

HPLC法同时测定对叶大戟草中山柰酚和槲皮素的含量^Δ

贺金华^{1,2*}, 蔡晓翠¹, 何江¹, 毛艳^{1,2}, 杨伟俊¹, 戎晓娟¹ (1.新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004; 2.新疆维吾尔药重点实验室, 乌鲁木齐 830004)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)35-3312-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.35.15

摘要 目的:建立同时测定对叶大戟草中山柰酚和槲皮素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Hypersil ODS-2 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.4%磷酸溶液 (52:48, V/V), 检测波长为 360 nm, 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 30 ℃。结果:山柰酚和槲皮素的质量浓度分别在 5.2~156.0 μg/ml 和 3.1~92.1 μg/ml 范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系 (r 分别为 0.999 9、0.999 7); 精密度、重复性、稳定性试验的 RSD 均 < 3%; 平均加样回收率分别为 101.73% 和 101.39%, RSD 分别为 1.27% 和 1.59% (n 均为 6)。结论:该方法准确、简单、快速、重复性好, 可用于对叶大戟草中山柰酚和槲皮素的含量测定。

关键词 对叶大戟草; 含量测定; 槲皮素; 山柰酚; 高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Kaempferol and Quercetin in *Euphorbia sororia* by HPLC

HE Jin-hua^{1,2}, CAI Xiao-cui¹, HE Jiang¹, MAO Yan^{1,2}, YANG Wei-jun¹, RONG Xiao-juan¹ (1.Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China; 2.Key Laboratory of Xinjiang Uygur Medicine, Urumqi 830004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of kaempferol and quercetin in *Euphorbia sororia*. METHODS: HPLC method was adopted. Hypersil ODS-2 C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with mobile phase consisted of methanol-0.4% phosphonic acid solution (52:48, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 360 nm, and column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear ranges of kaempferol and quercetin were 5.2-156.0 μg/ml ($r=0.999\ 9$) and 3.1-92.1 μg/ml ($r=0.999\ 7$), respectively. RSDs of precision, reproducibility and stability were all lower than 3%. The average recoveries were 101.73% (RSD=1.27%, $n=6$) and 101.39% (RSD=1.59%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is quick, simple, rapid and reproducible for the determination of kaempferol and quercetin in *E. sororia*.

KEY WORDS *Euphorbia sororia*; Content determination; Quercetin; Kaempferide; HPLC

对叶大戟草为大戟科 (Euphorbiaceae) 大戟属 (*Euphorbia*) 植物对叶大戟 *Euphorbia sororia* A. Schrenk 的干燥全草, 主要分布于中亚和我国新疆和田等地^[1]。其性温, 有小毒, 功能为利水消肿、降压清脑、泻下、杀虫, 用于治疗大便秘结、高血压头痛、头晕、肝硬化、水肿等。对叶大戟草是维吾尔族习用药材, 维药名为“苏扎甫”, 长期以来缺乏其药材质量评价的有效方法。有文献^[2-3]报道, 对叶大戟草含有山柰酚、山柰酚-3-*O*-β-D-吡喃葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*-β-D-吡喃半乳糖苷、槲皮素、槲皮素-3-*O*-β-D-吡喃葡萄糖苷、槲皮素-3-*O*-β-D-吡喃半乳糖苷、香草酸、反式对羟基肉桂酸、原儿茶酸、腺苷、尿嘧啶等。到目前为止, 还未见文献报道采用高效液相色谱 (HPLC) 法测定对叶大戟草药材中黄酮类成分的含量。因此, 笔者建立了以 HPLC 法同时测定对叶大戟草中山柰酚和槲皮素^[4-6]含量的方法, 为评价新疆各产地对叶大戟草的质量提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-2010C 型 HPLC 仪、CLASS-VP V6.14 SP1 型数据工作站 (日本岛津公司); BS110S 型电子天平 (德国 Sartorius 公司);

Δ 基金项目: 新疆维吾尔自治区重大科技专项计划项目 (No.201130105)

