

# HPLC 测定相思子叶中滨藜黄苷含量

李春阳, 张平, 袁旭江\*

(广东药学院中药研究开发所, 广州 510006)

[摘要] 目的: 建立相思子叶中滨藜黄苷含量的 HPLC 测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, Hypersil BDS C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相甲醇 (A) - 0.2% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 25 min, 15% ~ 70% A), 检测波长 330 nm, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>。结果: 滨藜黄苷在 0.327 ~ 3.27 μg 与其峰面积呈良好的线性关系, 线性回归方程为  $Y = 1933.4X + 57.897$  ( $r = 0.9995$ ), 平均加样回收率为 99.46% (RSD 1.78%)。结论: 该方法简便准确、分离度好、专属性强, 可用于相思子叶中滨藜黄苷的含量测定。

[关键词] 相思子; 高效液相色谱; 滨藜黄苷

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)19-0079-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190079

## Determination of Cirsimarín in Leaves of *Abrus precatorius* by HPLC

LI Chun-yang, ZHANG Ping, YUAN Xu-jiang\*

(Research & Development Institute of Chinese Materia Medica of Guangdong  
Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to establish an HPLC method for the determination of cirsimarín in the leaves of *Abrus precatorius*. **Method:** HPLC was performed on Hypersil BDS C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), and the mobile phase was methanol (A) - 0.2% formic acid solution (B) with the gradient elution program (0-25 min, 15% - 70% A). The detection wavelength was set at 330 nm, the flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. **Result:** Cirsimarín showed a good linear relationship from 0.327 to 3.27 μg ( $r = 0.9995$ ), and the regression equation was  $Y = 1933.4X + 57.897$  ( $r = 0.9995$ ). The average recovery was 99.46% with RSD of 1.78%. **Conclusion:** The HPLC method is simple and accurate with good specificity. It can be used to determine the content of cirsimarín in the leaves of *A. precatorius*.

[Key words] *Abrus precatorius*; HPLC; cirsimarín

相思子具有生津、润肺、清热、利尿等作用, 用于肝炎、支气管炎、咽喉肿痛等<sup>[1-2]</sup>疾病的防治, 相思子的根(相思子根)、茎叶(相思子藤)均可入药。相思子叶具有甘甜味道, 为广东凉茶原料, 民间多将其煲汤或泡茶以达到保肝降脂的保健作用。相思子叶含有三萜<sup>[3-7]</sup>、生物碱<sup>[8]</sup>和黄酮类等有效成分。笔者从相思子叶中分离得到滨藜黄苷<sup>[9]</sup>, 为相思子叶中主要黄酮成分之一。现代药理学研究表明滨藜黄苷具有良好的抗氧化<sup>[10]</sup>、脂解<sup>[11]</sup>等作用, 能够有

效引发脂质运动具有良好的抗肥胖作用, 滨藜黄苷产生的脂解性能是咖啡因的 20 倍<sup>[12]</sup>, 因此, 本文采用高效液相色谱法建立了相思子叶中滨藜黄苷含量测定方法, 以期对相思子叶的品质选择和质量标准提供试验数据。

### 1 仪器与试剂

1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), BP211D 型电子天平(1/10 万, 德国 sartorius 公司), JJ1000 型电子天平(1/1000, 常熟市双杰测试

[收稿日期] 20140122(006)

[第一作者] 李春阳, 硕士, 从事中药开发利用及质量分析研究, Tel:020-39352540, E-mail:370584673@qq.com

[通讯作者] \*袁旭江, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药开发利用及质量分析研究, Tel:020-39352540, E-mail:xjyuan\_xj@163.com

仪器厂)。

滨藜黄苷对照品(自制, HPLC 测定纯度 > 99%), 相思子叶经广东药学院李书渊教授鉴定为豆科相思子属植物相思子 *Abrus precatorius* 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** Hypersil BDS C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm, 大连依利特科学仪器有限公司), 流动相甲醇(A)-0.2% 甲酸水溶液(B) 梯度洗脱(0 ~ 25 min, 15% ~ 70% A), 检测波长 330 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 10 μL。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液的制备** 取滨藜黄苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 制成 327 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取相思子叶粉末 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加 50% 甲醇 50 mL, 称重, 超声处理 40 min, 取出, 放冷, 用 50% 甲醇补足失重, 摇匀, 以 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

