

七叶莲提取物中总黄酮和槲皮素的含量测定*

崔涛 夏伟军 彭玲芳**

(云南省药物研究所, 昆明 650111)

摘要 目的: 测定七叶莲提取物中总黄酮及槲皮素的含量。方法: 总黄酮含量测定, 以芦丁为对照品, 采用分光光度法, 于 509 nm 处测定; 槲皮素含量测定, 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Agilent ZORBAXSB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.4% 磷酸溶液 (36:64), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 254 nm, 柱温 25 °C。结果: 总黄酮线性范围为 0.0~40.0 μg · mL⁻¹ ($r=0.9999$), 槲皮素线性范围为 0.06~2.40 μg ($r=0.9992$); 总黄酮和槲皮素的平均回收率分别为 100.6% 和 98.7%。结论: 建立的方法具有良好的精密度和耐用性, 结果准确可靠, 可作为本产品的质量控制在方法。

关键词: 民族药; 七叶莲提取物; 总黄酮; 芦丁; 槲皮素; 含量测定; 分光光度法; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)11-2054-04

Determination of contents of total flavonoids and quercetin in *Schefflera venulosa* extracts*

CUI Tao, XIA Wei-jun, PENG Ling-fang**

(Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China)

Abstract Objective: To determine the contents of total flavonoids and quercetin in *Schefflera venulosa* extracts. **Methods:** The content of total flavonoids was determined with Vis-UV spectrophotometry; The wavelength was set at 509 nm; Rutin was used as the control. The separation and quantitation of quercetin was performed on a Agilent ZORBAXSB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with the mobile phase consisting of acetonitrile-0.4% phosphoric acid (36:64) at the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, the detective wavelength was 254 nm, and the column temperature was 25 °C. **Results:** The standard curve was linear in the range of 0.0-40.0 μg · mL⁻¹ for total flavonoids ($r=0.9999$) and 0.06-2.40 μg for quercetin ($r=0.9992$). The average recoveries of total flavonoids and quercetin were 100.6% and 98.7%, respectively. **Conclusions:** The methods are simple, accurate and with a good reproducibility and can be used to control the quality of *Schefflera venulosa* extracts.

Key words: ethnic drug; *Schefflera venulosa* extracts; total flavonoids; rutin; quercetin; assay; spectrophotometry; HPLC

七叶莲提取物是云南省药物研究所研制的中药新药原料药, 为五加科鹅掌柴属植物密脉鹅掌柴 *Schefflera venulosa* Wight et Arn. 的地上部分提取的有效部位。七叶莲始载于《云南中草药选》, 并收载于 2005 年版《云南省中药材标准》第 2 册彝族药部分, 性味、甘温, 具有止痛消肿、舒筋活络的功效, 用于风湿骨痛、头痛。分布于云南中部、西南部、东南部、南部及西北部, 贵州、湖南西部等^[1]。

根据《中药、天然药物注册分类》新药申报的要求, 需测定有效成分及其中代表成分含量。七叶莲

提取物中含有黄酮类化合物, 其苷元多为槲皮素。黄酮类化合物是植物中非常重要的一类次生代谢产物, 其对体内自由基有明显的清除作用, 并可抑制细胞的凋亡, 常是治疗心血管疾病药物的主要成分; 其中槲皮素具有抗自由基、抗氧化抗癌防癌、抗菌抗病毒、抗炎抗过敏、抗糖尿病并发症等多种生物活性及药理作用^[2]。总黄酮含量的测定方法有重量法、以芦丁为指标的亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠体系化学络合比色法^[3]、以芦丁为指标的三氯化铝化学络合比色法^[4]、以甘草苷为指标的碱性比色法^[5]等,

* 云南省科研院所技术开发研究专项(重点项目)资助(2006KFZX-01)

** 通讯作者 Tel: 13888002735; E-mail: penglf428@126.com

因上述方法中芦丁是七叶莲提取物中的成分,所以本文建立以芦丁为指标的亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠体系化学络合比色法,对七叶莲提取物中的总黄酮含量进行了测定;槲皮素的含量测定目前多采用高效液相色谱法,本文也采用高效液相色谱法对七叶莲提取物中槲皮素衍生物的水解产物槲皮素进行含量测定的研究。

1 仪器和试剂

UV-2501PC 型紫外分光光度仪,Agilent 1100 series 高效液相色谱仪(在线脱气、自动进样、光电二极管阵列检测器、Agilent Chemstation for LC system 色谱工作站)。

