

HPLC 法测定芪红水煎剂中花旗松素和槲皮素的含量

巴寅颖¹ 于萍¹ 杜宇琼¹ 车念聪¹ 靳华² 吴霞¹

(1 首都医科大学中医药学院, 中医络病研究北京市重点实验室, 北京, 100069; 2 首都医科大学附属佑安医院, 北京, 100069)

摘要 目的: 建立高效液相色谱法测定芪红水煎剂中 2 种主要有效成分花旗松素和槲皮素的含量。方法: 采用 Waters Sunfire C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-0.5% 磷酸溶液为流动相梯度洗脱, 流速 1 mL/min, 检测波长 290 nm (花旗松素), 365 nm (槲皮素)。结果: 花旗松素和槲皮素线性范围分别为 0.075 5~0.120 8 μg (r=0.999 4) 和 0.030 8~0.092 4 μg (r=0.999 9); 平均加样回收率 (n=6) 分别为 102.74% (RSD=1.71%) 和 102.45% (RSD=1.52%)。结论: 本法简便、准确, 重复性好, 可用于芪红水煎剂中花旗松素和槲皮素的含量测定。亦可作为芪红水煎液质量控制方法之一。

关键词 芪红水煎剂; 水红花子; 黄芪; 花旗松素; 槲皮素

Determination of Taxifolin and Quercetin in Qihong Decoction: HPLC Method

Ba Yinying¹, Yu Ping¹, Du Yuqiong¹, Che Niancong¹, Jin Hua², Wu Xia¹

(1 Beijing Key Laboratory of TCM Collateral Disease Theory Research, School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2 Beijing You An Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for the determination of taxifolin and quercetin in Qihong decoction. **Methods:** The determination was carried out with Waters Sunfire C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), using methanol-0.5% phosphoric acid as mobile phase with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL/min and it was detected that the wave length was 290 nm (taxifolin) and 365 nm (quercetin). **Results:** The linear ranges of taxifolin and quercetin were 0.0755~0.1208 μg (r=0.9994) and 0.0308~0.0924 μg (r=0.9999); the average recovery rate (n=6) was 102.74% (RSD=1.71%) and 102.45% (RSD=1.52%) respectively. **Conclusion:** This method was simple, steady and reliable, which could be used to determine the contents of taxifolin and quercetin and to control the quality of Qihong decoction.

Key Words Qihong decoction; Fructus polygoni orientalis; Radix astagali; Taxifolin; Quercetin

中图分类号: R284.1 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.11.057

芪红水煎剂是“全国名老中医药专家钱英教授传承工作室”和中医络病研究北京市重点实验室基于肝纤维化络病“虚”“瘀”并存的基本病机及结合国家级名老中医药专家钱英教授多年的临床经验总结,选用水红花子、黄芪=1:4 相配伍制成的用于治疗肝纤维化的中药方剂^[1-2]。此配伍与中医学对肝纤维化气虚血瘀、正虚邪恋的病机认识相一致。文献调研和前期的药理研究表明,水红花子、黄芪及芪红水煎剂对免疫肝纤维化大鼠的肝组织纤维化程度有明显改善作用^[3-8]。为保证药物质量可控,芪红水煎剂亟待建立稳定、可靠的质量控制方法。水红花子为蓼科植物红蓼 (*Polygonum orientale* L.) 的成熟果实。味辛、咸,性微寒。归肝、脾、胃经。具有散血消癥,消积止痛的功效。在临床上可用于急慢性肝病中的各期的治疗。花旗松素和槲皮素是水红花子的主要有效成分^[9-14],花旗松素也是 2015 版药典中

水红花子含量测定的指标性成分^[15]。因此,研究芪红水煎剂中花旗松素和槲皮素的含量测定方法具有重要意义。本实验采用 HPLC 法建立芪红水煎剂中花旗松素和槲皮素的含量测定方法,为系统建立芪红水煎液的质量控制方法提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 Waters 2695 高效液相色谱仪 (waters 科技有限公司), 2998PDA 检测器, Empower 工作站, 自动进样; Sartorius AG ME2355 型 1/100000 电子分析天平 (北京赛多利斯仪器有限公司); KQ-500DE 型超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司); HH-S 型电热恒温水浴锅 (北京市长风仪器仪表公司)。水红花子药材购自北京同仁堂有限公司 (批号: 091117, 产地: 辽宁本溪); 黄芪购自北京同仁堂有限公司 (批号: 100918, 产地: 甘肃渭原)。槲皮素 (批号: 100081-201408, 纯度: 99.1%) 和花旗松素 (批

