

HPLC 测定夏枯草中的芦丁和槲皮素

贾晓斌^{1,2}, 刘光敏^{1,2}, 封亮², 陈彦², 贾东升², 施峰²

(1. 江苏大学, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏省中医药研究院中药新型给药系统重点实验室, 国家中医药管理局中药口服制剂释药系统重点研究室, 江苏 南京 210028)

摘要: 目的 采用 HPLC 法测定夏枯草中芦丁和槲皮素的含量。方法 色谱柱为 Alltima C₁₈ (250 mm × 4.6 mm 5 μm), 流动相为甲醇 - 0.1% 冰醋酸, 检测波长 350 nm, 流速 1.0 mL • min⁻¹, 柱温 30 ℃。结果 芦丁、槲皮素的线性范围分别为 0.0149 ~ 0.2380 mg • mL⁻¹ (r = 0.9999), 0.0019 ~ 0.0306 mg • mL⁻¹ (r = 0.9998), 平均回收率分别为 97.78% (RSD = 0.83%)、101.18% (RSD = 0.83%)。安徽、湖北、贵州、江西、广西五产地中芦丁含量分别为 0.3527、0.2337、2.1164、0.9578 mg • g⁻¹ 生药, 槲皮素含量分别为 0.0872、0.0473、0.0721、0.5219、0.1755 mg • g⁻¹ 生药。结论 所建方法操作简便、准确, 可作为夏枯草中芦丁和槲皮素的含量测定方法。

关键词: 夏枯草; 芦丁; 槲皮素; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1006 - 0103(2010)01 - 0070 - 02

Determination of rutin and quercetin in *Prunella vulgaris* by HPLC

JIA Xiao - bin^{1,2}, LIU Guang - min^{1,2}, FENG Liang², CHEN Yan², JIA Dong - sheng², SHI Feng²

(1. Jiangsu University Zhenjiang, Jiangsu 212013 P. R. China; 2. The Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine Nanjing, Jiangsu, 210028 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To establish an HPLC method for determination of rutin and quercetin in *Prunella vulgaris*. **METHODS** The samples were separated on the Alltima C₁₈ (4.6 mm × 250 mm 5 μm) column which was eluted with methanol and water (0.1 % acetic acid) with detective wavelength at 350 nm and flow rate at 1.0 mL • min⁻¹, column temperature at 30 ℃. **RESULTS** The results indicated that the two compounds were basically isolated. The linear ranges of rutin and quercetin were 0.0149 - 0.2380 mg • mL⁻¹ (r = 0.9999), 0.0019 - 0.0306 mg • mL⁻¹ (r = 0.9998) respectively. The average recoveries were 97.78% (RSD = 0.83%), 101.18% (RSD = 0.83%) respectively. The contents of rutin in *Prunella vulgaris* from Anhui, Hubei, Guizhou, Jiangxi, Guangxi were 0.3527, 0.2337, 2.1164, 0.9578 mg • g⁻¹ crude drug respectively, and the contents of quercetin were 0.0872, 0.0473, 0.0721, 0.5219, 0.1755 mg • g⁻¹ crude drug respectively. **CONCLUSION** The method is sensitive, accurate, and can be used to control the quality of *Prunella vulgaris*. ; Determination.

Key words: *Prunella vulgaris*; Rutin; Quercetin; HPLC; Determination

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006 - 0103(2010)01 - 0070 - 02

夏枯草为唇形科植物, 具有清火明目、散结消肿的功效, 临床上常用于治疗目赤肿痛、甲状腺肿大、淋巴结结核、乳腺增生、肿瘤等症^[1-2]。黄酮类化合物为夏枯草中的主要成分^[1], 其测定方法主要为分光光度法^[3-5], 未见文献报道使用 HPLC 测定其黄酮成分。现采用 HPLC 法同时测定夏枯草中芦丁、槲皮素的含量, 为更好地控制其质量提供依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1200 型高效液相色谱系统(美国 Agilent)。芦丁、槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所); 夏枯草药材经南京中医药大学吴德康教授鉴定; 甲醇、

