

HPLC 同时测定蚊子草药材槲皮苷、山柰酚含量

于雷^{1 2}, 严铭铭^{2*}, 杨智^{3*}, 田雨², 于红威^{1 2}, 万志强², 展月²
(1. 吉林农业大学, 吉林 长春 130118;
2. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117; 3. 中国生物技术发展中心, 北京 100036)

【摘要】 目的:用 HPLC 同时测定蚊子草药材槲皮苷、山柰酚含量。方法:采用 Ultimate C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相为甲醇(A) -0.2% 磷酸水溶液(B) 梯度洗脱, 波长 254 nm, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 ℃。结果:对 10 个不同地区和采收时间的蚊子草中的主要及共有成分槲皮苷、山柰酚进行了 HPLC 定量研究。结论:建立的蚊子草含量测定方法准确、快速,是控制药材质量的较好方法。
【关键词】 蚊子草; 槲皮苷; 山柰酚; 槲皮素; 质量标准

蚊子草 *Filipendula palmata* (Pall) Maxim 为蔷薇科蚊子草属植物蚊子草的干燥全草,又名合叶子、黑白蚊子草。临床上治疗痛风、风湿、癫痫、冻伤及烧伤等症;在妇科止血方面亦有良好疗效^[1]。蚊子草中具有抗炎、抗菌、抗衰老作用的主要成分为黄酮类^[2]。本课题组针对黄酮类成分进行了系统研究,发现其具有良好的抗炎作用。为了更好的开发和利用这一植物资源,本实验对 10 个不同来源的蚊子草进行研究,建立了蚊子草药材的定性定量的控制方法,为药材质量标准的制定提供了科学依据。

1 材料

安捷伦 1100 型高效液相色谱仪; DZF 型真空干燥箱(上海博迅实业有限公司); AB265-S 型电子天平(瑞士梅特勒托利多); EYELA OSB-2000 型旋转蒸发仪(日本东京理化); KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); ZF-2 型三用紫外仪(上海市安亭电子仪器厂); 生物显微镜(OLYMPUS-CX31, 日本); SHB-IIIS 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); RZK-5 马弗炉(合肥新日高温技术有限公司)。水为纯净水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

对照品槲皮苷(批号 111538-200403), 山柰酚

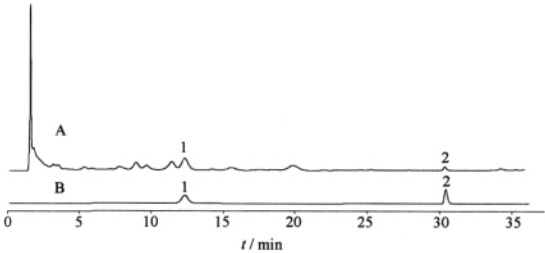
(批号 110861-200808) 均购自中国药品生物制品检定所。蚊子草药材采自吉林、内蒙古、河北、山西 4 省区野外,经长春中医药大学姜大成教授鉴定为蔷薇科蚊子草属植物蚊子草 *F. palmate*。

2 方法

2.1 色谱条件^[4] Ultimate C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm 5 μm); 流动相为甲醇(A) -0.2% 磷酸水溶液(B) ^[5],按表 1 方法进行梯度洗脱; 波长 254 nm; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 30 ℃。色谱图见图 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0 ~ 18	40	60
18 ~ 35	40 ~ 70	60 ~ 30



A. 蚊子草样品; B. 对照品; 1. 槲皮苷; 2. 山柰酚。

图 1 蚊子草 HPLC 色谱图

2.2 对照品溶液的制备 精密称定槲皮苷对照品 2.9 mg, 山柰酚对照品 3.4 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇定容。制成 29 mg · L⁻¹ 的槲皮苷对照品和 34 mg · L⁻¹ 的山柰酚对照品混合溶液。

【稿件编号】 20110224003
【基金项目】 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAI38B05)
【通信作者】 * 严铭铭, 教授, 主要从事中药有效成分的提取与分离, Tel: 13578990277, E-mail: yanmm595@yahoo.com.cn; * 杨智, 研究员, 主要从事中药有效成分的提取与分离, Tel: (010) 88225190, E-mail: yangz@cncbd.org.cn

