

研究论文

木中槲皮素、山奈酚和杨梅素含量的高效液相色谱法测定

游璐茜¹ 吴振² 赵玉芬^{*1,2}⁽¹⁾厦门大学化学化工学院; ⁽²⁾厦门大学医学院 厦门 361005

摘要 建立了同时测定木中槲皮素、山奈酚和杨梅素含量的反相高效液相色谱测定方法, 色谱柱为 UltimateTM XB-C18(150mm×4.6mm, 5 μ m), 流动相是体积比为 32:68 的乙腈 0.4% 磷酸, 淋洗速度 1.0 mL/min, 检测波长 360nm, 对 3 种样品的线性工作范围均为 0.072~2.16(μ g) ($R^2=0.9999$), 平均加样回收率 ($n=6$) 分别为 99.1%、97.0% 和 97.9%, 回收率测定标准偏差分别为 1.45%、1.38% 和 2.04%。所建方法稳定可靠, 可用于木的质量控制。

关键词 木 槲皮素 山奈酚 杨梅素 反相高效液相色谱测定

Simultaneous Determination of Quercetin, Kaempferol and Myricetin in *Loropetalum chinense* (*R. Brown*) *Oliv.* by High Performance Liquid Chromatography

You Luqian¹, Wu Zhen², Zhao Yufen^{*1,2}⁽¹⁾College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University;⁽²⁾Medical College of Xiamen University, Xiamen University, Xiamen 361005

Abstract A method based on reversed phase high performance liquid chromatography was developed to simultaneously determine the content of Quercetin, Kaempferol and Myricetin in the *Loropetalum chinense* (*R. Brown*) *Oliv.* UltimateTM XB-C18(150mm×4.6mm, 5 μ m) column was used and eluted at 25 °C with a mobile phase of acetonitrile and 0.4% phosphoric acid (32:68, *v/v*) at a flow rate of 1.0 mL/min. The calibration curves were constructed between peak area measured at 360 nm and the injected quantity, giving a linear working range of 0.072 ~ 2.16(μ g) ($R^2=0.9999$) for all the three analytes. The spiked recoveries ($n=6$) were 99.1%, 97.0% and 97.9% with RSD of 1.45%, 1.38% and 2.04%, respectively. This method is considered to be stable, accurate, reproducible and suitable for quality control of *Loropetalum chinense* (*R. Brown*) *Oliv.*

Keywords *Loropetalum chinense* (*R. Brown*) *Oliv.*, Quercetin, Kaempferol, Myricetin, RP-HPLC

木(*Loropetalum chinense* (*R. Brown*) *Oliv.*, 表格中简称为 *L. chinense*) 为金缕梅科金缕梅属植物, 收载于《中国药典》1977 年版(一部)^[1], 以根、叶和花入药, 其中, 木叶具有止血、止泻、止痛、生肌的效力, 用于子宫出血、腹泻、烧伤和外伤出血的治疗。资源初步调查的结果表明, 木在我国许多省市都有大面积的种植, 在皖、苏、浙、赣、湘、鄂、川、黔、闽、粤、桂、滇都有着丰富的资源。而同属的红花木(*Loropetalum chinense* (*R. Br.*) *Oliv. var. rubrum* Yeh, 表格中简称为 *L. chinense var. rubrum*), 也在这些地区有着大量的野生资源, 可见木这一民间药材的开发潜力相当大。

目前关于木中有效成分的研究报道非常少, 且仅限于木花叶中的没食子酰黄酮甙和没食子丹宁的报道^[2] 以及木叶中槲皮素的含量测定^[3]。槲皮素(Quercetin)及其衍生物是植物界分布最广泛的黄酮类化合物, 是最强的抗癌剂之一, 对肿瘤有化学预防和治疗双重作用, 对多种致癌剂、促癌剂有拮抗作用, 且可以抑制多类恶性肿瘤细胞的生长^[4]。然而, 笔者在对木中的有效成分进行分离鉴定后, 发

现 木中还含有另外两种黄酮类化合物-山奈酚(Kameferol, 学名: 4, 5, 7-二羟黄酮醇)和杨梅素(Myricetin), 以及其他一些多酚类化合物。山奈酚有着逆转肿瘤细胞多药耐药作用、对神经细胞的保护作用以及对蛋白激酶的抑制作用等^[4]; 而杨梅素则是能起到降血糖和对血小板活化因子拮抗的作用^[5,6]。因此, 仅仅测定 木中的槲皮素含量, 并不能代表 木中黄酮的含量, 也未能在开发 木这一民间药用资源的过程中有效地进行质量控制。为此, 本文采用了反相高效液相色谱(RP-HPLC), 建立了同时测定 木中槲皮素、山奈酚和杨梅素含量的新方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(自动进样器, 四元泵, 柱温箱, DAD 检测器, Agilent Chemstation 数据处理系统, Agilent 公司, 美国); Ultimate™ XB-C18(150mm × 4.6mm, 5μm) 色谱柱; 高速药物粉碎机 wk-600A(上海新诺仪器设备有限公司, 上海精胜仪器厂); 电热恒温鼓风干燥箱 DHG-9240A(上海精宏实验设备有限公司); 电热恒温水浴锅 HWS-12(上海一恒科技有限公司); 电子天平(METTLER-TOLEDO 仪器有限公司, 瑞士); 3 号筛(355μm, 50 目, 上海东方药品科技实业有限公司)。

