山奈酚	0.987 9	0.401 2	0.382 5	0.792 5	102.30	99.76	1.99
	0.990 5	0.402 2	0.382 5	0.778 6	98.40		
	0.992 7	0.403 1	0.382 5	0.782 2	99.10		
	1.000 2	0.406 2	0.382 5	0.780 6	97.90		
	0.989 1	0.401 7	0.382 5	0.778 8	98.60		
	0.991 5	0.402 6	0.382 5	0.793 7	102.23		

2.9 样品的含量测定 各样品分别做 3 个平行处理,按照 2.3 项下的方法制备供试品溶液,按照上述

色谱条件,进样分析,测定峰面积,按照外标法计算槲皮素与山奈酚的含量,结果见表 2。

表 2 不同部位槲皮素和山奈酚的质量分数 (n=3)

样品	槲皮素		山奈酚	
	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%
根	9.00	1.61	3.09	1.60
枝	41.79	1.89	7.52	1.97
叶	221.86	1.46	40.72	1.82

3 小结

本研究首次同时对截叶铁扫帚根、枝、叶部位中的槲皮素、山奈酚进行了含量测定,测定结果表明 3 个部位中均含有此 2 种成分,叶中含量尤其高。所以从槲皮素、山奈酚成分含量的角度考虑,把枝叶作为其入药部位,是比较合理的。为今后有针对性的进行药用资源的采摘、避免不合理砍伐提供了参考依据。本研究建立的同时测定截叶铁扫帚中槲皮素、山奈酚含量的高效液相色谱法简便快速、准确可靠,为截叶铁扫帚药材的质量控制及进一步推广应用提供了科学依据。

4 讨论

4.1 供试品溶液制备方法的选择 对供试品溶液制备时分别采用了超声和回流的提取方法,结果表明回流法提取率高,故采用回流法。回流提取的样品经过酸水解后,槲皮素和山奈酚的含量明显增加,尤其是山奈酚的含量,说明截叶铁扫帚叶中一大部分的槲皮素和山奈酚以结合型的形式存在于植物体内。由于黄酮苷对照品不易获得,采用 HPLC 分析时一般用相应的苷元来作对照品分析,所以本研究首先对叶提取物酸水解,再经乙酸乙酯萃取,既能保证提取完全,又能去除干扰成分,使得测定组分槲皮素和山奈酚色谱峰达到基线分离。

4.2 检测波长的选择 对槲皮素、山奈酚的 UV 光谱最佳吸收波长进行了摸索,考察了 254,360 nm 不同吸收波长的图谱,槲皮素、山奈酚在 254,365 nm 下均有较好的灵敏度,在 365 nm 下槲皮素、山奈酚有最大吸收,干扰少,图谱特征强,分离效果好。因

此,选择 365 nm 为检测波长。

4.3 流动相的选择 在实验过程中比较了乙腈-磷酸水溶液,甲醇-磷酸水溶液对样品分离的影响,用乙腈作为流动相时杂质出峰较快,不能与有效成分完全分离,使用甲醇作为流动相时分离效果好。流动相的 pH 对色谱峰的峰形及分离度影响较大,通过调整磷酸比例,以甲醇-0.2% 磷酸水溶液洗脱效果最佳。采用不同比例的甲醇-0.2% 磷酸水溶液(55:45,63:37)洗脱,也进行过甲醇-0.2% 磷酸水溶液梯度洗脱(0 min,30% 甲醇,15 min,45% 甲醇,35 min,60% 甲醇;0 min,45% 甲醇,15 min,63% 甲醇),采用梯度洗脱虽然可达到有效成分的分离,但是出峰时间晚,不具备简便快捷的优势,而甲醇-0.2% 磷酸水溶液(63:37)出峰快,色谱峰分离度良好。故选用甲醇-0.2% 磷酸水溶液(63:37)作为流动相。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 上册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:1444.

[2] 杨海涛,李志洲. 铁扫帚中主要有效成分的分析[J]. 宝鸡文理学院学报:自然科学版,2006,26(3):204.

[3] 王威,吴立军. 胡枝子属植物的化学成分的研究[J]. 中草药,2000,31(2):144.

[4] 周新,李宏杰. 黄酮类化合物的生物活性及临床应用进展[J]. 中国新药杂志,2007,16(5):350.

[5] 蒋立娣,宣贵达,吴好好. 桑叶提取物中槲皮素和山奈酚的含量测定[J]. 浙江大学学报:理学版,2009,36(6):705.

[6] 黄志勤,程齐来,李洪亮. RP-HPLC 测定细梗胡枝子中 3 种黄酮类有效成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(4):70.

[7] 黄怡,彭纓,高品一. HPLC 法同时测定山楂叶提取物中 4 种成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2011,28(2):135.

[责任编辑 蔡仲德]