

• 方药研究 •

高效液相色谱法测定地稔中芦丁和槲皮素的含量*

何 艳¹, 胡小祥², 张 辉^{1△}

(1. 湘南学院药学院, 湖南 郴州 423000; 2. 郴州市食品药品检验检测中心, 湖南 郴州 423000)

摘要: 目的 建立地稔药材中芦丁和槲皮素的含量测定方法。方法 采用高效液相色谱法测定, 色谱柱为 SERVO PT-C₁₈(250mm×4.6mm, 5μm); 流动相为甲醇(A)-0.2%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱 0~28min, 31% A; 28~28.1min, 31%A~44% A; 28.1~45min, 44% A; 检测波长 255nm, 流速 1.0mL·min⁻¹, 柱温 35℃, 进样量 10μL。结果 芦丁在 10.35~82.80μg·mL⁻¹($r=0.9998$), 槲皮素在 4.05~32.40μg·mL⁻¹($r=0.9997$)呈良好的线性关系。芦丁的平均加样回收率为 91.09%(RSD=0.87%), 槲皮素的平均加样回收率为 93.97%(RSD=1.00%), 3 批样品芦丁和槲皮素的含量分别为 0.857~0.933mg·g⁻¹, 0.306~0.333mg·g⁻¹。结论 该方法简便、准确、重现性好, 可用于地稔药材中芦丁和槲皮素的含量测定。

关键词: 地稔; 芦丁; 槲皮素; 含量测定; HPLC

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2016)05-0011-03

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.05.003

地稔为野牡丹科植物地稔(*M.dodecandrum* Lour.)的全草, 又名山地稔、地葡萄等。分布于湖南、广东、江苏、浙江、福建、贵州等地区。临床用于治疗高热、肿痛、咽喉肿痛、牙痛、赤白血痢疾、黄疸、水肿、痛经^[1]。研究表明, 地稔含有多糖、黄酮类、氨基酸、等多种化学成分, 其主要含槲皮素、芦丁、山奈酚等黄酮类化合物^[2-8]。现代药理研究地稔具有降血糖、抗氧化及镇痛抗炎等作用^[9-11]。芦丁具有镇痛、抗氧化作用^[12-13]; 槲皮素具有平喘、降低血压、调血脂等作用^[14]。因此, 地稔中芦丁、槲皮素含量测定的研究, 以期能为地稔的质量控制和进一步开发提供依据。

1 仪器与试剂

Waters e2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), AUW-220D 电子天平(岛津公司, 感量: 0.01mg), 恒温水浴锅(北京市光明医疗仪器有限公司)。

地稔药材 [分别采自郴州市湘南学院后山, 阴干, 经湘南学院药学院何艳老师鉴定为野牡丹科植物地稔(*Melastoma dodecandrum* Lour.)]; 芦丁对照品(中国药品生物制品研究所, 批: 100080-200707,

含量: 90.5%)和槲皮素对照品(中国食品药品鉴定研究院, 批: 100081-200907, 含量: 96.5%)。甲醇为色谱纯, 其余试剂、试药均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 SERVO PT-C₁₈ (250mm×4.6mm, 5μm); 流动相为甲醇(A)-0.2%磷酸溶液(B), 梯度洗脱: 0~28min, 31% A, 28~28.1min, 31%A→44% A, 28.1~45min, 44% A, 检测波长 255nm; 流速 1.0mL·min⁻¹, 柱温 35℃。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取芦丁、槲皮素对照品, 置于 100mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶液定容至刻度, 得芦丁、槲皮素的混合对照品储备溶液(分别为 103.54μg·mL⁻¹、40.52μg·mL⁻¹)

2.3 供试品溶液的制备

取地稔药材(批号: 160327), 粉碎、过三号筛。取粉末约 2g(同时测定水分), 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入甲醇: 15% HCl(4: 1)混合溶液^[15]50mL, 称定重量, 水浴回流 1h, 放冷至室温, 再称定重量,

* 基金项目: 湘南学院科研项目([2014]79 号-2014XJ53); 湖南省教育厅科学研究重点项目(14A134)

收稿日期: 2016-07-25

作者简介: 何艳(1985-), 女, 湖南邵阳人, 助理实验师, 研究方向: 中药药物分析及质量控制。

△通信作者: 张辉, E-mail: 526378710@qq.com

用提取溶剂补足减失的重量,摇匀,滤过,滤液过 0.45 μm 滤膜,即得。

2.4 水分的测定

分别取地稔药材(批号:160327、160402、160403)粉末约 3g,精密称定,参照《中国药典》2010 版附录 IX H 第一法测定^[10]水分。3 批地稔药材的水分含量分别为 13.5%、13.1%和 13.4%。