冰醋酸为色谱醇; 水为乐百氏纯净水; 其余试剂为分析纯。

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 Alltima C₁₈ (250 mm × 4.6 mm 5 μm), 流速 1.0 mL • min⁻¹, 检测波长 350 nm, 柱温 30 ℃, 进样量 20 μL。流动相为甲醇(A) - 0.1% 冰醋酸梯度洗脱(25% ~ 40% A 0 ~ 10 min、40% ~ 60% A 10 ~ 60 min), 分析时间 60 min。色谱图见图 1。在此条件下, 芦丁和槲皮素的 t_R 分别为 23.89、40.99 min。

1.2.2 溶液的制备 精密称取干燥至恒重的芦丁、槲皮素对照品适量, 加 60% 乙醇溶解, 分别制成 0.2380、0.0306 mg • mL⁻¹ 的对照品溶液。称取夏枯

基金项目: 江苏省中医药领军人才项目(2006); 江苏省自然科学基金(BK2006155)

作者简介: 贾晓斌, 男, 博士, 研究员, 从事中药制剂研究与开发工作。Email: jxiaobin2005@hotmail.com

草 0.5 g,依次用 10 倍量 95% 乙醇、60% 乙醇提取 (2 h×2),获得 95% 醇提溶液、60% 醇提溶液。取 60% 醇提溶液于 60 ℃ 旋转蒸发回收乙醇 浓缩液于水浴中挥干 ,加 10 mL 60% 乙醇溶解 ,超声 30 min ,即得供试品溶液。

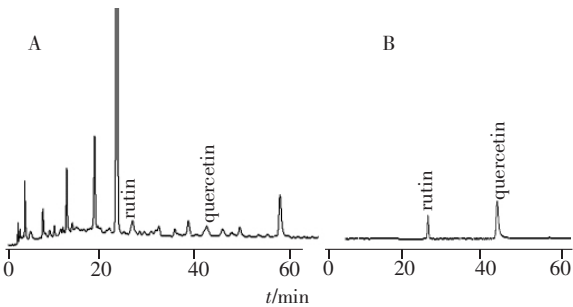


图 1 样品 (A) 及混合对照品 (B) 溶液的色谱图
Fig 1 Chromatograms of sample solution(A) and control solution (B)

1.2.3 线性关系考察 各取适量芦丁及槲皮素对照液 ,逐级稀释制成 0.2380、0.1190、0.0595、0.0298、0.0149 mg·mL⁻¹ 的芦丁对照品溶液和 0.0306、0.0153、0.0077、0.0038、0.0019 mg·mL⁻¹ 的槲皮素对照品溶液 ,各取 1 mL 制备成混合溶液 ,进样 20 μL 按“1.2.1”项色谱条件测定峰面积。以峰面积为纵坐标、以进样浓度 (mg·mL⁻¹) 为横坐标进行线性回归 ,回归方程分别为: $Y_{\text{芦丁}} = 4.690 \times 10^3 X + 1.63$ ($r = 0.9999$) , $Y_{\text{槲皮}} = 2.435 \times 10^4 X + 0.53$ ($r = 0.9998$) ; 线性范围分别为 0.0149 ~ 0.2380、0.0019 ~ 0.0306 mg·mL⁻¹。

1.2.4 精密度试验 取同一供试溶液 ,连续进样 6 次 ,记录峰面积 ,计算芦丁、槲皮素峰面积的 RSD ,RSD 分别为 1.15%、1.13% ($n = 6$) 。表明仪器精密度良好。

1.2.5 重复性试验 精密称定同一批样品 ,按“1.2.2”项下方法分别制备 6 份供试品溶液 ,按“1.2.1”项下色谱条件进行测定 ,记录峰面积 ,分别按回归方程计算芦丁、槲皮素的含量。其 RSD 值分别为 1.60%、1.73% ($n = 6$) ,表明此方法重复性良好。