木采于福建省三明市建宁县。乙腈(色谱醇)购自美国 Tedia 公司。甲醇(分析纯)为汕头市达濠精细化学品有限公司出品。磷酸(85%, 分析纯)购于上海联合化工厂。盐酸(36~38%, 分析纯)为汕头市西陇化工厂有限公司产品。水为自制重蒸水。槲皮素(批号: 10008±200406)、山奈酚(批号: 11086±200808)来自中国药品生物制品检定所。杨梅素自制, 由 NMR 鉴定结构, HPLC 分析后确定纯度大于 98%。

1.2 色谱条件

色谱柱: Ultimate™ XB-C18(150mm × 4.6mm, 5μm); 流动相: 乙腈-0.4% 磷酸水溶液(32: 68, 体积比); 检测波长: 360nm; 流速: 1.0ml/min; 柱温: 25 °C; 进样量: 10μL。

1.3 对照品溶液的制备

精密称取干燥的槲皮素、山奈酚和杨梅素对照品各 14.4mg, 用甲醇配成浓度分别为 0.144mg/mL 和 0.0228mg/mL 的溶液, 并于 4 °C 保存。

1.4 供试品溶液的制备^[3]

取 木叶, 粉碎后过 3 号筛, 称取粉末 1.0g, 置 100mL 圆底烧瓶中, 加入 80% 甲醇 50mL, 称重; 回流提取 1h, 取出放冷, 再称重, 以 80% 甲醇补足减失的重量, 过滤; 吸取滤液 25mL, 置 100mL 圆底烧瓶中, 加入 5% 盐酸 10mL 及甲醇 5mL, 回流 30min, 取出放冷, 转移至 50mL 量瓶中, 并用甲醇洗涤圆底烧瓶 3 次, 每次约 3mL, 一并转移至量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀; 过 0.45μm 微孔滤膜, 即得。

2 实验结果

2.1 色谱分离效果

图 1 和图 2 示出了在 1.2 节所述色谱条件下的分离效果。

2.2 线性关系的考察

分别吸取浓度为 0.0228mg/mL 的槲皮素、山奈酚和杨梅素对照品溶液 2.5、5、10、15、20、25、75μL, 注入液相色谱仪, 测定其峰面积。以槲皮素、山奈酚和杨梅素的进样量(μg) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。回归方程分别为:

$$\text{槲皮素: } Y = 2.82 \times 10^3 X - 1.99 (R^2 = 0.9999)$$

$$\text{山奈酚: } Y = 2.85 \times 10^3 X + 0.614 (R^2 = 0.9999)$$

$$\text{杨梅素: } Y = 3.02 \times 10^3 X - 0.0866 (R^2 = 0.9999)$$

结果表明槲皮素、山奈酚、杨梅素在 0.072~2.16(μg) 的范围内均具有良好的线性关系。

2.3 精密度试验

分别精密吸取浓度为 0.0228mg/mL 的槲皮素、山奈酚和杨梅素对照品溶液各 10μL, 分别重复进样 6 次, 峰面积的 RSD 分别为 0.30%、0.27% 和 0.36%。由以上数据表明本方法精密度良好。

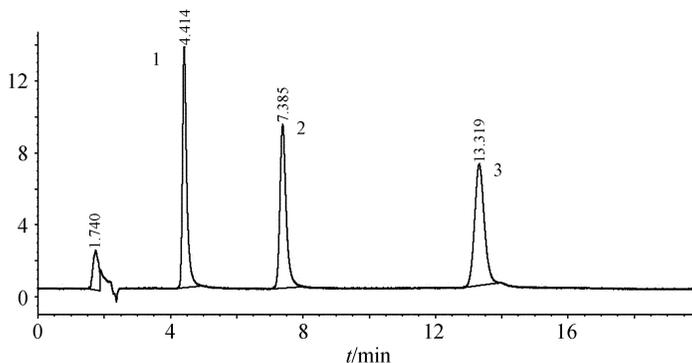


图1 对照品槲皮素、山奈酚和杨梅素的 HPLC 图谱

Fig. 1 Chromatogram for reference substance of Quercetin, Kaempferol and Myricetin

