

HPLC法测定委陵菜中黄酮类成分的含量

申东月^{1,2}, 朴淑娟², 林厚文², 汤真³, 张恒弼³ (1. 延边大学医学部, 吉林 延吉 133000; 2. 第二军医大学长征医院药部, 上海 200003; 3. 中国人民解放军第 208 医院, 吉林 长春 130061)

摘要 目的:建立 HPLC法测定委陵菜中槲皮素、翻白叶苷 A 和芹菜素含量的方法。方法:色谱柱为 ZORB-AXSB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.3%磷酸水溶液 (51:49); 检测波长为 360 nm; 流速为 0.9 mL/min。结果:槲皮素、翻白叶苷 A 和芹菜素的进样量分别在 0.72~10.08 μg/mL、0.86~12.04 μg/mL 和 0.54~7.56 μg/mL 范围内与其峰面积呈良好的线性关系, 线性系数均为 0.999 9, 平均回收率分别为 95.37%、96.87%、97.66%, RSD 分别为 1.79%、1.63%、2.08%, 药材中三中黄酮的含量分别为 100.0 μg/g、323.0 μg/g 和 55.0 μg/g。结论:该方法快速、简便、可靠, 适用于委陵菜中黄酮类成分的含量测定。

关键词 HPLC; 委陵菜; 槲皮素; 翻白叶苷 A; 芹菜素

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2009)01-0063-03

Determination of flavonoids in *Potentilla chinensis* ser by HPLC

SHEN Dong-yue^{1,2}, PAO Shu-juan², LIN Hou-wen², TANG Zhen³, ZHANG Heng-bi³ (1. Health Science Center, Yanbian University, Yanji 133000, China; 2. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 3. 208th hospital of PLA, Changchun 130061, China)

ABSTRACT Objective: To develop a HPLC method to determine the content of 3 flavonoids in *Potentilla chinensis* ser. **Methods:** ZORBAX SB-C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used, and the mobile phase was methanol-0.3% Phosphoric acid (51:49) with the flow rate of 0.9 mL/min and the detection wavelength at 360 nm. **Results:** The linear ranges of quercetin, potengriffioside A and apigenin were 0.72~10.08 μg/mL, 0.86~12.04 μg/mL and 0.54~7.56 μg/mL, respectively ($r = 0.9999$); the average recovery was 95.37%, 96.87% and 97.66%, the RSD was 1.79%, 1.63% and 2.08%, respectively; the content of these three flavonoids in the herb was 100 μg/g, 323 μg/g and 55 μg/g, respectively. **Conclusion:** This method is fast, and reliable convenient, which refers to the assay of flavonoids in *Potentilla chinensis*.

KEY WORDS HPLC; *Potentilla chinensis* ser; quercetin; potengriffioside A; apigenin

委陵菜又名白头翁、天青地白,为蔷薇科委陵菜属植物 *Potentilla chinensis* Ser 的干燥全草,多年生草本。具有清热解毒、凉血止痢等功效,用于赤痢腹痛、久痢不止、痔疮出血、痈肿疮毒,是被 2005 年版《中国药典》收录的唯一一种委陵菜属植物^[1]。委陵菜中主要含有黄酮、三萜和甾醇类化合物,槲皮素、翻白叶苷 A 和芹菜素是作者在前期研究中分离得到的成分^[2-4]。本实验采用 HPLC 法同时测定委陵菜中槲皮素、翻白叶苷 A 和芹菜素的含量,方法快速、简便、可靠,为委陵菜产品的开发及质量评定提供参考。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司),

包括 600 泵,996 二极管阵列检测器,Millennium32 数据处理系统;DZF-1 型真空干燥箱 (上海医用恒温设备厂);AE240 电子分析天平 (瑞士梅特勒-托利多仪器上海有限公司);SB-2200 型超声波清洗器 (上海 Branson 超声波仪器厂);槲皮素、翻白叶苷 A 和芹菜素对照品为本实验室自制,纯度均为 98% 以上;甲醇为色谱纯;磷酸为分析纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.3%磷酸水溶液 (51:49); 紫外检测波长: 360 nm; 流速: 0.9 mL/min; 进样体积: 20 μL。

