

RP-HPLC 同时测定布渣叶中 4 种黄酮类成分

孙冬梅^{1,2*}, 陈雪婷¹, 徐文杰¹

(1. 广东省中医研究所, 广州 510095; 2. 广州中医药大学, 广州 510405)

[摘要] 目的: 建立布渣叶药材中槲皮素、山奈素、芹菜素、异鼠李素 4 种黄酮类成分的含量测定方法。方法: 采用 Waters Xbridge™ C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-0.4% 磷酸水溶液为流动相, 二元梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 367 nm, 柱温 35 ℃。结果: 槲皮素、山奈素、芹菜素、异鼠李素分别在 14.58 ~ 72.90, 63.76 ~ 318.8, 32.92 ~ 164.6, 79.68 ~ 398.4 ng 与峰面积呈良好的线性关系, 平均加样回收率分别为 98.90%, 97.62%, 97.93%, 97.79%。结论: 该方法灵敏、可行, 重复性好, 为布渣叶药材质量控制提供新的参考依据。

[关键词] 布渣叶; 高效液相色谱; 槲皮素; 山奈素; 芹菜素; 异鼠李素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0072-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150072

Simultaneous Determination of Four Flavonoids in *Microctis Folium* by HPLC

SUN Dong-mei^{1,2*}, CHEN Xue-ting¹, XU Wen-jie¹

(1. Guangdong Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China;

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the content determination of quercetin kaempferol, apigen, isorhamnetin in *Microctis Folium*. **Method:** Waters Xbridge™ C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with a step gradient of methanol-0.4% phosphoric acid at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 367 nm, and the column temperature was at 35 ℃. **Result:** Linear relationships between values of peak area and mass concentration of quercetin kaempferol, apigen, isorhamnetin were kept in the range of 14.58-72.90, 63.76-318.8, 32.92-164.6, 79.68-398.4 ng. The average recovery of quercetin, kaempferol, apigen, isorhamnetin was 98.90%, 97.62%, 97.93%, 97.79%. **Conclusion:** This method is simple, accurate and can be used for quality control of *Microctis Folium*.

[Key words] *Microctis Folium*; HPLC; quercetin; kaempferol; apigen; isorhamnetin

布渣叶为椴树科布渣叶属植物的干燥叶^[1], 岭南习用草药, 其药用历史最早见于清·何克廉所著的《生草药性备要》, 载其: “味酸, 性平, 无毒, 解一切蛊胀, 清黄气, 消热毒, 作茶饮, 去食积。” 近代药理研究显示布渣叶具有清热利湿、消食化滞、保护心血管、降脂等作用^[2-5]。本试验采用 HPLC, 以黄酮类成分为主要研究对象, 对 4 种黄酮苷元进行定量分析, 从而为布渣叶药材质量控制提供新的参考依据。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪 (美国 Agilent), XS205DU 型电子分析天平 (Mettler-Toledo 公司)。

槲皮素 (批号 100081-200907)、山奈素 (批号 110861-200808)、芹菜素 (批号 111901-201102)、异鼠李素 (批号 110860-201109) 对照品均购于中国食品药品检定研究院, 布渣叶药材为广东省市售, 经广东省中医研究所刘法锦研究员鉴定为椴树科布渣叶属

[收稿日期] 20140110(007)

[基金项目] 广东省科技计划项目重大科技专项 (2012A080202016); 广东省中医药局建设中医药强省科研项目 (20132080)

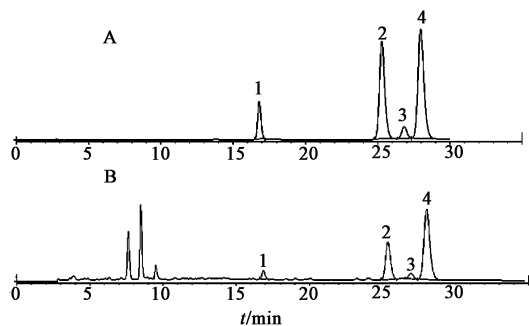
[通讯作者] * 孙冬梅, 硕士, 主任中药师, 从事中药质量评价研究, Tel: 020-83482683, E-mail: gdptem@163.com

植物 *Microcos paniculata* L. 的干燥叶。

甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters Xbridge C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 0.4% 磷酸水溶液(A)-甲醇(B)梯度洗脱(0~10 min, 35%~47% B; 10~30 min, 47% B;), 柱温 35 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 5 μL。对照品及供试品色谱见图 1。



