

RP-HPLC 同时测定溪黄草药材中 芦丁和槲皮素的含量^①

向海艳 谢扬^②

(南方医科大学药学院 广州市沙太南路 1023 号 510515)

摘要 采用 Kromasil C₁₈ 柱(250mm × 4.6mm, 5 μ m), 流动相为甲醇-0.2% 磷酸水溶液(45:55, V/V), 流速 1.0mL/min, 检测波长 350nm, 柱温 25 $^{\circ}$ C。结果表明: 芦丁和槲皮素进样浓度分别在 7.5—240.0 μ g/mL($r=0.9998$)和 5.0—160.0 μ g/mL($r=0.9995$) 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 平均加样回收率($n=3$) 分别为 98.78% 和 102.05%。该分析方法快速、准确, 重现性好, 可用于控制溪黄草的质量。

关键词 溪黄草; 反相-高效液相色谱法; 芦丁; 槲皮素

中图分类号: O657.7⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2011)03-1170-04

1 引言

溪黄草[*Rabdosia lophanthoides*(Buch.-Ham.ex D. Don) Hara.] 为唇形科植物线纹香茶菜的干燥全草, 具有清热利湿、退黄、凉血散淤之功效, 是我国南方地区治疗乙型肝炎的常用草药^[1], 主要含萜类、黄酮类、酚类、氨基酸等多种化学成分, 其中萜类和黄酮类是其药理作用的基础。目前有关溪黄草萜类成分如熊果酸、2 α -羟基熊果酸的含量测定已有文献报道^[2-6]。但对其黄酮类化学成分研究报道较少, 文献[7]研究了溪黄草黄酮类化合物的提取及其活性, 文献[8]报道溪黄草药材中含有芦丁、槲皮素等黄酮类成分, 由于黄酮类物质具有广泛的生理和药理活性, 包括抗病毒、抗癌、抗氧化、抗炎、抗衰老等^[9], 因此, 为了更好的控制溪黄草质量, 保证溪黄草药用疗效, 本论文采用 HPLC 同时测定溪黄草中黄酮类化合物芦丁及槲皮素的含量, 方法简便, 准确, 重复性好, 从而为溪黄草及其提取物的质量评价提供依据。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(包括四元泵、自动进样器、DAD 二极管阵列检测器, 美国安捷伦公司); AB135-S 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

对照品芦丁(批号: 100080-200306, 纯度 98%)、槲皮素(批号: 100081-200406, 纯度 97.3%, 中国药品生物制品检定所); 溪黄草药材(广东省药材公司)。甲醇为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。实验用水为去离子水。

① 广东省教育部产学研合作项目(2009B090300216)

② 联系人, 电话: (020) 62789419; E-mail: xhy330@126.com

作者简介: 向海艳(1974—), 女(土家族), 湖南省龙山县人, 讲师, 博士, 主要从事天然药物提取分离研究工作。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液的制备

2.2.1.1 供试品溶液

取本品粉末约 1g, 准确称定, 置于 50mL 圆底烧瓶中, 加入 70% 乙醇 20mL, 于水浴中加热回流提取 2h, 取出, 冷却, 过滤, 滤渣再同法提取 1 次, 合并两次滤液, 经减压浓缩至干, 用甲醇溶解, 定容至 10mL, 用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.1.2 混合对照品溶液

准确称取对照品芦丁 7.50mg 和槲皮素 5.00mg, 于小烧杯中先用甲醇溶解, 然后分别置于 5mL 棕色容量瓶中, 并用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得芦丁对照品储备液和槲皮素对照品储备液。分别准确移取芦丁对照品储备液和槲皮素对照品储备液各 2mL, 置于 10mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 得混合对照品溶液(芦丁:0.30mg/mL, 槲皮素:0.20mg/mL)。

