

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.10.06

# 辣蓼黄酮中芦丁、槲皮素与槲皮苷的含量分析

谷俐媛<sup>1</sup>, 陶俊宇<sup>2</sup>, 曾芸<sup>1</sup>, 韦英益<sup>1</sup>, 胡庭俊<sup>1\*</sup>

(1 广西大学动物科学技术学院, 南宁 530005; 2 广西医科大学基础医学院, 南宁 530021)

[收稿日期] 2017-06-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 10-0039-07 [中图分类号] S853.7

**[摘要]** 为保障辣蓼黄酮工业化生产中的质量控制, 建立辣蓼黄酮中芦丁、槲皮素与槲皮苷含量测定高效液相色谱法。结果表明, 运用高效液相色谱法测定辣蓼黄酮乙酸乙酯部分 (FEA) 中芦丁、槲皮苷与槲皮素的含量分别为 281.97、160.98、83.31 mg/g, 辣蓼黄酮正丁醇部分 (FNB) 中芦丁、槲皮苷与槲皮素的含量分别为 150.33、147.51、73.82 mg/g。该方法简单、准确、灵敏、重复性好, 可作为辣蓼黄酮中芦丁、槲皮素与槲皮苷含量分析的参考方法。

**[关键词]** 辣蓼; 黄酮; 高效液相色谱; 含量分析

## Determination of Contents of Rutin, Quercetin and Quercitrin in Flavonoids from *Polygonum hydropiper*

GU Li-yuan<sup>1</sup>, TAO Jun-yu<sup>2</sup>, ZENG Yun<sup>1</sup>, WEI Ying-yi<sup>1</sup>, HU Ting-jun<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005, China;

2. School of Preclinical Medicine, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Corresponding author: HU Ting-jun, E-mail: tingjunhu@126.com

**Abstract:** The flavonoids of *Polygonum hydropiper* were separated and purified by means of macroporous adsorption resin, and its antioxidant activity was tested in previous research, which gained satisfied results. In order to obtain flavonoids of *Polygonum hydropiper* with stable quality, and provide evidence for quality control in industrial production, high performance liquid chromatography for determination of total flavonoids in *Polygonum hydropiper* was used with rutin, quercetin and quercitrin as reference substance. The results showed that the contents of rutin, quercetin and quercitrin from flavonoids ethyl acetate (FEA) in *Polygonum hydropiper* were 281.97, 160.98, 83.31 mg/g respectively; The contents of rutin, quercetin and quercitrin of flavonoids n-butanol (FNB) in *Polygonum hydropiper* were 150.33, 147.51, 73.82 mg/g respectively. The method demonstrated advantage of simply, accuracy and sensitivity, and successfully applied to the analysis of rutin, quercetin and quercitrin content in flavonoids from *Polygonum hydropiper*.

**Key words:** *Polygonum hydropiper*; flavonoids; high performance liquid chromatography

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (31560708); 广西大学兽医学研究生培养基地建设项目 (20160976)

**作者简介:** 谷俐媛, 硕士研究生, 从事兽医药理与毒理学方向研究。

**通讯作者:** 胡庭俊。E-mail: tingjunhu@126.com.

辣蓼,味辛、温,具有祛风利湿,散瘀止痛,解毒消肿,杀虫止痒之功效<sup>[1]</sup>。张国英等采用聚酰胺柱层析的方法,从辣蓼中分离得到 5 个黄酮类化合物:金丝桃苷、芦丁、槲皮素、异鼠李素、山奈酚<sup>[2]</sup>。现代科学研究表明,黄酮类化合物具有生物抗氧化性、清除自由基作用以及抗衰老的活性,能影响血管的脆性与通透性、改善血液循环状态,净化血液,有降血脂、降血压、降血糖的作用,还有镇痛、免疫、抗炎、抗菌等药用保健功能<sup>[3]</sup>。

