

文章编号: 1006-2858(2008)10-0806-04

HPLC 法测定田基黄中槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷的含量

熊 丽, 陈晓辉, 高 询, 毛争艳, 毕开顺
(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立田基黄中槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷的含量测定方法, 为田基黄药材的质量控制和综合开发利用提供一定的科学依据。方法 采用 HPLC 法。色谱柱为 Hypersil C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为体积分数 0.04 % 的乙腈-磷酸水 (体积比 77:23), 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 371 nm, 柱温为 35 $^{\circ}$ C。结果 槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷质量浓度在 3.12 ~ 99.84 mg · L⁻¹ ($r = 0.9998$, $n = 6$) 内与峰面积呈良好的线性关系; 平均回收率为 99.1 % (RSD = 1.5 %, $n = 9$)。结论 该方法简便、快速、精密度好, 可用于田基黄的质量控制。

关键词: 槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷; 地耳草; 高效液相色谱法

中图分类号: R 917 **文献标志码:** A

田基黄原名地耳草, 始载于《生草药性备要》, 系藤黄科金丝桃属植物地耳草 (*Hypericum japonicum* Thumb.) 的干燥全草, 具有清热利湿、散瘀止痛、消肿解毒的功效^[1]。现已从田基黄中分离出黄酮类、酚类等有效成分。田基黄具有抑菌、保肝、抑制肿瘤细胞生长等多种药理学功效, 临床用于治疗急、慢性肝炎, 原发性肝癌, 伤寒, 副伤寒等^[2]。初步药理研究表明, 槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷具有保肝作用^[3], 并有较强的促凝血作用^[4], 是田基黄中重要的药理活性物质。本研究中作者首次采用 HPLC 法建立了田基黄中槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷的含量测定方法, 并测定了广西南宁等 16 个不同购买地的田基黄中槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷的含量, 为田基黄药材的质量控制和综合开发利用提供了一定的科学依据。

1 仪器与材料

LC-10AD 高效液相色谱仪、SPD-10A 紫外检测器 (日本岛津公司), N2000 色谱工作站 (浙江大学智达信息工程有限公司), AB135-S 天平 (瑞士 Mettler Toledo 仪器有限公司)。

槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷 (对照品, 自制, 经红外光谱、核磁共振谱以及质谱等技术分析鉴定,

并参照文献^[5]确定其为槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷, 峰面积归一化法计算其纯度质量分数大于 98.5 %, 符合定量要求), 甲醇、乙腈 (色谱纯, 山东禹王实业有限公司), 无水乙醇 (分析纯, 天津大茂化学试剂厂), 磷酸 (色谱纯, 天津科密欧化学试剂开发中心), 水 (二次重蒸水, 自制)。

16 份不同购买地的田基黄药材经沈阳药科大学孙启时教授鉴定为藤黄科金丝桃属植物地耳草 (*Hypericum japonicum* Thumb.) 的干燥全草。供试品经粉碎, 过 850 μ m 筛, 置广口瓶中密闭保存。

2 方法与结果

2.1 色谱条件的选择

色谱柱: Hypersil C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 体积分数为 0.04 % 的乙腈-磷酸水溶液 (体积比 77:23); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 371 nm; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L。

2.2 系统适用性试验

取供试品溶液按“2.1”条色谱条件进样测定, 槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷色谱峰与相邻色谱峰的分离度大于 1.5, 对称因子在 0.95 ~ 1.05 之间, 理论塔板数以槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷计不低于 4 000。

收稿日期: 2007-12-18

作者简介: 熊丽 (1983-), 女 (汉族), 江西南昌人, 硕士研究生, E-mail: xiongli131@163.com; 毕开顺 (1956-), 男 (汉族), 河北丰南人, 教授, 博士, 主要从事中药质量标准化、中药药效物质基础研究, Tel.: 024-23986296, E-mail: bikaishun@yahoo.com。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品储备液

精密称取干燥至质量恒定的对照品槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷适量于 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制成槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷质量浓度为 0.312 g L⁻¹储备液。

2.3.2 供试品溶液

取田基黄细粉约 2.0 g,精密称定,精密加体积分数为 60 %的乙醇 40 mL 于圆底烧瓶中,称质量,回流提取 1 h,放冷,再称质量,用体积分数为 60 %的乙醇补足损失的质量,摇匀,经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察