2.2.2 色谱条件

色谱柱: Kromasil C₁₈ 柱 (250mm \times 4.6mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-0.2% 磷酸水溶液 (45:55, V/V); 流速: 1.0mL/min; 检测波长: 350nm; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L。在上述色谱条件下取供试品溶液进样分析, 理论塔板数按芦丁计算不低于 6400, 芦丁和槲皮素色谱峰与相邻色谱峰的分离度大于 1.5。色谱图见图 1。

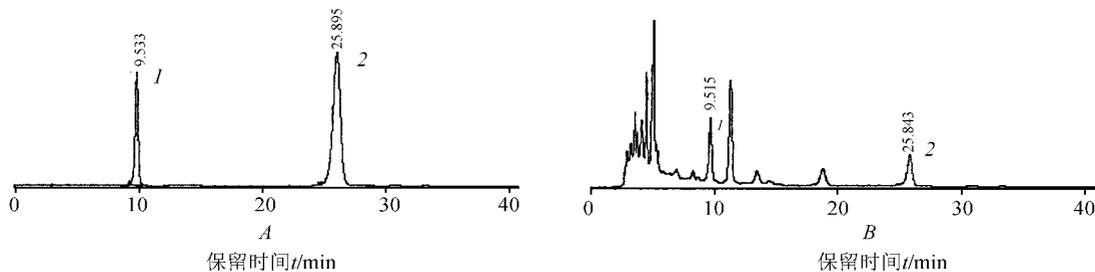


图 1 对照品(A)和样品(B) HPLC 图

1——芦丁; 2——槲皮素。

3 结果与讨论

3.1 方法学考察

3.1.1 线性范围的考察

分别准确移取上述混和对照品溶液 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0mL 置于 10mL 容量瓶中, 加入甲醇定容, 摇匀, 分别取 10 μ L 进样, 在上述色谱条件下进行分析。以对照品浓度 x (μ g/mL) 为横坐标, 峰面积 y 为纵坐标, 绘制校准曲线并进行回归计算, 芦丁和槲皮素回归方程分别为: $y = 4.167 + 15.86x$, $r = 0.9995$ ($n = 6$), $y = 6.227 + 31.68x$, $r = 0.9998$ ($n = 6$), 结果表明: 芦丁和槲皮素浓度分别在 7.5—240.0 μ g/mL 和 5.0—160.0 μ g/mL 范围内线性关系良好。

3.1.2 精密度实验

取混合对照品溶液(芦丁:29.4 μ g/mL; 槲皮素:20.3 μ g/mL), 在上述色谱条件下连续进样 6 次, 测定芦丁和槲皮素峰面积的 RSD 分别为 1.5% 和 1.1%。

3.1.3 重复性试验

准确称取同一样品粉末, 依 2.2.1.1 项下的方法操作, 平行制备 6 份溶液, 在上述色谱条件下

测定。计算芦丁和槲皮素的平均含量分别为 0.600mg/g 和 0.05mg/g, RSD 分别为 2.6% 和 2.8%。

3.1.4 稳定性实验

取供试品溶液, 分别放置 0, 0.5, 1, 2, 3, 4h 后, 在上述色谱条件下进样测定。计算芦丁和槲皮素峰面积的 RSD 分别为 0.9% 和 1.5%。结果表明供试品溶液在 12h 内稳定性良好。

3.1.5 加标回收率实验

准确称取已知含量的溪黄草药材样品 3 份, 每份 1g, 分别准确加入对照品溶液适量, 按“2.2.1.1”项下方法制备供试溶液, 测定含量并计算回收率, 结果见表 1。

表 1 样品回收率 (n=3)

成分	基值 (μg)	加入量 (μg)	实测值 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
芦丁	600	294	883	96.26	97.62	1.59
		588	1172	97.28		
		872	1466	99.31		
槲皮素	50	40.6	92.3	104.19	101.28	2.75
		60.9	111.5	100.99		
		81.2	130.1	98.65		

3.2 样品测定

取样品粉末, 按“2.2.1.1”项下的方法操作, 制备供试品溶液。在上述色谱条件下进样测定, 采用校准曲线法计算样品中芦丁和槲皮素的含量, 结果溪黄草药材中芦丁和槲皮素的含量分别为 0.60、0.05mg/g。