1. 杨梅素(Myricetin); 2. 槲皮素(Quercetin); 3. 山奈酚(Kaempferol)

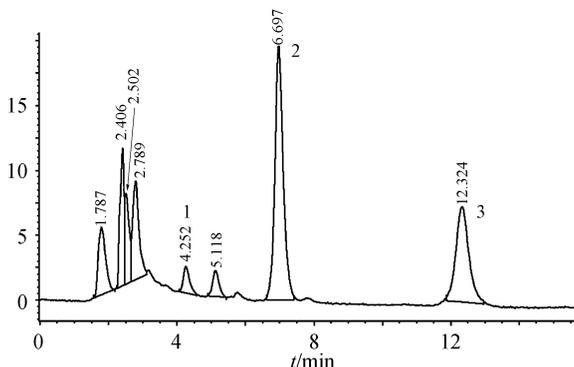


图2 木叶提取样品的 HPLC 图谱

Fig. 2 chromatogram for the extract of Loropetalum chinense(R. Brown) Oliv.

1. 杨梅素(Myricetin); 2. 槲皮素(Quercetin); 3. 山奈酚(Kaempferol)

2.4 重复性试验

取同一批 木叶, 粉碎后过 3 号筛, 精密称定药品粉末 6 份, 每份约 1.0 g, 按 1.4 节所示方法制备样品溶液, 进行槲皮素、山奈酚和杨梅素的含量测定。结果见表 1。

表 1 重复性试验结果

Tab. 1 Results of the repeatability test

对照品	测出含量/ %						平均含量/ %	RSD/ %
	1	2	3	4	5	6		
槲皮素	0.180	0.181	0.172	0.179	0.173	0.181	0.178	2.1
山奈酚	0.121	0.126	0.116	0.121	0.116	0.122	0.120	2.9
杨梅素	0.0110	0.0117	0.0113	0.0113	0.0111	0.0116	0.0113	2.2

由以上数据得出槲皮素、山奈酚和杨梅素的 RSD 分别为 2.1%、2.9% 和 2.2%, 表明本方法具有较好的重复性。

2.5 稳定性试验

取同一批 木叶的供试品溶液, 每隔 1h 进样 1 次, 连续进样 12 次, 每次 10 μ L。结果表明, 槲皮素和山奈酚在 12h 内稳定, 其峰面积的 RSD 分别为 0.29%、0.84%。而杨梅素在 10h 内稳定, 其峰面积的 RSD 为 2.2%。

2.6 回收率试验

取已知含量(槲皮素、山奈酚、杨梅素的含量分别为 0.178%、0.120%、0.0113%)的 木叶, 粉碎后过 3 号筛, 精密称定 6 份, 每份约 0.5g, 置 100mL 圆底烧瓶中, 分别精密加入槲皮素对照品溶液

(0.144mg/mL) 1.89mL 2 份, 2.60mL 2 份, 3.10mL 2 份; 山奈酚对照品溶液(0.144mg/mL) 0.96mL 2 份, 1.10mL 2 份, 1.15mL 2 份; 杨梅素对照品溶液(0.144mg/mL) 0.16mL 2 份, 0.20mL 2 份, 0.24mL 2 份, 水浴挥干, 按 1.4 节所述方法制备供试品溶液, 按 1.2 节所述色谱条件测定槲皮素、山奈酚和杨梅素的含量, 计算回收率, 结果(表 2~ 表 4) 分别为: 槲皮素的平均回收率为 99.1%, RSD= 1.45%; 山奈酚的平均回收率为 97.0%, RSD= 1.38%; 杨梅素的平均回收率为 97.9%, RSD= 2.04%。上述结果表明本方法可以满足 木中 3 个指标含量测定的要求。

表 2 槲皮素回收率试验结果

Tab. 2 Results of the Recovery Experiments of Quercetin

	称取样品 /g	样品中的量 /mg	加入对照品 /mg	总测得量 /mg	回收率 /%	平均回收 率 %	RSD /%
1	0.5004	0.889	0.272	1.16	99.6	99.1	1.45
2	0.5005	0.889	0.272	1.16	99.6		
3	0.5116	0.909	0.374	1.28	99.2		
4	0.5115	0.909	0.374	1.28	99.2		
5	0.5010	0.890	0.446	1.32	96.4		
6	0.4901	0.871	0.446	1.32	100.7		

表 3 山奈酚回收率试验结果

Tab. 3 Results of the Recovery Experiments of Kaempferol

	称取样品 /g	样品中的量 /mg	加入对照品 /mg	总测得量 /mg	回收率 /%	平均回收 率 %	RSD /%
1	0.5004	0.603	0.138	0.734	94.9	97.0	1.38
2	0.5005	0.603	0.138	0.738	97.8		
3	0.5116	0.616	0.158	0.771	98.1		
4	0.5115	0.616	0.158	0.771	98.1		
5	0.5010	0.603	0.166	0.762	95.8		
6	0.4901	0.590	0.166	0.751	97.0		

