

# 五爪龙外敷液中芹菜素与槲皮素的 HPLC 测定

董爱文<sup>1\*</sup>, 朱春艳<sup>2</sup>, 卓琦<sup>3</sup>

<sup>1</sup>吉首大学林产化工工程湖南省重点实验室, 张家界 427000;

<sup>2</sup>吉首大学生物资源与环境科学学院, 湖南吉首 416000; <sup>3</sup>吉首大学城乡资源与规划学院, 张家界 427000

**摘要:** 本实验建立芹菜素与槲皮素的 HPLC 检测法, 同时测定草药五爪龙外敷药液中芹菜素与槲皮素的含量。采用反相 shim-pack VP-ODS C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 优化条件为: 柱温 30 °C, 流动相: 甲醇-0.4% 磷酸(50:50, v:v); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 360nm; 进样体积 10 μL。对草药五爪龙外敷药液中芹菜素与槲皮素的含量进行测定。结果表明: 芹菜素与槲皮素均在 60 ~ 300 μg/mL 的范围内线性关系良好, *r* 分别为 0.9998 与 0.9996, 草药五爪龙乙醇浸液较水煎煮液中芹菜素与槲皮素含量均高。本法方便、快速、准确, 可检测草药五爪龙外敷液中的芹菜素与槲皮素的含量。

**关键词:** 五爪龙; 芹菜素; 槲皮素; 外敷液; HPLC

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

## Simultaneous Determination of Apigenin and Quercetin in External Application Liquid of *Potentilla kleiniana* Wight et Arn by HPLC

DONG Ai-wen<sup>1\*</sup>, ZHU Chun-yan<sup>2</sup>, ZHUO Qi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Forest Products Chemical Engineering of Hunan Province, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China;

<sup>2</sup>College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 416000, China;

<sup>3</sup>College of Urban-rural Resources and Planning Science, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China

**Abstract:** The objective of this study was to establish a HPLC method for the simultaneous determination of apigenin and quercetin in the external application liquid of *Potentilla kleiniana* Wight et Arn. Reversed phase chromatographic column Shim-pack VP-ODS C<sub>18</sub> (4.6 × 150 mm, 5 μm) was used for the separation of apigenin and quercetin under the conditions of methanol-4% phosphate acid(50:50, v:v) as the mobile phases, column temperature of 30 °C, flow rate of 1.0 mL/min, detection wavelength at 360 nm and injection volume of 10 μL. The results indicated that both apigenin and quercetin had good linear relationship in the range of 60-300 μg/mL with correlation coefficients of 0.9996 and 0.9997 respectively. The contents of apigenin and quercetin of the alcohol extract of *P. kleiniana* were higher than that of water-decocted liquid extract. In conclusion, the HPLC method developed in this study was convenient, quick and accurate. It can be used for determination of apigenin and quercetin in *P. kleiniana*.

**Key words:** *Potentilla kleiniana* Wight et Arn; apigenin; quercetin; external application liquid; HPLC

五爪龙 (*Potentilla kleiniana* Wight et Arn.) (蛇含委陵菜) 是委陵菜属植物<sup>[1]</sup>。常以全草入药, 性味: 苦, 微寒。具有清热解毒、止咳止痢、截疟、解毒活血等功效, 常用于治疗咽喉肿痛、小儿惊风、百日咳、急慢性胃炎等疗效显著<sup>[2]</sup>。武陵山区中医用五爪龙等草药用适量白酒捣烂后的醇浸液或水煎煮的汤液来外敷治疗疮毒、肿痛及蛇虫咬伤等。而两种

外敷液实际治疗效果差异较大, 中医会根据病况选择性使用何种外敷液及方中君药五爪龙用量。参考相关文献芹菜素具有抗氧化、抑制致癌物活性、抗炎、抗菌、抗病毒、抗焦虑、抗内毒素与免疫调节剂等作用<sup>[3,4]</sup>; 而槲皮素有抗癌防癌、镇痛、抗菌、抗病毒、抗衰老、抗炎、抗过敏、抗自由基及抗氧化等多种生物活性, 且对人体无毒、无害、无致死、致癌、致畸、致突变等作用<sup>[5,6]</sup>, 而委陵菜属植物均含芹菜素、槲皮素等<sup>[7]</sup>, 据此建立薄层层析分离、HPLC 法测定此外敷液中芹菜素与槲皮素的含量, 并对方法学进行了考察<sup>[8]</sup>, 结果表明, 此法能迅速、准确测定芹菜素

收稿日期: 2013-01-05 接受日期: 2013-07-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260634); 湖南省科技厅项目(2013NK3078; 2013FJ2012); 张家界市科技局项目(2013YB25)

\* 通讯作者 Tel: 86-744-8231386; E-mail: daw1999@163.com

与槲皮素在两外敷药液中的含量,初步探索了民间药的有效成分分析与检测方法。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

