

HPLC法同时测定铁包金不同药用部位中芦丁和槲皮素的含量

王吉文^{1*}, 房志坚^{1#}, 成金乐², 严寒静¹(1.广东药学院中药学院, 广州 510006; 2.中山市中智药业集团有限公司, 广东中山 528437)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)43-4098-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.43.23

摘要 目的:建立同时测定铁包金不同药用部位芦丁、槲皮素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为迪马ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-甲醇-0.2%磷酸(梯度洗脱),流速为0.9 ml/min,柱温为30 ℃,检测波长为360 nm。结果:芦丁和槲皮素的进样量分别在0.01~1.88、0.01~0.23 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系;精密性、稳定性、重复性的RSD<2%;芦丁、槲皮素的平均加样回收率分别为99.48%、102.34%,RSD分别为2.06%、2.37%(n=6)。结论:铁包金叶与藤茎部位中芦丁、槲皮素的含量均较高。该方法简单、稳定,结果准确、可靠,可用于铁包金的质量控制。

关键词 铁包金;芦丁;槲皮素;含量测定;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Rutin and Quercetin from Different Medicinal Parts of *Berchemia lineata* by HPLC

WANG Ji-wen¹, FANG Zhi-jian¹, CHENG Jin-le², YAN Han-jing¹(1.TCM College, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2.Zhongshan Zhongzhi Pharmaceutical Group Co., Ltd., Guangdong Zhongshan 528437, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of rutin and quercetin from different medicinal parts of *Berchemia lineata*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-methanol-0.2% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 0.9 ml/min. The column temperature was 30 ℃, and detection wavelength was set at 360 nm. RESULTS: The linear ranges were 0.01-1.88 μg for rutin and 0.01-0.23 μg for quercetin. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. Average recoveries were 99.48% (RSD=2.06%, n=6) and 102.34% (RSD=2.37%, n=6). CONCLUSIONS: The method can be used for quality control of *B. lineata*.

KEYWORDS *Berchemia lineata*; Rutin; Quercetin; Content determination; HPLC

铁包金(*Berchemia lineata*)为鼠李科勾儿茶属常用的一味民族药,其主要来源包括细叶勾儿茶、光枝勾儿茶、多花勾儿茶、多叶勾儿茶的藤茎或根,具有消肿解毒、止血镇痛、祛风除湿之功效,主治痈疽疔毒、咳嗽咯血、消化道出血、跌打损伤、烫伤、风湿骨痛、风火牙痛等症^[1-4]。据文献报道,铁包金中含有黄酮类、萜类、木脂素等多种化学成分,其中黄酮类化合物芦丁和槲皮素为其主要成分^[5],其对S180实体瘤有较好的抑制作用,且无顺铂的毒副作用^[6-7]。为提高铁包金的质量控制标准,本试验采用高效液相色谱(HPLC)法对铁包金根、茎、叶中的芦丁和槲皮素的含量进行测定。

1 材料

1.1 仪器

600型HPLC仪,包括2487型紫外检测器、Empower色谱工作站(美国Waters公司);CP225D型电子天平(德国Sartorius公司);KQ-500型超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

芦丁对照品(批号:100080-200707)、槲皮素对照品(批号:100081-200907)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为重蒸水。

- [7] 朱智勇,郑丰,陈武.HPLC法测定柿蒂中乌索酸与齐墩果酸的含量[J].安徽农业科学,2007,35(31):9840.
[8] 周长征.丁香柿蒂片的质量标准研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(15):80.

- [9] 郑一敏,青秀英,杨艳红,等.HPLC法测定柿蒂中金丝桃苷与齐墩果酸的含量[J].药学实践杂志,2005,23(3):163.
[10] 李计龙,刘建华,高玉琼,等.石吊兰挥发油成分的研究[J].中国药房,2011,22(27):2560.
[11] 孙贵娟,唐振柱,苏伟东,等.复方松油醇皮肤消毒液消毒性能的试验观察[J].中国消毒学杂志,2006,23(2):116.

