

苦荞提取物中芦丁和槲皮素的含量测定

邹亮¹,王战国²,胡慧玲³,赵钢^{1*},胡一冰¹,王安齐³

(1. 成都大学生物产业学院,成都 610106; 2. 四川大学生命科学学院,成都 610065;
3. 成都中医药大学药学院,成都 610075)

[摘要] 目的:测定苦荞提取物中芦丁和槲皮素的含量,评估苦荞提取物质量。方法:Welchrom-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.2% 甲酸水溶液(50:50),检测波长 280 nm,柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。结果:芦丁在 1.56~100.00 mg·L⁻¹,槲皮素在 1.52~97.00 mg·L⁻¹呈良好的线性关系。平均回收率芦丁为 98.49% (RSD 1.25%, n = 5),槲皮素为 97.87% (RSD 1.69%, n = 5),芦丁的含量为 18.97% ± 1.43%,槲皮素的含量为 5.03% ± 0.42%。结论:该方法成功应用于苦荞提取物中的芦丁和槲皮素的含量测定。

[关键词] 苦荞提取物;芦丁;槲皮素;高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2010)17-0060-03

Determination of Rutin and Quercetin in Tartary Buckwheat Extract

ZOU Liang¹,WANG Zhan-guo²,HU Hui-ling³,ZHAO Gang^{1*},HU Yi-bing¹,WANG An-qi³

(1. College of Biological Industry, Chengdu University, Chengdu 610106, China;

2. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

3. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the content of rutin and quercetin in the tartary buckwheat extract, so as to appraise its quality. **Method:** The chromatographic conditions were as follows: with the Welchrom-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) as the chromatographic column, methanol-0.2% formic acid solution (50:50) as the mobile phase, 280 nm as the detection wavelength, 30 °C as the column temperature, 1.0 mL·min⁻¹ as the flow rate. **Result:** The linear range for rutin was 1.56-100.00 mg·L⁻¹ and the linear range for quercetin was 1.52-97.00 mg·L⁻¹. The average recovery for rutin and quercetin was 98.49% (RSD 1.25%, n = 5) and 97.87% (RSD 1.69%, n = 5) respectively. **Conclusion:** Rutin and quercetin were 18.97% ± 1.43% and 5.03% ± 0.42% respectively determined by the method applied.

[Key words] tartary buckwheat extract; rutin; quercetin; HPLC

苦荞为蓼科荞麦属植物苦荞麦 *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. 的干燥成熟种子,又名野荞

麦、鞑靼荞、万年荞、野南荞^[1]。苦荞作为一种重要的小宗杂粮作物和药食同源植物在我国西南、中南、华北等省区均有分布。苦荞富含芦丁,山萘酚,山萘酚-3-O-芸香糖苷,槲皮素等黄酮类化合物^[1-3],现代药理研究具有降糖降脂、抗氧化、抗衰老及治疗心脑血管系统疾病等作用^[4-6]。本试验建立了同时测定苦荞提取物中芦丁和槲皮素含量的 HPLC 方法,以期综合评价苦荞提取物中芦丁和槲皮素含量及相对比例,为苦荞提取物的后期综合开发利用提供基础数据和参考。

[收稿日期] 20100824(002)

[基金项目] 国家星火计划项目(2010GA812002);四川省科技厅科技支撑项目(2008FZ0141)

[第一作者] 邹亮,副教授,博士,从事中药药剂学与中药质量标准化研究, Tel:028-84616653, E-mail: zouliang@edu. edu. cn

[通讯作者] * 赵钢,教授,从事药食同源植物资源开发, Tel: 028-84616653, E-mail: zhaogang@edu. edu. cn

1 仪器与试药

Waters 高效液相色谱仪 (Waters 515 HPLC pump, Waters 2487 UV detector, CBL-400 column), N2000 色谱工作站 (浙江大学智达信息工程有限公司), Welchrom-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm, Welch Materials, Inc. America), CP225D 和 BS210S 电子天平 (Sartorius, Germany); Genius 3 旋涡混合仪 (德国 IKA 公司); TGL-16C 台式高速离心机 (上海市安亭科技仪器厂); WSD-UP-III-10 精密型纯水机 (成都威思达智能科技有限公司), KH-300DB 型数控超声仪 (昆山禾创超声仪器有限公司)。

芦丁对照品 (批号 100080-200707) 和槲皮素对照品 (批号 100081-200406) 均由中国药品生物制品检定所提供。苦荞提取物 (成都大学生物产业学院药理学系自制)。甲醇为色谱纯, 其余试剂、试药均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Welchrom-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.2% 甲酸水溶液 (50:50); 柱温 30 °C; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 280 nm; 进样量 10 μL。

