

# HPLC同时测定布渣叶总黄酮提取物中6种黄酮类成分

江洁怡\*, 李养学, 李素梅, 胥爱丽

(广东省中医药工程技术研究院, 广州 510095)

**[摘要]** 目的:建立布渣叶总黄酮提取物中表儿茶素、牡荆苷、异牡荆苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷和水仙苷等6种黄酮类成分的HPLC同时测定方法。方法:采用HPLC法,Agilent HC-C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),甲醇-0.05%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,检测波长288 nm,柱温35℃,流速0.8 mL·min<sup>-1</sup>。结果:表儿茶素、牡荆苷、异牡荆苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷和水仙苷分别在131.200~1 312.000,149.800~1 348.200,131.400~1 051.200,99.175~595.050,109.955~659.730,267.000~1 348.200 ng呈线性关系,平均回收率分别为98.13%,97.41%,96.93%,98.22%,97.37%,97.82%。结论:该方法准确、可靠,重复性好,可用于布渣叶总黄酮提取物的质量评价与控制。

**[关键词]** 布渣叶总黄酮;高效液相色谱;表儿茶素;牡荆苷;异牡荆苷;山柰酚-3-*O*-芸香糖苷;异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷;水仙苷

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)09-0040-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016090040

## Simultaneous Determination of Six Flavonoids in Extract of *Microctis Folium* by HPLC

JIANG Jie-yi\*, LI Yang-xue, LI Su-mei, XU Ai-li

(Guangdong Province Engineering Technology Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a HPLC method for simultaneous determination of the content of epicatechin, vitexin, isovitexin, kaemferol-3-*O*-rutinoside, isorhamnetin-3-*O*-β-*D*-glucoside, and narcissi in extract of *Microctis Folium*. **Method:** The HPLC analysis was carried out on Agilent HC-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with amethanol-0.05% phosphoric acid solution as the mobile phase for gradient elution at a flow rate of 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was 288 nm, and the column temperature was 35℃. **Result:** Good linear relationship were found in the the range of 131.200-1 312.000 ng for epicatechin, 149.800-1 348.200 ng for vitexin, 131.400-1 051.200 ng for isovitexin, 99.175-595.050 ng for kaemferol-3-*O*-rutinoside, 109.955-659.730 ng for isorhamnetin-3-*O*-β-*D*-glucoside, and 267.000-1 348.200 ng for narcissi. Their average recoveries were 98.13%, 97.41%, 96.93%, 98.22%, 97.37%, 97.82%, respectively. **Conclusion:** The method is accurate, reliable, and can be used for the quality control and evaluation of total flavonoid extracts of *Microctis Folium*.

**[Key words]** total flavonoid extract of *Microctis Folium*; HPLC; epicatechin; vitexin; isovitexin; kaemferol-3-*O*-rutinoside; isorhamnetin-3-*O*-β-*D*-glucoside; narcissi

布渣叶为椴树科破布叶属破布叶的干燥叶<sup>[1]</sup>, 方,具有消食化积、清热利湿、解渴开胃的功效<sup>[3]</sup>, 又名破布叶、蓑衣子、烂布渣等<sup>[2]</sup>,盛产于我国南 作为广东、广西地区的民间草药被广泛用于凉茶中,

**[收稿日期]** 20150318(018)

**[基金项目]** 广东省重大科技项目(2012A080202016)

**[通讯作者]** \* 江洁怡, 硕士, 中药师, 从事中药质量标准研究, Tel:020-83492312, E-mail:blpz.jiang@qq.com

具有良好的药、食价值<sup>[4]</sup>。据报道布渣叶中主要含有黄酮类及生物碱类成分<sup>[5-7]</sup>,具有保护心血管、调血脂、抗衰老及杀虫等作用<sup>[8]</sup>。本实验室前期研究表明布渣叶中总黄酮成分,具有显著的调血脂作用,且无明显的肝肾损伤等不良反应<sup>[9-10]</sup>。本研究以表儿茶素、牡荆苷、异牡荆苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷和水仙苷等 6 个黄酮类成分为指标,建立 HPLC 含量测定方法,为布渣叶总黄酮的质量控制提供参考。

### 1 材料

e2695-2489 型高效液相色谱仪(美国 Waters, Empower Pro 色谱工作站),XS205DU 型电子分析天平(瑞士-梅特勒),KQ5200DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

