

HPLC法同时测定裸花紫珠药材中3种黄酮类成分的含量^Δ

刘勇^{1*}, 张鹏威^{2#}, 许立强², 苏文琴², 刘晓³(1.温州医科大学附属第二医院, 浙江温州 325027; 2.海南医学院药学院, 海口 571199; 3.温州市中医院, 浙江温州 325000)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2926-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.17

摘要 目的: 建立同时测定裸花紫珠药材中芦丁、木犀草素和槲皮素含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为Dikma Diamondsil C₁₈(2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.4%磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为0.8 ml/min, 检测波长为257 nm。结果: 芦丁、木犀草素和槲皮素的进样量分别在65.28~587.52、9.28~83.52、5.22~46.94 ng范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系(r 分别为0.999 9、0.999 7、0.999 9); 三者精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%; 平均加样回收率分别为99.58%、99.31%和99.24%, RSD分别为1.46%、1.64%和1.41%(n 均为6)。结论: 该方法准确、精密度高、重复性好, 可用于裸花紫珠药材中芦丁、木犀草素和槲皮素含量的同时测定。

关键词 裸花紫珠; 高效液相色谱法; 芦丁; 木犀草素; 槲皮素; 含量测定

Simultaneous Determination of 3 Kinds of Flavone in *Callicarpa nudiflora* by HPLC

LIU Yong¹, ZHANG Peng-wei², XU Li-qiang², SU Wen-qin², LIU Xiao³(1.The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang Wenzhou 325027, China; 2.School of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou 571199, China; 3.Wenzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang Wenzhou 325000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish an HPLC method for simultaneous determination of rutin, luteolin and quercetin in *Callicarpa nudiflora*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Dikma Diamondsil C₁₈(2) column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-0.4% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 0.8 ml/min. The detection wavelength was set at 257 nm. RESULTS: The liner range were 65.28-587.52 ng for rutin ($r=0.999 9$), 9.28-83.52 ng for luteolin ($r=0.999 7$) and 5.22-46.94 ng for quercetin ($r=0.999 9$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. Average recoveries were 99.58% (RSD=1.46%, $n=6$), 99.31% (RSD=1.64%, $n=6$) and 99.24% (RSD=1.41%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is accurate, precise and reproducible, and can be used for the determination of rutin, luteolin and quercetin in *C. nudiflora*.

KEYWORDS *Callicarpa nudiflora*; HPLC; Rutin; Luteolin; Quercetin; Content determination

离度和峰形均较好, 故选其作为流动相。

综上所述, 本方法简便、灵敏、准确, 可用于清咽利喉口服液的质量控制。

参考文献

- [1] 彭鹏, 程雪梅, 郭英, 等. 野菊花栓剂质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 81.
- [2] 王明星, 于秀华, 刘永强, 等. 抗感利咽胶囊的质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 90.
- [3] 蓝鸣生, 陈路, 覃成芳, 等. 五淋散胶囊中梔子苷和芍药苷的HPLC含量测定[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(14): 1 281.
- [4] 王岩, 彭红英, 周莉玲, 等. 追风透骨胶囊的质量标准研究

[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(19): 1 910.

- [5] 董宇, 狄留庆, 赵晓莉, 等. HPLC法测定血压平喷雾剂中绿原酸、阿魏酸、芍药苷、肉桂酸[J]. 中草药, 2012, 43(2): 296.
- [6] 王巧梅, 薛桂蓬, 邢建国, 等. 芪天胶囊中红景天苷和芍药苷的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1): 88.
- [7] 王新娣, 石晓峰, 沈薇, 等. 双波长HPLC法同时测定安乳散结丸中芍药苷与迷迭香酸的含量[J]. 中国药房, 2013, 24(19): 1 795.
- [8] 刘亚蓉, 宋霞, 刘海青. 双波长RP-HPLC法同时测定妇科十味片中芍药苷、阿魏酸[J]. 中成药, 2013, 35(6): 1 222.
- [9] 冯川, 刘唯芬, 慕善学, 等. RP-HPLC法测定清胰利胆颗粒中绿原酸和芍药苷的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(3): 219.
- [10] 靳淑敏, 杨维, 王伟华, 等. 多波长RP-HPLC法测定抗感宁合剂中绿原酸、葛根素和芍药苷[J]. 中成药, 2009, 31(1): 75.