4 结论

有关 HPLC 同时测定芦丁和槲皮素的文献有见报道, 多采用梯度洗脱的方法, 本实验选用甲醇-水为流动相, 加入一定量的磷酸抑制酸解离, 改善峰形, 等度洗脱分析溪黄草药材中芦丁和槲皮素的含量, 方法简单、快速。溪黄草虽在南方使用广泛, 但《中国药典》历版均未收载, 《广东中药材标准》2004 年版收载有溪黄草, 尚未见以其化学成分量为指标的质量控制, 且目前文献多报道其三萜类成分熊果酸、2 α -OH 熊果酸的含量测定, 而黄酮类化合物重要的药理活性提示其在药物质量控制中的重要意义, 本实验建立了高效液相色谱法同时测定其黄酮类化合物芦丁与槲皮素含量分析方法, 方法简便、快速、准确, 重复性好, 可为溪黄草药材及其提取物的质量控制提供一定的科学依据。

参考文献

- [1] 吴剑峰. 溪黄草的研究综述[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(8): 498—500.
- [2] 吴剑峰, 刘斌, 祝晨 等. 不同采收期溪黄草中 2 α -羟基熊果酸含量的动态研究[J]. 中草药, 2004, 35(1): 81—83.
- [3] 吴剑峰, 刘斌, 祝晨 等. 不同施肥区域溪黄草中 2 α -羟基熊果酸含量的比较[J]. 药学进展, 2004, 28(7): 318—321.
- [4] 林朝展, 祝晨, 杨金燕. 反相高效液相色谱法测定溪黄草中二萜类成分的含量[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(7): 1549—1551.
- [5] 吴剑峰, 刘斌, 祝晨 等. 不同种植基地的溪黄草茎、叶及全草 2 α -羟基熊果酸的含量测定[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(7): 500—501.
- [6] 李楚源, 邓乔华, 黄琳等. 溪黄草中熊果酸含量测定方法学研究[J]. 中外医疗, 2009, 28: 155—156.
- [7] 段志芳, 梁盛年, 谭细雪. 溪黄草黄酮的超声波法提取与活性研究[J]. 应用化工, 2007, 36(3): 232—235.
- [8] 赵洁. 溪黄草黄酮类成分的 HPLC-MS-MS 分析[J]. 中药材, 2009, 32(1): 70—72.
- [9] 张国辉, 马辰. 黄酮类化合物药动力学研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(5): 582—585.

Simultaneous Determination of Rutin and Quercetin in *Rabdosia Lophanthoides*(Buch. -Ham. ex D. Don) Hara by RP-HPLC

XIANG Hai-Yan XIE Yang

(College of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, P. R. China)

Abstract The amounts of rutin and quercetin were detected by HPLC on Kromasil C₁₈ column (250mm × 4.6mm, 5 μm) with methanol-0.2% phosphoric acid(45 : 55, V/V) as the mobile phase at flow rate of 1.0mL/min, detection wavelength of 350nm, and column temperature of 25 °C. The linear ranges were 7.5—240.0 μg/mL ($r = 0.9998$) for rutin and 5.0—160.0 μg/mL ($r = 0.9995$) for quercetin. The average recoveries ($n = 3$) for rutin and quercetin were 98.78% and 102.05%, respectively. The method is rapid, accurate with good repeatability, and can be applied to control the quality of *Rabdosia lophanthoides*(Buch. -Ham. ex D. Don) Hara.

