

HPLC 测定凤眼草中槲皮素与山柰素的含量

孟宪波*

(淄博市药品检验所, 山东 淄博 255086)

[摘要] 目的:建立以高效液相色谱法测定凤眼草中槲皮素与山柰素含量的方法。方法:Inertsil ODS-3 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.4% 磷酸溶液(50:50), 检测波长 360 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果:槲皮素在 11.1 ~ 333 μg ($r = 1$) 线性关系良好, 平均回收率为 97.82%, RSD 1.1%; 山柰素在 2.3 ~ 69 μg ($r = 1$) 线性关系良好, 平均回收率为 96.81%, RSD 1.7%。结论:方法简便、快速、重复性好, 可用于凤眼草的质量控制。

[关键词] 凤眼草; 槲皮素; 山柰素; 含量测定; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0077-03

[doi] 10.11653/syjf2013080077

HPLC Determination of Quercetin and Kaempferol in Ailanthi Fructus

MENG Xian-bo*

(Zibo Institute for Drug Control, Zibo 255086, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for the simultaneous determination of quercetin and kaempferol in Ailanthi Fructus. **Method:** Quercetin and kaempferol were separated on Inertsil ODS-3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column and detected at 360 nm. The mobile phase was methanol-0.4% phosphate (50:50). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** Quercetin and kaempferol were linear within the range of 11.1-333 μg ($r = 1$), 2.3-69 μg ($r = 1$) respectively. The average recovery was 97.82% with RSD of 1.1%, 96.81% with RSD of 1.7% respectively. **Conclusion:** The method is simple, reproducible, and it can be used for the quality control of Ailanthi Fructus.

[Key words] Ailanthi Fructus; quercetin; kaempferol; determination; HPLC

凤眼草为苦木科植物臭椿的干燥成熟果实。具有清利湿热, 止痛止血的功效; 可用于痢疾, 便血, 尿血, 崩漏, 白带, 阴道滴虫等病症。凤眼草还具有抗肺结核^[1]和较强的体外抗菌作用^[2]。文献报道, 从凤眼草中分离得到的化学成分有臭椿苦酮 A^[3]、甾类和萜类化合物^[4]及以槲皮素和山柰素为苷元的多种黄酮类化合物^[5]。黄酮类化合物是植物中非常重要的一类次生代谢产物, 化学性质较为稳定、药理作用较为显著^[6-7]。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^[8]; 山柰素具有抗菌、抗炎、抗皮肤癌、抗溃疡及抑制 HIV 蛋白酶的活

性等作用^[9]。本试验以槲皮素和山柰素为指标, 建立了凤眼草含量测定方法。

1 材料

LC-20AT 高效液相色谱仪, SPD-20A UV/VIS 检测器(日本岛津公司), Mettler AE240 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司), KS-300E 型超声波清洗机(宁波科生仪器厂)。

槲皮素对照品(批号 100081-200907, 含量以 96.5% 计), 山柰素对照品(110704-200303)均购自中国药品生物制品检定所; 凤眼草 8 批, 经本所中药室鉴定均为苦木科植物臭椿 *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle. 的干燥成熟果实, 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

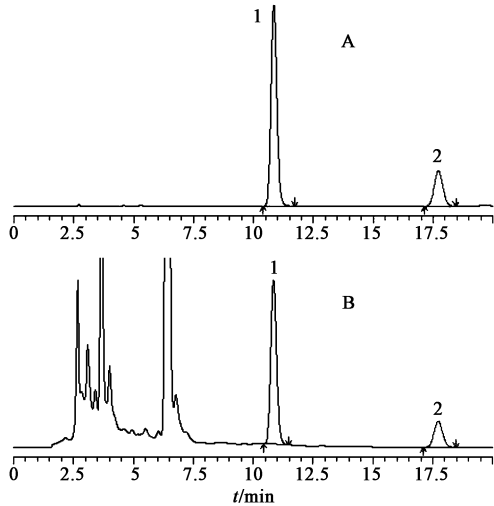
2.1 色谱条件与系统适用性 Inertsil ODS-3 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.4%