^Δ 基金项目: 浙江省公益性技术应用研究计划项目(No.2012C23082); 海南省重点科技计划项目(No.ZDXM20120095); 海南医学院科研培育基金立项项目(No.HY2010-011)

* 中药师, 硕士。研究方向: 中药制剂开发。电话: 0577-88002568。E-mail: lyssm@126.com

通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 药物制剂开发和药物质量标准。电话: 0898-66894429。E-mail: zpw0803@163.com

(收稿日期: 2014-04-18 修回日期: 2014-06-06)

裸花紫珠(*Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn.),别名贼子叶,黎药名补阙,为马鞭草科紫珠属植物,以叶入药,主要分布于我国广东、广西、海南等地。它具有抗菌、止血、散瘀消肿之功效,主治各种炎症、外伤出血、跌打肿痛、风湿肿痛、肺结核咳血、胃肠出血等症^[1-2]。文献报道裸花紫珠的主要有效成分为黄酮类化合物,如luteolin-7-*O*-(6"-trans-caffeoyl)- β -*D*-glucopyranoside、luteolin-7-*O*-(6"-trans-cinnamoyl)- β -*D*-glucopyranoside、luteolin-7-*O*-(6"-*p*-coumaryl)- β -*D*-glucopyranoside、紫珠萜酮、芹菜素、木犀草素、槲皮素、芦丁及其配糖体等^[3-4]。近年研究表明,黄酮类化合物如木犀草素具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、免疫调节等作用^[5-6]。目前,市售裸花紫珠单方制剂也以总黄酮为质控指标之一^[7]。由于黄酮类物质与鞣质存在天然的生源关系,部分鞣质具有与黄酮相类似的分子结构^[8],紫外吸收波长相互重叠,采用紫外分光光度法测定容易受到干扰^[9],因而较准确的定量方法应该采用高效液相色谱(HPLC)等分析方法。但是,上述部分化合物的对照品来源较少,因此目前主要测定的黄酮类化合物集中在对照品来源易得的几个化合物上。如,邹坤美等^[10]采用反相(RP)-HPLC法测定裸花紫珠胶囊中芦丁的含量;蔡金平等^[11]采用HPLC法同时测定裸花紫珠药材中毛蕊花糖苷和木犀草素的含量。为了更好地控制药材质量,需要尽可能地测定多个化合物含量,故笔者选择黄酮类的芦丁、木犀草素和槲皮素作为指标成分,采用HPLC法同时测定它们在裸花紫珠药材中的含量。

1 材料

1.1 仪器

LC-15C型HPLC仪,含LC Solution色谱工作站等(日本岛津公司);AE200型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);S04H型超声清洗机(美国Zealway公司)。

1.2 试剂

芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100080-200707,供含量测定用);槲皮素、木犀草素对照品(天津一方科技有限公司,纯度均为98%,批号分别为20121085、20121060);乙腈、甲醇(色谱纯,美国Tedia公司);水为纯净水,其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

裸花紫珠药材于2012年11月份采自海南不同地区,经海南九芝堂药业有限公司李伟高级工程师鉴定为马鞭草科裸花紫珠*C. nudiflora* Hook. et Arn.的干燥叶,阴干后备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Dikma Diamondsil C₁₈(2)(250 mm×4.6 mm,5 μ m);流动相:乙腈(A)-0.4%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~10 min,20%→30% A;>10~20 min,30%→40% A;>20~40 min,40%→50% A);流速:0.8 ml/min;检测波长:257 nm;柱温:室温。色谱见图1。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取芦丁、木犀草素、槲皮素对照品适量,加甲醇制备成每1 ml分别含芦丁32.64 μ g、木犀草素4.64 μ g、槲皮素2.608 μ g的混合对照品溶液,即得。

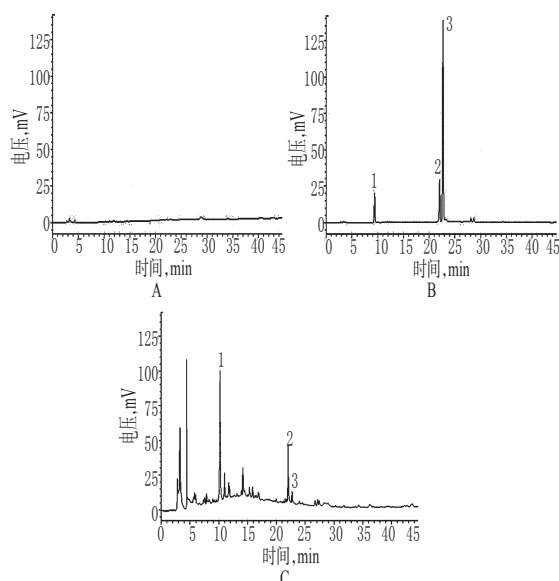


图1 高效液相色谱图

A. 空白溶剂;B.混合对照品;C.供试品;1.芦丁;2.木犀草素;3.槲皮素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank solution; B. mixed control; C. test sample; 1. rutin; 2. luteolin; 3. quercetin