* 副研究员, 硕士。研究方向: 维吾尔药有效成分定性定量分析及质量标准研究。电话: 0991-2326572。E-mail: hejh1216@163.com

KQ-5200B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

甲醇为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为重蒸水; 山柰酚、槲皮素对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号分别为 110861-200808、100081-200907)。

1.3 药材

所用 10 批药材采自新疆各地, 均为人工栽培品种, 经新疆食品药品检验所刘勇民主任药师鉴定为大戟科植物对叶大戟 *E. sororia* A. Schrenk 的干燥全草。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备

分别精密称取山柰酚与槲皮素对照品各适量, 以甲醇溶解并制备成每 1 ml 含山柰酚 0.52 mg、槲皮素 0.307 mg 的混合对照品贮备液, 即得。

2.2 供试品溶液的制备

取本品粉末 (过二号筛) 约 10 g, 精密称定, 置于 500 ml 圆底烧瓶中, 加甲醇 100 ml, 密塞, 称定质量, 加热 (70 ℃) 回流 2 h, 放冷, 再次称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取滤液 20 ml, 置于 50 ml 锥形瓶中, 加 25% 盐酸 5 ml, 密塞, 精密称定质量, 80 ℃ 水浴回流水解 60 min, 放冷, 再次称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Hypersil ODS-2 C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.4%磷酸溶液(52:48,V/V);检测波长:360 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。理论板数按山柰酚峰和槲皮素峰计算分别为7 180和5 520。色谱见图1。

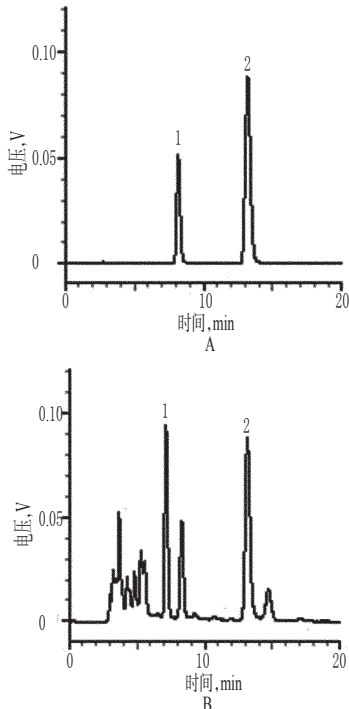


图1 高效液相色谱图
A.混合对照品;B.供试品;1.槲皮素;2.山柰酚

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed control; B. test sample; 1. quercetin; 2. kaempferide

2.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品贮备液0.1、0.2、0.5、1.0、3.0 ml,分别置于10 ml棕色量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,分别精密吸取10 μl注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,记录峰面积。以对照品质量浓度(x)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得山柰酚和槲皮素的回归方程分别为 $y=3.55\times 10^7x+1.11\times 10^4$ ($r=0.999\ 9,n=5$)和 $y=3.12\times 10^5x+2.82\times 10^5$ ($r=0.999\ 7,n=5$)。结果表明,山柰酚和槲皮素的质量浓度分别在5.2~156.0、3.1~92.1 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取混合对照品贮备液适量,按上述色谱条件连续进样测定5次,记录峰面积。结果,山柰酚和槲皮素的RSD分别为0.23%和0.58%(n均为5),表示仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一批药材适量,共6份,精密称定,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量。结果,样品中山柰酚和槲皮素的平均质量分数分别为0.070 5%和0.025 2%,RSD分别为2.18%和2.21%(n均为6),表明本方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液适量,室温静置,分别于0、4、8、12、24 h按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,山柰酚和槲皮素的RSD分别为0.26%和1.70%(n均为5),表明供试品溶液

在室温放置24 h内稳定。

2.8 加样回收率试验

取本品粉末(过二号筛)约5 g,共6份,精密称定,分别置于500 ml圆底烧瓶中,分别精密加入山柰酚对照品3.620 mg(或槲皮素对照品1.269 6 mg),按“2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率,结果分别见表1、表2。