2.2 混合对照品储备溶液的配制

分别称取在五氧化二磷减压干燥器中干燥过夜的芦丁、槲皮素对照品约 10.00 mg, 精密称定, 置于 50 mL 棕色量瓶中, 加入甲醇溶液约 45 mL, 超声处理 15 min (100 Hz), 冷却后, 用甲醇溶液定容至刻度, 得芦丁、槲皮素的混合对照品储备溶液 (分别为 200.00, 194.00 mg·L⁻¹)。

2.3 样品溶液的制备

称取苦荞提取物样品约 10.0 mg, 置于 50 mL 棕色量瓶中, 加入甲醇溶液约 45 mL, 超声处理 15 min (100 Hz), 冷却后, 用甲醇溶液定容至刻度, 得苦荞提取物样品溶液。样品溶液进样前, 过孔径 0.45 μm 滤膜。

2.4 色谱行为选择性

选择标准曲线工作溶液 (S2) 溶液和苦荞提取物样品溶液 (Y1), 按照 2.1 项下条件进行分析, 获得对照品和样品溶液的色谱图, 根据对照物质 (芦丁、槲皮素) 的峰型、保留时间、分离度、理论塔板数、拖尾因子等参数评价色谱行为的选择性。见图 1。

试验结果表明芦丁、槲皮素峰形对称, 保留时间约为 4.4, 12.3 min, 各对照物质的分离度均大于 1.5, 理论塔板数均高于 3 000, 拖尾因子符合分析要

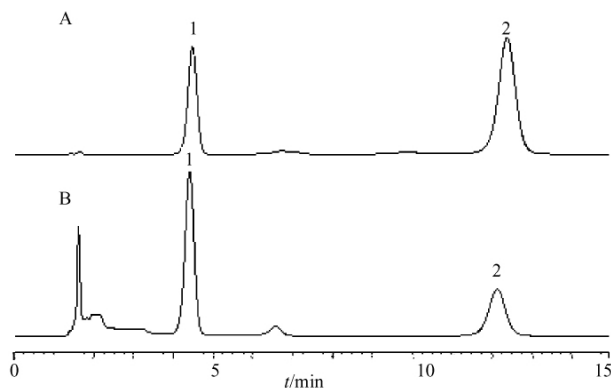


图 1 苦荞提取物 HPLC 图

A. 对照品; B. 苦荞提取物; 1. 芦丁; 2. 槲皮素

求, 样品中其他物质不干扰芦丁、槲皮素的测定, 即所建立的方法在 15 min 内能够完成样品测定, 方法满足测定要求。

2.5 标准曲线工作溶液的制备和线性关系的考察

采用倍数稀释法, 精密量取混合对照品储备溶液 5 mL, 置于 10 mL 棕色量瓶中, 加入甲醇溶液约 4 mL, 超声处理 5 min (100 Hz), 混匀, 冷却后, 用甲醇溶液定容至刻度, 得标准曲线工作溶液 1 (S1); 按上法, 精密量取标准曲线工作溶液 1 (S1) 5 mL, 置于 10 mL 棕色量瓶中, 加入甲醇溶液约 4 mL, 超声处理 5 min (100 Hz), 混匀, 冷却后, 用甲醇溶液定容至刻度, 得标准曲线工作溶液 2 (S2) ……以此类推, 得标准曲线工作溶液 3 (S3) ~ 7 (S7)。标准曲线工作溶液进样前, 分别过孔径 0.45 μm 滤膜。进样量为 10 μL。以各对照物质的浓度为横坐标 (C), 以各对照物质的峰面积 (A) 为纵坐标, 采用 Excel 软件处理, 获得各物质的标准曲线图, 记录其标准曲线方程及线性相关系数。结果见表 1。

表 1 芦丁、槲皮素标准曲线回归方程

成分	质量浓度范围 /mg·L ⁻¹	回归方程	r
芦丁	1.56 ~ 100.00	$A = 1.37 \times 10^4 C + 1.06 \times 10^4$	0.999 6
槲皮素	1.52 ~ 97.00	$A = 2.94 \times 10^4 C - 1.08 \times 10^3$	0.999 8

2.6 精密度试验

选择标准曲线工作溶液 (S3) 溶液, 按照 2.1 色谱条件方法, 连续进样, 记录芦丁、槲皮素峰面积, 芦丁和槲皮素峰面积的 RSD 分别为 1.35% 和 1.54%, 结果表明方法的精密度良好。

2.7 稳定性试验

按照 2.1 色谱条件方法, 于室温 (25 °C) 条件下, 选择标准曲线工作溶液 (S3) 溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 测定, 芦丁和槲皮素峰面积的