2.3 供试品溶液的制备 取蚊子草 0.5 g (吉林抚松)精密称定,置于 50 mL 三角瓶中,加入甲醇 20 mL,称重,超声处理 30 min,放冷,补足损失重量,定容至 25 mL 量瓶,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品储备液 5, 7, 9, 11, 15, 17, 20 μ L 注入高效液相色谱仪中,按照上述色谱条件测定峰面积,以进样量(μ g)为横坐标 X ,平均峰面积为纵坐标 Y ,绘制标准曲线并计算回归方程,见表 2。

表 2 槲皮苷与山柰酚的线性回归方程			
对照品	回归方程	线性范围/ μ g	r
槲皮苷	$Y = 11.894X - 7.392$	145 ~ 580	0.999 7
山柰酚	$Y = 554.190X - 30.124$	170 ~ 680	0.999 7

2.5 精密度试验 精密吸取 2.3 中蚊子草供试品溶液 10 μ L,重复进样 5 次,测定峰面积。以测得槲皮苷峰面积值 RSD 为 0.97%,山柰酚为 0.91%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取 2.3 中蚊子草供试品溶液,分别于制备后 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 进行测定,进样量 10 μ L。测得槲皮苷峰面积计算 RSD 求得为 1.2%,山柰酚为 1.1%。表明样品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.7 重复性试验 精密称取蚊子草样品(吉林抚松)5 份,按照 2.3 制备供试品溶液,2.1 方法测定,进样 10 μ L,测定 3 次。测得槲皮苷 RSD 为 1.9%,山柰酚为 1.8% 符合要求。

2.8 加样回收率试验 采用加样回收法,取已知含量的药材样品(吉林抚松)5 份,每份 0.25 g,精密加入槲皮苷与山柰酚混合标准品溶液 1 mL。按供试品制备方法和测试条件进行测定,各进样 10 μ L,计算槲皮苷回收率为 96.52%,RSD 为 1.3%;山柰酚回收率为 97.79%,RSD 为 1.5%。结果见表 3、4。

2.9 样品含量测定 精密称取来源不同的 10 份蚊子草药材的粗粉,按上述方法制备供试品溶液,分别精密吸取对照品与供试品溶液各 10 μ L,测定峰面积,计算得槲皮苷和山柰酚的含量,见表 5。

3 讨论

根据对 5 种文献报道的流动相进行了筛选,确定以甲醇-0.2% 磷酸(40:60)为流动相。而在实验过程中发现梯度洗脱效果更加,不仅分离效果好,而且

表 3 槲皮苷加样回收率						
取样量 /g	样品中槲皮苷量/mg	对照品加入量/mg	实测值 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.251 7	0.312 1	0.30	0.601	96.30		
0.252 2	0.312 7	0.30	0.596	94.42		
0.250 1	0.310 1	0.30	0.604	97.96	96.52	1.3
0.251 6	0.312 0	0.30	0.601	96.34		
0.250 8	0.311 0	0.30	0.600	96.34		
0.251 3	0.311 6	0.30	0.598	97.78		

表 4 山柰酚加样回收率						
取样量 /g	样品中槲皮苷量/mg	对照品加入量/mg	实测值 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.251 7	0.385 1	0.36	0.741	98.86		
0.252 2	0.385 9	0.36	0.742	98.93		
0.250 1	0.382 7	0.36	0.737	98.43	97.79	1.3
0.251 6	0.384 9	0.36	0.732	96.40		
0.250 8	0.383 7	0.36	0.729	95.91		
0.251 3	0.384 5	0.36	0.731	98.19		

表 5 蚊子草中槲皮苷与山柰酚质量分数 %		
样品来源	槲皮苷	山柰酚
样品 1(吉林抚松)	0.124	0.153
样品 2(吉林桦甸)	0.0976	0.148
样品 3(吉林永吉)	0.148	0.142
样品 4(内蒙古通辽)	0.118	0.151
样品 5(内蒙古霍林郭勒)	0.114	0.155
样品 6(内蒙古扎鲁特旗)	0.126	0.137
样品 7(山西黄龙)	0.130	0.124
样品 8(山西宜川)	0.0923	0.136
样品 9(河北隆化)	0.117	0.136
样品 10(河北滦平)	0.126	0.123