表1 山柰酚的加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery test of kaempferide(n=6)

样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$,%	RSD,%
3.529	3.620	7.254	102.90	101.73	1.27
3.530	3.620	7.187	101.02		
3.528	3.620	7.204	101.56		
3.534	3.620	7.191	101.03		
3.527	3.620	7.156	100.24		
3.529	3.620	7.281	103.65		

表2 槲皮素的加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery test of quercetin(n=6)

样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$,%	RSD,%
1.260 7	1.269 6	2.546 1	101.24	101.39	1.59
1.261 0	1.269 6	2.576 6	103.70		
1.260 3	1.269 6	2.515 5	98.89		
1.262 6	1.269 6	2.555 1	102.01		
1.260 2	1.269 6	2.536 7	100.56		
1.260 9	1.269 6	2.554 0	101.92		

2.9 样品含量测定

取新疆不同产地的10批对叶大戟草样品各适量,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,以外标法计算样品中山柰酚和槲皮素的质量分数,结果见表3。

表3 10批样品中山柰酚和槲皮素的含量测定结果(% ,n=3)

Tab 3 Content determination of quercetin and kaempferide in 10 batches of samples(% ,n=3)

产地	槲皮素	山柰酚
新疆和田	0.031 1	0.087 7
新疆和田	0.014 2	0.025 7
新疆和田	0.015 9	0.030 6
新疆和田	0.010 4	0.016 0
新疆和田	0.029 5	0.080 2
新疆和田	0.025 2	0.070 5
新疆吉木萨尔	0.028 3	0.072 2
新疆喀什	0.008 1	0.010 2
新疆喀什	0.012 6	0.023 9
新疆喀什	0.018 8	0.052 6

3 讨论

对叶大戟草中黄酮类化合物主要有槲皮素、山柰酚及其与各种糖形成的糖苷。本试验考察了甲醇和50%乙醇两种提取溶剂的提取效果,结果槲皮素和山柰酚在两种溶剂中的提取率基本一致,但用甲醇提取的样品杂质干扰较小,因此选择甲醇为提取溶剂。

由于直接测定槲皮素和山柰酚可能难以准确反映对叶大戟草中黄酮类化合物的实际含量,故采用甲醇提取与甲醇提取后再经25%盐酸水解的方法进行比较。结果发现,甲醇提取后经25%盐酸水解的样品中槲皮素和山柰素的含量明显高于单独甲醇提取法,故选择甲醇提取后再经25%盐酸水解的方法制备供试品溶液。另外,在水解酸度的考察中,笔者对甲

黄芪天麻胶囊的质量标准研究

樊莉^{1*},周世文²(1.第三军医大学第二附属医院药学部,重庆 400037;2.第三军医大学第二附属医院临床药理基地,重庆 400037)

中图分类号 R283.65;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)35-3314-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.35.16

摘要 目的:建立黄芪天麻胶囊的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对黄芪天麻胶囊中的黄芪、人参、天麻、川芎进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定天麻中天麻素的含量;色谱柱为C₁₈(300 mm×3.9 mm,10 μm),流动相为乙腈-水(4:96,V/V),柱温为25℃,检测波长为221 nm,流速为0.8 ml/min。结果:TLC斑点清晰、分离度好,阴性对照无干扰。天麻素的进样量在0.404 8~2.428 8 μg范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD均<2%;平均加样回收率为98.88%,RSD=0.97%($n=9$)。结论:所建标准可用于黄芪天麻胶囊的质量控制。

