

民族药材小一点红中槲皮苷的含量测定

蒋政萌^{1,2,3}, 龚小见^{1,2,3}, 周欣^{1,2,3}, 巫兴东^{2,3}, 李红梅¹, 赵超^{1,2,3*}

- (1. 贵州师范大学 贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵阳 550001;
2. 贵州师范大学 贵州省药物质量控制及评价技术工程实验室, 贵阳 550001;
3. 贵州师范大学 天然药物质量控制研究中心, 贵阳 550001)

[摘要] 目的:建立高效液相色谱法测定小一点红中槲皮苷含量的方法。方法:采用单因素试验和正交试验结合数据分析软件优化小一点红药材的提取方法来最大化提取小一点红中的槲皮苷;通过 HPLC 法测定槲皮苷的含量,采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.1% 乙酸水溶液(20:80),检测波长 351 nm,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。结果:小一点红的最优提取条件为过 40 目筛的药材粉末 0.5 g,精密加入 80% 甲醇 20 mL,热回流提取 30 min,提取 1 次;槲皮苷在 5.541~177.3 mg·L⁻¹(*r*=0.999 9)线性关系良好;槲皮苷的平均回收率分别为 99.87% (RSD 2.0%)。结论:所建立的槲皮苷的含量测定方法简便快捷,专属性强,线性、重复性、精密度和回收率良好,可应用于小一点红的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱法;小一点红;正交试验;槲皮苷
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)04-0093-05
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017040093
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161130.0909.010.html>
[网络出版时间] 2016-11-30 9:09

Content Determination of Quercitrin in National Medicine of *Emilia prenanthoidea*

JIANG Zheng-meng^{1,2,3}, GONG Xiao-jian^{1,2,3}, ZHOU Xin^{1,2,3},
WU Xing-dong^{2,3}, LI Hong-mei¹, ZHAO Chao^{1,2,3*}

- (1. Key Laboratory for Information System of Mountainous Areas and Protection of Ecological Environment,
Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 2. Guizhou Engineering Laboratory for Quality Control &
Evaluation Technology of Medicine, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China;
3. The Research Center for Quality Control of Natural Medicine, Guizhou
Normal University, Guiyang 550001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for the content determination of quercitrin in *Emilia prenanthoidea*. **Method:** The orthogonal experiment design and single factor test combined with statistical analysis had been applied to optimize the extraction conditions of *E. prenanthoidea* for improving the yield of quercitrin. The contents of quercitrin in *E. prenanthoidea* were determined by HPLC; detection was performed on a Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.1% acetic acid solution (20:80) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 351 nm, and sample size was 10 μL. **Result:** The optimal extraction conditions were as follows: 0.5 g medicinal powder (40 mesh), added with 20

[收稿日期] 20160318(012)

[基金项目] 贵州省高层次创新人才培养项目(黔科合人才(2015)4033号);贵州省科技厅贵州师范大学联合基金(黔科合 LH 字[2015]7768号);贵州省中药材、民族药材质量标准研究项目(DBXZYC52038);贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目(黔科合中药字[2013]5001号);贵阳市科技计划项(贵阳市科技重大专项项目)筑科合同[2012401]社-4号

[第一作者] 蒋政萌,在读硕士,从事药用植物开发与利用,Tel:18302689251,E-mail:13555711040@163.com

[通讯作者] *赵超,副研究员,硕士生导师,从事中药质量评价与新药研究,Tel:0851-86690448,E-mail:chaozhao@126.com

mL 80% methanol solution, and then hot reflux extraction for 30 min one time. Quercitrin had excellent linearity within the concentration range in 5. 541-177. 3 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$), and the average recovery rate was 99. 87% (RSD 2. 0%) . **Conclusion:** The established HPLC method is simple, rapid, and accurate, so it can be used for the quality control of *Emilia prenanthoidea*.