2.3 供试品溶液的制备

取裸花紫珠药材粉末(过40目筛)约1 g,精密称定,置100 ml量瓶中,精密加入甲醇50 ml,称定质量,超声处理(功率:180 W,频率:40 kHz)30 min,取出,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 标准曲线的制备

精密吸取混合对照品溶液2、6、10、14、18 μ l,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积积分值(A)为纵坐标,对照品进样量(m)为横坐标,绘制标准曲线,得芦丁、木犀草素、槲皮素的回归方程分别为 $A=3\ 523.2m+3\ 732(r=0.999\ 9,n=5)$ 、 $A=6\ 637.4m-7\ 873(r=0.999\ 7,n=5)$ 、 $A=5\ 622.0m+474(r=0.999\ 9,n=5)$ 。结果表明,芦丁、木犀草素、槲皮素的进样量分别在65.28~587.52、9.28~83.52、5.22~46.94 ng范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

吸取混合对照品溶液,按上述色谱条件连续进样测定6次,每次进样10 μ l,记录峰面积。结果,芦丁、木犀草素、槲皮素的RSD分别为1.51%、1.58%、1.31%(n均为6),表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一批药材粉末适量,按“2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,分别按上述色谱条件进样测定,每次进样10 μ l,记录峰面积,计算样品含量。结果,样品中芦丁、木犀草素和槲皮素的平均含量分别为1.010 0、0.400 5、0.186 4 mg/g,RSD分别为1.69%、1.37%、1.36%(n均为6),表明本方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一份供试品溶液,室温下放置,分别于0、2、4、8、12 h按上述色谱条件进样测定,每次进样10 μ l,记录峰面积。结果,芦丁、木犀草素和槲皮素的RSD分别为1.86%、1.89%、1.96%(n均为5),表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.8 加样回收率试验

取已知样品含量的同一批药材粉末适量,共6份,分别精密加入适量对照品溶液,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

对照品	序号	称样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
芦丁	1	0.500 8	0.655 4	0.571 2	1.218 1	98.51	99.58	1.46
	2	0.501 0	0.655 7	0.571 2	1.211 1	97.24		
	3	0.500 4	0.654 9	0.571 2	1.230 2	100.72		
	4	0.500 7	0.655 3	0.571 2	1.228 1	100.29		
	5	0.501 5	0.656 3	0.571 2	1.233 4	101.03		
	6	0.501 3	0.656 1	0.571 2	1.225 5	99.69		
木犀草素	1	0.500 8	0.171 7	0.162 4	0.334 5	100.26	99.31	1.64
	2	0.501 0	0.171 7	0.162 4	0.334 0	99.91		
	3	0.500 4	0.171 5	0.162 4	0.331 5	98.50		
	4	0.500 7	0.171 6	0.162 4	0.329 5	97.20		
	5	0.501 5	0.171 9	0.162 4	0.337 1	101.72		
	6	0.501 3	0.171 8	0.162 4	0.331 4	98.25		
槲皮素	1	0.500 8	0.074 5	0.071 7	0.147 1	101.27	99.24	1.41
	2	0.501 0	0.074 5	0.071 7	0.146 6	100.53		
	3	0.500 4	0.074 4	0.071 7	0.145 0	98.43		
	4	0.500 7	0.074 5	0.071 7	0.145 5	99.06		
	5	0.501 5	0.074 6	0.071 7	0.144 5	97.50		
	6	0.501 3	0.074 5	0.071 7	0.145 3	98.66		

2.9 样品含量测定

取海南不同地区所产裸花紫珠样品粉末适量,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,每次进样 10 μ l,记录峰面积,以峰面积计算样品中芦丁、木犀草素和槲皮素的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of content determination of samples($n=3$)