芦丁对照品(批号 100080-200306)、槲皮素对照品(批号 100081-200406)均由中国药品生物制品检定所提供;乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂为分析纯。

七叶莲提取物为云南省药物研究所自制(七叶莲地上部分经 65% 乙醇提取,其提取液回收乙醇后的浓缩液再经过 D-101 大孔吸附树脂柱纯化得到干浸膏)。小试样品批号:20080701;中试样品批号:20090301 20090302 20090303。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取经五氧化二磷减压干燥 24 h 的芦丁对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含芦丁 0.2 mg 的溶液,作为对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取小试样品约 50 mg 于 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,即得。

2.1.3 显色溶液的制备 取芦丁对照品溶液或供试品溶液 0.0~5.0 mL,置于 25 mL 量瓶中,加 5% 亚硝酸钠试液 1 mL,摇匀后放置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加 4% 氢氧化钠溶液 10 mL,振摇,加水至刻度,摇匀后放置 15 min,即得显色溶液。

2.1.4 测定波长的选择 分别取芦丁对照品溶液 2.0 mL、供试品溶液 5.0 mL,按“2.1.3”项下方法制得芦丁对照品显色溶液和供试品显色溶液,分别在 360~650 nm 波长范围内扫描。结果表明,芦丁对照品显色溶液和供试品显色溶液均在 509 nm 处有最大吸收,因此选 509 nm 为测定波长。

2.1.5 标准曲线的绘制 精密吸取芦丁对照品溶液 0.0 1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 mL,按“2.1.3”项下方法制得系列芦丁对照品显色溶液。以 0.0 $\mu\text{g} \cdot$

mL^{-1} 的对照品显色溶液作为空白,在 509 nm 处测定上述系列芦丁对照品显色溶液的吸收度。以吸收度 Y 为纵坐标,浓度 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标,绘制标准曲线,回归方程为:

$$Y = 0.01329X - 0.00137 \quad r = 0.9999$$

结果表明,芦丁浓度在 0.0~40.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系。

2.1.6 重复性试验 取同一小试样品按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液 6 份。分别取供试品溶液 5.0 mL,按“2.1.3”项下方法制得 6 份供试品显色溶液,在 509 nm 处测定吸收度,根据吸收度从回归方程求出样品中总黄酮的含量。结果 RSD ($n = 6$) 为 0.17%。

2.1.7 中间精密度试验 由 3 位不同分析人员分别取同批小试样品 2 份,共 6 份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液。分别取供试品溶液 5.0 mL,按“2.1.3”项下方法自“置于 25 mL 量瓶中”起进行操作,即得 6 份供试品显色溶液,在 509 nm 处测定吸收度。根据吸收度从回归方程求出各样品中总黄酮的含量。结果样品中总黄酮的百分含量 ($n = 6$) 为 34.9%,RSD 为 0.18%。

2.1.8 加样回收率试验 分别精密吸取已知总黄酮百分含量(34.9%)的小试样品按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,取供试品溶液 1.0 mL 于 25 mL 量瓶中,共 6 份,分别精密加入芦丁对照品溶液(230 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 2.0 mL,按“2.1.3”项下方法自“加 5% 亚硝酸钠试液 1 mL”起进行操作,即得供试品显色溶液,测定吸收度,根据吸收度从回归方程求出各样品中总黄酮的含量。本测定方法的平均回收率 ($n = 6$) 为 100.6%,RSD 为 0.39%。

2.1.9 稳定性试验 取同一小试样品按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液。取供试品溶液 5.0 mL,按“2.1.3”项下方法制得供试品显色溶液,间隔一定时间(0,15,30,60,90,120 min),在 509 nm 处测定吸收度。表明供试品溶液在 120 min 内基本稳定,RSD ($n = 6$) 为 0.27%。

2.1.10 样品测定 取批号为 20090301 20090302,20090303 的中试样品 3 批,每批取 2 份,分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液。分别取供试品溶液 5.0 mL,按“2.1.3”项下方法制得供试品显色溶液,在 509 nm 处测定吸收度。根据吸收度从回归方程求出各样品中总黄酮的含量,结果批号为 20090301 20090302 20090303 的样品中总黄酮含量分别为 34.5% 36.0% 35.0%。

2.2 槲皮素含量测定

2.2.1 对照品溶液及供试品溶液的制备 精密称取槲皮素对照品适量,加甲醇制成每1 mL含槲皮素0.03 mg的溶液,作为对照品溶液;取样品约100 mg,精密称定,加甲醇-25%盐酸溶液(4:1) 25 mL,摇匀,置水浴中加热回流30 min,迅速冷却至室温,转移至50 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取滤液,即得供试品溶液。