A. 对照品; B. 供试品;

1. 槲皮素; 2. 山奈素; 3. 芹菜素; 4. 异鼠李素

图 1 布渣叶 HPLC

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品贮备液的制备 精密称取槲皮素、山奈素、芹菜素、异鼠李素对照品适量, 分别加甲醇制成每 1 mL 含槲皮素 72.9 μg、山奈素 159.4 μg、芹菜素 164.6 μg、异鼠李素 199.2 μg 的对照品溶液。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密吸取槲皮素、芹菜素对照品贮备液 1 mL, 山奈素、异鼠李素对照品贮备液 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 即得每 1 mL 含槲皮素 7.29 μg、山奈素 31.88 μg、芹菜素 16.46 μg、异鼠李素 39.84 μg 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取布渣叶药材(过 3 号筛) 1 g, 精密称定, 置 100 mL 锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定至量, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 15 mL 置平底烧瓶中, 加盐酸溶液 2 mL, 摇匀, 称定质量, 置水浴中加热水解 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 线性关系考察 分别精密吸取 2.2.2 项下混合对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 μL, 按 2.1 项下色谱条件分别进样测定, 由峰面积对质量浓度进行线性回

归, 得回归方程、相关系数及线性范围, 见表 1。

表 1 线性考察

| 成分 | 回归直线方程 | 线性范围/ng |
|------|---------------------|---------------|
| 槲皮素 | $Y = 4.39X - 3.15$ | 14.58 ~ 72.9 |
| 山奈素 | $Y = 4.12X - 12.00$ | 63.76 ~ 318.8 |
| 芹菜素 | $Y = 3.47X - 3.44$ | 32.92 ~ 164.6 |
| 异鼠李素 | $Y = 4.16X - 17.13$ | 79.68 ~ 398.4 |

注: $r = 0.9999$ 。

2.4 精密度试验 取同一混合对照品溶液(槲皮素 4.374 mg·L⁻¹、山奈素 19.128 mg·L⁻¹、芹菜素 9.876 mg·L⁻¹、异鼠李素 23.904 mg·L⁻¹), 按 2.1 项色谱条件, 重复进样 6 次, 进样量 5 μL, 测定峰面积, 得出日内峰面积的 RSD 分别为 0.23%, 0.76%, 0.54%, 0.27%, 表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液, 室温下按上述色谱条件分别于制备供试品溶液后的 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样, 测定峰面积。结果 RSD 分别为 0.53%, 0.27%, 0.36%, 0.19%, 表明供试品溶液在室温下 12 h 内稳定。

2.6 重复性试验 取同一批样品(S1) 6 份, 精密称定, 按 2.2.3 项下方法处理, 制成供试品溶液, 分别进样测定。结果槲皮素、山奈素、芹菜素、异鼠李素的平均质量浓度分别为 0.088 3, 0.633 3, 0.111 0, 1.390 mg·g⁻¹, RSD 分别为 1.58%, 0.87%, 1.46%, 0.73%, 表明该方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验 取已知含量的样品(S1) 6 份, 各约 0.5 g 精密称定。分别精密加入一定量的混合对照品溶液, 制备供试品溶液, 测定峰面积, 计算回收率。结果见表 2。

2.8 样品测定 取不同产地的布渣叶药材粉末约 1 g, 精密称定, 按 2.2.3 项下方法处理, 制成供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件, 测定 10 个不同产地布渣叶中槲皮素、山奈素、芹菜素及异鼠李素的含量, 结果见表 3。

3 讨论

近年来研究显示, 黄酮类成分为布渣叶药材中重要的活性部位, 由于黄酮苷类成分在体内容易水解、代谢, 主要以苷元的形式存在, 因此选择黄酮苷元作为评价指标, 可以更好地实现布渣叶药材的质量控制。本试验采用 HPLC 对布渣叶中槲皮素、山奈素、芹菜素及异鼠李素进行同时测定^[6-8], 操作简便, 结果准确, 重复性良好, 为布渣叶药材质量控制提供新的参考依据。