**2.3 系统适应性考察** 分别取 2.2 项下对照品和供试品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 按 2.1 项下色谱条件进行分析, 结果滨藜黄苷与样品中其他成分能达到完全分离, 且分离度均 > 1.5, 理论塔板数大于 80 000。对照品溶液和供试品溶液色谱见图 1。

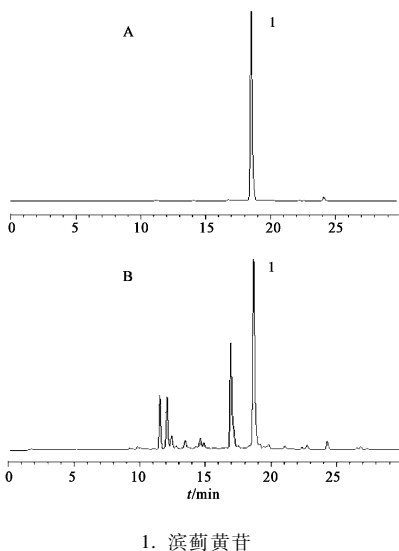


图1 滨藜黄苷对照品(A)和相思子叶供试品(B)的HPLC

**2.4 线性关系考察** 取 2.2.1 项下对照品溶液分别稀释制得 6 个不同质量浓度的对照品溶液 32.7,

65.4, 130.8, 196.2, 261.6, 327 mg·L<sup>-1</sup>, 分别精密吸取 10 μL, 按 2.1 项下色谱条件进行测定分析, 以滨藜黄苷进样量(μg)为横坐标, 峰面积积分值为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到滨藜黄苷的回归方程为  $Y = 1\,933.4X + 57.897$  ( $r = 0.999\,5$ ), 结果表明滨藜黄苷在 0.327 ~ 3.27 μg 与峰面积呈良好的线性关系

**2.5 精密度试验** 精密吸取对照品溶液 10 μL, 按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 测得滨藜黄苷峰面积 RSD 1.17%, 表明仪器的精密度良好。

**2.6 稳定性试验** 精密吸取供试品溶液进样 10 μL, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 按 2.1 项下色谱条件进样检测, 测得滨藜黄苷峰面积的 RSD 4.03%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.7 重复性试验** 取同一批相思子叶样品 6 份, 精密称定, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件下分别进样测定, 得到滨藜黄苷的质量分数平均值为 13.01 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 1.14%, 表明该方法的重复性良好。

**2.8 加样回收率试验** 取同一批已知含量(13.01 mg·g<sup>-1</sup>) 的相思子叶粉末 0.25 g, 精密称定, 共 6 份, 每份中加入 2.2.1 项下滨藜黄苷对照品溶液适量, 按 2.2.2 项下方法分别制备供试品溶液, 精密吸取 10 μL 进样测定, 计算平均加样回收率和 RSD, 结果见表 1。

表1 相思子叶中滨藜黄苷加样回收率

称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.254 2	3.307	6.573	99.88		
0.255 1	3.319	6.513	97.68		
0.253 3	3.295	6.474	97.22		
0.255 7	3.327	6.622	100.8	99.46	1.78
0.253 5	3.298	6.547	99.36		
0.252 4	3.284	6.612	101.8		

注: 加入量均为 3.27 mg。

**2.9 样品测定** 取 4 批不同产地相思子叶, 分别按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 10 μL 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 每个样品平行测定 3 份, 计算 4 批样品中滨藜黄苷的含量及其 RSD, 结果见表 2。

## 3 讨论

**3.1 供试品溶液制备方法的选择** 曾比较相思子叶粉碎和不粉碎的差别, 发现粉碎后提取率提高; 比

表2 相思子叶中滨藜黄苷含量测定

No.	采收时间	产地	滨藜黄苷/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%
1	2011-02	广东英德	13.01	1.14
2	2014-01	广东广州	14.35	1.03
3	2013-08	广东茂名	7.18	2.17
4	2011-11	广东茂名	38.12	1.07