基金项目: 首都中医药研究专项课题 (编号: 16ZY07)

作者简介: 巴寅颖 (1986.02—), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 中药化学, Tel: (010) 83911633, E-mail: byy3333@sina.com

通信作者: 吴霞 (1967.10—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中药化学, Tel: (010) 83911671, E-mail: wuxia6710@163.com

号:111816-201102,纯度:98.9%)对照品均购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈(Fisher 公司,色谱纯);娃哈哈纯净水;磷酸(北京试剂厂,分析纯)。其他试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 溶液制备 对照品溶液制备:精密称取花旗松素 7.55 mg、槲皮素 7.70 mg,分别置于 25 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,作为对照品储备液。花旗松素对照品储备液浓度 0.302 mg/mL,槲皮素对照品储备液浓度 0.308 mg/mL。供试品溶液制备:称取水红花子 10.0 g,黄芩 40.0 g,置于圆底烧瓶中,加 8 倍量蒸馏水,回流提取 1.5 h,过滤,滤渣继续加 6 倍量蒸馏水,回流提取 1 h,过滤。合并滤液,浓缩干燥成干粉,备用。精密称取芪红水煎剂样品粉末约 400 mg,置于三角瓶中,精密量取甲醇 10 mL,称重,超声 30 min,放至室温后再称重,补足至原重量,0.45 μ m 微孔滤膜过滤,即得供试品溶液。

1.2.2 色谱条件与系统适应性试验 色谱柱:Waters Sunfire C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μ m);检测波长 290 nm(花旗松素)、365 nm(槲皮素);流速:1.0 mL/min;柱温:25 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ L。流动相:甲醇(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱:30%~39%甲醇(0—10 min),39%~47%甲醇(10—20 min),47%甲醇(20—30 min),47%~58%甲醇(30—40 min)。依上述色谱条件,分别精密吸取花旗松素和槲皮素对照品溶液各 10 μ L、供试品溶液 20 μ L 分别进样,进行系统适应性试验。

1.2.3 线性关系考察 精密吸取一定量的花旗松素和槲皮素对照品储备液,置于 10 mL 容量瓶中,甲醇定容摇匀,配制成 6 份不同浓度的混合对照品溶液。6 份混合对照品溶液中花旗松素对照品浓度为 0.007 55、0.015 1、0.030 2、0.060 4、0.090 6、0.120 8 mg/mL,槲皮素对照品浓度为 0.003 08、0.007 7、0.015 4、0.030 8、0.061 6、0.092 4 mg/mL。分别取以上对照品溶液,用自动进样器进样 10 μ L,按“2.1”项下色谱条件测定色谱峰峰面积。以对照品进样量为横坐标,以色谱峰峰面积为纵坐标绘制标准曲线,并分别进行线性回归。

1.2.4 精密度考察 精密吸取同一混合对照品溶液 10 μ L,注入高效液相色谱仪,按“2.1”项下色谱条件测定色谱峰峰面积,连续测定 6 次,计算花旗松素和槲皮素色谱峰面积 RSD。

1.2.5 稳定性试验 精密吸取同一芪红水煎剂样品

溶液,分别于样品溶液制备后 0、2、4、6、8、12、24 h 样,每次进样 20 μ L,按“2.1”项下色谱条件测定色谱峰峰面积。计算花旗松素和槲皮素色谱峰面积 RSD。

1.2.6 重复性试验 精密称取同一批芪红水煎剂样品粉末 6 份,每份约 400 mg。按“2.1.2”项下方法制成供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,分别进样 20 μ L,记录花旗松素和槲皮素峰面积。计算芪红水煎剂样品中花旗松素和槲皮素的平均含量和 RSD。