2.2.2 色谱条件及适用性试验 色谱柱: Agilent ZORBAXSB-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.4%磷酸溶液(36:64); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 254 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL。在上述色谱条件下,槲皮素的保留时间约为6.8 min,分离度大于1.5,理论塔板数不低于2500。见图1。

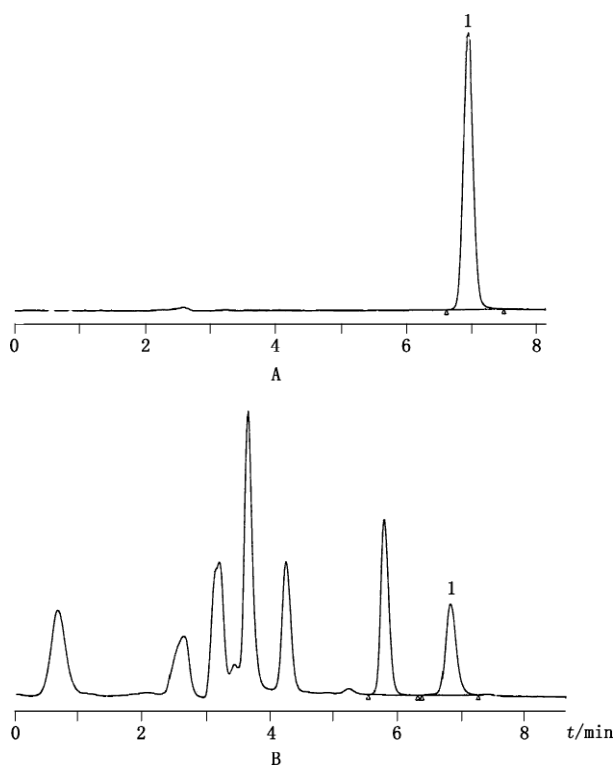


图1 对照品(A)及样品(B)色谱图

Fig 1 Chromatograms of reference substance(A) and sample(B)

1. 槲皮素(quercetin)

2.2.3 线性关系考察 精密称取槲皮素对照品适量,配制成浓度分别为0.006, 0.015, 0.030, 0.060, 0.120, 0.240 mg·mL⁻¹的系列对照品溶液。分别精密吸取不同浓度的对照品溶液10 μL,按上述色谱条件进样测定。以槲皮素吸收峰面积的积分值Y为纵坐标,进样量X(μg)为横坐标,绘制标准曲线,

回归方程为:

$$Y = 1337X - 27.21 \quad r = 0.9992$$

结果表明,槲皮素进样量在0.06~2.40 μg范围内呈良好的线性关系。

2.2.4 重复性试验 取同一批小试样品6份,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,进样测定。结果样品中槲皮素含量(n=6)为0.998%,RSD为0.88%。表明本法重复性良好,符合要求。

2.2.5 中间精密度试验 由3位不同分析人员分别取同批小试样品2份,共6份,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,依法测定。结果槲皮素在样品中的百分含量(n=6)为0.997%,RSD为1.9%,表明精密度良好。

2.2.6 加样回收率试验 精密称取已知槲皮素含量(0.998%)的小试样品约60 mg,共6份,分别精密加入槲皮素对照品溶液(0.12 mg·mL⁻¹) 5 mL,按“2.2.1”项下方法制备供试溶液,依法测定,计算。结果平均回收率(n=6)为98.7%,RSD为0.86%,表明本法准确性较好。

2.2.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液10 μL,间隔一定时间(0, 2, 4, 8, 16, 24 h)进样测定,结果表明供试品溶液在24 h内基本稳定,RSD(n=6)为1.3%。

2.2.8 范围 结合重复性试验结果,取低浓度(1.1 mg·mL⁻¹)、高浓度(4.8 mg·mL⁻¹)供试品溶液各3份,共6份,注入液相色谱仪,测定槲皮素的峰面积,RSD(n=6)为0.31%。说明在供试溶液1.1~4.8 mg·mL⁻¹浓度范围内测定槲皮素含量均可行。

2.2.9 样品测定 取批号为20090301, 20090302, 20090303的中试样品3批,每批取2份,按“2.2.1”项下方法制得供试品溶液,注入液相色谱仪,测定槲皮素的峰面积,根据槲皮素的峰面积从回归方程求出各样品中槲皮素的含量。结果批号为20090301, 20090302, 20090303的样品中槲皮素含量分别为0.955%, 0.927%, 0.906%。