标准变异系数 (RSD) 分别为 1.18% 和 1.66% ,结果表明在室温条件下各物质在 8 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验 称取苦荞提取物样品 1 (批号 080601) ,约 10 mg ,5 份 ,连续制备 5 份样品 ,按照 2.1 色谱条件方法 ,进样 ,记录芦丁、槲皮素峰面积 ,芦丁和槲皮素的平均含量分别为 19.51% 和 4.80% ,芦丁和槲皮素含量的标准变异系数 (RSD) 分别为 1.12% 和 1.41% ,表明方法的重复性良好。

2.9 回收率试验 称取已知含量的苦荞提取物样品 1 (批号 080601) ,约 5 mg ,5 份 ,分别置于 50 mL 棕色量瓶中 ,分别加入芦丁 1.0 mg (芦丁甲醇溶液 1 mL ,浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和槲皮素 0.25 mg (槲皮素甲醇溶液 1 mL ,浓度为 $0.25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) ,按照 2.3 项下方法制备。按含量测定项下方法测定 ,以 (测定值与样品中含量之差) 与加入对照物质的量的比值的百分数作为回收率 ,结果芦丁和槲皮素的平均回收率分别为 98.49% 和 97.87% ,RSD 分别为 1.25% 和 1.69% ($n=5$)。结果见表 2。

表 2 芦丁、槲皮素加样回收率试验

成分	称样量 /mg	已知量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%
芦丁	5.3	1.03	1.00	2.01	98.10	1.25
	4.9	0.96	1.00	1.94	98.44	
	5.1	0.99	1.00	1.98	98.60	
	4.8	0.94	1.00	1.91	96.95	
	4.6	0.90	1.00	1.90	100.36	
槲皮素	5.3	0.25	0.25	0.49	96.05	1.69
	4.9	0.24	0.25	0.48	96.82	
	5.1	0.24	0.25	0.49	98.22	
	4.8	0.23	0.25	0.48	97.88	
	4.6	0.22	0.25	0.47	100.39	

2.10 样品含量测定 以 2.3 样品溶液的制备方法分别制备 6 批苦荞提取物样品溶液 ($n=3$) ,按照 2.1 色谱条件方法 ,进样 ,获得色谱图 ,记录芦丁、槲皮素峰面积 ,按照各对照物质的标准曲线回归方程 ,测定各物质的浓度 ,计算各对照物质在样品中的质量分数。结果见表 3。

6 批苦荞提取物中芦丁的质量分数为 $18.97\% \pm 1.43\%$ 槲皮素的含量为 $5.03\% \pm 0.42\%$ 。

表 3 苦荞提取物样品中芦丁和槲皮素 ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

批号	成分	样品含量	RSD
080601	芦丁	19.61 ± 0.28	1.43
	槲皮素	4.92 ± 0.07	1.42
080801	芦丁	20.62 ± 0.47	2.28
	槲皮素	5.23 ± 0.07	1.34
080802	芦丁	19.21 ± 0.21	1.09
	槲皮素	5.03 ± 0.05	0.99
090301	芦丁	19.72 ± 0.39	1.98
	槲皮素	4.75 ± 0.09	1.89
090302	芦丁	18.02 ± 0.36	2.00
	槲皮素	4.51 ± 0.06	1.33
090303	芦丁	16.62 ± 0.30	1.81
	槲皮素	5.72 ± 0.09	1.57

3 讨论

从研究结果可以看出 ,芦丁和槲皮素是课题组研苦荞提取物的主要成分 ,二者含量总和约占苦荞提取物质量的 25%。这为后期开展苦荞提取物的药用和保健作用提供了重要的基础数据和参考。

从研究结果可以看出 ,课题组开发的苦荞提取物中芦丁和槲皮素的相对比例约为 4:1 ,这为后期进行产品开发特别是口服给药后的体内生物利用度研究提供参考信息。

[参考文献]

- [1] 孙博航,吴雅清,高慧媛,等.苦荞麦的化学成分[J].沈阳药科大学学报,2008,25(7):541.
- [2] 张琪,刘慧灵,朱瑞,等.苦荞麦中总黄酮和芦丁的含量测定方法的研究[J].食品科学,2003,24(7):113.
- [3] 景仁志,陈波,葛绍荣,等.薄层扫描法测定苦荞叶中芦丁的含量[J].四川大学学报:自然与科学版,1997,(6):77.
- [4] 李洁,梁月琴,郝一彬.苦荞类黄酮降血脂作用的试验研究[J].山西医科大学学报,2004,35(6):570.
- [5] 张瑞,王英平,任贵兴.苦荞麦的药理研究进展[J].特产研究,2008,(1):74.
- [6] Liu C L, Chen Y S, Yang J H, et al. Antioxidant activity of tartary (*Fagopyrum tataricum* L. Gaertn.) and common buckwheat sprouts [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(1):173.

[责任编辑 顾雪竹]