[收稿日期] 20120903(003)

[通讯作者] * 孟宪波, 硕士, 从事药品检验工作, Tel: 05333593270, E-mail: mxianbo@126.com

磷酸溶液(50:50),检测波长 360 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 35 ℃。理论板数按槲皮素峰计算不低于 7 000。

在以上色谱条件下,槲皮素和山柰素的色谱峰分离度良好(图 1)。



A. 对照品;B. 样品;1. 槲皮素;2. 山柰素

图 1 凤眼草 HPLC

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取槲皮素对照品和山柰素对照品适量,精密称定,分别置于 100,250 mL 量瓶中,加 80% 甲醇制成每 1 mL 含槲皮素 0.111 0 mg、山柰素 0.046 0 mg 的对照品储备溶液。临用时,分别精密吸取槲皮素对照品储备溶液 10 mL、山柰素对照品储备溶液 5 mL,置于同一 100 mL 量瓶中,加 80% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得(每 1 mL 含槲皮素和山柰素分别为 0.011 1,0.002 3 mg)。

2.2.2 供试品溶液 取本品粉末(过三号筛)约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇-盐酸(5:1)50 mL,密塞,称定质量,加热回流 1 h,迅速冷却,再称定质量,用 80% 甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 线性关系考察 精密吸取 2.2.1 项下对照品溶液 1, 5, 10, 20, 30 μL 进样,以进样量(μg)对峰面积(A)进行线性回归,求得槲皮素回归方程为 $Y = 3\,212.2X - 2293.4$ ($r = 1$);山柰素回归方程为 $Y = 4\,012.1X - 1\,064.9$ ($r = 1$)。表明,槲皮素和山柰素分别在 11.1 ~ 333, 2.3 ~ 69 μg 线性关系良好。

2.4 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL,连续进样 6 次,计算槲皮素和山柰素峰面积的 RSD 分别为 0.21%, 0.29%。

2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液(1 号样品),分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 各进样 10 μL,测定槲皮素和山柰素的峰面积,计算其 RSD 分别为 2.5%, 1.6%。表明供试品溶液在 10 h 内基本稳定。

2.6 重复性试验 取同一批(1 号样品)供试品 6 份,分别按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,测定。槲皮素和山柰素含量平均值分别为 0.818 9, 0.106 8 mg·g⁻¹, RSD 分别为 2.1%, 1.5%。

2.7 加样回收试验 取同一批(1 号样品,槲皮素和山柰素含量分别为 0.818 9, 0.106 8 mg·g⁻¹)供试品约 0.5 g,精密称定,共 6 份,分别精密加入槲皮素和山柰素对照品储备溶液 5, 1 mL,精密加入 80% 甲醇-盐酸(5:1)50 mL,密塞,称定质量,加热回流 1 h,迅速冷却,再称定质量,用 80% 甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,测定。槲皮素和山柰素平均回收率分别为 97.82%, 96.81%, RSD 分别为 1.1%, 1.7%(表 1)。

表 1 槲皮素、山柰素加样回收率试验

化合物	称样量 /g	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
槲皮素	0.495	0.406	0.555	0.942	96.74	96.81	1.7
	0.503	0.412	0.555	0.951	97.23		
	0.505	0.413	0.555	0.965	99.42		
	0.503	0.412	0.555	0.956	98.11		
	0.503	0.412	0.555	0.951	97.15		
山柰素	0.502	0.411	0.555	0.957	98.29	96.81	1.7
	0.495	0.053	0.046	0.097	95.65		
	0.503	0.054	0.046	0.098	96.30		
	0.505	0.054	0.046	0.098	96.09		
	0.503	0.054	0.046	0.100	99.78		
	0.503	0.054	0.046	0.097	97.61		
	0.502	0.053	0.046	0.096	95.43		

2.8 样品测定 取不同批号的样品,分别按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定(表 2)。

