

# HPLC 波长切换法测定不同产地水红花子中花旗松素和槲皮素的含量

高晓丽<sup>1</sup>, 丑静<sup>2</sup>, 孟宪生<sup>1\*</sup>, 包永睿<sup>1</sup>, 王帅<sup>1</sup>, 康廷国<sup>1</sup>(1.辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2.沈阳神龙药业有限公司, 沈阳 110161)

**摘要:** 目的 建立 HPLC 测定水红花子中花旗松素和槲皮素含量的方法, 为水红花子质量标准的研究提供科学依据。方法 用高效液相色谱波长切换法同时测定花旗松素和槲皮素的含量, 色谱条件为 Agilent TC-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以 A 相 0.1% 磷酸水和 B 相甲醇: 乙腈(60:40)为流动相梯度洗脱, 其中 B 相为甲醇与乙腈按 60:40 固定体积比例配制的混合有机相。流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长: 0~42 min 为 290 nm, 42~49 min 为 371 nm, 温度: 25 °C。结果 此方法线性良好, 花旗松素和槲皮素的平均加样回收率分别为 99.89%, 99.22%; RSD 分别为 2.03%, 3.00%。结论 不同产地的水红花子药材中花旗松素和槲皮素的含量存在较大差异; 该方法稳定, 重复性好, 操作简单, 可作为水红花子药材的质量控制方法, 也为合理利用水红花子这一资源提供依据。

**关键词:** 水红花子; 花旗松素; 槲皮素; 波长切换

中图分类号: R927.2

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2013)05-0508-04

## HPLC Wavelength Switching Method for the Determination of Different Origin Polygonum Orientale Taxifolin and Quercetin Content

GAO Xiaoli<sup>1</sup>, CHOU Jing<sup>2</sup>, MENG Xiansheng<sup>1\*</sup>, BAO Yongrui<sup>1</sup>, WANG Shuai<sup>1</sup>, KANG Tingguo<sup>1</sup>(1.College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China; 2.Shenyang Shen Long Drug Industry Co., Ltd., Shenyang 110161, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish the method for determining the content of taxifolin and quercetin in fructus polygoni for its quality standards to provide the scientific basis for the study. **METHODS** The Agilent TC-C<sub>18</sub> Column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used, phase A was 0.1% phosphoric acid and phase B was methanol : acetonitrile (60 : 40) as the mobile phase, gradient elution, where phase B was mixed by methanol and acetonitrile in 60 : 40 volume ratio of mixed organic phase. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the detection wavelength 290 nm in 0–42 min, 371 nm in 42–49 min, the column temperature was 25 °C. **RESULTS** The isolation effect among taxifolin and quercetin showed good linear correlation, the average recoveries were 99.89%, 99.22%; RSD were 2.03%, 3.00%. **CONCLUSION** There have a great differences in contents of taxifolin and quercitrin among the samples from different origins. The method is simple, accurate and with good reproducibility. Which could be used as fructus polygoni orientalis quality control of medicines, it also provide a scientific reference for the rational use of fructus polygoni orientalis.

**KEY WORDS:** fructus polygoni orientalis; taxifolin; quercetin; wavelength switchiing

水红花子系蓼科植物红蓼(Polygonum orientale L.)的干燥成熟果实, 具有散血消癥、消积止痛、利水消肿的功能, 主要用于癥瘕痞块、癭瘤、食积不消、胃脘胀痛、水肿腹水等症的治疗<sup>[1]</sup>。主产于江苏、安徽、黑龙江、吉林、山西等地。现代药理研究表明, 该药具有抗急性心肌缺血、扩张血管、降血压、抗菌和抗肿瘤等广泛的药理活性<sup>[2]</sup>。