2.2 供试品溶液的配制 精密称取干燥粉碎的委陵菜粉末 (60 目) 1.0 g, 加入石油醚 50 mL, 水浴回流 30 min, 过滤, 弃去石油醚, 药渣挥干。药渣加甲

基金项目: 上海-SK 研究与发展基金 (2003010-t)。

作者简介: 申东月 (1982-), 女 (朝鲜族), 硕士研究生。

通讯作者: 林厚文. Tel: (021) 65585154, E-mail: franklin67@126.com.

醇 50 mL 水浴回流 3 h, 冷却至室温, 转入 50 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 聚丙烯微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的配制 精密称取经 P_2O_5 干燥 24 h 的槲皮素、翻白叶苷 A、芹菜素对照品, 分别为 3.6 mg、4.3 mg、2.7 mg 置于 100 mL 容量瓶, 加甲醇 90 mL 超声溶解, 冷却至室温后甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得浓度依次为 36.0 g/mL、43.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 27.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

2.4 线性关系的考察 精密吸取对照品溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、5.0、7.0 mL 置于 25 mL 容量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 分别精密进样 20 μL , 重复进样 ($n=3$), 按 2.1 项下色谱条件测定槲皮素、翻白叶苷 A 和芹菜素的峰面积。分别以对照品浓度 X (g/mL) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线。槲皮素的线性范围为 0.72 ~ 10.08 $\mu\text{g/mL}$, 回归方程 $Y=60911X-7217.7$, $r=0.9999$; 翻白叶苷 A 的线性范围为 0.86 ~ 12.04 $\mu\text{g/mL}$, 回归方程 $Y=23399X+5152.6$, $r=0.9999$; 芹菜素的线性范围为 0.54 ~ 7.56 $\mu\text{g/mL}$, 回归方程 $Y=58530X-11782$, $r=0.9999$ 。

2.5 精密度试验 精密吸取同一对照品 20 μL , 分别在 1 d 内重复进样 5 次, 记录色谱图及峰面积积分值, 结果槲皮素 RSD 为 1.57%、翻白叶苷 A RSD 为 0.87%、芹菜素 RSD 为 1.13% ($n=5$); 另连续 5 d, 每天进样 1 次, 计算日间 RSD 分别为槲皮素 RSD 为 1.88%、翻白叶苷 A RSD 为 1.22%、芹菜素 RSD 为 2.08%。

2.6 稳定性试验 取委陵菜供试品于制备后分别放置 0、2、4、8、16、24 h, 分别精密吸取 20 μL , 注入液相色谱仪中, 按 2.1 项下条件进行测定, 计算峰面积积分值, 结果槲皮素、翻白叶苷 A、芹菜素的峰面积的 RSD 分别为 0.49%、1.25% 和 1.27%。

2.7 重现性试验 取同一批委陵菜粉末 5 份, 按 2.2 项下方法制备, 按 2.1 项下条件测定, 计算相对标准偏差。结果槲皮素、翻白叶苷 A 和芹菜素含量的 RSD 分别为 2.03%、1.19%、1.87%。

2.8 加样回收率试验 采用加样回收法, 取已知含量的委陵菜粉末 5 份, 每份各称取 1.0 g, 精密称定, 各分别加入 2.3 项下制备的对照品溶液, 槲皮素、翻白叶苷 A 和芹菜素依次为 3 mL、6 mL 和 2 mL, 按 2.2 项下方法制成供试品溶液, 按 2.1 项下进行测定。结果见表 1。

2.9 样品测定 精密称定 3 份委陵菜药材粉末 1.0 g, 按 2.2 项下方法制备, 按 2.1 项下进行测定, 峰面积积分值代入回归方程计算含量。结果槲皮素、翻白叶苷 A 和芹菜素的平均含量分别为 100.0 $\mu\text{g/g}$ 、323.0 $\mu\text{g/g}$ 和 55.0 $\mu\text{g/g}$, RSD 分别为 2.07%、0.94% 和 2.11%。对照品图与样品图分别见图 1(A) 与图 1(B)。

