

HPLC测定杠板归中槲皮素的含量^{*}

陈华国^{1, 2}, 周欣^{1, 2*}, 赵超^{1, 2}, 龚小见^{1, 2}, 秦傲^{1, 2}

(1. 贵州师范大学 天然药物质量控制研究中心, 贵阳 550001

2 贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵阳 550001)

摘要 目的: 建立反相高效液相色谱法测定杠板归中槲皮素的含量。方法: 采用 Hypersil ODS(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)柱, 乙腈-0.02% 磷酸(35:65)为流动相, 流速为 1 mL·min⁻¹, 检测波长 370 nm, 柱温 25℃。结果: 槲皮素浓度在 0.1026~1.026 μg之间线性关系良好, $r=1.00$ 平均回收率为 97.02% ($n=9$)。结论: 本方法分离效果好, 简便准确, 可用于杠板归中槲皮素的含量测定, 以控制杠板归药材质量。

关键词: 杠板归; 槲皮素; HPLC; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)10-1749-03

RP-HPLC determination of quercetin in *Polygonum perfoliatum* L.^{*}

CHEN Hua-guo^{1, 2}, ZHOU Xin^{1, 2*}, ZHAO Chao^{1, 2}, GONG Xiao-jian^{1, 2}, QIN Ao^{1, 2}

(1. The Research Center for Quality Control of Natural Medicine, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China

2 Key Laboratory for Information System of Mountainous Areas and Protection of Ecological Environment

Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

Abstract Objective To determine the content of quercetin in *Polygonum perfoliatum* L. **Methods** An RP-HPLC method was established. The chromatographic column was Hypersil ODS(4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-0.02phosphoric acid(35:65). The flow rate was 1 mL·min⁻¹, the detection wavelength was at 370 nm, and the column temperature was 25℃. **Results** The average recovery of quercetin ($n=9$) was 97.02%. **Conclusion** The method is effective, simple and accurate, and can be used to determine the content of quercetin in *Polygonum perfoliatum* L.

Key words *Polygonum perfoliatum* L.; quercetin; HPLC; assay

杠板归为蓼科植物杠板归 *Polygonum perfoliatum* L. 的地上部分, 主产于贵州、江苏、浙江、福建、江西、广东、广西、四川、湖南。中医认为有利水消肿、清热解毒、止咳之功效, 主治肾炎水肿、百日咳、泻痢、湿疹、疖肿、毒蛇咬伤^[1]等症。该植物临床应用广泛, 尤其在治疗妇科炎症疾病方面具有独到疗效, 目前市场上已有以该植物入药的中成药制剂上市, 如: 康妇灵胶囊、玫芦消痤膏、妇平胶囊、妇炎消胶囊等。其化学成分研究及质量控制方法文献报道很少, 仅用咖啡酸为对照进行了薄层色谱鉴别研究^[2]; 杠板归的化学成分研究报道很少, 活性成分不明确, 为此, 我们对杠板归的化学成分进行了系统

的研究, 研究结果表明: 黄酮类化合物是其主要化学成分。黄酮类化合物具有抗氧化、清除氧自由基作用; 调节心血管系统作用; 抗炎免疫及抗衰老等作用^[3]。为了更有效地控制药材质量, 根据所含的主要成分之一槲皮素的特点, 采用高效液相色谱法进行了含量测定方法研究。

1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (四元泵, DAD 检测器, 自动进样器), 十万分之一天平 (梅特勒 托利多); 色谱乙腈 (天津市科密欧化学试剂开发中心); 水 (重蒸水, 临用前制备); 盐酸、磷酸等 (分析纯); 槲皮素对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号:

* 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目 (黔科合农字 [2006]5007号); 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目 (黔科合中药专字 [2007]5023号); 贵阳市科学技术计划项目 ([2007]筑科合同字第 5-2号); 贵州省中医药、民族医药科学技术研究项目 (黔中医药发 [2008]42号)