2.5 系统适应性实验

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液 10 μL ,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图,结果见图 1。由实验结果可知,在该色谱条件下,芦丁、槲皮素与其他成分可达到基线分离,且分离度均>1.5,具有良好的分离效果。

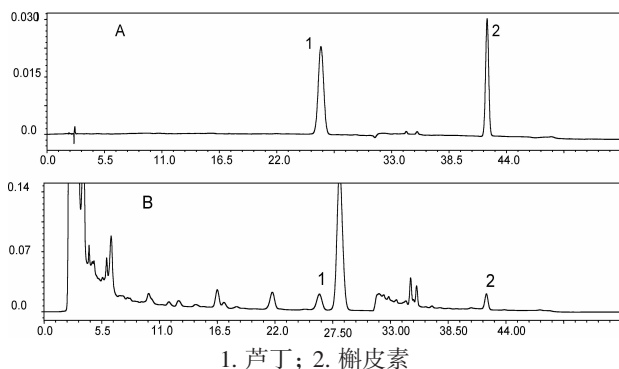


图 1 混合对照品(A)和地稔供试品(B)溶液的 HPLC 图

2.6 线性关系考察

分别精密量取混合对照品溶液 1、2、4、5、6、8mL 于 10mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪中,测定其峰面积。以进样浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线,其标准曲线方程及线性相关系数见表 1。

表 1 芦丁、槲皮素线性回归方程

成分	线性回归方程	变异系数(r)
芦丁	$A=20801C-44263$	0.9998
槲皮素	$A=40052C-24148$	0.9997

2.7 精密度试验

精密吸取混合对照品储备溶液 5mL 于 10mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,吸取 10 μL ,注入液相色谱仪中,连续进样 6 次,测得其峰面积并计算,芦丁和峰面积槲皮素的 RSD 分别为 0.23%($n=6$),0.34%($n=6$);结果表明方法的精密度良好。

2.8 稳定性试验

精密吸取供试品溶液 10 μL ,分别在 0、2、6、12、

18、24h 依次进样,测定其峰面积并计算,芦丁和槲皮素峰面积的 RSD 分别为 0.72%($n=6$),0.99%($n=6$);结果表明供试品溶液 24h 内稳定性良好。

2.9 重复性试验

精密称取同一批地稔(批号:160327)粉末 6 份,照“2.3”项下制备,得供试品溶液,进样 10 μL ,测定峰面积,按干燥品计算其含量,芦丁和槲皮素的含量分别为 0.93mg $\cdot\text{g}^{-1}$,0.32mg $\cdot\text{g}^{-1}$,RSD 分别为 0.87%($n=6$),1.44%($n=6$)。

2.10 加样回收率试验

取已知含量的地稔药材(批号:160327)6 份,各约 2g,精密称定,置具塞锥形瓶中,按表 2 分别加入芦丁、槲皮素对照品,按“2.3”项下方法,制备供试品溶液,进样 10 μL ,测定芦丁和槲皮素含量,计算回收率,结果芦丁平均回收率 91.09%,RSD=0.87%,槲皮素平均回收率 93.97%,RSD=1.00%。

表 2 芦丁和槲皮素加样回收率试验结果

组分	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%
芦丁	1.61	1.31	2.81	91.60
	1.57	1.31	2.76	90.04
	1.53	1.31	2.74	92.37
	1.62	1.31	2.81	90.84
	1.56	1.31	2.74	90.08
	1.55	1.31	2.74	90.84
槲皮素	0.55	0.58	1.10	94.83
	0.54	0.58	1.09	94.83
	0.53	0.58	1.07	90.10
	0.56	0.58	1.10	90.10
	0.54	0.58	1.09	94.83
	0.57	0.58	1.07	90.10

2.11 含量测定

取不同批号的样品粉末(阴干,过三号筛)约 2g,各 3 份,精密称定,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别吸取供试品溶液各 10 μL ,进样,测定峰面积,计算含量(按干燥品计算),结果见表 3。

表 3 含量测定结果($n=3$)

批号	成分	含量/(mg $\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/%
160327	芦丁	0.933 $\pm$ 0.008	0.87
	槲皮素	0.315 $\pm$ 0.005	1.44
160402	芦丁	0.857 $\pm$ 0.006	0.67
	槲皮素	0.306 $\pm$ 0.006	1.88
160403	芦丁	0.907 $\pm$ 0.006	0.64
	槲皮素	0.333 $\pm$ 0.006	1.73

