

枸骨中芦丁和槲皮素含量测定*

李艳芝 姜静静

(济宁医学院药学院, 山东日照 276826)

摘要 目的 采用高效液相色谱法测定枸骨不同部位(嫩叶、老叶、枝、青果、红果)及不同采收期枸骨叶中芦丁和槲皮素的含量。**方法** 采用 C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.5%磷酸水溶液(47:53), 流速为 0.7 ml/min, 检测波长为 356 nm, 柱温 25℃, 测定枸骨中芦丁和槲皮素含量。**结果** 芦丁和槲皮素线性范围分别为 0.52~5.2 μg 和 0.34~3.4 μg, 相关系数 r 均为 0.9999, 平均回收率分别为 98.6% 和 99.2%, RSD 分别为 1.70% 和 1.91% (n=6)。**结论** 枸骨不同部位及不同采收期枸骨叶中芦丁和槲皮素含量有明显差异。

关键词 枸骨; 芦丁; 槲皮素; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.2 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2015)04-096-03

Determination of rutin and quercetin in Ilex cornuta Lindl. et Paxt.

LI Yanzhi, JIANG Jingjing

(School of Pharmaceutical Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective Using HPLC to determine the contents of flavonoids (rutin and quercetin) in *Ilex cornuta* Lindl. et Paxt. and provide the scientific basics of quality control and reasonable application. **Methods** The contents of rutin and quercetin in *Ilex cornuta* Lindl. et Paxt. were analyzed by C18 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) using methanol-0.5% aqueous solution of phosphoric acid (47:53) as mobile phase at the flow rate of 0.7 ml/min and UV detection was at 356 nm. **Results** Rutin and quercetin respectively showed good linear relationships at the range of 0.52 ~ 5.2 μg ($r=0.9999$) and 0.34~3.4 μg ($r=0.9999$). The recovery rates were 98.6% and 99.2% (n=6) while RSD 1.70% and 1.91% (n=6). **Conclusion** The contents of rutin and quercetin in different parts of *Ilex cornuta* Lindl. et Paxt and the leaves harvesting in different months are different.

Keywords: *Ilex cornuta* Lindl. et Paxt.; Rutin; Quercetin; HPLC

枸骨(*Ilex cornuta* Lindl. et Paxt.)为冬青科冬青属植物^[1],其叶、果实和根均可药用,传统入药部位为叶,为苦丁茶来源之一^[2],是预防动脉粥样硬化及减肥的良好饮品^[3]。黄酮类化合物为枸骨中主要有效成分^[4-5],测定其含量可作为评价枸骨质量的依据。本文采用反相高效液相色谱法测定了枸骨不同部位及不同采收期枸骨叶中芦丁和槲皮素含量,为枸骨的质量控制及合理采收提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

岛津 LC-20A 高效液相色谱仪; LC-20AT 泵; SIL-20A 自动进样器; SPD-M20A 检测器; CT0-20AC 柱恒温箱控制器; LC Solution 工作站; SYZ-550 石英亚沸高纯水蒸馏器(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂生产); LD-02 型二两装高速中药粉碎机(中国温岭市大海药材器械厂)。

1.2 试剂与药品

枸骨样品采自山东日照,经济宁医学院中药教研室鉴定为冬青科冬青属植物枸骨,自然阴干,备用;芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号 100080-200707);槲皮素对照品(南昌贝塔生物科技有限公司,供含量测定用,批号 10199-081219);甲醇为色谱纯,水为二次蒸馏水,其他试剂为分析纯。

* [基金项目] 2013 年日照市应用技术与开发计划项目(编号: 2013JHSZ017)

2 含量测定

2.1 色谱条件

C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.5%磷酸水溶液(47:53); 柱温: 25℃; 流速: 0.7 ml/min; 检测波长: 356 nm; 理论塔板数按芦丁和槲皮素计算均大于 4000。外标法定量分析。对照品和样品色谱图见图 1。