目前,用于黄酮类化合物检测的方法包括分光光度法、薄层色谱法、超临界流体色谱法、质谱法、高效液相色谱法和毛细管电泳法<sup>[4-9]</sup>。其中,分光光度法操作简单,但误差较大。质谱及其联用技术所用仪器精密,但价格非常昂贵。薄层色谱法和毛细管电泳法在灵敏度和精确度方面都不如高效液相色谱法。因此,本研究选用进样量少,分辨效率高、灵敏度和准确度高的高效液相色谱法作为测定辣蓼黄酮中芦丁、槲皮素与槲皮苷含量的分析方法。高效液相色谱法(HPLC)应用广泛,已成为生命科学,临床化学,药物研究等方面的重要检测方法<sup>[10]</sup>。HPLC法具有分离效能高,灵敏度高,重现性好的优点<sup>[11]</sup>。本试验运用高效液相色谱法,以芦丁、槲皮素与槲皮苷为对照品对辣蓼总黄酮进行目标成分含量测定,为获得质量稳定含量均一的辣蓼总黄酮提供方法依据。

## 1 材料

1.1 仪器与试剂 Waters 2695 分离单元, Waters 2998 二极管阵列检测器, Empower 色谱工作站, 超声波清洗机(DTDN, 宁波新芝生物科技有限公司), 纯水仪(CD-UPT-1, 成都纯越科技有限公司), 微量离心机(TYPE1-14, SIGMA), 旋转蒸发器(ALPHA RA-8, Heidolph), 电热恒温干燥箱(DHG-9071A, 上海精宏实验设备有限公司), 乙腈(色谱纯, TEDIA), 磷酸(色谱纯, Fisher), 甲醇(色谱纯, TEDIA), 石油醚(分析纯, 西陇化工股份有限公司), 三氯甲烷(分析纯, 西陇化工股份有限公司), 无水乙醇(分析纯, 北京化工厂), 芦丁对照品(中国食品药品检定研究院 100080-200707), 槲皮素

对照品(中国食品药品检定研究院 100081-201408), 槲皮苷对照品(中国食品药品检定研究院 111538-200504)。

1.2 辣蓼黄酮 辣蓼生药购自南宁市山草堂, 经酶解-超声偶联法提取后滤液经过石油醚、氯仿、乙酸乙酯以及正丁醇萃取。收集乙酸乙酯与部分与正丁醇部分, 经 XDA-8 大孔吸附树脂分离纯化, 得辣蓼黄酮乙酸乙酯部分(FEA)与辣蓼黄酮正丁醇部分(FNB)。FEA为淡黄色粉末, FNB为棕黄色粉末。

## 2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters XBridge™ C18 (4.6 mm×250 mm 5 μm); 柱温 30 ℃; 流速为 1 mL/min; 进样量 10 μL; 检测波长为 359 nm; 流动相: A相为乙腈, B相为 0.3%磷酸水溶液, A : B 为(27 : 73)等度洗脱。

2.2 供试样品的制备 精密称取 0.1 g FNB 与 0.1 g FEA 分别置于 10 mL 容量瓶中, 加入流动相至刻度线于 37 ℃ 下超声 20 min 充分溶解, 补足失重后 4 ℃ 保存。

2.3 对照品的制备 取芦丁、槲皮素与槲皮苷对照品均精密称定为 3 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中混合, 用流动相定容至刻度。取上述标准品溶液各 1 mL 置于 5 mL 容量瓶中并用流动相定容至刻度, 此时芦丁、槲皮素与槲皮苷质量浓度为 60 μg/ml。

2.4 专属性试验 在“2.1”所述的液相色谱条件下注入对照品与样品, 记录芦丁、槲皮苷与槲皮素保留时间, 计算分离度, 理论塔板数。

2.5 线性关系与线性范围 取“2.3”项下混合对照品溶液配制成系列梯度的混合标准品对照液, 按“2.1”项下所述色谱条件测定, 记录芦丁、槲皮苷与槲皮素的峰面积。以混合对照品浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线并进行线性回归。