(收稿日期:2013-10-23 修回日期:2014-01-09)

* 硕士研究生。研究方向:中药质量控制与分析。E-mail: wangjiwenlj@136.com

通信作者:副教授。研究方向:中药质量、中药资源。电话:0760-88207998。E-mail: jian139@tom.com

1.3 药材

铁包金药材经广东药学院房志坚副教授鉴定,分别为鼠李科勾儿茶属植物细叶勾儿茶[*Berchemia lineata*(L.)DC.]、光枝勾儿茶(*Berchemia polyphylla* Wall)、多花勾儿茶[*Berchemia floribunda*(Wall.) Brongn.],具体来源见表1。

表1 铁包金的样品来源

Tab 1 Origins of *B. lineata*

样品	来源	采集时间/批号
细叶勾儿茶(根、藤茎)	广东封开	2013.8
细叶勾儿茶(根、藤茎)	广东化州	2013.2
细叶勾儿茶(根、藤茎)	广东怀集	2012.11
细叶勾儿茶(根、藤茎、叶)	广东广州	2013.9
细叶勾儿茶(根、藤茎、叶)	广东中山	2012.10
细叶勾儿茶(根、藤茎、叶)	广东清远	2012.9
光枝勾儿茶(根、藤茎、叶)	广西防城	2012.10
多花勾儿茶(根、藤茎、叶)	广东中山	2012.9
多花勾儿茶(藤茎)	中山中智制药有限公司	0120120701

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:迪马 ODS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-甲醇(5:1.5, V/V, A)-0.2%磷酸(B),梯度洗脱(0~5 min, 25%A;5~40 min, 25%~60%A);流速:0.9 ml/min;检测波长:360 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。在此色谱条件下,理论板数按槲皮素计不低于3 000;分离度均>1.5。色谱见图1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取芦丁和槲皮素对照品各3.76、4.62 mg,分别置10 ml量瓶中,加甲醇定容,即得芦丁和槲皮素对照品贮备液。分别吸取上述对照品贮备液5.0、0.5 ml,置同一25 ml量瓶中,加甲醇定容,即得每1 ml含芦丁75.20 μg、槲皮素9.24 μg的混合对照品溶液。另吸取上述芦丁对照品贮备液0.4 ml,置25 ml量瓶中,加甲醇定容,即得每1 ml含芦丁6.02 μg的芦丁对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取铁包金根、藤茎、叶的干燥粉末(过2号筛)各2.0、1.0、0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别加入40、20、10 ml 80%乙醇,回流提取2 h,放冷,滤过,挥干,残渣加甲醇使溶解,将根、藤茎、叶提取物分别转移至10、10、25 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下的混合对照品溶液1、5、10、15、20、25 μl,芦丁对照品溶液2 μl,按上述色谱条件分别进样测定,记录色谱图。以进样量(x, μg)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得芦丁和槲皮素的回归方程分别为 $y=1\ 063\ 575.51x+10\ 240.90$ ($r=0.999\ 8$)、 $y=3\ 012\ 505.50x-5\ 201.14$ ($r=0.999\ 8$)。结果表明,芦丁和槲皮素的进样量分别在0.01~1.88、0.01~0.23 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系。

2.4 精密度试验

精密吸取含芦丁157.80 μg/ml、槲皮素11.30 μg/ml的混合对照品溶液10 μl,按上述色谱条件进样测定,重复6次,记录色谱图。结果,芦丁、槲皮素峰面积的RSD分别为0.82%、1.63%($n=6$),表明所用仪器精密度良好。