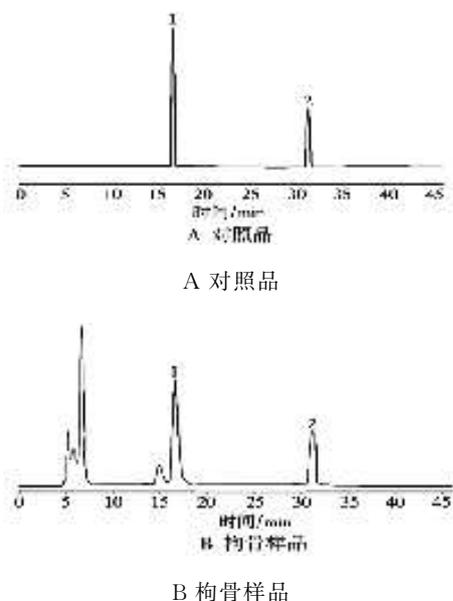


图 1 对照品及枸骨样品高效液相色谱图

2.2 对照品溶液的制备

用甲醇分别溶解干燥至恒重的芦丁和槲皮素对照品适量, 配制成芦丁 0.26 mg/ml 和槲皮素 0.17 mg/ml 的混合对照品溶液。

2.3 线性关系考察

参照文献^[6-7]进行线性关系考察, 得芦丁和槲皮素的回归方程分别为 $Y = 15587X + 20055$ ($r = 0.9999$), $Y = 40012X - 48581$ ($r = 0.9999$), 芦丁和槲皮素的线性范围分别为 0.52~5.2 μg 和 0.34~3.4 μg。

2.4 样品溶液的制备

分别精密称取 5.0 g 枸骨嫩叶、老叶、枝、青果、红果及不同采收期枸骨叶粉末(过 40 目筛), 加适量 90%乙醇超声提取 2 次, 每次 30 min, 合并 2 次滤液浓缩得浸膏, 用甲醇定容至 25 ml 容量瓶中, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 取续滤液为样品溶液。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 20 μL, 连续进样 6

次, 结果芦丁和槲皮素的峰面积 RSD 分别为 0.78% 和 0.91%。

2.6 稳定性试验

参照文献^[8]进行稳定性试验, 结果表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好, 峰面积的 RSD 为 0.81% ($n = 6$)。

2.7 重复性试验

精密称取枸骨老叶样品 6 份(每份 5.0g), 按样品溶液制备方法制备 6 份样品溶液, 各进样 20 μL 测定。结果 RSD 为 1.73%, 表明方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

参照文献^[9]进行回收率试验, 计算芦丁和槲皮素平均回收率($n = 6$) 分别为 98.6% 和 99.2%, RSD 分别为 1.70% 和 1.91%。

2.9 样品测定

按样品溶液制备方法制备各样品溶液, 按上述色谱条件进样 20 μL, 得各样品芦丁和槲皮素含量, 结果见表 1 和表 2。

表 1 枸骨不同部位中芦丁和槲皮素含量测定结果($n = 3$)

部位	芦丁含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	槲皮素含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
嫩叶	0.932	0.704
老叶	1.203	0.225
枝	0.237	0.178
青果	0.180	0.162
红果	0.194	0.153

表 2 不同采收期枸骨叶中芦丁和槲皮素含量测定结果($n = 3$)

采收时间	芦丁含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	槲皮素含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
2013-01-21	0.489	0.434
2013-02-21	0.512	0.492
2013-03-21	1.237	0.826
2013-04-21	0.902	0.713
2013-05-21	0.693	0.525
2013-06-21	0.461	0.318
2013-07-21	0.350	0.112
2013-08-21	0.272	0.095
2013-09-21	0.259	0.089
2013-10-21	0.207	0.099
2013-11-21	0.298	0.225
2013-12-21	0.164	0.153

3 讨论

3.1 提取条件的选择

本实验考察了加热回流和超声提取 2 种方法,结果表明超声提取率高,杂质少,故选取超声提取法;提取溶剂的选择我们比较了甲醇和不同浓度乙醇的提取效率,结果表明用 90%乙醇提取效果最好;同时比较了超声提取时间及提取次数的提取率,结果表明超声提取 2 次,每次 30 min 提取率最高,根据实验结果最终确定样品提取方法为采用 90%乙醇为提取溶剂,超声提取 2 次,每次 30 min。

3.2 测定波长的选择

对混合对照品和样品溶液在 200~600 nm 进行紫外扫描,结果表明,两者均在 356 nm 波长处有最大吸收,且干扰比较小,故选择 356 nm 作为检测波长。