2.6 精密度试验 取“2.3”项下混合对照品溶液按“2.1”项下所述色谱条件重复进样测定 6 次, 记录芦丁、槲皮苷与槲皮素的峰面积, 计算 RSD 值。

2.7 重复性试验 分别取 FEA 与 FNB 6 份, 按“2.2”项下制备成供试样品, 按“2.1”项下所述色谱条件测定芦丁、槲皮苷与槲皮素的峰面积, 计算

RSD 值。

2.8 稳定性试验 取 FEA 与 FNB 按“2.2”项下制备成供试样品于室温中放置 0、2、4、6、8、10、12 h，按“2.1”项下所述色谱条件测定芦丁、槲皮苷与槲皮素的峰面积，计算 RSD 值。

2.9 加样回收率试验 取同一批已知含量的 FEA 与 FNB，并加入一定含量的对照品，按“2.2”项下制备成供试样品，按“2.1”项下所述色谱条件测定芦丁、槲皮苷与槲皮素的峰面积。计算芦丁、槲皮苷与槲皮素的含量，计算回收率，结果见表 1~表 4。由表中结果可知，用本方法检测辣蓼黄酮中芦丁、槲皮苷与槲皮素含量时对目标成分的损耗低，回收率在 97%~99% 之间。

2.10 样品测定 取不同批次的 FEA 与 FNB 每批次样品取 3 份，按“2.2”项下制备成供试样品，按

“2.1”项下所述色谱条件测定芦丁、槲皮苷与槲皮素的峰面积。计算芦丁、槲皮苷与槲皮素的含量。

### 3 结果与分析

3.1 回归方程与线性关系 以各标准品浓度为横坐标，峰面积为纵坐标建立回归方程，如图 1 所示。芦丁： $Y=381177X-4828.4$ ， $R^2=0.9999$ ，槲皮苷： $Y=823682X-665955$ ， $R^2=0.9998$ ，槲皮素： $Y=659877X-442376$ ， $R^2=0.9999$ 。结果表明芦丁在进样量在 10~100  $\mu\text{g/mL}$ ，槲皮苷在进样量在 10~100  $\mu\text{g/mL}$ ，槲皮素在 20~200  $\mu\text{g/mL}$  内与峰面积呈良好线性关系。在“2.1”所述的液相色谱条件下，芦丁、槲皮苷与槲皮素保留时间分别为 7.9、11.9 和 26.5 min，各峰分离度大于 1.5，理论塔板数大于 3000。供试样品相同的保留时间处无杂峰干扰，表明方法专属性良好。色谱图如图 2~图 6 所示。

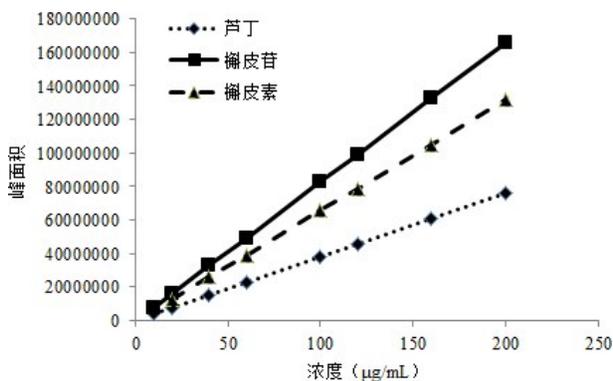


图 1 峰面积-浓度标准曲线

Fig 1 Standard curve of peak area-concentration

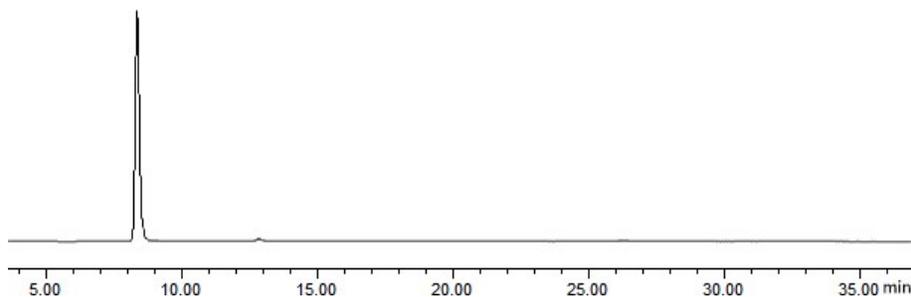


图 2 芦丁对照品色谱图 (60  $\mu\text{g/mL}$ )