3 讨论

采用 PDA 检测器分别对芦丁对照品溶液、槲皮素对照品溶液在波长 190~400nm 进行紫外扫描,结果显示芦丁在波长 255,355nm 处有最大吸收,槲皮素在波长 256,375nm 处有最大吸收,综合考虑本文选用 255nm 作为检测波长。曾选用甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.2%磷酸溶液作为流动相进行试验,芦丁和槲皮素的分离度较差。经对比采用此色谱条件,芦丁、槲皮素与其他组分色谱峰得到较好的分离。采用纯甲醇作为提取溶剂与甲醇:15%HCl(4:1)混合溶液提取溶剂进行对比,发现采用混合溶液作为提取溶剂对芦丁和槲皮素的提取率远远大于纯甲醇作为提取溶剂的提取率;同时,采用甲醇:15%HCl(4:1)混合溶液作为提取溶剂时,对比回流提取和超声提取两种提取方式,结果显示地稔中芦丁和槲皮素的得率,回流提取高于超声提取。

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(第5册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:678-680.
- [2] 张超,方岩雄. 中药地稔黄酮类成分的分离与鉴定[J]. 中国药理学杂志,2003,38(4):256-258.
- [3] 唐迈,廖宝珍,林媛,等. 地稔的化学成分研究[J]. 中草药,2008,39(8):1149-1150.
- [4] 张超,陈志成,姚慧珍,等. 地稔水溶性多糖 MD1 的分离纯化及组成分析[J]. 广州医学院学报,2002,30(2):21-23.
- [5] 石冬梅,刘剑秋,陈炳华. 地稔果实营养成分研究[J]. 福建

师范大学学报(自然科学版),2000,16(3):70-71.

- [6] 麻秀萍,张明昶,徐文芬,等. 黔产地稔药材中没食子酸和芦丁含量的测定与评价[J]. 贵州农业科学,2012,40(4):59-61.
- [7] 程淼,孟令杰,周兴栋,等. 地稔中黄酮及其苷类化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(17):3301-3304.
- [8] 曾荣香,张清华,管咏梅,等. 柱前衍生化高效液相色谱法测定地稔多糖中单糖组成[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(10):73-76.
- [9] 李丽,罗泽萍,周焕第,等. 瑶药地稔不同提取部位的降血糖活性研究[J]. 中成药,2014,36(5):1065-1068.
- [10] 周芳,张兴桑,张旖箫,等. 地稔水煎液镇痛抗炎药效学的实验研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(10):2370-2371.
- [11] 张超,姚惠珍,徐兰琴,等. 地稔多糖 MD1 清除活性氧自由基及对人红细胞膜脂质过氧化作用影响的研究[J]. 广州医学学报,2002,30(4):18-20.
- [12] 臧志和,曹丽萍,钟玲. 芦丁药理作用及制剂的研究进展[J]. 医药导报,2007,26(7):758-760.
- [13] 艾凤伟,李诗莹,成效天,等. 芦丁制剂的研究新进展[J]. 中成药,2012,34(7):1347-1350.
- [14] 刘敏,余乐,李水福,等. 畚药地稔不同时间、部位的没食子酸和槲皮素含量测定[J]. 中国现代应用药学,2014,31(11):1351-1353.
- [15] 刘敏,李水福,程科军. HPLC 法测定畚药地稔药材中没食子酸和槲皮素[J]. 中草药,2012,43(4):721-723.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,附录 52.

(编辑:徐建平)

Determination of Rutin and Quercetin in Melastoma Dodecandrum by HPLC

HE Yan¹, HU Xiaoxiang², ZHANG Hui¹

(1. School of Pharmacy Xiangnan University, Chenzhou 423000, China;
2. Chenzhou Institute Center for Food and Drug Control, Chenzhou 423000, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish a method for the determination of rutin and quercetin in Melastoma dodecandrum by HPLC. **Methods** The chromatographic conditions were as follows:with the SERVO PT-C₁₈ column (250mm×4.6mm, 5μm) as chromatographic column, methanol (A)-0.2% phosphoric acid (B) as mobile phase, gradient elution: 0~28min, 31% A; 28~28.1min, 31%A~44% A; 28.1~45min, 44% A, 255nm as the detection wavelength, 35℃ as the column temperature, 1.0mL·min⁻¹ as the flow rate. **Results** The good linear range for rutin was 10.35~82.80μg·mL⁻¹ ($r=0.9998$) and for quercetin was 4.05~32.40μg·mL⁻¹ ($r=0.9997$). The average recovery was 91.09%(RSD=0.87%) for rutin and 93.97%(RSD=1.00%) for quercetin. The content range of rutin and quercetin was 0.857~0.933mg·g⁻¹, 0.306~0.333mg·g⁻¹ in 3 batches of herbs, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and repeatable, and it is suitable for content determination of rutin and quercetin in Melastoma dodecandrum.

KEY WORDS: Melastoma dodecandrum; rutin; quercetin; content determination; HPLC