2.5 重复性试验

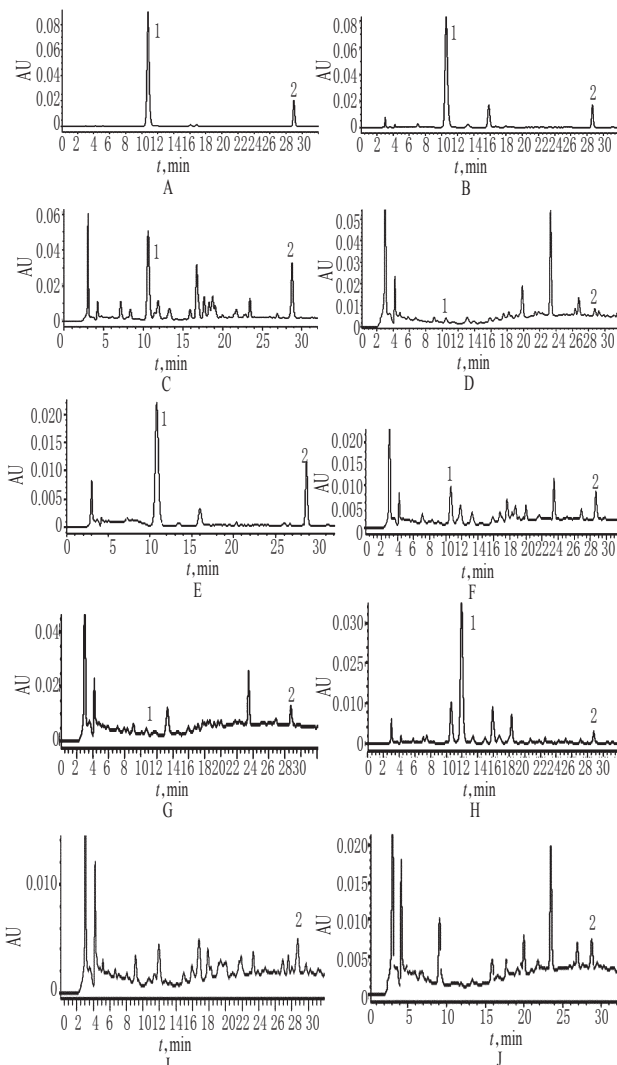


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.细叶勾儿茶叶;C.细叶勾儿茶藤茎;D.细叶勾儿茶根;E.光枝勾儿茶叶;F.光枝勾儿茶藤茎;G.光枝勾儿茶根;H.多花勾儿茶叶;I.多花勾儿茶藤茎;J.多花勾儿茶根;1.芦丁;2.槲皮素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. the leaves of *B. lineata*; C. the stem of *B. lineata*; D. the root of *B. lineata*; E. the leaves of *B. polyphylla*; F. the stem of *B. polyphylla*; G. the root of *B. polyphylla*; H. the leaves of *B. floribunda*; I. the stem of *B. floribunda*; J. the root of *B. floribunda*; 1. rutin; 2. quercetin

取细叶勾儿茶(广东中山)叶的干燥粉末(过2号筛)共6份,每份约0.1 g,精密称定,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,芦丁、槲皮素峰面积的RSD分别为1.79%、1.78%($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.6 稳定性试验

精密吸取细叶勾儿茶(广东中山)叶制成的供试品溶液10 μl,分别于0、2、4、6、8、12 h按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,芦丁、槲皮素峰面积的RSD分别为0.34%、1.70%($n=6$),表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.7 加样回收率试验

取已知含量的细叶勾儿茶(广东中山)叶的干燥粉末(过2

号筛)共6份,每份约50 mg,精密称定,分别精密加入芦丁、槲皮素对照品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录色谱图,计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery tests(n=6)

组分	取样量,mg	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
芦丁	51.6	2.022 8	1.972	3.956 6	98.06	99.48	2.06
	52.4	2.054 1	1.972	4.052 2	101.32		
	52.1	2.042 4	1.972	4.040 1	101.30		
	52.4	2.054 1	1.972	4.048 5	101.14		
	51.6	2.022 8	1.972	3.965 5	98.52		
	50.1	1.964 0	1.972	3.867 8	96.54		
槲皮素	51.6	0.091 3	0.109	0.199 2	98.99	102.34	2.37
	52.4	0.092 7	0.109	0.207 0	104.88		
	52.1	0.092 2	0.109	0.206 4	104.76		
	52.4	0.092 7	0.109	0.202 5	100.76		
	51.6	0.091 3	0.109	0.201 4	101.03		
	50.8	0.089 9	0.109	0.202 8	103.60		

2.8 样品含量测定

取不同产地的铁包金样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录色谱图,计算样品含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果(n=2)

Tab 3 Results of content determination of samples(n=2)