Fig 2 Chromatogram of rutin reference substance

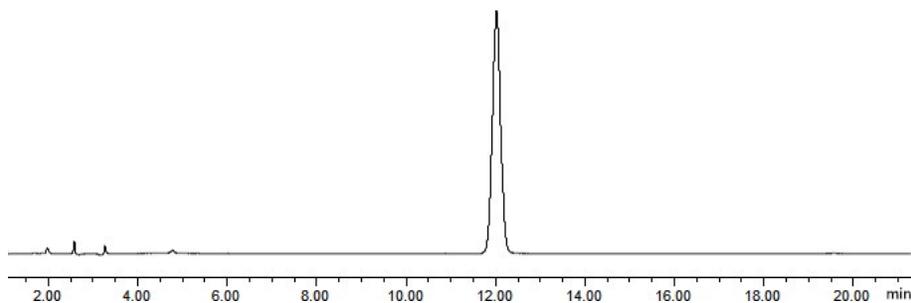


图 3 槲皮苷对照品色谱图 (60 µg/mL)

Fig 3 Chromatogram of quercitrin reference substance

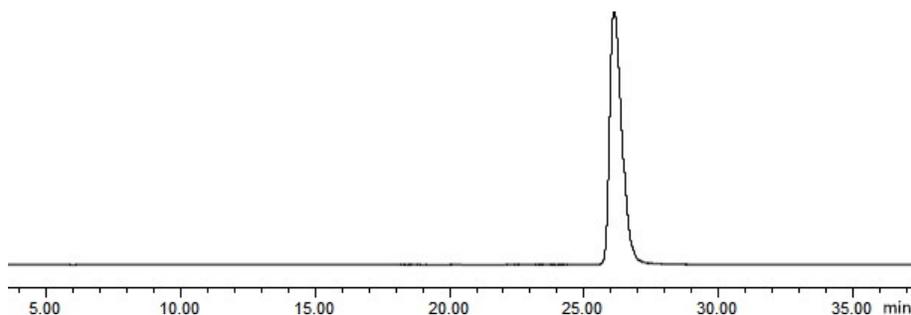


图 4 槲皮素对照品色谱图 (60 µg/mL)

Fig 4 Chromatogram of quercetin reference substance

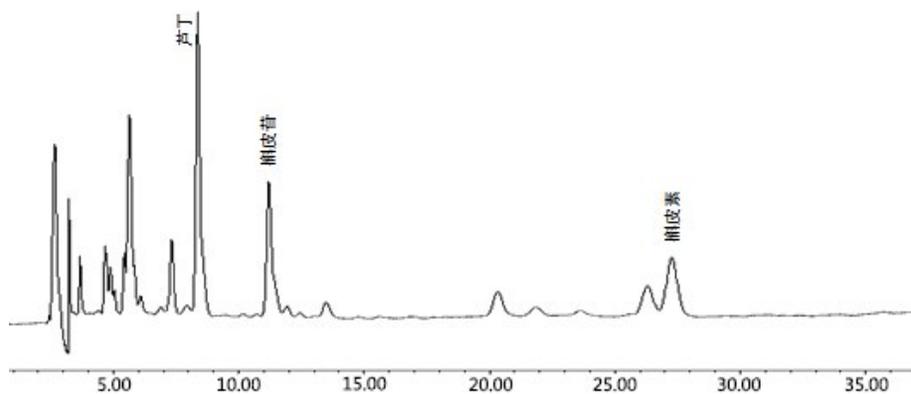


图 5 FEA 色谱图 (60 µg/mL)