表 1 加样回收率测定结果 ($n=5$)

组分	样品中含量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
槲皮素	98.5	108.0	203.5	95.65	1.47
	98.5	108.0	201.5		
	98.5	108.0	202.5		
	98.5	108.0	201.0		
	98.5	108.0	200.0		
翻白叶苷 A	321.0	258.0	574.0	99.18	2.58
	321.0	258.0	584.5		
	321.0	258.0	572.0		
	321.0	258.0	583.5		
	321.0	258.0	570.5		
芹菜素	54.0	54.0	108.5	97.96	2.25
	54.0	54.0	105.5		
	54.0	54.0	107.0		
	54.0	54.0	107.5		
	54.0	54.0	106.0		

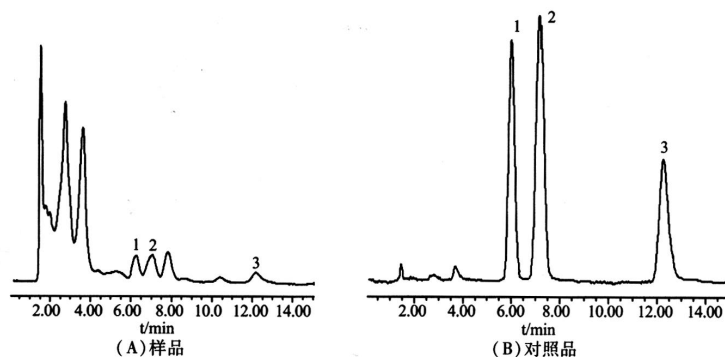


图 1 委陵菜黄酮类成分含量测定图

1 槲皮素; 2-翻白叶苷 A; 3 芹菜素

3 讨论

3.1 供试品溶液的制备采用石油醚萃取可有效除去委陵菜全草中含有的酯类成分,减少了干扰峰的出现和有效组分分离度的下降。

3.2 黄酮类化合物中的酚羟基易电离,易产生拖尾,加入适量的 H_3PO_4 能使峰形良好,为了延长柱子的寿命,本实验在确保峰形良好的前提下尽量降低了 H_3PO_4 的加入量。

3.3 实验过程中考察了不同比例的甲醇-水系统和乙腈-水系统流动相以及不同类型色谱柱的分离效果,最终流动相确定为甲醇-0.3%磷酸水溶液(51:

49),达到了成本低、分离效果好、保留时间适宜的效果。

参考文献:

- [1] 中国药典 2005年版.一部[s], 2005: 149.
- [2] 王庆贺,李志勇,沈阳,等.委陵菜三萜类化学成分研究[J].中国中药杂志,2006,31(17): 1434.
- [3] 沈阳,王庆贺,林厚文,等.委陵菜化学成分的研究[J].中药材,2006,29(3): 237.
- [4] 高雯,沈阳,张红军,等.委陵菜的化学成分研究[J].药学服务与研究,2007,7(4): 262.

收稿日期:2008-04-01

(上接第 23 页)

