

野牡丹中槲皮素的测定

刘燕, 唐铁鑫

(肇庆医学高等专科学校, 广东 肇庆 526020)

[摘要] 目的: 建立野牡丹主要成分的含量测定方法。方法: 样品加入甲醇-25% 盐酸溶液(4:1)混合溶液进行水解, 采用 RP-HPLC 方法测定水解后产生的槲皮素。色谱柱为 Shimpack VP-ODS(4.6 mm × 150 mm, 5 μm) C₁₈, 以甲醇-0.4% 磷酸水溶液(50:50)为流动相, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 360 nm。结果: 槲皮素在 21.2 ~ 169.6 μg·mL⁻¹ 线性关系良好($r=0.9995$), 平均回收率为 96.3%, RSD 1.54%。结论: 方法简便、准确、可靠, 可用于野牡丹中槲皮素的含量测定。

[关键词] 野牡丹; 槲皮素; 反相高效液相色谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0085-00

Assay of Quercetin in *Melastoma candidum*

LIU Yan, TANG Tie-xin

(Zhaoqing Medical College, Zhaoqing 526060, China)

[Abstract] **Objective:** Established a assay method for the content of active component in *Melastoma candidum*. **Method:** The raw materials was hydrolyzed by adding methanol-25% hydrochloride aqueous solution (4:1) mixture and the result quercetin in the solution was assayed RP-HPLC method. Shimpack VP-ODS(4.6 mm × 150 mm, 5 μm) C₁₈ column was used, the mobile phase was methanol-0.4% phosphoric acid aqueous solution (50:50), the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was 360 nm. **Result:** The calibration curve of quercetin was linear in 21.2-169.6 mg·L⁻¹ ($r=0.9995$). The average recovery is 96.3%, and its RSD was 1.54%. **Conclusion:** The method was convenient, accurate and of good recovery and was effective for the assay of quercetin in *M. candidum*.

[Key words] *Melastoma candidum*; quercetin; RP-HPLC; assay

野牡丹 *Melastoma candidum* D. Don 性凉、味酸涩, 具有清热解暑、利湿消肿等功效, 主治肠炎、痢疾等疾病^[1], 是野牡丹止痢片和野牡丹颗粒的原料^[2-3]; 抗菌实验、药效学实验表明野牡丹口服液体外对痢疾杆菌和大肠杆菌均有抑制作用, 对离体兔肠的蠕动有明显抑制作用, 对蓖麻油和番泻叶引起的刺激性腹泻均有抑制作用^[4-5]。野牡丹中槲皮苷、异槲皮苷、槲皮素、芦丁等黄酮类成分有明显的单胺氧化酶 B 拮抗作用和自由基清除活性^[6]。野牡丹药材没有国家质量标准, 不利于药材的质量控制, 本

法为野牡丹质量控制提供一定依据。

1 仪器与试剂

LC-10AT vp 高效液相色谱泵, SPD-10A vp 紫外-可见检测器, Shimpack VP-ODS(4.6 mm × 150 mm, 5 μm) C₁₈ 色谱柱, 日本岛津公司; N2010 色谱工作站(浙江大学智达信息工程有限公司); FA1104 电子天平(上海精密科学仪器有限公司); 25 μL 微量注射器(澳大利亚 Hamilton 公司); 野牡丹药材采自肇庆北岭山下, 经唐铁鑫鉴定为 *M. candidum*; 槲皮素(中国药品生物制品检定所, 批号 100081-200406), 色谱纯甲醇(天津市四友生物医学技术有限公司), 水为重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Shimpack VP-ODS C₁₈ 色谱柱(4.6

[收稿日期] 20110212(003)

[第一作者] 刘燕, 硕士, 副教授, 研究方向: 药物分析, Tel: 0758-2857607, E-mail: liuyan630117@163.com

mm × 150 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.4% 磷酸水溶液(50:50), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 360 nm。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取槲皮素对照品适量, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 含 212 μg 的溶液作为对照品贮备液。再精密吸取 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 mL 至 5 mL 的量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得到系列对照品溶液。

2.3 样品溶液和空白溶液的制备 取野牡丹药材粗粉约 0.5 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入甲醇-25% 盐酸溶液(4:1) 混合溶液 50 mL, 称定质量,

加热回流 1 h, 放冷, 再称定质量, 用甲醇-25% 盐酸溶液(4:1) 混合溶液补足减失的质量, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。另外, 取溶剂甲醇-25% 盐酸溶液(4:1) 混合溶液做空白。