Key words *Rabdosia lophanthoides*(Buch. -Ham. ex D. Don) Hara; RP-HPLC; Rutin; Quercetin

穷酸的西南联大与 3 位诺贝尔奖得主 ——真正意义上的世界一流大学

西南联大的历史,前后不过 8 年半(1937 年 9 月至 1946 年 5 月)。当年的物质条件可够穷酸的:学生宿舍无一砖一瓦,全是夯黄土为墙,堆茅草为顶,窗户没有一块玻璃,仅有几根树枝聊以象征。绝大多数师生经常是食不果腹,衣不蔽体,不时还要在敌机轰炸下逃生。在校学生不超过 2000。可是当年的西南联大,在三不管的地方,坚守大学理想,主张“教授是大学的灵魂”,实行“不妄用一钱,不妄用一人”,教师为爱国而教,学生为救国而学,吃红薯干,点桐油灯,以苦为乐,励精图治,弦歌不辍,为人师表,一身正气,人格独立,不党不官,沉潜专注,甘于寂寞。一言以蔽之,“五·四”运动所倡导的“科学和民主”精神之传承与发扬光大也!因此,培养出 3 位诺贝尔奖得主——杨振宁和李政道,另一位则是朱棣文(其父朱汝瑾是联大助教,其姑朱汝华是教授——曾昭抡的得意门生)。

拥有国家一流的教授阵容;运行一套“思想自由,兼容并包”和纯粹研究学问的办学理念;推行一种通才教育的培养目标;有一位深受众望的校长——这些因素奠定了西南联大堪称世界一流大学的基础。

西南联大身后的三校(北大、清华和南开),当今在校学生总数当在 60000—70000 之间,相当于当年的 30 多倍,三校校园内高楼大厦林立,与当年西南联大的茅屋草舍相比,真是天壤之别。所耗费的资金当在西南联大的数百倍以上。三校的年寿,从 1950 年算起,已有 59 年,若从改革开放算起,亦有 30 年,为当年西南联大寿命的 4 倍至 5 倍。以人力、财力和时间来看,都是当年西南联大无法望其项背的。以如此优越的条件和实力,却培养不出世界一流杰出的人才——60 年来无 1 人获得诺贝尔奖,其故安在!?

清华大学 1 位教授在美国访问时发现,世界一流的哈佛大学大门,却是十分古旧俭朴的:拱型的门洞是用红砖砌的,中间是铁制的大门,门框上面是三角形的尖顶。两边的围墙也是红砖砌的,中间是陈旧的铁制护栏。但是而今中国学校的大门,甭说大学,就是一些重点中学的校门,也比哈佛大学的壮观。在一些国人看来,似乎要成为世界一流大学、一流中学就在于校门以及办公大楼的气派和壮观!?

我国是世界最大的发展中国家(最大的穷国),美国是世界最大的发达国家(最大的富国)。这位清华大学教授还看到在这世界最大的富国中,名牌大学的办公大楼和办公家具仍是俭朴的:楼房大多是 3 层的,上个世纪的转盘电话和用过多年的木制家具还在使用。而在我们这个世界最大的穷国中的某些名牌大学,转盘电话和古朴的木制家具早已(淘汰)不见踪影!仿佛这些“过时”的东西,与名牌大学的“身份”太不相称了吧!。

清华大学前校长梅贻琦说过:“大学者,非谓有大楼之谓也,有大师之谓也”。靠浮华的“形象工程”能建成世界一流名牌大学吗?

早在两千多年前,古希腊哲学大师亚里士多德就说过,产生杰出的思想家和杰出发明家需要三个条件:一是对学问有真正的兴趣,二是有充分的思想自由,三是有充足的闲暇时间。

北京大学前校长蔡元培说过,“大学并不是贩卖毕业证的机关,也不是灌输固定知识的机关,而是研究学理的机关。所以,大学的学生并不是熬资格,也不是硬记教员讲义,是在教员指导之下自动地研究学问的。”“尤当养成学问家之人格”。“所以延聘教员,不但是求有学问的,还要求于学问上很有研究的兴趣,并能引起学生的研究兴趣的。”

这些学术大师是许多人、甚至包括一些大人物推崇备至的,但其上述办学理念在实际中却常弃之如敝屣,也许正是我们办大学需要深刻反思的。(2011-05-06)

(本刊摘编自《随笔》杂志 2008 年第 2 期何兆武《关于诺贝尔奖情节》等文)