

HPLC法测定白花蛇舌草中槲皮素-3-O-β-d-吡喃葡萄糖苷的含量^Δ

曹广尚*, 杨培民#, 周鹏, 李芳(山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)47-4453-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.47.12

摘要 目的:建立测定白花蛇舌草中槲皮素-3-O-β-d-吡喃葡萄糖苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-1%冰醋酸(60:40, V/V),检测波长为254 nm,流速为1.0 ml/min,柱温为35 ℃。结果:槲皮素-3-O-β-d-吡喃葡萄糖苷的质量浓度在5.24~52.40 μg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD均<1.97%;平均加样回收率为99.57%,RSD=1.28%($n=6$)。结论:该方法操作简便,结果准确、可靠,可用于白花蛇舌草药材中黄酮类活性成分的含量测定。

关键词 白花蛇舌草;槲皮素-3-O-β-d-吡喃葡萄糖苷;高效液相色谱法;含量测定

Content Determination of Quercetin-3-O-β-d-glucopyranoside in *Hedyotis diffusa* by HPLC

CAO Guang-shang, YANG Pei-min, ZHOU Peng, LI Fang (The Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for the content determination of quercetin-3-O-β-d-glucopyranoside in *Hedyotis diffusa*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% acetic acid (60:40, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 254 nm, and column temperature was 35 ℃. RESULTS: The linear range of quercetin-3-O-β-d-glucopyranoside were 5.24-52.40 μg/ml ($r=0.999\ 9$) with an average recovery of 99.57% (RSD=1.28%, $n=6$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1.97%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reliable, and can be used for the quality control of *H. diffusa*.

KEYWORDS *Hedyotis diffusa*; Quercetin-3-O-β-d-glucopyranoside; HPLC; Content determination

白花蛇舌草为茜草科植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd. 的干燥全草,广泛分布于热带地区,我国长江以南诸省皆有分布,是临床常用中药之一。其具有清热解毒、活血化瘀、利湿通淋的功效,主要用于治疗肿瘤、肝炎、肺炎等疾病^[1-2]。然而该药材标准在历版《中国药典》收中均未见记载。关于其药理作用和活性成分的报道颇多^[3-7],有关其药效物质基础的研究也各有说法。笔者在文献报道和前期研究的基础上,对其有关成分进行了分离和药效成分筛选^[8-9],采用高效液相色谱(HPLC)法测定了白花蛇舌草中新分离的活性成分槲皮素-3-O-β-d-吡喃葡萄糖苷的含量,并对不同产地的白花蛇舌草药材进行了测定,旨在为白花蛇舌草质量控制方法的完善提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-2010型HPLC仪,配有SPD-10A型检测器和CLASS-VP型色谱工作站(日本岛津公司);AE200s型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);KQ5200型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

^Δ基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81274052);山东省自然科学基金资助项目(No.ZR2011HL043)

* 主管药师。研究方向:中药制剂及质量控制。E-mail: cgs198041@163.com

通信作者:教授,博士研究生导师。研究方向:中药制剂。电话:0531-68617607。E-mail: jnyym7777@126.com

1.2 试剂

槲皮素-3-O-β-d-吡喃葡萄糖苷对照品(经北京中医药大学科研测试中心鉴定,纯度>99%);乙腈(色谱纯,美国fisher公司);磷酸为色谱纯,水为纯净水,其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

白花蛇舌草由山东中医药大学附属医院药学部提供,产地分别为江西、山东、江苏、广东、河南、云南,经山东中医药大学李峰教授鉴定为茜草科植物白花蛇舌草 *H. diffusa* Willd. 的干燥全草。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-1%冰醋酸(60:40, V/V);流速:1 ml/min;进样量:10 μl;检测波长:254 nm;柱温:35 ℃。在此色谱条件下,理论板数按槲皮素-3-O-β-d-吡喃葡萄糖苷峰计应不低于5 000;分离度不小于2。色谱见图1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品贮备液 精密称取槲皮素-3-O-β-d-吡喃葡萄糖苷对照品10.48 mg,加甲醇溶解并定容至100 ml量瓶中,制成质量浓度为104.80 μg/ml的对照品贮备液,于室温下避光贮藏,备用。

2.2.2 供试品溶液 取本品适量,研碎,取约1 g,精密称定,置索式提取器中,加石油醚(60~90 ℃)适量,回流提取至提取液无色,药渣挥去石油醚,加甲醇100 ml回流提取3 h,甲醇蒸干,

