

高效液相色谱法测定风柜斗草中槲皮素和异鼠李素的含量

林艺华^{1,2}, 陈育青²

(1.福州大学化学化工学院, 福建 福州 350002;

2.福建漳州卫生职业学院药学系, 福建 漳州 363000)

摘要:目的:建立闽南草药风柜斗草中槲皮素和异鼠李素含量测定的方法。方法:采用70%甲醇超声提取, HPLC-PDA分析方法测定。色谱条件为色谱柱Ultimate Column TMC₁₈ 4.6×150mm×5μm, 流动相甲醇:0.5%磷酸=55:45, 流速:1.0 mL/min, 柱温:30℃, 检测波长:370nm。结果:闽南草药风柜斗草中槲皮素在10~200μg/mL与峰面积的线性关系良好, 回归方程为:Y=38409X-54808(r=0.9998), 平均回收率为95.2%, RSD值为0.72%;异鼠李素在5~101μg/mL与峰面积的线性关系良好, 回归方程为:Y=37623X-26662(r=0.9997), 平均回收率为97.03%, RSD为2.35%。结论:本试验建立的HPLC-PDA分析方法具有回收率高、重现性好、选择性强等特点, 适用于闽南草药风柜斗草中槲皮素和异鼠李素含量的测定。

关键词: 风柜斗草; 槲皮素; 异鼠李素; 高效液相色谱

中图分类号: O657.72 文献标识码: A 文章编号: 1009-8143(2011)04-0017-04

Determination of Quercetin and Isorhamnetin in the Medicinal Herb of *Sarcopyramis Nepalensis* Wall by HPLC

Lin yi-hua^{1,2}, Chen yu-qing²

(1.College of Chemistry and Chemical Engineering, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian350002,China;

2.Department of Pharmacy, Zhangzhou Health Vocational College, Zhangzhou, Fujian363000,China)

Abstract: **Objective:** To establish a method for determining the content of quercetin and isorhamnetin in the medicinal herb of *Sarcopyramis nepalensis* Wall. **Methods:** With absolute methanol solvent, ultrasonic extraction, UltimateTM C₁₈ (4.6*150mm, 5μm) column, methanol 0.5% phosphoric acid = 55:45 (V/V) as mobile phase, the flow rate was 1.0ml/min, The column temperature was at 30℃ with 370nm detection wavelength, HPLC-PDA determination of quercetin. **Results:** The linear range of quercetin concentration was from 10μg/mL to 200μg/mL, Y=38409X-54808 (r=0.9998), The average recovery was 95.2% with the RSD of 0.72%. The linear range of isorhamnetin concentration was from 5μg/mL to 101μg/mL, Y=37623X-26662 (r=0.9997), The average recovery was 97.03% with the RSD of 2.35%. **Conclusion:** The proposed method had highly repeatability and selectivity. It was simple, fast and could be used for the quality control of quercetin and isorhamnetin in the medicinal herb of *Sarcopyramis nepalensis* Wall.

Keywords: *Sarcopyramis nepalensis* Wall; quercetin; isorhamnetin; HPLC

风柜斗草为野牡丹科(Melastomaceae)植物肉穗草属楮头红(*Sarcopyramis nepalensis* Wall, *S. nepalensis* Wall)的全草,在我国主要产于福建、台湾等地,生于树林下或阴沟边。据《中药大辞典》记载:全草可药用,其性凉、味酸、无毒,具清热解毒、清肝泻火之效,是治疗急性肝炎、肺热咳嗽、蛇头

疔、无名肿毒等疾病的珍稀名贵中草药^[1]。风柜斗草对急性肝炎(甲肝、乙肝急性期)疗效最佳,对慢性肝炎及乙肝病毒携带者有效^[2]。在福建民间特别是闽南广为使用,是一种极有价值的天然药用植物和中草药资源。风柜斗草中含有黄酮类、多糖类、游离苷类、酚类、鞣质类、皂苷类及多种无机元素等成