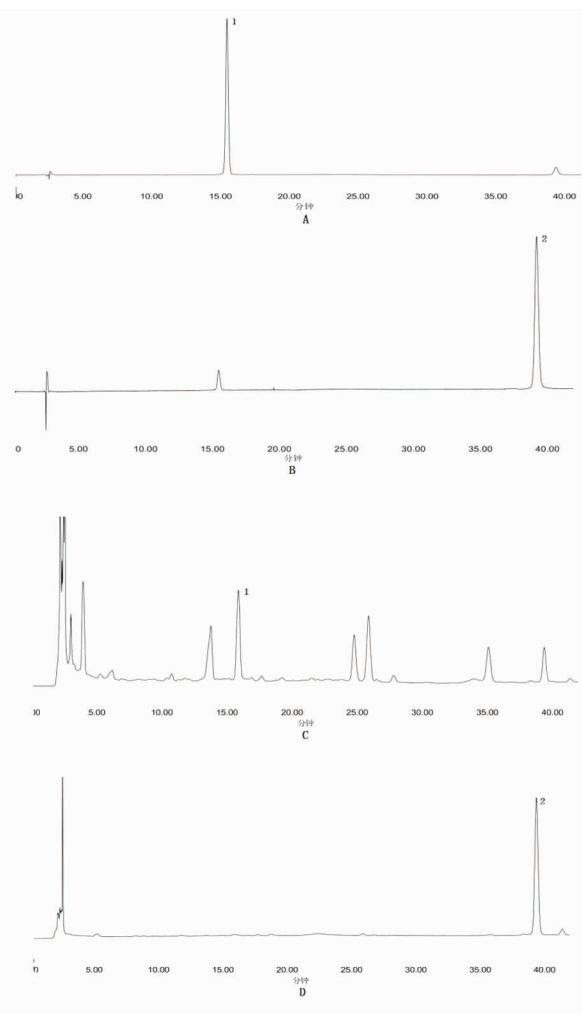


图 1 芪红水煎剂样品与对照品高效液相色谱图

注:A 花旗松素对照品(290 nm);B 槲皮素对照品(365 nm);C 芪红水煎剂样品溶液(290 nm);D 芪红水煎剂样品溶液(365 nm)。1 花旗松素;2 槲皮素。

1.2.7 加样回收率试验 精密称取同一批芪红水煎剂样品粉末(花旗松素和槲皮素的平均含量为 0.548 mg/g 和 0.438 mg/g)6 份,每份约 200 mg,置于三角瓶中,分别加入花旗松素对照品溶液 0.35 mL(浓度为 0.030 2 mg/mL)、槲皮素对照品溶液 0.3 mL(浓度为 0.308 mg/mL),精密量取甲醇 5 mL,称重,超声 30 min,放至室温后再称重,补足至原重量,0.45 μ m 微

孔滤膜过滤,制成供试品溶液,按“2.1”下色谱条件,进样 20 μL,记录花旗松素和槲皮素峰面积。计算花旗松素和槲皮素的平均回收率和 *RSD*。

2 结果

2.1 系统适应性试验 依上述色谱条件,花旗松素的洗脱时间为 15.8 min,槲皮素的洗脱时间为 39.5 min,在对照品溶液和供试品溶液色谱图相应位置上,有相同保留时间且有相同紫外吸收的色谱峰,且与其他成分分离良好。结果见图 1。

2.2 线性关系考察 花旗松素回归方程为: $Y = 34\,801\,528.75 X + 15\,909.96$, $r = 0.999\,4$ ($n = 6$);槲皮素回归方程为: $Y = 59\,529\,654.69 X + 21387.78$, $r = 0.999\,9$ ($n = 6$)。结果表明,花旗松素、槲皮素分别在 0.075 5~0.120 8 μg 和 0.030 8~0.092 4 μg 质

量范围内与色谱峰面积呈良好的线性关系。

2.3 精密度考察 花旗松素和槲皮素色谱峰面积 *RSD* 分别为 0.68%、1.07%。表明该方法精密度良好,符合定量分析要求。

2.4 稳定性试验 花旗松素和槲皮素色谱峰面积 *RSD* 分别为 1.71% 和 1.36%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 重复性试验 计算得芪红水煎剂样品中花旗松素和槲皮素的平均含量分别为 0.548 mg/g 和 0.438 mg/g, *RSD* 分别为 1.98% 和 2.21%。表明该方法重复性良好。

2.6 加样回收率试验 计算得花旗松素和槲皮素的平均回收率($n = 6$)分别为 102.74% 和 102.45%, *RSD* 分别为 1.71% 和 1.52%。具体结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果($n = 6$)