** 通讯作者 Tel: (0851) 6690018; E-mail: alic9800@sina.com

110263- 200201); 杠板归药材产地分别为贵州花溪、牛郎关大兴田、贵州沿河、贵州贞丰、河南省光山县文殊乡、湖南辰溪等地, 共收集了 20 批样品, 经贵阳中医学院何顺志研究员鉴定为 *Polygonum perfoliatum* L.。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil ODS(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱, 乙腈 - 0.02% 磷酸 (35: 65) 为流动相, 流速为 1 mL · min⁻¹, 检测波长 370 nm, 柱温 25 °C。在以上色谱条件下槲皮素与其他组分分离度良好, 见图 1。

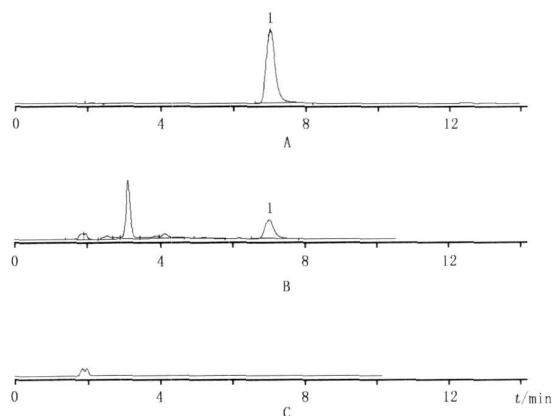


图 1 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

A. 对照品 (reference substance) B 样品 (samples) C. 空白 (blank)

1 槲皮素 (quercetin)

2.2 对照品溶液的制备 精密称取槲皮素对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备 取本品中粉 1 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 0.1% 盐酸甲醇溶液 25 mL, 称定重量, 加热回流提取 4 h 放冷, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 即得。

2.4 线性关系考察 精密称取经五氧化二磷干燥至恒重的槲皮素对照品 10.26 mg 置 100 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 含槲皮素 0.1026 mg 的对照品溶液。分别精密吸取该对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积, 并以对照品的进样量 X (μg) 为横坐标, 峰面积积分值 Y 为纵坐标, 进行线性回归, 得槲皮素的回归方程为:

$$Y = 5567.69X + 75.73 \quad r = 1.00$$

结果表明, 槲皮素在 0.1026~ 1.026 μg 范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取上述槲皮素对照品溶液 5 μL, 按上述色谱条件, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算 RSD 为 0.05%, 说明该方法具有良好的精密度。

2.6 稳定性试验 取同一批号样品 (贵州黔西县), 按供试品溶液的制备方法操作, 分别于 0, 2, 4, 8, 12 h 精密吸取适量进样, 测得槲皮素峰面积的 RSD 为 1.2%。结果表明, 供试品溶液至少在 12 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一批号样品 (贵州黔西县) 6 份, 分别制备供试液, 测得槲皮素平均含量为 0.264%, RSD 为 1.0%。结果表明, 该试验重复性良好。

2.8 回收率试验 采用加样回收法, 取已知含量的样品 (贵州黔西县) 0.5 g (理论含量 1.3 mg), 精密称定, 分别精密加入一定量的槲皮素, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按上述测定方法进行测定, 计算回收率, 结果见表 1。平均回收率 ($n = 9$) 为 97.02%。

表 1 槲皮素回收率试验结果表 ($n = 3$)

Tab 1 Recovery test of quercetin

序号 (No)	加入量 (added) /mg	实测值 (found) /mg	回收率 (recovery) /%	平均回收率 (average recovery) /%	RSD /%
1	1.00	2.28	96.00	96.33	0.6
2	1.00	2.27	97.00		
3	1.00	2.29	96.00		
4	1.30	2.59	96.92	97.43	1.6
5	1.30	2.61	99.23		
6	1.30	2.58	96.15		
7	1.60	2.9	98.12	97.29	0.7
8	1.60	2.86	96.88		
9	1.60	2.89	96.87		