收稿日期: 2011-4-8

作者简介: 林艺华(1982-),女,助教,主要从事天然药物化学成分分析与研究。E-mail: 478731213@qq.com

分^[3],其黄酮类成分以槲皮素、异鼠李素为主要苷元成分^[4]。本文参考一定的色谱条件^[5,6],建立了测定风柜斗草提取物中槲皮素和异鼠李素含量测定的HPLC法。

1 实验部分

1.1 主要仪器与材料

超声波清洗器(昆山市仪器有限公司),高效液相色谱仪(Waters 2695),旋转蒸发仪,电子分析天平,水浴锅等。

风柜斗草(购于漳州聚善堂,批号20091101),经鉴定,为野牡丹科植物肉穗草属猪头红(*Sarcopyram nepalensis* Wall, *S. nepalensis* Wal.)的干燥全草;槲皮素标准品(中国药品生物制品检定所,100081-200406);异鼠李素标准品(中国药品生物制品检定所,110860-200407);水为超纯水。

1.2 溶液的制备

对照品溶液的制备:精密称取标准品槲皮素10mg,异鼠李素5mg,分别置于不同的10mL容量瓶

中,用甲醇定容,即得1mg/mL槲皮素和0.5mg/mL异鼠李素单标储备液。各精密吸取储备液2mL,置于10mL容量瓶中,加甲醇定容,得0.2mg/mL和0.1mg/mL的混标溶液。同法制备0.1和0.05mg/mL、0.08和0.040mg/mL、0.06和0.03mg/mL、0.04和0.02mg/mL、0.02和0.01mg/mL、0.01和0.005mg/mL溶液。

供试品溶液的制备:精密称取风柜斗草粉末5.00g,置于250mL的具塞锥形瓶中,加入100mL 70%甲醇溶液,超声提取90min后,再加入15mL的盐酸20mL,水浴100℃加热回流3h,放冷,取上清液过0.45μm微孔滤膜,滤液放入进样瓶中,供HPLC测定。

1.3 色谱条件

色谱柱为Ultimate Column™ C₁₈ 4.6×150mm×5μm;流动相甲醇:0.5%磷酸=55:45;流速:1.0mL/min;柱温:30℃;检测波长:370nm;进样量:10μL,理论塔板数以槲皮素计不低于2000。图1为对照品和供试品的色谱图。

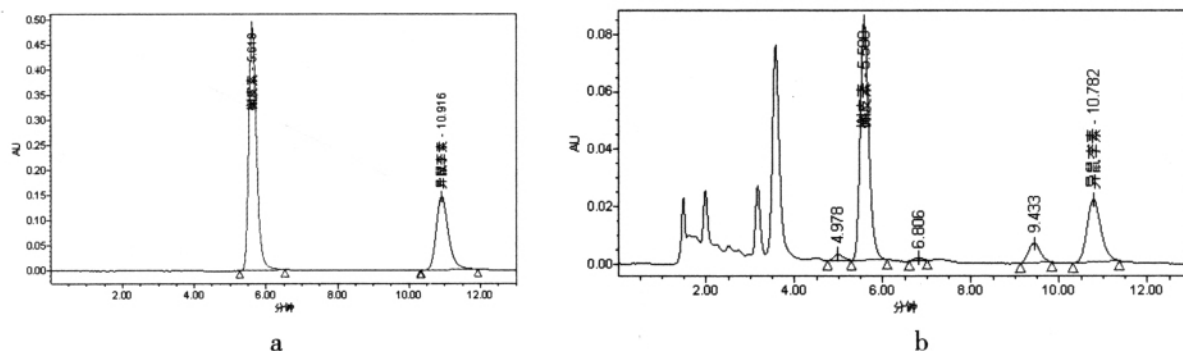


图1 对照品和供试品溶液的色谱图

(a:槲皮素和异鼠李素混标;b:供试品溶液)