分别精密量取对照品储备液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,进样测定,以对照品峰面积(A)为纵坐标,质量浓度(ρ ,mg L⁻¹)为横坐标,绘制标准曲线并进行回归计算。结果表明,槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷质量浓度在 3.12 ~ 99.84 mg L⁻¹内与峰面积呈良好的线性关系,回归方程为 $A = 9.663 \times 10^3 \rho - 5.411 \times 10^3$, $r = 0.9998$ ($n = 6$)。

2.5 精密度试验

精密吸取对照品溶液 (24.96 mg · L⁻¹) 10 μ L,在“2.1”条色谱条件下连续重复进样 6 次,测定,槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷峰面积 RSD 为 2.7 %,表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

精密称取同一批供试品(广西南宁供试品),共 6 份,按“2.3.2”条方法操作,在“2.1”条色谱条件下进样测定,槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷含量 RSD 为 1.1 %,表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(广西南宁供试品)各 10 μ L,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定,槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷峰面积 RSD 为 1.5 %,表明供试品在 24 h 内稳定性良好。

2.8 回收率试验

精密称取已知含量的田基黄药材(广西南宁供试品)9 份,每份 1.0 g,每 3 份为一组,每组分别精密加入槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷对照品溶液(质量浓度为 0.312 g L⁻¹)0.7、1.4、2.1 mL 于圆底烧瓶中,常压下挥干溶剂,按“2.3.2”条操作制成所需溶液,在“2.1”条色谱条件下进样测定,结果见表 1。

Table 1 Recoveries of quercetin-7-O- α -L-rhamnoside (n = 9)

Sample	m_{original} / mg	m_{added} / mg	m_{found} / mg	Recovery/ %	Average recovery/ %	RSD/ %
1	0.445	0.218	0.655	97.7		
2	0.441	0.218	0.658	99.1		
3	0.444	0.218	0.661	100.4		
4	0.446	0.437	0.869	97.7		
5	0.439	0.437	0.867	97.3	99.1	1.5
6	0.443	0.437	0.888	102.1		
7	0.446	0.655	1.088	98.6		
8	0.447	0.655	1.093	99.4		
9	0.444	0.655	1.095	99.7		

2.9 供试品含量测定

取不同购买地的田基黄药材粉末各约 2.0 g,精密称定,按“2.3.2”条方法操作,在“2.1”条色谱条件下进行 HPLC 分析,代表性色谱图见图 1,16 个不同购买地的田基黄中槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷的含量测定结果见表 2。在所收集的 16 个不同购买地的药材中,槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷的含量存在较大的差异,这些差异可能是由气候、生长环境、采收期和储藏方法等不同引起的。

3 讨论

a. 色谱条件及流动相组成。对照品紫外吸收光谱表明,在 371 nm 和 255 nm 处均有较强吸收,在 371 nm 处干扰峰较少,故选择 371 nm 作为检测波长。分别对甲醇-磷酸水、乙睛-磷酸水按不同的比例混合进行考察。结果表明,采用乙睛-磷酸水流动相系统所得色谱峰峰形好,柱效高,可达到理想的分离度。

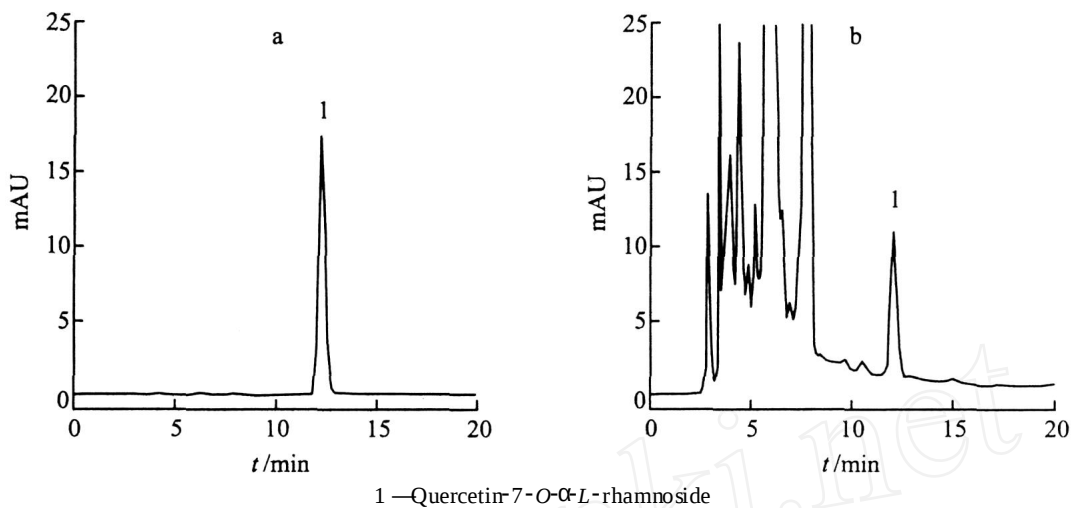


Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (a) and sample (b)