2.9 样品测定 取 20 批药材样品, 按照上述含量测定方法测定, 结果花溪高坡、贵遵路 63 km (背阴)、贵遵路 63 km (向阳)、牛郎关大兴田、贵州沿河、贵遵路 64 km 桥下、新添寨奶牛场、贵州贞丰、贵阳不布关土坡、贵遵路 64 km 桥上、河南省光山县文殊乡、久长、龙里谷脚、水城陡箐、黔南民族师范学院校园内、铜仁、江口、德旺、息峰县柿花坪、贵州黔西县、黔南民族师范学院后山、湖南辰溪等地杠板归中槲皮素的含量 ($n = 2$) 分别为 0.198%, 0.201%, 0.174%, 0.211%, 0.232%, 0.258%, 0.188%, 0.196%, 0.174%, 0.223%, 0.158%, 0.224%, 0.171%, 0.183%, 0.191%, 0.181%, 0.223%。

0.264%, 0.203%, 0.148%。

3 讨论

3.1 杠板归中含有多种化学成分,如黄酮类、生物碱类、木脂素类、内酯类、多糖类等多种活性成分,成分较为复杂。以流动相(1)乙腈-0.02磷酸溶液(30:70);(2)乙腈-0.02磷酸溶液(35:65);(3)乙腈-0.02磷酸溶液(40:60);(4)甲醇-0.02磷酸溶液(30:70);(5)甲醇-0.02磷酸溶液(35:65);(6)甲醇-0.02磷酸溶液(40:60)分析,在流动相(1)、(4)条件下分离效果不好。在流动相(2)、(3)、(5)、(6)条件下杠板归中槲皮素与其他组分有较好的分离,结果较好,但流动相(5)、(6)条件下槲皮素的出峰时间较晚,约25 min,故综合考虑,选择流动相(2)。

3.2 根据文献及用SPD-M10A二极管阵列检测器从190~400 nm进行光谱扫描,槲皮素对照品在370 nm处有最大吸收,故选择370 nm为检测波长。

3.3 取供试品适量,分别采用95%乙醇(含1%盐酸),50%甲醇(含1%盐酸)及甲醇(含1%盐酸)为提取溶剂,药材中槲皮素的含量分别为0.037%,0.012%,0.048%,结果用甲醇(含1%盐酸),槲皮素提取率最高,故选用甲醇(含1%盐酸)为提取溶剂。以甲醇(含1%盐酸)为提取溶剂,对超声提取和回流提取进行了比较,结果回流提取的效果明显

优于超声提取。考察了回流提取1,2,3,4,5 h的提取率,药材中槲皮素的含量分别为0.021%,0.163%,0.204%,0.261%,0.263%,说明回流提取4 h基本能把药材中槲皮素提取完全。对甲醇中盐酸的含量进行了考察,分别考察了不同浓度盐酸甲醇溶液,结果1.0%的盐酸甲醇提取效果较好。

3.4 测定了20批不同产地杠板归药材中槲皮素的含量,结果平均含量为0.20%,最低为湖南辰溪产只有0.148%,最高为贵州黔西县产含量为0.264%,不同产地杠板归药材中槲皮素的含量有差异,说明杠板归中槲皮素的含量受产地、环境、气候、采收季节、贮存条件行等的影响。

参考文献

- 1 Curative Investigation and Exploitation of Guizhou Medicines(贵州苗药医药研究与开发). Guiyang(贵阳): Science and Technology Publishing Company of Guizhou(贵州科学技术出版社), 1998. 8
- 2 Quality Standard of Chinese Traditional Medicine and Folk Traditional Medicine of Guizhou(贵州省中药材、民族药材质量标准). Guiyang(贵阳): Science and Technology Publishing Company of Guizhou(贵州科学技术出版社), 2003. 11
- 3 ZHU Dan(朱丹), YUAN Fang(袁芳), MENG Kun(孟坤), et al The investigate evolvement of flavone compound(黄酮类化合物的研究进展). China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2007, 22(6): 387

(本文于2009年4月3日收到)