3 讨论

3.1 按中国药典2005年版一部附录XVIII A中药质量标准分析方法验证指导原则进行了准确度、精密度、专属性、线性关系、耐用性和稳定性的方法学考察。实验结果表明:总黄酮及槲皮素含量测定的方法均简便合理、专属性强,含量测定数据和图谱均符合要求。故七叶莲提取物质量标准研究可选用该两项测定方法对其做定量指标。

3.2 有文献报道用三氯化铝甲醇溶液(含醋酸)络合化学比色法测定总黄酮的含量^[4],但七叶莲提取物的供试品溶液在 270 ~ 280 nm 处的吸收度非常低,所以本文未采用该方法,而采用了亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠体系络合化学比色法^[3]。也有文献报道^[6],总黄酮比色法测定含量以槲皮素作对照,经试验发现以槲皮素为对照测定本样品中总黄酮含量,对照品与样品的最大吸收峰不一致,而本文以芦丁作为对照测定本样品中总黄酮含量可行。

3.3 据查阅的文献资料^[7,8],槲皮素的含量测定均采用乙腈-0.4%磷酸溶液作为流动相体系,因此本研究选用乙腈-0.4%磷酸溶液体系,在流动相比比例为乙腈-0.4%磷酸溶液(36:64)时,槲皮素可达到有效的分离。

3.4 槲皮素的测定中,考察了槲皮素的水解条件,结果表明,采用 25% 盐酸溶液 25 mL 水解提取 30 min 比较合适。

参考文献

- LIU Rui(刘睿),GU Qian-qun(顾谦群),CUI Cheng-bin(崔承彬) *et al.* Chemical constituents of *Schefflera venulosa* and their anti-tumor activities(密脉鹅掌柴的化学成分及其抗肿瘤活性). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药) 2005, 36(3): 328
- WANG Yan-fang(王艳芳),WANG Xin-hua(王新华),ZHU Yu-tong(朱宇同). Advancement of researches in quercetin(槲皮素的药理作用研究进展). *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发) 2003, 15(2): 171
- FANG Yuan(方圆),WANG Xue-yan(王雪彦),CHAO Ruo-bing(晁若冰). Study on the determination of astilbin and total flavonoids in *Rhizoma Smilacis Glabrae*(土茯苓药材中落新妇苷和总黄酮的含量测定方法研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2010, 30(9): 1738
- ZHANG Ling(张凌),ZHANG Dao-ying(张道英),LIU Ya-li(刘亚丽) *et al.* Determination of total flavonoids and luteolin in traditional Tibetan drug *Pyrethrum tatsienense* (Bur. et Franch.) Ling(藏药打箭菊中总黄酮及木犀草素的含量测定). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2008, 28(5): 755
- WU Wei-ping(伍蔚萍),SUN Wen-ji(孙文基),YAN Hong-tao(阎宏涛) *et al.* Determination of total flavone in licorice by spectrophotometry(分光光度法测定甘草中总黄酮的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2005, 25(4): 469
- LI Hong-xiong(李洪雄),PENG Xiao-chun(彭晓春),JIANG Jian-bo(蒋剑波). Extraction and determination of content of flavonoids in the root of *Ginkgoes*(银杏根中黄酮类化合物的提取及其含量测定). *J Jishou Univ(Nat Sci Ed)*[吉首大学学报(自然科学版)] 2002, 23(3): 56
- PAN Xin(潘馨). RP-HPLC determination of quercetin in several plants of *Folium Rhododendri* in Fujian(RP-HPLC测定几种闽产杜鹃中槲皮素的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2002, 22(6): 436
- LU Xin-yan(鲁鑫焱),ZHANG Chao(张超),ZHAO Huai-qing(赵怀清) *et al.* Determination of contents of total flavonoids and quercetin in *Trigonella foenum-graecum* L. at different growing areas(不同产地胡芦巴中总黄酮和槲皮素的含量测定). *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报) 2004, 21(6): 430

(本文于 2010 年 11 月 23 日收到)

《药物分析杂志》编辑部声明

本刊已开通在线投稿编辑系统,并入网“中国学术期刊网络出版总库”,作者稿件一经本刊录用,将同时被“中国学术期刊网络出版总库”收录,进入因特网提供信息服务,并通过本刊在线系统实现文摘查询(非营利性)。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。作者如不同意,请在投稿时向本刊书面声明,否则将视为同意本刊网络传播权。