[**Key words**] HPLC; *Emilia prenanthoidea*; orthogonal experiment; quercitrin

小一点红别名细红背叶、耳挖草,干燥全草入药,主产于贵州(都匀、独山、荔波、雷山、凯里、天柱、黎平、兴仁、贞丰)、浙江、云南、广东、广西、四川、福建等地。其性味苦凉,具有清热解毒、活血化瘀之功效,主治跌打损伤、红白痢、疮疡肿毒^[1-3],是我国南方地区常用的传统中草药。目前国内关于小一点红的化学成分^[4]、药理药效等方面的研究比较薄弱,更没有相关的质量控制研究,严重影响和制约着其资源的深度开发和利用。通过查阅同属植物一点红和绒缨菊的研究报道,以本课题组关于小一点红的挥发性成分的研究^[4]和一点红化学成分研究^[5-6]为基础结合 UPLC-ESI-MS/MS 给出的小一点红提取液色谱图上每个色谱峰对应化合物的相对分子质量,从一点红中分离纯化出的单体中筛选相似的相对分子质量的化合物进高效液相进一步分析比对保留时间,笔者指认出了 4 个化合物,其中槲皮苷在紫外检测器下响应高,并且通过预试验发现槲皮苷在小一点红中的含量较高。槲皮苷具有抗氧化清除自由基、抗肿瘤、抗抑郁、降血压、抗动脉粥样硬化、保肝护肝等广泛的生物活性,具有很好的研究和开发价值^[7-14]。为了提高该药材的质量,促进中药新资源的开发与利用,本文利用单因素试验-正交试验优化小一点红中的槲皮苷的提取方法,并建立了 HPLC 测定贵州不同产地小一点红中槲皮苷的含量。

1 材料

UltiMate 3000 型高效液相色谱仪(包括四元泵处理器,自动进样器,RS 柱温箱,二极管阵列检测器以及 Chromeleon 7.1 色谱工作站, Dionex), Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4. 6 mm×250 mm,5 μm), KQ-300 DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),明澈™-D24UV 型纯水/超纯水系统(Merck Millipore), AL204 型 1/1 万电子分析天平和 XS-105DU 型 1/10 万电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

槲皮苷购自中国食品药品检定研究院(批号 111538-201105,纯度 92. 7%)。甲醇为分析纯,乙腈为色谱纯,水为超纯水(自制)。

样品均由贵阳中医学院孙庆文副教授鉴定为菊科千里光亚族一点红属植物小一点红 *Emilia prenanthoidea* 的干燥全草。方法学考察采用在贵州省都匀市大坪镇采的药材。药材信息来源见表 1。

表 1 小一点红样品来源信息
Table 4 Information of *Emilia prenanthoidea*

No.	收集地	采集时期
S1	贵州雷山	2015-09
S2	贵州黎平	2015-09
S3	贵州锦屏-瑶白	2015-09
S4	贵州锦屏-隆里	2015-09
S5	贵州天柱-社学	2015-09
S6	贵州榕江	2015-10
S7	贵州都匀-伍寨	2015-10
S8	贵州都匀-大坪	2015-10
S9	贵州都匀-洛邦	2015-10
S10	贵州贵阳	2015-10

2 方法与结果

2.1 小一点红提取工艺的单因素试验优化

2.1.1 提取溶剂体积分数的考察 小一点红药材粉末(过 60 目筛),0. 5 g,6 份,称定质量,置 150 mL 具塞锥形瓶中,分别精密加入体积分数分别为 20% ,40% ,60% ,70% ,80% ,90% 的甲醇 10 mL,精密称重,加热回流 90 min(80 ℃),1 次,室温放冷后补重,摇匀,0. 45 μm 微孔滤膜滤过,进样分析。计算槲皮苷的含量,考察甲醇体积分数对槲皮苷提取效果的影响。结果显示最佳提取溶剂为 70% 甲醇溶液。见图 1。