花旗松素具有许多重要的生物学活性, 能够抑制和激活多种酶, 从而产生不同的生理效应。由于其含有较多的酚羟基, 具有抗氧化、抗辐射作

用, 工业上用做食品添加剂。此外, 还具有抗病毒和抗肿瘤活性<sup>[3]</sup>。槲皮素具有非常广泛的生理和药理活性, 它具有抗炎、抗氧化、抗过敏、抗菌、抗病毒、抗癌等作用, 槲皮素对恶性肿瘤生长和转移的抑制作用是近年来一个十分活跃的研究课题<sup>[4]</sup>。因此, 研究水红花子中花旗松素和槲皮素的含量测定方法具有重要意义。花旗松素在 290 nm 处有最大紫外吸收, 槲皮素在 371 nm 处有最大紫外吸收, 本实验采用 HPLC 波长切换法建立了花旗松素和槲皮素的含量测定方法, 此方法方便、可行, 为水红花子的新药研究提供了参考。

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项“十一五”计划(2010ZX09401-304-105C)

作者简介: 高晓丽, 女, 硕士 Tel: 13664236749 E-mail: 785250407@qq.com

\*通信作者: 孟宪生, 男, 博士, 博导, 教授 Tel:

(0411)87406496 E-mail: mxsvvv@126.com

## 1 仪器和试剂

### 1.1 仪器

Agilent-1100 高效液相色谱仪(Agilent 科技有限公司); DAD 检测器; HS6150 型超声波清洗器(天津恒奥科技发展有限公司); CP225D 电子分析天平(德国 Sartorius)。

### 1.2 试剂

花旗松素(成都曼思特生物科技有限公司, 批号: A0082, 供含量测定用); 槲皮素(中国药品生物制品检定所, 批号: 100081-200406, 供含量测定用); 甲醇、磷酸(色谱纯, 天津市科密欧化学试剂开发中心); 乙腈(Media 公司, 色谱纯); 水为去离子水; 其他试剂均为分析纯。水红花子样品来源于甘肃、内蒙古、黑龙江等地, 经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为正品。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件<sup>[5]</sup>

色谱柱: Agilent TC-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 1%磷酸水(A)-甲醇:乙腈(60:40)(B), 二元线性梯度洗脱, 0~23 min: 26% B→31% B(74% A→69% A); 23~25 min: 31% B→38% B(69% A→62% A); 25~50 min: 38% B→43% B(62% A→57% A); 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 25 °C; 检测波长: 0~42 min 为 290 nm, 42~49 min 为 371 nm; 进样量: 10 μL。

### 2.2 系统适应性试验

按“2.1”项下色谱条件, 对照品溶液理论塔板数以花旗松素和槲皮素峰计算, 均≥4 000; 花旗松素和槲皮素与相邻峰之间的分离度均>1.5; 对称因子均在 0.95~1.05 之间。

### 2.3 对照品溶液的制备

精密称取适量花旗松素和槲皮素对照品, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 制成花旗松素和槲皮素浓度分别为 0.148, 0.060 mg·mL<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

### 2.4 供试品溶液的制备

称取水红花子药材 5 g, 置 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 60%乙醇 30 mL, 回流提取 2 h, 共提取 3 次, 合并提取液, 60%乙醇定容至 100 mL 量瓶中, 摇匀, 即得。

### 2.5 线性关系考察

精密量取 6 个不同浓度的混合对照品溶液各 10 μL, 用自动进样器按“2.1”项下色谱条件分别

进样测定, 花旗松素对照品浓度分别为 0.028, 0.259, 0.089, 0.119, 0.148, 0.178 mg·mL<sup>-1</sup>, 槲皮素对照品浓度分别为 0.012, 0.024, 0.036, 0.048, 0.060, 0.072 mg·mL<sup>-1</sup>, 在上述条件下进行分析, 测定对照品色谱峰面积, 以色谱峰面积(Y)对进样量(X)进行回归分析, 得到花旗松素和槲皮素的回归方程、相关系数分别为  $Y=509.43X+10.234$ ,  $r=0.9999(n=6)$ ;  $Y=266.1X-6.2324$ ,  $r=0.9995(n=6)$ 。结果表明, 花旗松素、槲皮素进样量分别在 0.284~1.783, 0.123~0.720 μg 内与峰面积呈线性关系。