2 结果与讨论

2.1 线性关系实验

精密吸取“1.2”项下配成的7个系列对照品溶液10μL,按照上述色谱条件,以峰面积Y为纵坐标,浓度X为横坐标,进行线性回归,得回归方程。如下所示:槲皮素 $Y=38409X-54808$,相关系数 $r=0.9998$,线性范围为10-200μg/mL;异鼠李素: $Y=37623X-26662$,相关系数 $r=0.9997$,线性范围为

5~101μg/mL,说明槲皮素和异鼠李素与峰面积的线性关系良好。

2.2 精密度与重复性试验

按“1.3”项的色谱条件下,精密吸取10μL对照品溶液,连续进样6次,记录峰面积,计算精密度,RSD值分别为0.13%和0.53%,表明本实验精密度符合有关规定。

精密称取试样5.00g,共6份,按照“1.2”项下制备供试品溶液和“1.3”项色谱条件下进样分析,得到RSD值分别为0.10%和0.31%,表明该方法重

复性好。

2.3 稳定性试验

精密吸取 10 μ L 供试品溶液,按照上述色谱条件,分别在制备后 0、4、8、12、24、48h 时测定峰面积,考察风柜斗草中槲皮素和异鼠李素含量的稳定性。其 RSD 值分别为 0.48% 和 0.53%,由结果可知:供试品提取液中槲皮素和异鼠李素成分在 48h 内稳定。

2.4 加标回收率试验

精密称取样品,置于 10mL 具塞刻度试管锥形瓶中,分别加入不同量的标准品,每个浓度水平下做 3 次平行试验按上述“1.2”项方法制备供试品溶液,并按“1.3”项的实验条件进行分析测定,计算风柜斗草中槲皮素和异鼠李素的回收率,根据回收率的计算公式^[7],其平均回收率槲皮素为 95.2%,其 RSD 值为 0.72%;异鼠李素平均回收率为 97.03%,RSD 值为 2.35%。结果见表 1。

表1 加样回收率

	样品编号	称样量(g)	样品量(mg)	加标量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
槲皮素	1	2.02	1.2524		3.1938	96.3		
	2	2.03	1.2586	2.016	3.1778	95.2		
	3	2.01	1.2462		1.2462	95.3		
	4	2.05	1.2710		1.2710	95.4		
	5	2.03	1.2586	1.008	1.2586	94.4	95.2	0.72
	6	2.01	1.2462		1.2462	94.3		
	7	2.03	1.2586		1.2586	95.6		
	8	2.04	1.2648	0.504	1.2648	94.5		
	9	2.05	1.2710		1.2710	95.8		
异鼠李素	1	2.03	0.5278		0.5278	98.3		
	2	2.05	0.5330	1.016	0.5330	96.5		
	3	2.01	0.5226		0.5226	98.4		
	4	2.03	0.5278		0.5278	98.3		
	5	2.02	0.5252	0.508	0.5252	92.1	97.03	2.35
	6	2.03	0.5278		0.5278	98.6		
	7	2.01	0.5226		0.5226	94.6		
	8	2.02	0.5252	0.254	0.5252	98.7		
	9	2.02	0.5252		0.5252	97.8		

2.5 样品含量测定

按“1.2”项下制备方法操作,分别取 10 μ L 对照品和供试品溶液,按其色谱条件进样,以峰面积按外标法计算。供试品溶液中槲皮素和异鼠李素的平均含量为 0.045mg/mL、0.018mg/mL,并推算出闽南风柜斗草粉末样品中槲皮素、异鼠李素的含量为 0.8947mg/g 和 0.3579mg/g。

2.6 讨论

2.6.1 色谱条件的优化

黄酮类化合物具有一定的酚羟基,表现出酸性,HPLC 方法测定酸性化合物有:反相(RP-bonded phase chromatography,RPC)色谱法、离子对色谱法(paired ion chromatography,PIC)和离子色谱法(ion chromatography)^[8]。由于 RPC 比较简单、方便、