表 4 杨梅素回收率试验结果

Tab. 4 Results of the Recovery Experiments of Myricetin

	称取样品 /g	样品中的量 /mg	加入对照品 /mg	总测得量 /mg	回收率 /%	平均回收 率 %	RSD /%
1	0.5004	0.0566	0.0230	0.0792	98.3	97.9	2.04
2	0.5005	0.0567	0.0230	0.0792	97.8		
3	0.5116	0.0579	0.0288	0.0851	94.4		
4	0.5115	0.0579	0.0288	0.0868	100.3		
5	0.5010	0.0567	0.0346	0.0904	97.4		
6	0.4901	0.0555	0.0346	0.0898	98.1		

2.7 样品测定

按拟定的含量测定方法测定了白花 木的树叶、红花 木的树枝、花朵中的槲皮素、山奈酚和杨梅素的含量, 按外标法计算, 结果见表 5。

表5 样品测定结果($n=3$)Tab. 5 Results of the Samples Detection($n=3$)

品种	提取部位	槲皮素的含量/%	槲皮素的RSD/%	山奈酚的含量/%	山奈酚的RSD/%	杨梅素的含量/%	杨梅素的RSD/%
白花木	树叶	0.180	0.56	0.121	0.34	0.0112	1.05
红花木	树枝	0.0347	0.17	0.0384	0.40	0.0199	0.87
	花朵	0.125	2.02	0.0328	2.03	0.0487	0.43

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

使用不同厂家生产的不同型号的色谱柱对木样品溶液中槲皮素、山奈酚和杨梅素等3个成分的分离效果表明,以Ultimate™ XB-C18(150mm×4.6mm, 5 μ m)色谱柱的分离效果最好,因此采用其来进行测定。

3.2 流动相的选择

采用酸性流动相,可有效提高柱效,减少槲皮素、山奈酚和杨梅素的色谱峰拖尾。因此实验中考察了不同浓度的磷酸水溶液的分离效果,其中以0.4%磷酸水溶液的分离效果最佳。同时,当“甲醇-水”体系和“乙腈-水”体系流动相洗脱能力相差不大时,“甲醇-水”体系的泵压很大,而“乙腈-水”体系的泵压适当。通过对不同体积比的分离效果的比较,发现以使用由乙腈:0.4%磷酸=32:68所组成的流动相的分离效果最佳。

3.3 供试品溶液制备方法的选择

实验中对超声波萃取法、冷浸法和回流提取法分别进行了考察,发现采用回流提取的方法能获得较高的提取效率,并且提取出来的有效成分具有较好的线性关系、稳定性和重复性。随后比较了回流提取时间为1、2和3h时的提取效率,发现回流时间超过1h时,3个成分的含量不再明显增加,故本实验选择回流时间为1h。实验还发现以5%盐酸水解30min效果最好。综合考虑,最终确定用80%甲醇回流提取1h以及5%盐酸水解30min的方法来制备供试品溶液。

采用以上所考察的分离条件和供试品溶液制备方法测定了木中槲皮素、山奈酚和杨梅素的含量:在重复性试验中,这3种成分的RSD分别为2.1%、2.9%和2.2%;在回收率试验中,这3种成分的RSD分别为1.45%、1.38%和2.04%。可见我们所采用的分离条件和样品溶液制备方法较为适合,并且能更有效地对木这一民间药用资源的开发进行质量控制。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 1977: 528~529.
- [2] 刘延泽, 吴养洁, 袁珂等. 天然产物研究与开发, 1997, 9(3): 12~18.
- [3] 李雪晶, 高叶, 周小江. 湖南中医药大学学报, 2008, 28(2): 46~50.
- [4] 张文志, 周新, 赵学增. 中国误诊学杂志, 2007, 7(22): 5219~5220.
- [5] 钟正贤, 陈学芬, 周桂芬等. 中国现代应用药学杂志, 2003, 20(6): 466~468.
- [6] 臧宝霞, 金鸣, 吴伟等. 药学学报, 2003, 38(11): 831~833.

游璐茜

1983年10月生于福建漳州
2006年毕业于四川大学本科
现系厦门大学化学化工学院硕士生
从事天然药物化学方面的研究
Email: maggie_0_yuan@163.com



赵玉芬

1975年获美国纽约州立大学石溪分校化学博士
中国科学院院士, 厦门大学医学院药理学系主任
长期从事生命有机化学、有机磷化学、生命起源、药物化学、化学生物学研究
Email: yfzhao@xmu.edu.cn