样品	来源	含量,mg/g	
		芦丁	槲皮素
细叶勾儿茶根	广东封开	0.012 5	0.008 1
细叶勾儿茶根	广东化州	0.003 0	0.009 3
细叶勾儿茶根	广东怀集	0.013 9	0.009 6
细叶勾儿茶根	广东广州	0.137 6	0.007 9
细叶勾儿茶根	广东中山	0.001 0	0.010 1
细叶勾儿茶根	广东清远	0.007 6	0.006 8
光枝勾儿茶根	广西防城	0.015 9	0.018 6
多花勾儿茶根	广东中山		0.010 4
细叶勾儿茶藤茎	广东封开	0.094 0	0.014 0
细叶勾儿茶藤茎	广东化州	0.645 0	0.099 6
细叶勾儿茶藤茎	广东怀集	0.194 8	0.021 3
细叶勾儿茶藤茎	广东广州	1.034 4	0.026 7
细叶勾儿茶藤茎	广东中山	0.393 9	0.045 7
细叶勾儿茶藤茎	广东清远	0.872 4	0.150 5
光枝勾儿茶藤茎	广西防城	0.155 1	0.031 6
多花勾儿茶藤茎	广东中山		0.019 9
多花勾儿茶藤茎	中山中智药业		0.031 4
细叶勾儿茶叶	广东广州	39.696 0	1.817 5
细叶勾儿茶叶	广东中山	39.200 9	1.769 4
细叶勾儿茶叶	广东清远	34.750 4	1.675 9
光枝勾儿茶叶	广西防城	12.404 0	1.361 8
多花勾儿茶叶	广东中山	4.198 6	0.338 6

3 讨论

3.1 提取方法的选择

预试验中,笔者对比了不同提取溶剂(水、甲醇、乙醇)和提取方法(超声、回流),结果提取效率为回流>超声,乙醇>甲醇>水;进一步对乙醇的体积分数、提取时间进行考察,结

果采用80%乙醇回流提取2 h的提取效率最高。

3.2 流动相的选择

流动相考察了甲醇-水、甲醇-磷酸、乙腈-磷酸、乙腈-甲醇-磷酸等溶液不同比例的等度与梯度洗脱。结果显示,流动相为乙腈-甲醇(5:1.5, V/V, A)-0.2%磷酸(B)梯度洗脱时,色谱图的基线平稳,芦丁、槲皮素峰形对称,能与其他组分达到基线分离。

3.3 检测波长的选择

本研究对不同吸收波长(250、260、285、360、370 nm)下的图谱进行了分析。结果表明,在360 nm波长下,芦丁、槲皮素与杂质峰能较好分离,且吸光度较高。

3.4 芦丁对照品溶液的制备

由于铁包含不同部位样品中芦丁含量差距较大,为了保证所有样品中芦丁含量均在标准曲线范围内,故本研究另制备另一低浓度的芦丁单独进样扩大芦丁的标准曲线范围。

已有相关文献^[8-9]对铁包金中槲皮素的含量进行了测定,但并未明确指出所用药材各部位的含量。本试验结果表明,铁包金药材中的芦丁、槲皮素主要集中在叶和藤茎部位,根中的含量较低,其中多花勾儿茶根、藤茎部位不含芦丁,可利用其特点与其他两种植物区别开来;叶的槲皮素含量高于藤茎,这与张荣祥等^[9]的结论一致;6批不同产地的细叶勾儿茶样品中,广东广州产的根、藤茎、叶中的芦丁含量最高,广东清远产的藤茎部位的槲皮素含量高于其他产地;不同品种叶的部位中,细叶勾儿茶芦丁、槲皮素的含量最高,其次为光枝勾儿茶、多花勾儿茶。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2000: 2 607-2 608.
- [2] 滕红丽, 陈科力, 陈士林. 壮药铁包金及其药材商品的物种基础[J]. 中药材, 2010, 33(5): 674.
- [3] 藏志和, 曹丽萍, 钟铃. 芦丁药理作用及制剂的研究进展[J]. 医药导报, 2007, 26(7): 758.
- [4] 孟德胜, 汪士良. 槲皮素及其苷类研究进展[J]. 中国药房, 2000, 11(5): 232.
- [5] 张国利, 滕红丽, 陈科力. 壮药铁包金的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国医药导报, 2011, 8(6): 5.
- [6] 陈小龙, 滕红丽, 沈玉霞, 等. 铁包金总黄酮体内对S180实体瘤的抑制作用[J]. 中国药理学报, 2011, 27(1): 121.
- [7] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1990: 260-261.
- [8] 郭力城, 滕红丽, 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): 2 983.
- [9] 张荣祥, 阮婧华, 王道平. 反相高效液相色谱法测定铁包金中槲皮素的含量[J]. 贵州教育学院学报: 自然科学版, 2011, 20(12): 4.

(收稿日期: 2013-11-10 修回日期: 2014-01-06)