成分	称样量(mg)	样品中对照品含量(mg)	对照品加入量(mg)	检出量(mg)	回收率(%)	均值(%)	<i>RSD</i> (%)
花旗松素	200.70	0.1100	0.1057	0.2194	103.54	102.74	1.71
	201.02	0.1102	0.1057	0.2196	103.56		
	199.22	0.1092	0.1057	0.2181	103.10		
	200.55	0.1099	0.1057	0.2205	104.61		
	200.99	0.1101	0.1057	0.2178	101.89		
	200.28	0.1098	0.1057	0.2152	99.76		
槲皮素	200.70	0.0879	0.0924	0.1835	103.41	102.45	1.52
	201.02	0.0880	0.0924	0.1838	103.67		
	199.22	0.0873	0.0924	0.1795	99.86		
	200.55	0.0878	0.0924	0.1839	104.00		
	200.99	0.0880	0.0924	0.1822	101.90		
	200.28	0.0877	0.0924	0.1818	101.86		

2.7 样品含量测定 按芪红水煎剂处方比例(水红花子:黄芪 = 1:4)将药材混合,共 50 g,8 倍量水回流提取 1.5 h,过滤,滤渣继续用 6 倍量水回流 1 h,过滤,合并滤液,浓缩干燥成干粉,同时制备 3 批。精密称取每批芪红水煎剂样品粉末约 400 mg,分别置于三角瓶中,精密量取甲醇 10 mL,称重,超声 30 min,放至室温后再称重,补足至原重量,0.45 μm 微孔滤膜过滤,进样 20 μL,按“2.1”项下色谱条件测定色谱峰峰面积。计算花旗松素和槲皮素含量。结果见表 2。

表 2 芪红水煎剂中花旗松素和槲皮素含量($n = 3$)

样品号	花旗松素含量(mg/g)	槲皮素含量(mg/g)
1	0.548	0.438
2	0.554	0.444
3	0.539	0.434

3 讨论

本试验首次采用高效液相色谱法测定芪红水煎

剂中花旗松素和槲皮素的含量,所建立的方法简单、准确、可靠,可作为芪红水煎剂质量控制方法之一。

为保持与临床药理实验的一致性,本试验所采用的提取方法与临床药理实验样品一致。流动相选择时,曾考察了乙腈-0.5% 甲酸水溶液、乙腈-0.5% 磷酸水溶液、甲醇-0.5% 甲酸水溶液、甲醇-0.5% 磷酸水溶液等,结果用甲醇-0.5% 磷酸水溶液进行梯度洗脱分离度较好。

参考文献

[1] 杜宇琼,车念聪,张秋云,等. 钱英教授“养血柔肝法”治疗肝纤维化经验初探[J]. 中西医结合肝病杂志,2012,22(6):366-367.
[2] 杜宇琼,宋乃光,车念聪,等. “络病”理论指导下的肝纤维化治疗思路研究[J]. 中华中医药杂志,2010,25(10):1604-1606.
[3] 杜宇琼,车念聪,高彦彬,等. 水红花子现代药理作用研究进展[J]. 北京中医药,2015,34(12):993-995.
[4] 杜宇琼,车念聪,张秋云,等. 芪红水煎液对免疫肝纤维化大鼠肝功能及肝纤维化标志物的影响[J]. 中国中医急症,2016,25(9):1679-1681.

现出很好的单系性,而肾唇虾脊兰的 matK 序列只有网上一条,在此并不能否定 matK 序列对虾脊兰属植物的鉴定效率,所以利用 ITS2 + matK 基因组序列能够对虾脊兰属植物进行快速鉴别。而 psbA-trnH 序列 NJ 树的表明,虾脊兰属大部分植物不能被区分,其鉴定准确率太低,不适于虾脊兰属植物的鉴定。

参考文献

- [1] 龙波,龙春林,李苏梅. 兰科药用植物[A]. 亚太地区民族植物学论坛,2006.
- [2] 苏文君,龙波,刘飞虎. 虾脊兰属植物研究现状[J]. 北方园艺,2012(16):190-193.
- [3] 黄卫昌,周翔宇,倪子轶,等. 基于标本和分布信息评估中国虾脊兰属植物的濒危状况[J]. 生物多样性,2015,23(4):493-498.
- [4] 程新玮,赵焕新,宁康,等. DNA 条形码技术在中药质量评价中的研究进展[J]. 食品与药品,2013,15(14):295-299.
- [5] Coghlan M L,Haile J,Houston J,et al. Deep sequencing of plant and animal DNA contained within Traditional Chinese Medicines reveals legality issues and health safety concerns[J]. PLoS Genet,2012,8(4):436-446.
- [6] 陈士林. 中国药典中药材 DNA 条形码标准序列[M]. 北京:科学技术出版社,2015.
- [7] 陈士林,姚辉,韩建萍,等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则[S]. 中国中药杂志,2013,38(2):141-147.
- [8] Wong KL,But PP,Shaw PC. Evaluation of seven DNA barcodes for differentiating closely related medicinal Gentiana species and their adulterants[J]. Chin Med,2013,8(1):16.
- [9] 胡伟毅,邵套喜. matK 序列作为 DNA 条形码在苍耳属中的应用[J]. 杂草科学,2013,31(4):13-16.