较了甲醇、乙醇、水对相思子叶提取效果,甲醇提取的供试品溶液基线较为平整,峰分离度和对称性较好;在此基础上考察了甲醇浓度的影响,结果50%甲醇提取效果最好;比较超声法和加热回流法,两者对滨藜黄苷提取率差异不大,鉴于超声提取法操作简便快捷,选择超声法进行提取;对不同超声时间(20,40,60,80 min)和溶剂用量(40,50,60,100 mL)进行考察比较,结果发现50 mL 50%甲醇为溶剂超声提取40 min时效果最佳,因此确定该工艺参数为供试品制备方法。

**3.2 检测波长的选择** 滨藜黄苷在275,330 nm处有较大吸收,通过对275,300,330 nm下样品溶液HPLC色谱峰进行了比较,结果显示以330 nm的色谱图基线平稳,待测成分峰形较好,干扰较少,因此选择330 nm作为滨藜黄苷的检测波长。

**3.3 流动相的选择** 考察了甲醇和不同浓度甲酸水溶液(0.1%甲酸溶液、0.2%甲酸溶液、0.4%甲酸溶液)在等度洗脱(60:40,50:50,40:60)条件下对色谱峰的分离情况,结果以0.2%甲酸溶液的色谱峰分离度较好但均存在拖尾现象,进一步比较甲醇-0.2%甲酸溶液的不同梯度洗脱条件(0~20 min,30%~95%甲醇)、(0~25 min,15%~95%甲醇)和(0~25 min,15%~70%甲醇),结果以正文中流动相条件对滨藜黄苷色谱峰的出峰时间、峰形和分离度情况均达到最佳状态。

**3.4 成分含量差异** 相思子产于广东英德、茂名及广州等地,为岭南特有品种。本文通过对3个产地共4个批相思子叶进行测定,结果显示相思子叶中滨藜黄苷含量在0.71%~3.81%,其中茂名产相思子叶含量相差较大(最高3.81%,最低0.7%),而广州产和英德产的含量相近(约1.3%),造成差异性的原因可能是采收期和产地不同等,但其是否具有规律性有待进一步深入研究。

本文建立了相思子叶中滨藜黄苷含量的HPLC

测定方法,该方法简便准确、分离度和重复性好,专属性强,为相思子叶质量标准及其资源开发利用奠定一定的基础和依据。

#### [参考文献]

- [1] 江苏新医学院编.中药大辞典.下册[M].上海:上海科学技术出版社,2006:1503.
- [2] 谢宗万.全国中草药汇编.下册[M].北京:人民卫生出版社,1996:416.
- [3] Kennelly E J, Cai L, Kim N C, et al. Abrusoside e, a further sweet-tasting cycloartane glycoside from the leaves of *Abrus precatorius* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(5):1381.
- [4] Choi Y H, Hussain R A, Pezzuto J M, et al. Abrusosides A-D, four novel sweet-tasting triterpene glycosides from the leaves of *Abrus precatorius* [J]. *J Nat Prod*, 1989, 52(5):1118.
- [5] Chiang T C, Chang H M, Mak T C W. New Oleanene-type triterpenes from *Abrus precatorius* and X-ray crystal structure of abrusgenic acid-methanol 1:1 solvate [J]. *Planta Medica*, 1983, 49(11):165.
- [6] Xiao Z H, Wang F Z, Sun A J, et al. A new triterpenoid saponin from *Abrus precatorius* Linn [J]. *Molecules*, 2011, 17(1):295.
- [7] Karwasara V S, Jain R, Tomar P, et al. Elicitation as yield enhancement strategy for glycyrrhizin production by cell cultures of *Abrus precatorius* Linn [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2010, 46(4):354.
- [8] Kinjo J, Matsunoyo K, Inoue M, et al. A new saponin and other constituents in *Abrus precatorius* L. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39(1):116.
- [9] 李春阳,张平,袁旭江.相思子叶化学成分研究[J]. *广东药学院学报*, 2014, 30(1):24.
- [10] Jung H A, Choi J S. Comparative antioxidant activity and HPLC profiles of some selected Korean thistles [J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(1):28.
- [11] Zarrouki B, Pillon N J, Kalbacher E, et al. Cirsimarín, a potent antilipogenic flavonoid, decreases fat deposition in mice intra-abdominal adipose tissue [J]. *Int J Obes*, 2010, 34(11):1566.
- [12] Girotti C, Ginet M, Demame F C, et al. Lipolytic activity of cirsimarín extracted from *Microtea debilis* [J]. *Planta Medica*, 2005, 71(12):1170.

[责任编辑 顾雪竹]