Fig 5 Chromatogram of FEA

3.2 精密度试验 结果显示芦丁、槲皮苷与槲皮素的 *RSD* 值分别为 0.12%、0.45% 和 0.25%，精密度符合兽药典要求。

3.3 重复性试验 按重复性实验要求，结果显示：芦丁、槲皮苷与槲皮素的 *RSD* 值分别为 1.10%、1.02% 和 1.03%，FNB 的 *RSD* 值分别为 0.68%、1.19% 和 0.61%。

3.4 稳定性试验 结果显示：FEA 的 *RSD* 值分别为 0.41%、0.17% 和 0.52%，得 FNB 的 *RSD* 值分别为 0.41%、0.78% 和 0.93%，表明供试品室内放置 12 h 内稳定。

3.5 加样回收率试验 结果见表 1~表 3。由表中结果可知，用本方法检测辣蓼黄酮中芦丁、槲皮苷与槲皮素含量时对目标成分的损耗低，回收率在

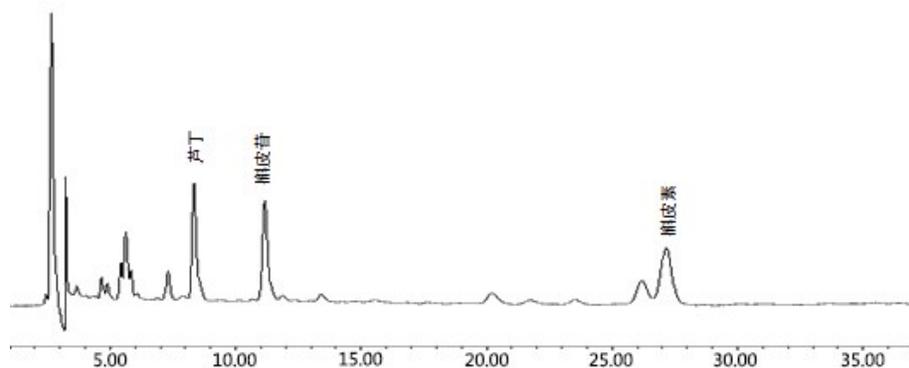


图 6 FNB 色谱图 (60 µg/mL)

Fig 6 Chromatogram of FNB

97%~99%之间。

3.6 样品测定 对不同批次,不同提取物的样品进行含量检测,结果如表 4,结果显示为 FEA 中芦丁、

槲皮苷与槲皮素的含量分别为 281.97、160.98、83.31 mg/g, FNB 中芦丁、槲皮苷与槲皮素的含量分别为 150.33、147.51、73.82 mg/g。

表 1 FEA 与 FNB 中芦丁回收率测定结果

Tab 1 Recovery rate of rutin for FEA and FNB

编号 Number	样品中芦丁含量/µg Sample content of rutin	芦丁对照品加入量/µg Dosage of quercetin reference substance	测得量/µg Detectable amount	回收率/% Recovery rate	平均回收率/% Average recovery rate	RSD/%
FEA-1	27.6	40	66.9	98.9		
FEA-2	28.9	20	48.0	98.2	97.9	1.14
FEA-3	28.1	10	36.6	96.7		
FNB-1	14.7	40	54.7	99.9		
FNB-2	15.6	20	35.17	98.7	98.8	1.06
FNB-3	15.3	10	24.51	97.8		

表 2 FEA 与 FNB 中槲皮苷回收率测定结果

Tab 2 Recovery rate of quercitrin for FEA and FNB

编号 Number	样品中槲皮苷含量/µg Sample content of quercitrin	槲皮苷对照品加入量/µg Dosage of quercitrin reference substance	测得量/µg Detectable amount	回收率/% Recovery rate	平均回收率/% Average recovery rate	RSD/%
FEA-1	15.7	40	54.7	98.2		
FEA-2	16.3	20	35.9	98.9	98.6	0.36
FEA-3	15.9	10	25.5	98.6		
FNB-1	15	40	53.8	97.8		
FNB-2	14.9	20	33.9	97.4	98.2	1.07
FNB-3	15.4	10	25.3	99.4		