- [12] 张继友,李前锋,潘仲巍,等.毛细管胶束电动色谱测定大黄及复方制剂中蒽醌化合物[J].兰州大学学报:自然科学版,2003,39(3): 101.
- [13] 沈守杰,岳美娥,师彦平.市售大黄及三黄片中蒽醌类活性成分的胶束电动毛细管色谱含量测定[J].分析测试技术与仪器,2005,11(2): 90.
- [14] 尚小玉,袁倬斌.胶束电动毛细管色谱分离大黄中有效成分的研究[J].中草药,2001,32(8): 691.
- [15] 尚小玉,袁倬斌.环糊精修饰胶束电动毛细管色谱法测定大黄中有效成分[J].分析化学,2002,30(7): 853.
- [16] Shi S, Li W, Liao Y, *et al*. Online concentration of aristolochic acid I and II in Chinese medicine preparations by micellar electrokinetic chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1167(1): 120.
- [17] 曹艳,黄必胜,王平,等.胶束电动毛细管色谱法测定半夏等药材中苯甲酸的含量[J].时珍国医国药,2006,17(10): 1896.
- [18] 赵新峰,孙毓庆.胶束电动毛细管色谱法测定牡丹皮及六味地黄丸中丹皮酚的含量[J].沈阳药科大学学报,2002,19(1): 35.
- [19] 郭涛,孙沂,隋因,等.胶束电动毛细管色谱法同时测定当归中阿魏酸和腺苷的含量[J].药物分析杂志,2003,23(5): 348.
- [20] 段建平,陈红青,潘雅玲.毛细管胶束电动色谱法同时测定丹参及其中成药中的水溶性和脂溶性成分[J].福州大学学报:自然科学版,2002,30(6): 873.
- [21] 王媛,袁倬斌.胶束电动毛细管电泳分离和测定牡蛎中的氨基酸[J].分析实验室,2003,22(5): 73.
- [22] 王勇,吴春敏,卢端萍.胶束电动毛细管电泳法测定熊胆及鸡胆、鸭胆与狗胆中胆汁酸成分[J].海峡药学,2006,18(4): 61.
- [23] 杨伟峰,赵维良.胶束电动毛细管色谱法测定西洋参中人参皂苷 R_{b1} 、 R_{c} 的含量[J].中国中药杂志,2003,28(12): 1135.
- [24] 梁生旺,王瑞,王淑美,等.胶束电动毛细管色谱法分离分析三七中的人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{c} 和三七皂苷 R_1 [J]. 药物分析杂志,2007,27(2): 183.
- [25] 王瑞,王淑美,梁生旺,等.胶束电动毛细管色谱法分离分析山茱萸中齐墩果酸和熊果酸[J].中药材,2007,30(8): 946.
- [26] 肖美添,叶静,黄雅燕,等.胶束毛细管电泳测定枇杷叶中熊果酸和齐墩果酸的含量[J].药物分析杂志,2007,27(5): 724.
- [27] 马少妹,王巧娥,李琦,等.泽泻乙醇提取物的 HPCE 分离研究[J].分析实验室,2005,24(1): 8.
- [28] Zhou L, Zhou X, Luo Z, *et al*. In-capillary derivatization and analysis of ephedrine and pseudoephedrine by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1190(1-2): 383.
- [29] 吴江明,栾连军,程翼宇.胶束毛细管电泳法同时测定黄连-吴茱萸药对中 5 种生物碱的含量[J].药物分析杂志,2006,26(3): 325.
- [30] 纳鹏君,毛学峰,陈平,等.山豆根中苦参碱和氧化苦参碱的胶束毛细管电泳法测定[J].分析测试学报,2003,22(2): 63.
- [31] 翁前锋,袁凯龙,张宏颖,等.胶束电动毛细管色谱法检测中药马齿苋中多巴胺和去甲肾上腺素[J].色谱,2005,23(1): 18.
- [32] 罗东玲,席先蓉,高言明,等.胶束电动毛细管色谱法测定戊己丸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量[J].中国中药杂志,2007,32(18): 1936.
- [33] Wang XK, He YZ, Qian LL. Determination of polyphenol components in herbal medicines by micellar electrokinetic capillary chromatography with Tween 20[J]. Talanta, 2007, 74(1): 1.
- [34] 李琦,胡广林,徐晓琴,等.胶束电动毛细管色谱法测定穿心莲中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯[J].分析化学,2003,31(4): 451.
- [35] 赵新峰,孙毓庆.胶束电动毛细管色谱法测定山茱萸中莫罗苷和番木鳖苷的含量[J].药物分析杂志,2007,27(8): 1154.
- [36] 刘海兴,米新艳,啜会民,等.胶束电动毛细管色谱法测定生脉注射液中五味子酯甲的含量[J].分析化学,2004,32(10): 1416.

收稿日期:2008-01-24