2.1.2 提取粒度考察 取同一批小一点红药材(大坪)粉碎后分别过 20,40,60,80,100 目的药筛,每个粒度 0. 5 g,精密称定,置 150 mL 具塞锥形瓶中,分别精密加入 70% 甲醇 10 mL,以下按 2.1.1 项下方法操作,进样分析。计算槲皮苷的含量,考察药材粒度对槲皮苷提取效果的影响。结果药材最佳粒度为 40 目,见图 2。

2.1.3 料液比考察 取小一点红药材粉末(过 40 目筛)0. 5 g,5 份,精密称定,置 150 mL 具塞锥形瓶

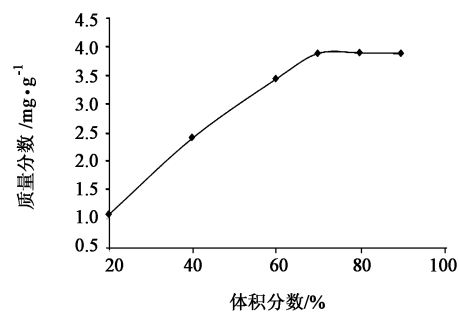


图 1 甲醇体积分数对槲皮苷质量分数的影响
Fig.1 Effects of methanol concentration on content of quercitrin

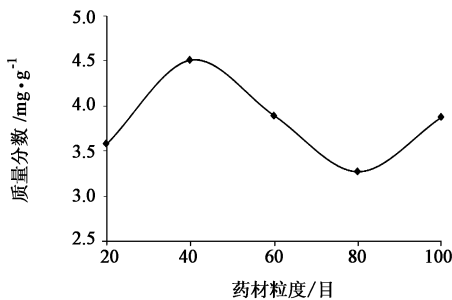


图 2 药材粒度对槲皮苷质量分数的影响
Fig.2 Effects of granularity on content of quercitrin

中,分别精密加入 70% 甲醇 10,20,30,40,50 mL,以下按 2.1.1 项下操作,进样分析。计算槲皮苷的含量,考察料液比对提取出槲皮苷含量的影响。结果表明随着提取溶剂的增加槲皮苷提取效果无显著性差异。针对料液比笔者选择了 1:20,1:40,1:60,1:80,1:100 共 5 种不同比例,在预试验中发现小一点红药粉比较疏松,提取溶剂少时药粉易黏沾在瓶壁上,使得到的数据很不稳定,平行性很差。因此选择 1:40 为最佳提取料液比。

2.2 小一点红提取方法的正交优化 以槲皮苷含量为指标,在单因素试验中考察了提取方式、提取溶剂、提取溶剂体积分数、药材粒度、料液比、提取温度、提取时间与提取次数指标,并从中选择影响槲皮苷含量较明显的甲醇浓度、料液比、提取温度、提取时间 4 个因素为考察因素,并选择最优点和其附近的两个点为考察水平,选用 L₉(3⁴) 正交试验表进行正交试验。正交试验数据及其直观分析见表 2。

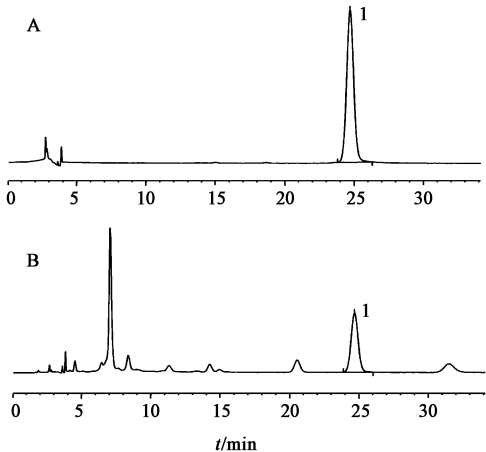
由极差分析分析可知,各个因素对槲皮苷提取率的影响程度大小顺序为 B>A>C>D。直观分析得出的较优水平组合为 B₂A₃C₁D₂。以最优组合制备供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取槲皮苷对照品 11.82 mg,用 80% 甲醇溶解,定容到 10 mL,配制 成每 1 mL 含槲皮苷 1.182 mg 的对照品储备液,并精密移取 1 mL 稀释至 10 mL,配制质量浓度为