表 3 FEA 与 FNB 中槲皮素回收率测定结果  
Tab 3 Recovery rate of quercetin for FEA and FNB

编号 Number	样品中 槲皮素含量/ $\mu\text{g}$ Sample content of quercetin	槲皮素对照品加入量/ $\mu\text{g}$ Dosage of quercetin reference substance	测得量/ $\mu\text{g}$ Detectable amount	回收率/% Recovery rate	平均回收率/% Average recovery rate	RSD/%
FEA-1	9.3	20	29.1	99.2		
FEA-2	8.9	10	18.4	97.6	98.1	0.90
FEA-3	9	5	13.7	97.7		
FNB-1	7.5	20	26.9	98.1		
FNB-2	8.2	10	17.6	96.8	97.8	0.86
FNB-3	7.9	5	12.7	98.4		

表 4 不用批次的 FNB 与 FEA 中芦丁、槲皮苷与槲皮素含量 (n=3)  
Tab 4 Content of rutin, quercitrin and quercetin in FEA and FNB

批号 Batch number	芦丁测得量 $/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$ Detectable amount of rutin	芦丁平均值 $/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$ The average of rutin	RSD/%	槲皮苷测得量 $/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$ Detectable amount of quercitrin	槲皮苷平均值 $/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$ The average of quercitrin	RSD/%	槲皮素测得量 $/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$ Detectable amount of quercetin	槲皮素平均值 $/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$ The average of quercetin	RSD/%
20140517 FEA	282.99			165.12			82.97		
	280.99	81.99	0.35	160.98	61.69	1.93	84.95	3.31	1.81
	281.97			159.00			81.99		
20140521 FEA	285.00			167.00			79.85		
	286.99	86.99	0.69	171.00	70.00	1.56	80.99	79.61	1.90
	288.98			172.00			78.00		
20140524 FEA	292.97			173.00			85.21		
	294.03	93.33	0.21	177.98	74.99	1.51	84.32	5.04	0.77
	292.99			174.00			85.60		
20140517 FNB	153.94			144.21			67.48		
	152.00	152.33	1.00	149.00	46.73	1.64	64.98	6.16	1.90
	151.00			147.00			66.00		
20140521 FNB	149.00			146.00			71.48		
	151.93	150.33	1.01	147.98	147.51	0.90	71.98	3.82	1.42
	150.00			148.53			69.97		
20140524 FNB	144.99			144.86			74.47		
	149.00	146.99	1.36	149.00	146.31	1.60	73.00	73.82	1.02
	146.96			145.06			74.00		

#### 4 讨论与小结

前人研究表明,辣蓼中所含黄酮成分有芦丁、槲皮苷、槲皮素、金丝桃苷、异鼠李素与山柰酚。芦丁能对糖尿病大鼠的氧化应激损伤,降低尿中蛋白

含量<sup>[12]</sup>。芦丁与槲皮素在小鼠模型中显示出明显的抗惊厥作用<sup>[13]</sup>。有学者研究发现槲皮苷、芦丁、槲皮素与山柰酚为辣蓼中含量最多的黄酮<sup>[14]</sup>。所以本试验选取 3 者为指标物质对 FEA、FNB 相应成

分进行含量检测。

在前期试验中曾经考察过用甲醇与 0.3% 磷酸水溶液进行洗脱,但槲皮素的色谱峰会出现拖尾,于是选用乙腈与 0.3% 磷酸水溶液作为流动相,测得芦丁、槲皮苷与槲皮素的峰形较好,各组分在各自浓度范围内线性关系良好。在精密度试验中,相对标准偏差(RSD)都小于 1%,说明该方法精密度高,是可靠的。