LC-20A 高效液相色谱仪(日本)岛津;R-215 旋转蒸发仪(瑞士)BUCHI;LD5-2A 离心机(北京医用);HH-6 电子恒温水浴锅(苏州威尔实验用品有限公司);MHA 型数显式恒温电热套(北京科伟永兴仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

乙醇、磷酸、盐酸、乙酸乙酯、石油醚、氯仿、甲酸为国产分析纯,水为蒸馏水,甲醇为色谱纯;薄层层析用硅胶(青岛海洋化工有限公司);羧甲基纤维素钠(湘潭市森泰化工);芹菜素标准品(购于天津尖峰天然产物研究开发有限公司,纯度 $\geq 98\%$ );槲皮素标准品(批号:100081-200907,中国药品生物制品鉴定所)。

五爪龙两外敷液按张家界市永定区沙堤乡余水溪村田中医提供的药方配制。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Shim-pack VP-ODS  $C_{18}$  (4.6 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ m);柱温:30  $^{\circ}$ C;流动相:甲醇-0.4%磷酸(50:50, v:v);流速:1.0 mL/min;检测波长:360 nm;进样体积:10  $\mu$ L。检测液进样前经 0.45  $\mu$ m 滤膜抽滤。

### 2.2 标准品溶液的制备

精密称取于 60  $^{\circ}$ C 减压干燥至恒重的芹菜素与槲皮素标准品各 20.00 mg,混合置于 100 mL 容量

瓶中,乙醇溶解并定容,得两成分各 0.2 mg/mL 的混合标准品溶液,用 0.45  $\mu$ m 滤膜抽滤,即得。

### 2.3 供试溶液的制备

A 液:按配方称取阴干水分新鲜五爪龙(15 g)等草药混合,加入适量 50% 乙醇捣碎,补充乙醇至 500 mL,密封后室温浸渍 8 h,三层脱脂棉纱布过虑;B 液:按配方称取阴干水分新鲜五爪龙(15 g)等草药切碎、混合后加 500 mL 蒸馏水,温火煎煮至沸腾后 30 min,趁热三层脱脂棉纱布过虑;两外敷液用 4 号新华滤纸抽滤,滤液再用旋转蒸发仪浓缩至 15 ~ 30 mL。浓缩液依次用石油醚、氯仿萃取去杂后各加入 25% 盐酸 15 mL 水浴回流水解 60 min,快速冷却,离心(10 000 rpm)10 min,取上清液,用旋转蒸发仪浓缩至 10 mL 左右,经硅胶 G 薄层层析,刮取与芹菜素、槲皮素标准品相同  $R_f$  0.65 与 0.53 的全部芹菜素与槲皮素斑点<sup>[9]</sup>。溶解定容至 100 mL,摇匀,用 0.45  $\mu$ m 滤膜抽滤,即得。

### 2.4 标准曲线的绘制

精密移取混合标准品溶液 0、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5 mL,置于 10 mL 容量瓶中,乙醇稀释定容,摇匀,配制成各 0、60、120、180、240、300  $\mu$ g/mL 的混合溶液,按色谱条件分别进样检测<sup>[10]</sup>。以浓度(X)为横坐标,峰面积积分值(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程: $Y_{芹} = 16248X - 50319, r = 0.9998$ ;  $Y_{槲} = 160275X - 43582, r = 0.9996$ ,线性范围为 60 ~ 300  $\mu$ g/mL。

### 2.5 精密度试验

精密吸取混合标准品溶液 10  $\mu$ L,按 2.1 项色谱条件连续重复进样 6 次,测定其峰面积,结果见表 1,芹菜素 RSD = 1.641% ( $n = 6$ )、槲皮素 RSD = 1.605% ( $n = 6$ ),表明仪器精密度良好。

表 1 精密度测定结果

Table 1 Results of precision tests

名称 Name	1	2	3	4	5	6
浓度(Concentration, $\mu$ g/mL)	200	200	200	200	200	200
芹菜素峰面积(Peak areas of apigenin)	3153628	3127985	3138969	3165813	3148749	3153265
槲皮素峰面积(Peak areas of quercetin)	3161762	3148513	3162691	3138179	3165258	3152387

### 2.6 重现性试验

制取 6 份水煎样品溶液,按 2.3 项实验室处理后的滤液按 2.1 项色谱条件测定其峰面积,结果外

敷汤液中芹菜素与槲皮素平均质量分数分别为 0.078%、0.106%,RSD 为 1.463%、1.378% ( $n = 6$ ),表明本方法的重现性较好。

## 2.7 稳定性研究

取 2.3 项制备的两种供试溶液,按 2.1 项色谱条件,每隔 6 h 进样 10  $\mu\text{L}$  (3 d 测 7 次),结果乙醇外敷液 RSD 为 2.158%、2.085% ( $n=7$ ),而水煎液 RSD 为 1.836%、1.785% ( $n=7$ ),表明两种外敷液中芹菜素与槲皮素在室温下 3 d 内较稳定。