柱性能较好、应用范围广泛,故最为常用。所以本文采用反相色谱法。

本实验测定的黄酮类成分,由对照品溶液在 200-600nm 范围内扫描,可知槲皮素、异鼠李素在 370.1nm、370.1nm 处有最大吸收。故选择在 370nm 处检测,基线较为平稳,干扰较小,检测值较高。黄酮类成分为酸性化合物,用 HPLC 法测定分离酸性化合物时,应在流动相加入酸性溶液,以控制 pH 值,防止拖尾,因此在流动相中加入 0.5% 的磷酸,通过调整甲醇和硫酸的比例,确定流动相。

2.6.2 提取条件的优化

黄酮类化合物一般表现中等偏大的极性,因此本实验采用亲水性有机溶剂甲醇、乙醇进行提取,提取过程采用不同浓度的醇溶液为提取溶剂,以槲

皮素、异鼠李素为对照品,通过比较风柜斗草中黄酮类成分得率,确定选择 70% 甲醇提取率最好。

本次采用超声波提取法和索氏提取法这两种常用的提取方法进行对比,比较这两种提取方法的黄酮类成分得率,确定提取方法为超声提取法。在用超声波辅助醇溶剂提取过程中,通过考察不同的超声时间(30、60、90、120 min)提取率,选择超声提取 90 min 效果最佳。

70% 甲醇超声提取风柜斗草黄酮类成分,提取出来的大部分为黄酮糖苷的成分,因此,需加入酸水溶液进行水解形成苷元成分。我们对酸水解时间进行考察,选出最佳水解时间为 3h。黄酮类化合物酸水解过程中酸的加入量及酸度直接影响到黄酮类化合物水解的程度。酸加入量太少,其水解不完全,若加入量太多,则溶液酸性太强,黄酮类化合物转变成盐类。因此,我们对加酸量进行考察^[9,10]。实验结果发现加入 1.5 mol/L 盐酸 20 mL,提取效果最好。同时,我们还通过不同水解温度考察温度对水解效果的影响,结果表明,在一定的温度范围内,水解率与温度成正比关系,温度越高,水解越完全,因此选择水解温度 100℃。

3 结 论

本实验采用 RP-HPLC 法测定闽南草药风柜斗草中槲皮素和异鼠李素的含量,实验结果表明该法

具有回收率高、重现性好、选择性强等特点,结果准确,适用于闽南草药风柜斗草中槲皮素和异鼠李素含量的测定。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(下册)[M]. 上海:上海人民出版社,1997:2290.
- [2] 陈桂菲, 叶淑玲. 风柜斗草药用探讨 [J]. 时珍国医国药, 2000,11(2):129.
- [3] 李清禄, 陈强, 何海斌, 等. 楮头红提取物的生物活性研究[J]. 中国药学杂志, 2007,42(17):1292.
- [4] 万春鹏, 郑啸, 陈海峰, 等. 东方肉穗草黄酮类化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2009,34(2):173-174.
- [5] 吴景林. 鱼腥草中槲皮素提取方法的研究 [J]. 四川化工, 2010(1):17-20.
- [6] 丁立新, 李春英, 孙启芬. 高效液相色谱法测定小叶金钱草中槲皮素和山奈素的含量 [J]. 黑龙江医药科学, 2009,32(5):17-18.
- [7] 国家药典委员会. 中国药典 2005 年版 一部[S]. 北京:化学工业出版社, 2005. 附录 XV 115.
- [8] 谢培山. 中药色谱指纹图谱 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2005:31-48.
- [9] 赖宇红, 童惠贞, 冼彦芳, 等. 银杏黄酮测定时水解条件的研究 [J]. 中国药科大学学报, 2007,38(6):569-571.
- [10] 赖宇红, 童惠贞, 冼彦芳, 朱焕容. 中国药典水解测定银杏黄酮的改进建议 [J]. 药物分析杂志, 2009,29(7):1163-1165.