### 2.6 精密度试验

取混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 每次进样 10 μL, 记录峰面积, 计算得花旗松素和槲皮素的峰面积 RSD 分别为 1.04%和 0.70%(n=6), 表明精密度良好。

### 2.7 稳定性试验

取供试品溶液分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 测定, 记录峰面积。结果花旗松素和槲皮素峰面积的 RSD 分别为 1.29%和 1.66%(n=6), 表明供试品溶液在 10 h 内基本稳定。

### 2.8 重复性试验

取同批样品约 5 g, 精密称定, 共 6 份, 按“2.4”项下方法制成供试品溶液, 取 10 μL 注入液相色谱仪, 按“2.1”项下条件测定, 记录峰面积。结果花旗松素和槲皮素峰面积的 RSD 分别为 2.52%和 2.72%(n=6), 表明方法重复性良好。

### 2.9 加样回收率试验

精密称取已测知含量的水红花子药材粉末 6 份, 每份约 1 g, 分别加入花旗松素与槲皮素的对照品溶液(花旗松素浓度为 0.303 0 mg·mL<sup>-1</sup>, 槲皮素浓度为 0.083 3 mg·mL<sup>-1</sup>)10 mL, 按“2.4”项下方法制成供试品溶液, 按“2.1”项下条件测定。结果见表 1 和表 2, 花旗松素和槲皮素的平均回收率(n=6)分别为 99.89%和 99.22%, RSD 分别为 2.03%和 3.00%。

表 1 花旗松素回收率试验(对照品 5.010 2 mg)

Tab 1 Recovery test of taxifolin(reference 5.010 2 mg)

称样量/g	样品花旗松素含量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
5.033 8	5.002 2	9.939 8	98.55		
5.012 7	5.014 5	9.957 6	98.66		
5.018 5	5.023 9	9.996 0	99.24	99.89	2.03
5.003 4	5.012 7	9.896 6	97.48		
5.073 2	5.013 4	9.978 5	99.10		
5.022 7	5.012 3	9.883 7	97.23		

表 2 槲皮素回收率试验(对照品 0.923 4 mg)

称样量/g	样品槲皮素含量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
5.033 8	0.938 5	1.848 5	98.55	99.22	3.00
5.012 7	0.935 6	1.839 5	97.89		
5.018 5	0.932 8	1.849 2	99.24		
5.003 4	0.923 0	1.832 1	98.45		
5.003 2	0.934 1	1.831 6	97.19		
5.022 7	0.932 2	1.848 5	99.23		