## 2.8 加样回收率试验

同批次配制好的药方材料 12 份,各加入 0.2 mg/mL 的标准品混合溶液 5 mL 后按 2.3 项的方法制取乙醇与水煎外敷液各 6 份并处理外敷液,按 2.1 项色谱条件测定,计算回收率,结果乙醇外敷液中芹菜素与槲皮素平均回收率为 100.7% 与

99.3%,RSD 为 1.538% 与 1.865% ( $n=6$ ),水煎外敷液中芹菜素与槲皮素平均回收率为 99.2% 与 98.6%,RSD 为 2.037% 与 2.107% ( $n=6$ ),因此本法具有较好的回收率。

## 2.9 样品测定

分别精密吸取标准品混合溶液与 2.3 项的水煎液与乙醇液各 10  $\mu\text{L}$ ,按 2.1 项色谱条件进行检测,其 HPLC 检测图谱见图 1,以 6 mL/min 与 12 min 左右所出峰的峰面积进行计算,结果水煎液中芹菜素与槲皮素的质量分数为 0.125% 与 0.131%,乙醇液中芹菜素与槲皮素的质量分数为 0.316% 与 0.268%。

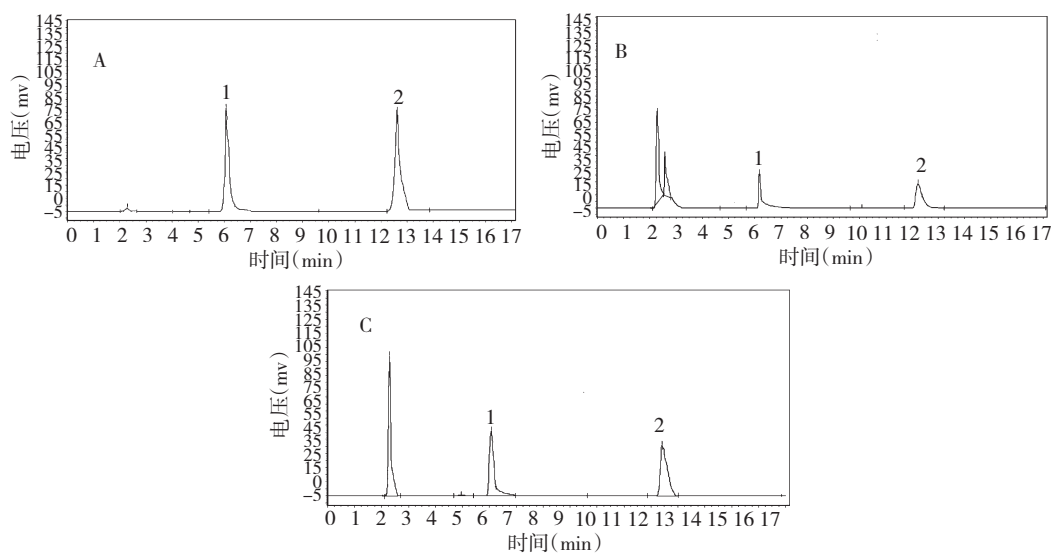


图 1 标准品(A)、水煎液(B)及乙醇液(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of standard(A), water-decocted extract(B) and alcohol extract(C)

峰 1: 芹菜素; 峰 2: 槲皮素

Peak 1: apigenin; Peak 2: quercetin

## 3 讨论

由于田老中医常年在乡间用草药五爪龙等的乙醇液或水煎煮液外敷治疗山区农民的疮毒、肿痛及蛇虫咬伤,其所用药料完全一致,只是方中所用溶剂不同,而治疗效果差异明显;HPLC 检测的结果(图 1B、C)也显示溶剂不同外敷液中药效成分差异较大,这与治疗时乙醇液比水煎液的治疗效果好是一致的,而对两外敷液中其它药效成分还有待进一步分析与检测。

本实验所用供试液完全按乡村中医提供的药方和方法制备,并对外敷液中芹菜素与槲皮素进行了初步纯化与薄层层析,使其达到能进行 HPLC 法检

测,分离纯化后的外敷液在室温下 3 d 内较稳定,这与民间一副制剂用三天,一天外敷三到五次也是一致的。

本实验建立的方法具有操作简便,能迅速、准确测定两外敷药液中芹菜素与槲皮素的含量,其精密度、重现性、回收率都较好,此为民间用药中有效成分的分析与检测建立了初步方法。

## 参考文献

- 1 Wang BE(王兵娥),Huang DH(黄德红),Du SQ(杜双全). Study on the crude drugs feature of *Potentilla kleiniana*. *Chin Pharm J*(中国药学杂志),2005,4:261-264.

(下转第 272 页)