2.4 专属性和系统适应性试验 取对照品溶液、样品溶液、空白溶液按 2.1 色谱条件分别进样 5 μL, 记录色谱图, 见图 1。空白溶液色谱在样品色谱图槲皮素峰位置处无干扰, 理论塔板数达 7 000 以上, 与前后峰的分度大于 2, 拖尾因子为 1.170。

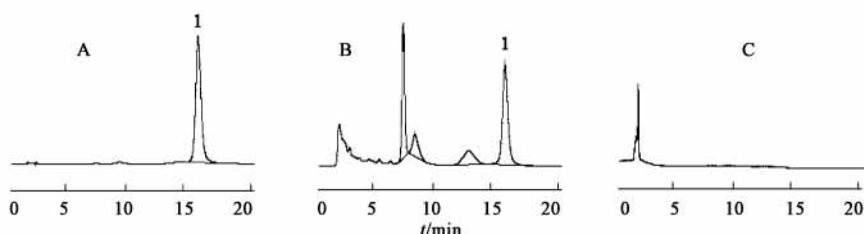


图 1 野牡丹中槲皮素 HPLC

A. 对照品; B. 供试品; C. 空白溶液; 1. 槲皮素

2.5 线性关系考察 精密吸取 2.2 对照品溶液, 按 2.1 色谱条件进样, 测定峰面积积分值, 以浓度(Y) 为纵坐标, 以峰面积(X) 为横坐标进行线性回归, 得回归方程为 $Y = 1.046 1 \times 10^4 X - 2.60 \times 10^5$ ($r = 0.999 5$)。槲皮素在 21.2 ~ 169.6 mg·L⁻¹ 呈良好的线性关系。

2.6 精密度 取样品溶液连续进样 6 次, 按上述色谱条件测定峰面积, 结果峰面积的 RSD 1.83%, 表明仪器的精密度良好。

2.7 稳定性试验 取同一份样品溶液, 分别在第 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 按上述色谱条件分别测定峰面积, 并计算含量, 结果 RSD 2.29%, 表明样品液在 8 h 内稳定。

2.8 重复性试验 取同一批样品 6 份, 按样品溶液制备方法制备供试品溶液, 按上述方法测定, 结果, 样品中槲皮素质量分数 0.443 3%, RSD 2.46%, 表明方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验 精密称取药材粉末(测得槲皮素含量为 4.427 mg·g⁻¹) 6 份, 置锥形瓶中, 精密加入槲皮素对照品贮备液(212 mg·L⁻¹, 5 mL), 减压干燥器中挥去溶剂, 精密加入甲醇-25% 盐酸溶液(4:1) 混合溶液 25 mL, 称定质量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定质量, 用甲醇-25% 盐酸溶液(4:1) 混合溶液补足减失的质量, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤

过, 同样品溶液方法测定。结果见表 1。

表 1 槲皮素加样回收率试验

No.	称样量 /g	样品中含量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.248 2	1 098.8	1 060	2 107.7	95.18		
2	0.249 1	1 102.8	1 060	2 131.5	97.05		
3	0.249 5	1 104.5	1 060	2 118.6	95.67		
4	0.252 2	1 116.5	1 060	2 129.7	95.58	96.3	1.54
5	0.248 7	1 101.0	1 060	2 108.4	95.04		
6	0.248 9	1 101.9	1 060	2 151.7	99.04		

2.10 样品测定 取不同地点的 3 批野牡丹样品, 按前面的样品制备和含量测定方法测定, 含量分别为 0.381 5%, 0.354 2%, 0.437 8%。

3 讨论

芦丁、槲皮苷都是槲皮素的衍生物。在前期试验中, 直接测定野牡丹中芦丁、槲皮苷, 杂质峰的峰高和峰面积很大, 芦丁和槲皮苷不能与杂质分离; 直接测定槲皮素, 含量太低, 只有 0.017%。这几个成分不能单独代表野牡丹的活性成分含量。因此参考《中国药典》的质量标准^[7] 测定它们水解后产生的苷元槲皮素。水解溶剂类型和用量、加热条件均参照文献^[9], 对提取时间进行了考察, 分别回流 30, 45, 60, 85, 90 min, 结果回流 60 min 组含量最高, 确定回流时间为 1 h。槲皮素的高效液相色谱条件较成熟, 因此直接参照文献, 系统适应性试验结果表明