1.2.6 稳定性试验 取同一夏枯草供试溶液 ,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定 ,考察其稳定性。记录峰面积 ,计算芦丁和槲皮素峰面积的 RSD 分别为 1.13%、0.61% 。表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

1.2.7 加样回收率 称取已知含量的样品 6 份 ,每份约 0.5 g ,准确计算样品中芦丁和槲皮素的含量 ,

分别加入适量芦丁和槲皮素对照品溶液 ,按“1.2.2”项下方法制备供试品溶液 ,进样。结果见表 1。

表 1 芦丁和槲皮素加样回收率的试验结果 (mg $n = 6$)

Table 1 Recovery test of rutin and quercetin (mg $n = 6$)						
成份	样品含量	加入量	测得量	回收率 / %	$\bar{X}$ / %	RSD / %
芦丁	0.1764	0.1785	0.3499	97.20	97.78	0.83
	0.1763	0.1785	0.3494	97.01		
	0.1765	0.1785	0.3511	97.84		
	0.1763	0.1785	0.3536	99.30		
	0.1762	0.1785	0.3504	97.60		
	0.1764	0.1785	0.3509	97.74		
	0.1764	0.1785	0.3509	97.74		
槲皮素	0.0436	0.0428	0.0862	99.46	101.18	2.29
	0.0436	0.0428	0.0883	104.25		
	0.0437	0.0428	0.0862	99.20		
	0.0436	0.0428	0.0859	98.74		
	0.0436	0.0428	0.0875	102.55		
	0.0436	0.0428	0.0877	102.85		
	0.0436	0.0428	0.0877	102.85		

1.2.8 样品的测定 取不同产地夏枯草属药材 ,按“1.2.2”项下方法 ,制得各产地夏枯草供试品溶液 ,按“1.2.1”项下色谱条件测定其中芦丁、槲皮素的含量。结果:安徽亳州、湖北随州、贵州贵阳、江西樟树、广西南宁产夏枯草中芦丁和槲皮素的含量分别为 0.3527、0.0.2337、2.1164、0.9578 mg·g⁻¹ 生药和 0.0872、0.0473、0.0721、0.5219、0.1755 mg·g⁻¹ 生药 ,表明不同产地夏枯草药材中两成份的差异较大。

2 讨论

曾考察乙腈 - 0.5% 冰醋酸、甲醇 - 0.5% 冰醋酸、乙腈 - 0.1% 磷酸、甲醇 - 0.1% 冰醋酸等不同流动相。通过比较发现:以甲醇 - 0.1% 冰醋酸的色谱峰峰形较好 ,故选择甲醇 - 0.1% 冰醋酸为流动相梯度洗脱。分别考察了 230、254、280、330、350 nm 处的色谱分离情况。经综合考虑各峰峰高及峰面积比例 ,选择 350 nm 为检测波长。

参考文献:

[1] 封亮,贾晓斌,陈彦,等. 夏枯草化学成分及抗肿瘤机制研究进展[J]. 中华中医药杂志 2008 23(5): 428-434.
[2] 贾晓斌,封亮,陈彦,等. 夏枯草肺癌化学预防物质基础研究思路与方法[J]. 中草药 2009 40(2): 316-318.
[3] 李跃辉,张水寒,唐莉,等. 夏枯草药材质量标准研究[J]. 中华中医药杂志 2006 21(6): 374-375.
[4] 赵福全. 紫外/可见分光光度法测定夏枯草中黄酮的总含量[J]. 齐齐哈尔大学学报 2007 23(3): 7-9.
[5] 王本富,彭燕,李冬,等. HPLC 测定白花蛇舌草注射中芦丁的含量[J]. 华西药理学杂志 2009 24(5): 532-533.

收稿日期:2009-03-22