且保留时间适中,最终确定为甲醇-0.2% 磷酸梯度洗脱。

对蚊子草样品进行紫外全波长扫描,在 254 nm,365 nm 附近有较高吸收,同时测定表明槲皮苷与山柰酚在 254,365 nm 也有 2 个较强吸收。而实验结果表明采用 365 nm 测定时,样品色谱图有干扰,最终确定检测波长为 254 nm。

在蚊子草供试品提取条件的确定过程中,曾比较了回流提取法、超声提取法及微波加热提取法 3 种提取方法,并比较了甲醇、乙醇、乙酸乙酯及丙酮 4 种提取溶剂,结果表明,采用超声提取法以甲醇做为提取溶剂所制得供试品,杂质含量少且待测成分含量高,故确定以甲醇为提取溶剂采用超声提取法

进行样品的提取;进一步试验比较了溶剂用量(10, 25, 50 mL)及超声时间(20, 30, 40 min)。最终确定溶剂用量为25 mL,超声时间为30 min。

[参考文献]

- [1] 《长白山植物药志》编写组. 长白山植物药志[M]. 吉林: 吉林人民出版社, 1982: 406.
- [2] 邹浩军, 明亮. 黄酮类化合物抗炎免疫及抗衰老药理研究进展[J]. 安徽卫生职业技术学院学报, 2003, 2(6): 48.

- [3] 郝艳玲. HPLC法测定蒺藜中总黄酮的含量[J]. 实用药物与临床, 2006, 9(5): 276.
- [4] 陈学松, 张涛. 侧柏叶不同炮制品中槲皮苷含量的比较[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(10): 847.
- [5] 王祥培, 吴红梅, 万德光, 等. 砂仁不同部位及近缘种中槲皮苷含量的比较[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(9): 2215.
- [6] 中国药典. 一部[S]. 2005.

[责任编辑 丁广治]

《中国中药杂志》现状简介

国际检索和收录: SCI-E 总被引频次达到 443(285 篇文献);被美国《医学索引》(Medline/PubMed)收录,在被 Medline 收录的中国期刊中排名第 4 位,居我国药学和中医药学期刊首位;被美国《化学文摘(网络版)》(CA, Chemical Abstracts Web)在千刊表中排名第 232 位。同时,还被荷兰爱思唯尔公司《斯高帕斯数据库》(Scopus)美国《生物学文摘(预评)》(BAP, BIOSIS Previews),俄罗斯《文摘杂志》(AJ, Abstracts Journal, VINITI)英国《国际农业与生物科学研究文摘》(CABI, Centre for Agriculture and Bioscience Abstracts),美国《国际药文学文摘》(IPA, International Pharmaceutical Abstracts),美国《乌利希期刊指南》(Ulrich PD, Ulrich's Periodicals Directory),《日本科学技术振兴机构中国文献数据库》[JSTChina, Japan Science & Technology Agency(Chinese Bibliographic Database)],《英国皇家化学学会系列文摘》(RSC, Royal Society of Chemistry)英国《全球健康》(GH, Global Health),荷兰《医学文摘》(EM, Excerpta Medica),菲律宾《西太平洋地区医学索引》(WPRIM, Western Pacific Region Index Medicus)等 14 家权威性专业文摘或数据库收录。

国内收录: 为“中国科学引文数据库”、“中国学术期刊综合评价数据库”来源期刊,中国自然科学核心期刊,中国中文核心期刊,中国科技核心期刊,并被《中国学术期刊文摘》中、英文版收录。

据中国知网(CNKI)“中国科技期刊影响因子年报”公布《中国中药杂志》目前总被引频次达到 1 7036,影响因子 1.421,基金论文比例 0.72,下载量达到 39.69 万次,国内外发行达到机构用户 3 192 个,分布在 15 个国家和地区,个人读者分布在 23 个国家和地区。

据中国科学技术信息研究所最新发布的《中国科技期刊引证报告》(核心版)期刊检索统计结果表明:《中国中药杂志》总被引频次为 5 544,影响因子 0.707,基金论文比 0.68,全年发表文章达 800 余篇。期刊综合总排名从 2010 年的第 52 位跃居第 39 位,在药理学类以及中医药学类期刊中位居第一,全部指标保持多年持续上升,在我国药理学以及中医药学等学科领域科技期刊中均名列前茅。