3.3 流动相的选择

本实验对甲醇-冰醋酸水溶液系统、甲醇-水系统、甲醇-0.5%磷酸水溶液系统进行了考察,结果显示,甲醇-0.5%磷酸水溶液系统(47:53)分离度好、峰形较好,满足分离要求。

3.4 小结

本文采用反相高效液相色谱法测定了枸骨不同部位:嫩叶、老叶、枝、青果、红果及不同采收期枸骨叶中芦丁和槲皮素含量,测定结果表明,枸骨中芦丁和槲皮素含量与药用部位有关,叶中的含

量明显高于其他部位,与传统入药部位为叶相吻合,不同部位的芦丁和槲皮素含量顺序均为:叶>枝>果实,且同一部位中芦丁含量均高于槲皮素;不同采收期枸骨叶中黄酮类化合物含量有显著差异,其中 3 月份含量最高。另外,2010 年版中国药典一部收录的枸骨叶,质量标准没有含量测定项,本文为枸骨叶质量标准的完善提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 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,2010:233.
- [2] 邱丰艳,王小精. 冬青属苦丁茶的药理研究进展[J]. 安徽农业科学,2007,35(32):10350-10352.
- [3] 李维林,吴菊兰,任冰如,等. 枸骨的化学成分[J]. 植物资源与环境学报,2003,12(2):1-5.
- [4] 左文健,梅文莉,曾艳波,等. 枸骨的化学成分和药理活性研究进展[J]. 安徽农业科学,2011,39(27):16560-16562.
- [5] 洪艳平,上官新晨,刘楠,等. 枸骨叶总黄酮提取与测定[J]. 江西农业大学学报,2008,30(3):529-533.
- [6] 崔涛,夏伟军,彭玲芳. 七叶莲提取物中总黄酮和槲皮素的含量测定[J]. 药物分析杂志,2011,31(11):2054-2057.
- [7] 茅向军,许乾丽,鲍家科,等. HPLC 法测定一枝黄花中芦丁的含量[J]. 药物分析杂志,2010,30(9):1785-1787.
- [8] 徐力. HPLC 法测定飞燕草中芦丁的含量[J]. 中国当代医药,2011,18(33):49-50.
- [9] 王金梅,高健,邴妙利,等. HPLC 法测定连翘中叶、茎、果实等不同部位芦丁的含量[J]. 河南大学学报,2007,26(4):23-25.

(收稿日期 2015-03-10)

(上接第 95 页)

- [27] Butcher M J, Gjurich B N, Phillips T, et al. The IL-17A/IL-17RA axis plays a proatherogenic role via the regulation of aortic myeloid cell recruitment[J]. Circ Res, 2012, 110(5): 675-687.
- [28] Danzaki K, Matsui Y, Ikesue M, et al. Interleukin-17A deficiency accelerates unstable atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(2):273-280.
- [29] De Boer O J, van der Meer J J, Teeling P, et al. Differential expression of interleukin-17 family cytokines in intact and complicated human atherosclerotic plaques[J]. J Pathol, 2010, 220(4):499-508.
- [30] Eid R E, Rao D A, Zhou J, et al. Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells[J]. Circulation, 2009, 119(10):1424-1432.

- [31] Simon T, Taleb S, Danchin N, et al. Circulating levels of interleukin-17 and cardiovascular outcomes in patients with acute myocardial infarction[J]. Eur Heart J, 2013, 34(8):570-577.
- [32] Erbel C, Dengler T J, Wangler S, et al. Expression of IL-17A in human atherosclerotic lesions is associated with increased inflammation and plaque vulnerability[J]. Basic Res Cardiol, 2011, 106(1):125-134.
- [33] Liu Z, Lu F, Pan H, et al. Correlation of peripheral Th17 cells and Th17-associated cytokines to the severity of carotid artery plaque and its clinical implication[J]. Atherosclerosis, 2012, 221(1):232-241.
- [34] Zheng Y, Wang Z, Deng L, et al. Osteopontin promotes inflammation in patients with acute coronary syndrome through its activity on IL-17 producing cells[J]. Eur J Immunol, 2012, 42(10):2803-2814.

(收稿日期 2015-04-12)