表 2 小一点红中槲皮苷提取工艺优选的正交试验分析
Table 2 Orthogonal test analysis of extracton process of quiercitrin

No.	A 溶剂浓度 /%	B 料液比 /mL	C 提取时间 /h	D 提取温度 /℃	槲皮苷 /mg·g ⁻¹
1	60	10	0.5	75	4.40
2	60	20	1.0	80	4.68
3	60	30	1.5	85	4.79
4	70	10	1.0	85	4.34
5	70	20	1.5	75	4.88
6	70	30	0.5	80	4.95
7	80	10	1.5	80	4.73
8	80	20	0.5	85	5.02
9	80	30	1.0	75	4.98

118.2 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。
2.4 供试品溶液的制备 取小一点红药材粉末(过 40 目筛)0.5 g,称定质量,置 150 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇 20 mL,精密称重,加热回流 30 min(80 ℃),1 次,冷却至室温后用 80% 甲醇溶液补足质量,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。
2.5 色谱条件及系统适应性试验 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.1% 乙酸水溶液(20:80),检测波长 351 nm,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,柱温 25 ℃。
精密吸取对照品及供试品溶液适量,按上述色谱条件进样分析,结果分离度均>1.5,且不受其他组分干扰,理论板数>8 000,表明该方法专属性良好。见图 3。



1. 槲皮苷;A. 对照品;B. 供试品
图 3 小一点红 HPLC
Fig.3 HPLC chromatograms of Emlia prenanthoidea

2.6 方法学考察
2.6.1 线性范围考察 精密吸取槲皮苷对照品溶

液 1.5,1.0,0.75 mL 分别至 10 mL 量瓶中,80% 甲醇定容,制备得不同质量浓度系列对照品工作液 B,C,D,再精密吸取 D 溶液 5,2.5,1.25,0.625 mL 分别至 10 mL 的量瓶中,80% 甲醇定容,制备得不同质量浓度系列对照品工作液 E,F,G,H。不同质量浓度系列对照工作溶液,0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 2.5 项下的色谱条件进样分析。以对照品质量浓度为横坐标,峰面积比为纵坐标,进行线性回归,得回归方程 $Y=0.286\ 1\ X-0.188\ 8(r=0.999\ 9)$,槲皮苷在 5.541 ~ 177.3 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.6.2 精密度试验 取对照品溶液,按 2.5 项下的色谱条件进样分析,连续进样 6 次,测定峰面积,即为日内精密度;连续测定 3 d,测定峰面积,即为日间精密度。结果槲皮苷峰面积的 RSD 0.6%,1.1%。表明仪器精密度良好。

2.6.3 重复性试验 精密称取小一点红粉末(过 40 目筛),0.5 g,6 份,按 2.4 项下的方法进行制备(正交最优组合),按 2.5 项下的色谱条件进样分析,结果槲皮苷质量分数为 5.10 mg·g⁻¹,RSD 1.1%。表明方法重复性良好。

2.6.4 稳定性试验 取供试品溶液 1 份,分别于 0,2,4,8,12,24 h 按 2.5 项下的色谱条件进样分析,计算 24 h 内槲皮苷 RSD,结果显示 RSD 1.2%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6.5 加样回收率试验 精密称取已知含量的供试品 0.25 g,9 份,3 份一组,分别加入含量 50%,100%,150% 的槲皮苷对照品溶液,按 2.4 项下的方法进行制备,按 2.5 项下的色谱条件进样分析,计算加样回收率。见表 3。