### 2.10 样品的测定

取不同产地的 12 份样品按“2.4”项下方法制成供试品溶液, 分别取 10  $\mu$ L, 注入液相色谱仪测定含量, 色谱图见图 1, 结果见表 3。

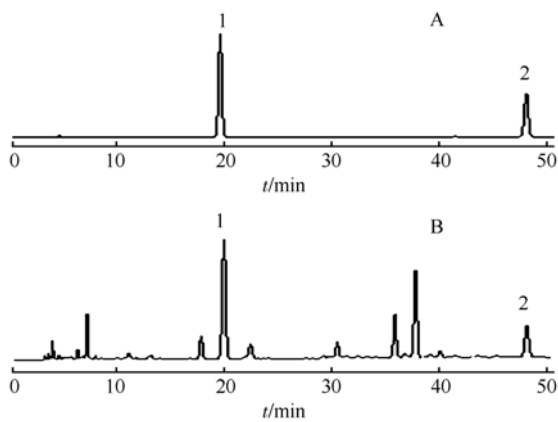


图 1 高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-样品溶液; 1-花旗松素; 2-槲皮素

Fig 1 HPLC chromatograms

A-reference substances; B-sample; 1-taxifolin; 2-quercetin

表 3 样品中花旗松素和槲皮素的含量

样品号	样品产地	花旗松素/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	槲皮素/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	花旗松素和槲皮素 总含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	甘肃	4.995 6	0.945 3	5.940 9
2	内蒙古	4.068 7	0.260 3	4.329 0
3	黑龙江	4.945 3	1.034 2	5.979 5
4	安徽(1)	5.388 7	1.100 9	6.489 6
5	安徽(2)	5.423 4	1.109 8	6.533 2
6	河北安国	2.398 7	0.560 3	2.959 0
7	四川	4.102 0	0.694 5	4.796 5
8	浙江	4.739 4	0.923 0	5.662 4
9	江西	2.915 4	0.756 4	3.671 8
10	江苏	6.089 9	1.254 6	7.344 5
11	河北	1.465 4	0.207 7	1.673 1
12	山西	4.400 5	0.810 9	5.211 4

### 2.11 数据处理

将表 3 中花旗松素和槲皮素含量数据用 SPSS 软件进行相关性分析, 结果二者的 Pearson 相关系数  $r=0.834$ ,  $P=0.01$ , 并结合散点图说明不同产地的水红花子药材中花旗松素含量和槲皮素含量有直线相关趋势。

### 3 讨论

花旗松素和槲皮素提取条件选择时, 本实验采用正交实验考察了水红花子的最佳醇提条件, 结果用 60%乙醇, 料液比 1:6, 提取 3 次, 每次 2 h, 花旗松素和槲皮素的提取率较高。流动相选择时, 实验曾选用 0.1%磷酸水-甲醇溶液、0.1%磷酸水-乙腈溶液、0.1%磷酸水-甲醇-乙腈溶液、水-甲醇-乙腈溶液做流动相, 结果用 0.1%磷酸水-甲醇-乙腈三相系统分离度较好, 加入一定磷酸可改善峰型和分离度, 最终确定流动相为 A 相 0.1%磷酸水和 B 相甲醇:乙腈(60:40)为流动相梯度洗脱, 其中 B 相为甲醇与乙腈按 60:40 固定体积比例配制的混合有机相, 分离度较好。

在水红花子含量测定中波长切换点确定时, 水红花子中花旗松素和槲皮素具有广泛而显著的生物学活性, 其含量也反映了不同商品水红花子的内在质量。而仅建立某单一成分的含量测定方法在很大程度上带有较大的片面性<sup>[6]</sup>。因此, 本实验通过波长切换建立了同时测定二者含量的方法。通过比较色谱图, 在波长为 290 nm 时, 花旗松素有较强吸收, 而槲皮素吸收微弱, 在波长为 371 nm 时, 槲皮素有较强吸收, 而花旗松素几乎没有吸收, 单波长检测不能同时检测到二者的最大吸收波谱, 故在确保有较好分离度的情况下, 本实验采用波长切换法使二者在同一色谱条件下的最大吸收谱图显示在一张谱图上。波长切换点选择无色谱峰处, 以不损失谱峰为原则, 因此最终确定切换点为 42 min<sup>[7]</sup>。通过一次进样同时准确测定二者含量, 提高了分析方法的灵敏度, 缩短了分析时间, 提高了分析效率, 消除了单一成分含量测定可能存在的片面性, 得到的谱图反映的信息量更全面和合理, 为系统评价水红花子的质量提供更完善的理论依据。

做数据处理分析时, 通过 SPSS 软件做水红花子药材中花旗松素和槲皮素含量相关性分析, 结果表明两者之间具有一定的相关性, 不同产地的水红花子药材中花旗松素含量和槲皮素含量呈正

相关, 为采用花旗松素或槲皮素单一成分评价水红花子的质量提供一定依据。

水红花子中花旗松素和槲皮素在同一色谱条件下进行测定的色谱条件作者未见文献报道, 本实验采用 HPLC 波长切换法对水红花子中花旗松素和槲皮素的含量进行测定, 具有快速、简便、准确、重复性好、分离度好的特点, 可用于水红花子药材的内在质量控制, 也为合理利用水红花子这一资源提供依据。

不同产地含量测定表明, 各地的水红花子中有效活性成分的含量差异较大, 其中以江苏、安徽、浙江等地含量较高, 为临床水红花子的应用提供一定的理论依据。

## REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 77.
- [2] CHINESE HERBAL MEDICINE COMMISSION. Chinese

Herbal Medicine(中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999: 681-683.