- [10] 姬生国,潘胜利,王峻,等. 基于叶绿体 matK 基因序列探讨 10 种石杉科石杉属植物的系统关系及分子鉴定[J]. 中国中药杂志,2007,32(19):1971-1974.
- [11] 滕艳芬,吴晓俊,徐红,等. 石斛及其常见混淆品的 matK 基因序列比较[J]. 中国药科大学学报,2002,33(4):280-283.
- [12] 王果平,樊丛照,朱军,等. 基于形态特征和 DNA 条形码技术的维吾尔药材沙枣基原鉴定[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2216-2221.
- [13] 余亚东,石林春,马晓冲,等. 白术与苍术及其混伪品 DNA 条形码鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2194-2198.
- [14] 石林春,陈俊,向丽,等. 基于 ITS2 条形码的中药材天南星及其混伪品 DNA 分子鉴定[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2176-2179.
- [15] 吴劲松,张宇思,刘薇,等. 白及属药用植物 DNA 条形码的确立及其应用[J]. 药学报,2014,49(10):1466-1474.
- [16] 马孝熙,任伟超,向丽,等. 蒲黄、松花粉等花粉类药材及其混伪品的 DNA 条形码鉴定[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2189-2193.
- [17] 于俊林,赵莎,任明波,等. 基于 ITS2 条形码鉴定柴胡与大叶柴胡[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2160-2163.
- [18] 张雅琴,石钺,宋明,等. 蕨类药材石韦及其混伪品的 psbA-trnH 序列鉴定[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2222-2226.
- [19] SUN ZY,GAO T,YAO H,et al. Identification of *Lonicera japonica* and its related species using the DNA barcoding method[J]. Planta Med,2011,77:301-306.
- [20] 宋明,张雅琴,林韵涵,等. 基于 ITS2 和 psbA-trnH 序列对细小种子类药材车前子的鉴定比较[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2227-2232.

(2016-03-31 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 2424 页)

- [5] 杜宇琼,车念聪,赵晖,等. 黄芪对肝纤维化大鼠肝组织 TIMP-1 及 MMP-1 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报,2013,36(11):775-778.
- [6] 杜宇琼,赵晖,张秋云,等. 水红花子对免疫肝纤维化大鼠肝功能及血清肝纤维化标志物的影响[J]. 中国中医急症,2011,20(9):1433-1434.
- [7] 张晨,黄进,詹菲,等. 黄芪多糖对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化的保护作用[J]. 世界中医药,2015,10(6):887-890.
- [8] 刘畅,刘平,慕永平,等. 黄芪汤治疗慢性肝病研究进展[J]. 世界中医药,2015,10(2):157-161.
- [9] 包永睿,王帅,孟宪生,等. 水红花子黄酮类成分对入肝癌细胞株 SMMC-7721 的影响[J]. 中药材,2013,36(2):255-259.
- [10] 盛华刚. 水红花子的化学成分和药理作用研究进展[J]. 化工时

刊,2013,27(2):44-46.

- [11] 秦佩,雷志明,吴双,等. 槲皮素对 Con A 诱导自身免疫性肝损伤作用[J]. 中国公共卫生,2015,31(6):757-759.
- [12] 翟延君,佟苗苗,程飞,等. 花旗松素和 3,3'-二甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对肿瘤细胞的增殖抑制作用[J]. 中成药,2012,34(2):217-220.
- [13] 沈钦海,秦召敏,刘丽,等. 槲皮素对肝细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 天津医药,2015,43(10):1100-1103.
- [14] 刘英娟,申玉金,杜金梁,等. 槲皮素对四氯化碳致鲤肝细胞损伤的保护作用[J]. 农业生物技术学报,2015,23(3):369-379.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2015:83.

(2016-05-05 收稿 责任编辑:王明)