表 3 小一点红中槲皮苷的加样回收试验
Table 3 Recoveries of quercitrin of *Emilia prenanthoidea*

称样量 /g	样品中量 /mg	加样量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.250 6	1.278	0.631	1.924	102.41		
0.251 4	1.282	0.631	1.900	97.84		
0.250 6	1.278	0.631	1.921	101.82		
0.250 4	1.277	1.262	2.509	97.59		
0.250 2	1.276	1.262	2.513	98.00	99.87	2.0
0.251 1	1.281	1.262	2.528	98.86		
0.251 0	1.280	1.893	3.218	102.39		
0.250 7	1.279	1.893	3.175	100.18		
0.257 3	1.312	1.893	3.200	99.73		

2.7 样品测定 精密称取 10 批各产地小一点红

药材,0.5 g,按 2.4 项下的方法进行制备供试品溶液,按 2.5 项下的色谱条件进样分析,并计算含量。结果槲皮苷质量分数分别为 3.17,0.73,3.83,3.40,1.19,1.77,1.44,5.10,4.07,1.75 mg·g⁻¹。

3 讨论

3.1 提取方法与提取溶剂的选择 采用甲醇、乙醇和水 3 种溶剂,超声和回流 2 种提取方法提取小一点红中的槲皮苷,系统分析槲皮苷的提取方法与提取溶剂。实验结果表明,甲醇为提取溶剂时提取效果及目标成分色谱峰峰形均最佳,回流提取为最适宜的提取方法。比较提取效果发现热回流法与超声提取法两者提取效果相差不大,考虑到全草中药色素较重会对色谱柱产生影响,而采用热回流提取法提取的提取液色素很浅,不用考虑脱色步骤,使提取方法更加简捷。

3.2 药材粒度的选择 将小一点红粉碎至不同粒度,热回流提取下,槲皮苷产率随小一点红粒度的减小先升高后降低。这是因为药材粒度减小,比表面积增大,有利于提取液的渗透,使槲皮苷利于溶出;但过小的粒度易造成原料表面吸附现象严重,反而使槲皮苷溶出效果下降,同时过小的粒度使溶出过程中有大量黏液杂质溶出,体系黏度增加,不仅难以过滤,而且不可避免地使槲皮苷产率有所下降^[15];当药材粒度 < 100 目时,槲皮苷产率经反复验证均 > 80 目,可能是因为药材粒径进一步减小,使药材细胞壁破碎利于槲皮苷溶出,对于该现象还有待进一步研究。综合考虑,选择 40 目为最佳提取粒度。

3.3 提取温度、提取时间与提取次数的选择 分别考察了 70,75,80,85,90 ℃ 为提取温度的影响;0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 h 为提取时间的影响;1,2,3 次为提取次数的影响;结果表明 80 ℃ 热回流 0.5 h,提取 1 次提取效果最好。

3.4 检测波长的选择 取槲皮苷对照品溶液及供试品溶液,0.45 μm 微孔滤膜滤过,在波长 190 ~ 800 nm 进行全波长扫描,结果槲皮苷在 256 nm 和 351 nm 下均有较好的灵敏度且色谱峰的纯度均 > 0.999。在 256 nm 下槲皮苷色谱峰附近峰较明显,药材中其他成分对其有干扰,且基线不稳,而在 351 nm 下槲皮苷峰形较好,分离度 > 1.5 且干扰小,图谱特征强,分离效果更好。因此,选择 351 nm 为检测波长。

3.5 流动相的选择 考察了甲醇-水,乙腈-水,乙腈-水(甲酸调 pH 3),乙腈-0.1% 甲酸水,乙腈-0.1% 乙酸水,乙腈-0.2% 乙酸水 6 个溶剂系统。