Table 2 Contents(c) of quercetin-7-O-α-L-rhamnoside in Hypericum japonicum from different origins

No.	Origins	c/ (mg · g ⁻¹)
1	Hangzhou , Zhejiang	0. 507
2	Chongqing	0. 158
3	Kaifeng , Henan	0. 239
4	Nanchang , Jiangxi	0. 409
5	Fuzhou , Fujian	0. 182
6	Xiaogan , Hubei	0. 296
7	Yulin , Guangxi	0. 492
8	Ningbo , Zhejiang	0. 339
9	Yueyang , Hunan	0. 396
10	Nanning , Guangxi	0. 444
11	Nantong , Jiangsu	0. 364
12	Qinxi , Guangxi	0. 197
13	Chengdu , Sichuan	0. 424
14	Jiujiang , Jiangxi	0. 257
15	Luoan , Jiangxi	0. 249
16	Wuhu , Anhui	0. 502

b. 提取条件。分别考察了体积分数为 40 %、60 %、80 %、95 %的乙醇和 40 %、60 %、80 %、95 %的甲醇为提取溶剂时槲皮素-7-O-α-L-鼠李糖苷的提取效率。结果证明,以体积分数为 60 %的乙醇为提取溶剂时提取效率较高,且提取物中干扰峰较少,色谱分离效果较好,故采用体积分数为 60 %的乙醇为提取溶剂。

c. 提取方法。分别考察了超声法与加热回流法,比较其含量。结果证明,加热回流法对槲皮素-7-O-α-L-鼠李糖苷的提取效率较高,故选择加热回流法提取。

4 结论

首次建立了田基黄中槲皮素-7-O-α-L-鼠李糖苷含量测定的 HPLC 法,并测定了 16 个不同购买地的田基黄中槲皮素-7-O-α-L-鼠李糖苷的含量,平均回收率为 99. 1 %;该方法简便、快速、精密度好;本实验为田基黄药材质量控制和综合利用提供了科学依据。

参考文献:

[1] 《中华草本》编委会. 中华草本[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:598 - 601.

[2] 张素琴,邱海霞. 田基黄的研究概况[J]. 中国中医药

- 科技,1999,6(5):351-352.
- [3] 傅梵. 田基黄活性成分的研究[D]. 上海:上海第二军医大学,2005:2.
- [4] 吴庆立. 中国金丝桃属药用植物化学成分研究及广
义藤黄科化学分类学探讨[D]. 北京:中国协和医科大学,1997:57-58.
- [5] 张琳,金媛媛,田景奎. 田基黄的化学成分研究[J]. 中国药学杂志,2007,42(5):341-344.

Content determination of quercetin-7-O- α -L-rhamnoside in *Hypericum japonicum* by HPLC

XIONG Li, CHEN Xiao-hui, GAO Xun, MAO Zheng-yan, BI Kai-shun
(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract : Objective To establish an HPLC method for the determination of quercetin-7-O- α -L-rhamnoside in *Hypericum japonicum*. **Methods** The separation was performed on an Hypersil C₁₈ column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) with the mobile phase consisting of 0.04% acetonitrile-aqueous phosphoric acid (V/V = 77/23) at the flow rate of 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹. The detection wavelength was set at 371 nm and the column temperature was set at 35 $^{\circ}$ C. **Results** The calibration curve was linear over the range of 3.12 - 99.84 mg $\cdot$ L⁻¹ for linarin ($r = 0.9998$). The average recovery was 99.1% (RSD = 1.5%, $n = 9$). **Conclusions** The method is simple, accurate and reproducible, which is suitable for the quality control of *Hypericum japonicum*.

Key words : quercetin-7-O- α -L-rhamnoside; *Hypericum japonicum*; HPLC