3 讨论

分别取槲皮素和山柰素对照品溶液,在 190 ~ 450 nm 进行扫描,结果槲皮素在 372, 295, 256, 203 nm 处有最大吸收;山柰素在 366, 266, 198 nm 处有最大吸收。根据 2 种成分的吸收情况并参考文献[10-11],以 360 nm 作为检测波长。

表 2 样品中槲皮素与山柰素含量测定 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

No.	产地	槲皮素	山柰素
1	安徽	0.817 2	0.102 9
2	河南	0.432 7	0.068 8
3	安徽	1.119 7	0.213 4
4	河南	0.102 1	0.019 3
5	安徽	0.423 1	0.055 6
6	安徽	0.538 3	0.078 7
7	山东	1.007 1	0.248 8
8	山东	0.582 4	0.066 5

黄酮类化合物常用的定量分析方法^[12]有比色法、紫外分光光度法、薄层扫描法和高效液相色谱法,现多采用高效液相色谱法。测定槲皮素和山柰素常用的流动相有不同比例的乙腈-0.1% 甲酸溶液^[13]、甲醇-水^[14]及甲醇-0.4% 磷酸溶液^[10]。其中以甲醇-0.4% 磷酸溶液最为常用,故本实验采用甲醇-0.4% 磷酸溶液(50:50)作为流动相,分离效果较好。

酸水解提取槲皮素和山柰素的方法有先用溶剂提取,提取液加盐酸进行水解^[15-16]和直接加入溶剂与一定量的盐酸进行水解^[17-18]。本实验对两种方法进行了比较,结果无明显差异,因此采用了较为简便的后一种方法,并对加入盐酸的量和提取时间进行了考察,确定了本实验的提取条件。

[参考文献]

- [1] Rahman S, Fukamiya N, Okano M. Anti-tuberculosis activity of quassinoids[J]. Chem Pharm Bull, 1997, 45(9):1527.
- [2] 沈逸萍. 凤眼草体外抗菌实验研究[J]. 时珍国医国药, 1999, 10(7):499.
- [3] 赵春超, 邵建华, 王金辉, 等. 凤眼草的化学成分[J]. 中草药, 2006, 37(12):1768.
- [4] 赵春超, 王金辉, 李文, 等. 凤眼草的化学成分研究[J]. 中国药物化学杂志, 2003, 13(4):211.
- [5] 赵春超, 邵建华, 张玉伟, 等. 凤眼草的化学成分的

分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(10):800.

- [6] 宋家玲, 杨永健, 李强, 等. 多甲氧基黄酮类化合物研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17):308.
- [7] 郑楚, 唐金良, 杨冬业, 等. 罗汉果总黄酮对实验性糖尿病大鼠的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22):194.
- [8] 王艳芳, 王新华, 朱宇同. 槲皮素药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(2):171.
- [9] Zvrko E, Mikic A, Vuckovic L, et al. Prognostic relevance of CD105-assessed microvessel density in laryngeal carcinoma[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2009, 141(4):478.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:204.
- [11] 李慧, 许亮, 徐保利, 等. HPLC 测定地锦草中没食子酸、槲皮素及山柰素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7):100.
- [12] 涂华, 陈碧琼, 张燕军. 天然类黄酮物质的提取工艺研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6):277.
- [13] 潘馨, 陈森鸿. HPLC 法测定土荆芥中槲皮素和山柰素的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(9):1500.
- [14] 孟建升, 蒋俊春, 周晓. HPLC 测定蛭芎活血丸中山柰素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20):109.
- [15] 孟建升, 蒋俊春, 周晓. HPLC 测定蛭芎活血丸中山柰素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20):109.
- [16] 朱晓勤, 彭水梅, 吴锦忠. HPLC 测定截叶铁扫帚不同要用部位中槲皮素、山柰素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10):80.
- [17] 李永宏. HPLC 测定百蕊颗粒中山柰素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):97.
- [18] 刘燕, 唐铁鑫. 野牡丹中槲皮素的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12):85.

[责任编辑 顾雪竹]