残渣加70%乙醇溶解并转移至25 ml量瓶中,加70%乙醇定容至刻度,摇匀,即得。

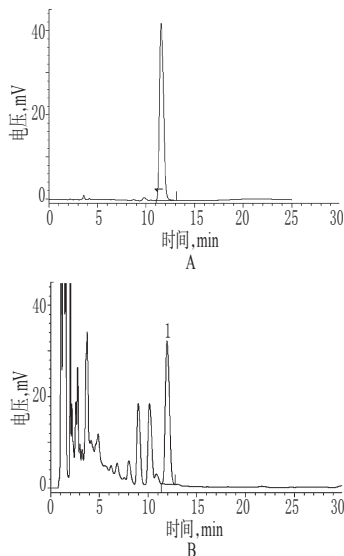


图1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; 1. 槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. test sample; 1. quercetin-3-*O*- β -*D*-glucopyranoside

2.3 线性关系考察

精密吸取对照品贮备液各5.0、4.0、3.0、2.0、1.0、0.5 ml,加甲醇稀释至10 ml,摇匀,得质量浓度分别为52.40、41.92、31.44、20.96、10.48、5.24 $\mu\text{g/ml}$ 的对照品溶液,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积积分值(y)为纵坐标,对照品的质量浓度(x , $\mu\text{g/ml}$)为横坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=8\ 626\ 654.9x+751.7$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷的质量浓度在5.24~52.40 $\mu\text{g/ml}$ 范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.4 精密度试验

精密吸取同一对照品溶液10 μl ,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果, $\text{RSD}=0.78\%$ ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液适量,分别于0、2、4、6、8、10、12 h按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果, $\text{RSD}=1.15\%$ ($n=7$),表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.6 重复性试验

称取同一批次的白花蛇舌草(山东)粗粉6份,每份约1.0 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果, $\text{RSD}=1.97\%$ ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取已知含量的同一批次白花蛇舌草约0.5 g,精密称定,共6份,分别精密加入质量浓度为0.375 0 mg/ml 的对照品溶液1 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率,结果见表1。

2.8 样品含量测定

取不同产地的白花蛇舌草样品各3份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品

含量,结果见表2。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

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

样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
0.375 2	0.375 0	0.753 2	100.80		
0.379 0	0.375 0	0.752 4	99.58		
0.384 3	0.375 0	0.756 7	99.32	99.57	1.28
0.368 8	0.375 0	0.742 9	99.75		
0.370 3	0.375 0	0.741 2	98.88		
0.372 8	0.375 0	0.744 3	99.07		

表2 样品含量测定结果($n=3$)

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

产地	槲皮素-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷,mg/g
江苏	0.56
山东	0.75
江西	0.18
广东	0.25
河南	0.37
云南	0.43

3 讨论

将对照品溶液在200~500 nm范围内进行扫描,结果发现,在254 nm处出峰多,主峰高,分离效果好,其他成分在该波长处无干扰,因此选择此波长作为检测波长。笔者曾比较了不同流动相乙腈-0.1%磷酸(30:70, V/V)、乙腈-水(65:35, V/V)、乙腈-1%冰醋酸(60:40, V/V)的出峰效果,结果发现,乙腈-1%冰醋酸(60:40, V/V)为流动相时的各峰分离度、峰形较佳,柱效较好。

2010年版《中国药典》中没有收载白花蛇舌草的药材标准,地方收载标准也没有对其进行质量控制,严重影响了其的临床疗效。本研究在前期工作的基础上,对其新分离的活性成分槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷进行含量测定,方法操作简便、结果准确,可为建立白花蛇舌草药材中黄酮类活性成分的含量测定方法及该药材的全面质量控制标准提供参考。

参考文献

- [1] 黄建荣,刘咏海,喻志标,等.白花蛇舌草化学成分和药理活性研究进展[J].中成药,2005,27(11):1 329.
- [2] 施峰,贾晓斌,贾东升,等.白花蛇舌草预防肺癌物质基础研究[J].中华中医药杂志,2010,25(3):403.
- [3] 陈永康.白花蛇舌草化学成分的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(27):290.
- [4] 杨帅,杨文文,胡金芳,等.GC-MS结合保留指数分析白花蛇舌草挥发性成分[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(9):93.
- [5] 张创峰,杨友亮,刘普,等.白花蛇舌草化学成分和药理作用研究进展[J].西北药学杂志,2012,27(4):379.
- [6] 朱博,刘辰卉.白花蛇舌草的化学成分与药理作用研究进展[J].海峡药学,2011,23(5):52.
- [7] 罗新根,蒋琳兰,赵树进.高效液相色谱法同时测定白花蛇舌草中两组分的含量[J].中国药房,2004,15(3):47.
- [8] 刘丹丹,娜,婧莹.白花蛇舌草抗肿瘤药理研究[J].中医药导报,2009,15(9):64.
- [9] 陈秀珍,朱大诚,王艳辉.白花蛇舌草药理作用及临床应用研究新进展[J].中药材,2009,32(1):157.

(收稿日期:2013-11-25 修回日期:2014-03-17)