结果表明,以乙腈- 0.1% 乙酸水溶液溶液为流动相,所得色谱峰峰形较好,分离效果较佳,且峰的对称性较好,故选用乙腈-0.1% 乙酸水溶液作为流动相。

贵州民族药材小一点红在贵州民间有广泛的应用,但是缺少质量标准对其质量进行控制,更没有相应的含量测定方法。本实验在借鉴 UPLC-Q-TOF-MS/MS 联用技术对中药化学成分鉴定的相关研究^[16-17]基础上,利用 UPLC-MS/MS 分析得到小一点红提取液在 DAD 检测器下各个色谱峰的相对分子质量,并从同属植物含有相似化学成分入手,筛选同属植物一点红中具有相似相对分子质量的化学成分通过比对 HPLC 保留时间再次确认是否含有该化学成分。为小一点红的化学成分鉴定提供了一种高效、准确的分析方法,笔者初步从中指认了 4 种化学成分,并筛选出在小一点红中含量高且具有广泛生物活性、药理药效的槲皮苷为指标性成分建立准确、可靠、简便易行的含量测定方法,为民族药材小一点红的质量标准建立提供科学支撑,从而促进小一点红的深度开发与利用。贵州省内不同产地 10 批小一点红药材的含量测定结果显示,贵州省不同产地小一点红中槲皮苷质量分数差异较大(质量分数范围 0.73 ~5.10 mg·g⁻¹),其根本原因可能是地域环境的不同土壤酸碱度、土壤湿度、气温、光照时间以及海拔高度不同所致。

[参考文献]

[1] 中华本草编委会. 中华本草.第 7 册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999: 826.

[2] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志. 第 77 卷第 1 册[M]. 北京: 科学出版社,1999:325.

[3] 贵州植物志编委会. 贵州植物志. 第 9 卷[M]. 成都: 四川民族出版社,1989:227.

[4] 赵 超,周欣,龚小见,等. SPME/GC/MS 分析小一点红挥发性成分[J]. 光谱实验室,2010, 27(4): 1601-1603.

[5] 邹小华, 赵超, 龚小见, 等. 一点红化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(23): 1891-1893.

[6] 邹小华, 赵超, 周欣. 一点红的薄层色谱研究[J]. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 2012, 30(3): 9-11.

[7] Ham Y M, Yoon W J, Park S Y, et. al. Quercitrin protects against oxidative stress-induced injury in lung fibroblast cells via up-regulation of Bcl-Xl [J]. J Funct Foods, 2012, 4(1): 253-262.

[8] DING M, ZHAO J, Bowman L, et al. Inhibition of AP-1 and MAPK signaling and activation of Nrf2/ARE pathway by quercitrin [J]. Int J Oncol, 2010, 36(1): 59-67.

[9] 刘晓岩, 王莹, 李廷利. 熊果酸与槲皮苷镇静催眠作用对 NO,IL-1 β 和 TNF- α 水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(9): 162-165.

[10] Choi J S, Bae J K, Kim D S, et al. Dietary compound quercitrin dampens VEGF induction and PPAR γ activation in oxidized LDL-exposed murine macrophages: Association with scavenger receptor CD36 [J]. J Agr Food Chem, 2009, 58(2): 1333-1341.

[11] 杨竹雅, 卫莹芳, 海青山, 等. 槲皮苷对家兔离体主动脉环的作用及其机制探讨[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(1): 90-92.

[12] 张家瑞. 槲皮苷和山柰酚对糖尿病小鼠血糖及血脂水平的影响[J]. 现代食品科技, 2013, 29(3): 459-462.

[13] 徐春蕾, 李祥, 陈宏降, 等. 三白草中化学成分对 H₂O₂ 损伤 LO₂ 细胞保护作用[J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(2): 163-164.

[14] 杨琳. 槲皮苷药理活性研究进展[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(6): 61-63.

[15] 王丽萍, 徐传远, 田亚红, 等. 搅拌法提取紫花地丁中绿原酸的工艺[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(19): 4798-4800.

[16] 郭宜城, 欧阳辉, 何明珍, 等. UPLC/Q-TOF-MS/MS 鉴定西南银莲花中的皂苷类成分[J]. 中草药, 2015, 45(10): 1378-1387.

[17] 杨林军, 谢彦云, 李志锋, 等. UPLC/Q-TOF-MS/MS 分析中华常春藤中的成分[J]. 中草药, 2016, 47(4): 566-572.

[责任编辑 顾雪竹]