药材产地	芦丁,mg/g	RSD,%	木犀草素,mg/g	RSD,%	槲皮素,mg/g	RSD,%
海南五指山	1.010 0	1.52	0.400 5	1.39	0.186 4	1.11
海南海口	2.521 0	1.38	0.090 1	1.69	0.170 4	1.34
海南澄迈	1.123 0	0.87	0.135 2	1.25	0.217 8	1.35

3 讨论

芦丁、木犀草素和槲皮素均为黄酮类化合物,具有类似的紫外吸收特征。为了确定检测波长,笔者分别将芦丁、木犀草素和槲皮素对照品溶液在200~600 nm范围内进行全波长扫描。结果表明,芦丁、木犀草素和槲皮素分别在259、255、257 nm波长处具有特征吸收峰,此外在361、354、378 nm波长处也具有特征吸收峰,但3个化合物在低波长处的吸光度均比高波长处更大。为兼顾三者响应值,最终选定检测波长为257 nm。

试验中分别考察了甲醇-0.4%磷酸溶液和乙腈-0.4%磷酸溶液两种流动相系统。一般而言,等度洗脱的基线较平稳,但在等度洗脱试验中发现3个化合物若要完全分离需要90 min以上。因此,为缩短分析时间,又进行了梯度洗脱试验。结果发现,在以甲醇-磷酸溶液系统做梯度洗脱时,基线漂移较严重,故选择乙腈-磷酸溶液系统作为流动相。这与蔡金平等^[11]

研究结果不一致,其原因可能与色谱柱及分离化合物不完全相同有关。试验还考察了磷酸溶液的体积分数(0.1%、0.4%),通过色谱图显示,以0.1%磷酸溶液作B泵溶液时,色谱峰拖尾明显,故确定以乙腈-0.4%磷酸溶液为流动相梯度洗脱。

由于木犀草素和槲皮素的结构相差较小,保留时间较接近,故试验还考察了流动相流速。结果发现,在流速分别为1.0、0.8 ml/min时,木犀草素和槲皮素的分离度分别为2.0、2.2。为兼顾分析时间,没有继续降低流速,选择流速为0.8 ml/min,可达到分离度>2.0的要求。

在样品提取试验中,笔者考察了不同提取溶剂(50%甲醇、甲醇、50%乙醇、95%乙醇)和不同提取时间(15、30、60 min)的提取效果。结果显示,以甲醇作为溶剂时,样品能提取完全,色谱图基线较平稳且峰形对称性良好;提取15 min不能提取完全,故选择提取30 min。

综上所述,本方法准确、精密度高、重复性好,可用于裸花紫珠药材中芦丁、木犀草素和槲皮素含量的同时测定。

参考文献

- [1] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所,中国医学科学院药物研究所,北京医科大学药学院,等.中药志:第5册[M].北京:人民卫生出版社,1994:147.
- [2] 刘明生.黎药学概论[M].北京:人民卫生出版社,2008:165.
- [3] 蔡金平,董琳,关薇薇.裸花紫珠的研究进展[J].现代药物与临床,2012,27(1):60.
- [4] 高飞鹏,汪豪,叶文才,等.裸花紫珠叶的化学成分[J].中国药科大学学报,2010,41(2):120.
- [5] Hu C, Kitts DD. Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activities of solvent-fractionated dandelion (*Taraxacum officinale*) flower extracts in vitro[J]. *J Agric Food Chem*, 2003,51(1):301.
- [6] Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, et al. Lu-teolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages[J]. *J Pharm Exp Ther*, 2001,296(1):181.
- [7] 湛乐刚,宋永强.分光光度法测定裸花紫珠药材水提取物中总黄酮的含量[J].华西药学杂志,2005,20(5):449.
- [8] 徐为人,刘成卜,王建武.水飞蓟宾构象的理论研究[J].中草药,2004,35(4):376.
- [9] 许沛虎,毛培,张雪琼,等.解毒保肝片中总黄酮与总鞣质的含量测定[J].医药导报,2009,28(3):362.
- [10] 邹坤美,汪霞.RP-HPLC法测定裸花紫珠胶囊中芦丁的含量[J].中国药师,2009,12(8):1066.
- [11] 蔡金平,董琳,盛琳,等.HPLC同时测定裸花紫珠药材中毛蕊花糖苷和木犀草素[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(1):81.

(收稿日期:2013-12-15 修回日期:2014-03-26)