运用高效液相色谱法测定 FEA 中芦丁、槲皮苷与槲皮素的含量分别为 281.97、160.98、83.31 mg/g, FNB 中芦丁、槲皮苷与槲皮素的含量分别为 150.33、147.51、73.82 mg/g,本试验所测的芦丁、槲皮素与槲皮苷与 Zhao F P<sup>[15]</sup> 研究结果相一致。本研究运用的高效液相色谱检测辣蓼黄酮中芦丁、槲皮素与槲皮苷含量的方法,峰型对称性较好,回收率高,且操作简单、准确,精密度、重复性好,可以用于辣蓼黄酮中芦丁、槲皮素与槲皮苷的含量分析。

## 参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2010 年版二部[S]. Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China (the second section), 2010 edition.[S].
- [2] 张国英,曾 韬. 辣蓼主要化学成分的研究[J]. 林产业化学与工业, 2005, 25(3): 21-24.  
Zhang G Y, Zeng T. Study on chemical constituents of polygonum hydropiper linn [J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2005, 25(3): 21-24.
- [3] 沈冰冰,王 敏,罗 娟,等. 蓼属药用植物的化学成分及其药理学研究进展[J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(7): 63-70.  
Shen B B, Wang M, Luo J, et al. Research progress of chemical constituents and its pharmacological activities from the medicinal plants of genus polygonum [J]. Journal of Hunan University of Chinese Medicine, 2015, 35(7): 63-70.
- [4] Baranowska I, Raróg D. Application of derivative spectrophotometry to determination of flavonoid mixtures [J]. Talanta, 2001, 55(1): 209-212.
- [5] Ji Y L, Wang G F, Fang B. Electrocatalysis and determination of baicalin at a nano-Au/single-wall carbonnanotube modified electrode [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2010, 29(6): 11-14.
- [6] Zhang H W, Chen G, Ye J N. Determination of rutin and quercetin in plants by capillary electrophoresis with electrochemical detection [J]. Analytica Chimica Acta, 2000, 423(1): 69-76.
- [7] Zhang J X, Chen G, Ye J N. Determination of puerarin, daidzein and rutin in pueraria lobata (wild.) ohwi by capillary electrophoresis with electrochemical detection [J]. Journal of Chromatography A, 2001, 923(1-2): 255-262.
- [8] Xu J C, Zhang L, Chen G. Fabrication of graphene/poly (ethyl 2-cyanoacrylate) composite electrode for amperometric detection in capillary electrophoresis [J]. Sensors and Actuators B Chemical, 2013, 182(3): 689-695.
- [9] Hong T K, Lee D W, Choi H J, et al. Transparent, flexible conducting hybrid multilayer thin films of multiwalled carbon nanotubes with graphene nanosheets [J]. ACS Nano, 2010, 4(7): 3861-3868.
- [10] 王 磊,赵 伟. 用高效液相色谱法测定大豆发酵制品中的异黄酮[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(5): 408-410.  
Wang L, Zhao W. Determination of isoflavones in soybean fermented product by HPLC [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2011, 39(5): 408-410.
- [11] 张人福,宋晓园. 高效液相色谱在药学的应用概况及最近进展[J]. 中国当代医药, 2013, 20(21): 15-16.  
Zhang R F, Song X Y. The Application and progress of high performance liquid chromatography in pharmaceutical [J]. China Modern Medicine, 2013, 20(21): 15-16.
- [12] Hao H H, Shao Z M, Tang D Q, et al. Preventive effects of rutin on the development of experimental diabetic nephropathy in rats [J]. Life Sciences, 2012, 91(19-20): 959-967.
- [13] Nieoczym D, Socata K, Raszewski G, et al. Effect of quercetin and rutin in some acute seizure models in mice [J]. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2014, 54(15): 50-58.
- [14] Yang X, Wang B C, Zhang X, et al. Simultaneous determination of nine flavonoids in polygonum hydropiper L. samples using nanomagnetic powder three-phase hollow fibre-based liquid-phase microextraction combined with ultrahigh performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011, 54(2): 311-316.
- [15] Zhao F P, Strack D, Baumert A, et al. Antioxidant flavonoids from leaves of Polygonum hydropiper L [J]. Phytochemistry, 2003, 62(2): 219-228.

(编辑:陈希)