关键词 黄芪天麻胶囊;质量标准;黄芪;人参;天麻;川芎;天麻素;薄层色谱法;高效液相色谱法

Study on Quality Standard of Huangqi Tianma Capsules

FAN Li¹,ZHOU Shi-wen²(1.Dept. of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400037, China;2.Clinical Pharmacology Base, The Second Affiliated Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of Huangqi tianma capsules. METHODS: Astragali Radix, *Panax ginseng*, *Gastrodia elata* and *Ligusticum chuanxiong* were identified by TLC. The content of gastrodin was determined by HPLC: the determination was performed on C₁₈(300 nm×3.9 mm,5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-water(4:96,V/V) at the flow rate of 0.8 ml/min. The temperature was 25℃ and the detection wavelength was set at 221 nm. RESULTS: TLC spots were clear and well-separated without interference from negative sample. The linear range of gastrodin was 0.404 8-2.428 8 μg($r=0.999\ 9$) with an average recovery of 98.88% (RSD=0.97%, $n=9$). RSDs of precision, stability and reproducibility were all lower than 2%. CONCLUSIONS: The standard is suitable for the quality control of Huangqi tianma capsules.

KEY WORDS Huangqi tianma capsule; Quality standard; Astragali Radix; *Panax ginseng*; *Gastrodia elata*; *Ligusticum chuanxiong*; Gastrodin; TLC; HPLC

醇提取液与25%盐酸溶液进行了4:1、3:1、2:1三种体积比的比较,结果发现甲醇提取液与25%盐酸溶液的体积比为4:1时水解程度最高,故选择甲醇提取液-25%盐酸溶液(4:1,V/V)作为水解酸度。

本试验在样品提取时采用了酸水解法,而酸水解的3个关键条件是水解温度、盐酸体积分数和水解时间。因此,笔者在确定盐酸体积分数为25%的前提下,考察了不同水解温度(70、80、90℃)与不同水解时间(30、60、90 min)的水解效果。结果表明,在水解温度为80℃、水解时间为60 min的条件下将对叶大戟草中的黄酮苷水解完全。

本试验通过紫外扫描,发现槲皮素在254 nm与360 nm波长处均有最大吸收,考虑到山柰素在360 nm波长处也有最大吸收,故选择测定波长为360 nm。在流速的考察过程中,分别选用0.8、1.0、1.2 ml/min作为流速的参考值,结果表明1.0 ml/min的流速可使槲皮素和山柰素的分离度达到最好的效果。另外,本试验还考察了25、30、35℃三个不同柱温对槲皮素和山柰素分离效果的影响,结果发现30℃时被测成分色谱峰的峰形和分离效果最佳,故选择柱温为30℃。

本试验采用HPLC法测定了10批对叶大戟草药材中山柰

酚和槲皮素的含量,结果发现10批样品中山柰酚和槲皮素的含量差异较大,这种差异可能与药材的生长环境、采集时间有关,有待进一步的研究。目前,新疆和田地区为对叶大戟草商品药材的主要供应地点,鉴于长期以来药用对叶大戟草大多为人工栽培品种,故在制定限度时参考了和田地区种植的药材品质。在此条件下,建议药用对叶大戟草的产地固定为新疆和田地区和吉木萨尔周边地区;其他地区若采用人工栽培品种,建议考察产地的生态条件。

参考文献

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会.中国植物志:第34卷第3册[M].北京:科学出版社,1997:121.
- [2] 张维库,张晓琦,叶文才.对叶大戟地上部分的化学成分[J].中国药科大学学报,2007,38(4):315.
- [3] 张维库,杨国恩,李茜,等.对叶大戟化学成分的研究[J].中国中药杂志,2006,31(20):1 694.
- [4] 潘馨,陈森鸿. HPLC法测定土荆芥中槲皮素和山柰素的含量[J].药物分析杂志,2008,28(9):1 500.
- [5] 刘亚蓉. HPLC法同时测定沙棘膏中槲皮素、山柰素、异鼠李素的含量[J].药物分析杂志,2008,28(5):759.
- [6] 邵振中,贾晓斌,辛然,等.白花蛇舌草中黄酮类抗肿瘤活性成分的HPLC分析[J].中国药房,2010,21(15):1 394.

(收稿日期:2012-09-17 修回日期:2013-02-19)

* 主管药师,硕士。研究方向:药剂学。电话:023-68774707。
E-mail: fanli1977411@126.com