- [3] QIAO H, XIE J, ZHANG X Y. Douglas fir in biological activity and its application [J]. Chin Tradit and Herb Drugs(中草药), 2003, 34(8): 15-17.
- [4] XUE B, LI F Y. Determination of quercetin in chinese herbal medicine reserach [J]. Jiangxi Chemica(江西化工), 2006, 4(12): 9-14.
- [5] ZHENG Z J, ZHAI Y J, ZHANG H, et al. HPLC determination of taxifolin in polygonum orientale different harvest [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2008, 39(12): 1890-1891.
- [6] HAO X L, ZHANG Y W. Chinese medicine quality standards establish the necessity of multiple indicator determination talking [J]. Chinese Practicing Pharmacists(中国执业药师), 2009, 6(9): 31-33.
- [7] CHEN X Y, BI K S, YI L X, et al. Simultaneous determination of four components in guizhi-gancao decoction by HPLC with double-wavelength switch [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(3): 265-267.

收稿日期: 2012-09-05

## HPLC 测定中医滋补膏方中橙皮苷含量

杨道纳<sup>1</sup>, 蔡天进<sup>1</sup>, 刘金来<sup>2\*</sup>, 李笑慧<sup>2</sup>, 周曙华<sup>2</sup> (1. 苍南县人民医院, 浙江 苍南 325800; 2. 温州市人民医院, 浙江 温州 325000)

**摘要:** 目的 建立高效液相色谱法测定中医滋补膏方中橙皮苷含量的方法。方法 采用 Hypersil ODS2 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 乙腈-甲酸缓冲液(取甲酸 1.7 mL, 加水, 再加三乙胺 1.8 mL, 定容至 1 000 mL)(20 : 80)为流动相; 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长为 283 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 20 μL。结果 橙皮苷 2.1~12.6 μg·mL<sup>-1</sup> 内, 峰面积与浓度呈良好的线性关系( $r=0.999\ 8$ ), 平均回收率和 RSD 分别为 99.1%和 1.68%。结论 方法简便、可靠, 重复性好, 可用于中医滋补膏方中橙皮苷含量测定。

**关键词:** 高效液相色谱法; 含量测定; 中医滋补膏方; 橙皮苷

中图分类号: R917.101 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2013)05-0511-03

## Determination of Hesperidin in Herbal Paste by HPLC

YANG Daona<sup>1</sup>, CAI Tianjin<sup>1</sup>, LIU Jinlai<sup>2\*</sup>, LI Xiaohui<sup>2</sup>, ZHOU Shuhua<sup>2</sup> (1. Cangnan People's Hospital, Cangnan 325800, China; 2. Wenzhou People's Hospital, Wenzhou 325000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a high performance liquid chromatography method for the determination of the Hesperidin in Herbal Paste. **METHODS** The analytical column was packed with the Hypersil ODS2 column(250 mm×4.6 mm, 5 μm). Mobile phase consisted of Acetonitrile-Methanoic acid buffer solutions(20 : 80), The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and the UV detection wavelength was 283 nm. The temperature of the column was 30 °C. The injection volume was 20 μL. **RESULTS** A good linearity was obtained over the range of 2.1–12.6 μg·mL<sup>-1</sup> for Hesperidin( $r=0.999\ 8$ ). The average recovery was 99.1% and RSD was 1.68%. **CONCLUSION** This method is simple, reliable, reproducible and can be used for the determination of

基金项目: 2011 年浙江省药学会医院药学科专项基金项目(2011ZYY17)

作者简介: 杨道纳, 男, 副主任药师 Tel: 13806624375 E-mail: ydndn@163.com \*通信作者: 刘金来, 男, 主任药师 Tel: 13806888387 E-mail: liujinlai01@126.com