表 2 布渣叶中 4 种成分加样回收率

| 成分 | 取样量/g | 样品中量/mg | 加入量/mg | 测得量/mg | 回收率/% | 平均值/% | RSD/% |
|------|---------|---------|---------|---------|--------|-------|-------|
| 槲皮素 | 0.502 3 | 0.044 4 | 0.043 7 | 0.087 6 | 98.90 | 97.89 | 1.16 |
| | 0.509 9 | 0.045 0 | 0.043 7 | 0.087 5 | 97.12 | | |
| | 0.514 0 | 0.045 4 | 0.043 7 | 0.088 9 | 99.43 | | |
| | 0.508 3 | 0.044 9 | 0.043 7 | 0.087 1 | 96.58 | | |
| | 0.501 7 | 0.044 3 | 0.043 7 | 0.086 8 | 97.11 | | |
| | 0.504 1 | 0.044 5 | 0.043 7 | 0.087 5 | 98.19 | | |
| 山奈素 | 0.502 3 | 0.318 1 | 0.318 8 | 0.629 3 | 97.62 | 98.35 | 0.83 |
| | 0.509 9 | 0.322 9 | 0.318 8 | 0.637 4 | 98.66 | | |
| | 0.514 0 | 0.325 5 | 0.318 8 | 0.639 9 | 98.63 | | |
| | 0.508 3 | 0.321 9 | 0.318 8 | 0.637 9 | 99.12 | | |
| | 0.501 7 | 0.317 7 | 0.318 8 | 0.627 2 | 97.08 | | |
| | 0.504 1 | 0.319 2 | 0.318 8 | 0.634 9 | 99.00 | | |
| 芹菜素 | 0.502 3 | 0.055 8 | 0.049 4 | 0.104 1 | 97.93 | 99.11 | 1.02 |
| | 0.509 9 | 0.056 6 | 0.049 4 | 0.105 6 | 99.14 | | |
| | 0.514 0 | 0.057 1 | 0.049 4 | 0.105 5 | 98.05 | | |
| | 0.508 3 | 0.056 4 | 0.049 4 | 0.106 1 | 100.56 | | |
| | 0.501 7 | 0.055 7 | 0.049 4 | 0.104 7 | 99.17 | | |
| | 0.504 1 | 0.056 0 | 0.049 4 | 0.105 2 | 99.80 | | |
| 异鼠李素 | 0.502 3 | 0.698 2 | 0.796 8 | 1.477 4 | 97.79 | 98.31 | 0.97 |
| | 0.509 9 | 0.708 8 | 0.796 8 | 1.497 0 | 98.92 | | |
| | 0.514 0 | 0.714 5 | 0.796 8 | 1.496 7 | 98.17 | | |
| | 0.508 3 | 0.706 5 | 0.796 8 | 1.482 9 | 97.44 | | |
| | 0.501 7 | 0.697 4 | 0.796 8 | 1.474 9 | 97.58 | | |
| | 0.504 1 | 0.700 7 | 0.796 8 | 1.496 9 | 99.93 | | |

表 3 布渣叶中 4 种成分含量 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

| No. | 产地 | 槲皮素 | 山奈素 | 芹菜素 | 异鼠李素 |
|-----|------|---------|---------|---------|-------|
| S1 | 广东雷州 | 0.088 3 | 0.633 3 | 0.111 0 | 1.390 |
| S2 | 广东遂溪 | 0.069 4 | 0.507 9 | 0.087 7 | 1.103 |
| S3 | 广东化州 | 0.077 3 | 0.554 8 | 0.097 2 | 1.217 |
| S4 | 广东博罗 | 0.090 3 | 0.647 4 | 0.113 4 | 1.420 |
| S5 | 广西玉林 | 0.063 1 | 0.452 6 | 0.079 3 | 0.994 |
| S6 | 广东肇庆 | 0.070 2 | 0.503 3 | 0.093 8 | 1.106 |
| S7 | 广东阳西 | 0.059 1 | 0.422 4 | 0.074 0 | 0.944 |
| S8 | 广西来宾 | 0.068 4 | 0.491 3 | 0.086 3 | 1.078 |
| S9 | 广东江门 | 0.089 1 | 0.641 3 | 0.112 4 | 1.403 |
| S10 | 广东茂名 | 0.091 2 | 0.653 7 | 0.115 0 | 1.433 |

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国科技出版社, 2010: 88.

[2] 陈淑英, 余佩琪, 练美莲, 等. 布渣叶对血脂影响的实验研究[J]. 中药新药与临床药理, 1991(21): 3.

[3] 田素英, 曾聪彦, 梅全喜, 等. 布渣叶的化学成分、药理作用与临床研究进展[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(1): 134.

[4] 潘天玲, 李坤平, 林赞菲, 等. 不同产地布渣叶总黄酮含量及其清除自由基活性研究[J]. 广东药学院学报, 2009, 25(5): 452.

[5] 曾聪彦, 梅全喜, 戴卫波. 布渣叶药理作用研究的新进展[J]. 中华中医药学刊, 2010(9): 1927.

[6] 曾聪彦, 李依信, 梅全喜, 等. HPLC 法测定布渣叶中槲皮素的含量[J]. 今日药学, 2010, 20(4): 17.

[7] 曾聪彦, 李依信, 梅全喜, 等. HPLC 法测定布渣叶中山奈素的含量[J]. 中医药学报, 2010, 38(5): 87.

[8] 李坤平, 潘天玲, 周宏兵, 等. 反相高效液相色谱法测定不同产地布渣叶的 3 种水解黄酮苷元[J]. 理化检验-化学分册, 2010, 46(9): 1060.

[责任编辑 顾雪竹]