对照品表儿茶素(批号 110878-200102),牡荆苷(批号 111668-200602)购于中国食品药品检定研究院;异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷(批号 140917,纯度 98%),异牡荆苷(批号 Y-116-120630,纯度 > 98%),水仙苷(批号 s-063-130114,纯度 > 98%)均购于成都瑞芬思生物科技有限公司;山柰酚-3-*O*-芸香糖苷(批号 13103022,纯度 98%)购于上海同田生物技术股份有限公司,布渣叶总黄酮提取物为本实验室自制。

乙腈、甲醇色谱纯,水为双蒸水,其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Agilent HC-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.05% 磷酸溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 25 min, 18% ~ 30% A; 25 ~ 35 min, 30% A; 35 ~ 45 min, 30% ~ 32% A; 45 ~ 60 min,

32% ~ 35% A; 60 ~ 75 min, 35% ~ 40% A; 75 ~ 85 min, 40% A; 85 ~ 90 min, 40% ~ 45% A),检测波长 288 nm,柱温 35 °C,流速 0.8 mL · min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取表儿茶素、牡荆苷、异牡荆苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷和水仙苷对照品适量,加甲醇分别制成每 1 mL 含表儿茶素 131.20 μg,牡荆苷 299.60 μg,异牡荆苷 198.35 μg,山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 219.91 μg,异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷 262.80 μg 和水仙苷 267.00 μg 的对照品溶液作为储备液,备用。

**2.3 供试品溶液的制备** 取布渣叶总黄酮提取物干膏粉约 0.1 g,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,加甲醇约 40 mL 超声处理(功率 200 W,频率 40 kHz)使溶解,放冷后加甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液,备用。

**2.4 线性关系考察** 精密量取 2.2 项下配制好的对照品储备液适量,加甲醇分别制成每 1 mL 含表儿茶素 131.20, 262.40, 393.60, 656.00, 918.40, 1 312.00 μg; 牡荆苷 14.98, 29.96, 59.92, 89.98, 134.82 μg; 异牡荆苷 13.14, 26.28, 39.42, 52.56, 78.84, 105.12 μg; 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 9.9175, 19.835, 29.752 5, 39.67, 49.587 6, 59.505 μg; 异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷 10.995 5, 21.991, 32.986 5, 43.982, 54.977 5, 65.973 μg; 水仙苷 26.70, 53.40, 80.10, 106.80, 134.82 μg 的对照品溶液。按 2.1 项下色谱条件分别进样,测定峰面积,并以峰面积(Y)对进样量(X)进行线性回归,分别得标准曲线。结果见表 1。

表 1 线性关系考察 (n = 2)

Table 1 Result of linear relationship tests (n = 2)

项目	回归方程	相关系数	线性范围/ng
表儿茶素	$Y = 357.14X - 9\ 688.2$	0.999 55	131.200 ~ 1 312.000
牡荆苷	$Y = 1\ 830X - 4\ 280$	0.999 54	149.800 ~ 1 348.200
异牡荆苷	$Y = 2\ 080X - 1\ 190$	0.999 81	131.400 ~ 1 051.200
山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷	$Y = 1\ 210X + 3\ 810$	0.999 60	99.175 ~ 595.050
异鼠李素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y = 1\ 090X + 1\ 830$	0.999 87	109.955 ~ 659.730
水仙苷	$Y = 895X - 4\ 770$	0.999 39	267.000 ~ 1 348.200

**2.5 精密度试验** 精密吸取对照品溶液(表儿茶素 131.2 mg · L<sup>-1</sup>,牡荆苷 59.92 mg · L<sup>-1</sup>,异牡荆苷 39.42 mg · L<sup>-1</sup>,山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 29.752 5 mg · L<sup>-1</sup>,异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷 32.986 5 mg · L<sup>-1</sup>,

水仙苷 80.10 mg · L<sup>-1</sup>) 10 μL,照 2.1 项下色谱条件,重复进样 6 次,记录表儿茶素、牡荆苷、异牡荆苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷和水仙苷峰面积,结果峰面积的 RSD 分别为 0.1%,

0.4%, 0.2%, 0.3%, 0.2%, 0.2%, 均 < 2%, 表明仪器精密良好。

**2.6 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液 10 μL, 照 2.1 项下色谱条件, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 重复进样, 结果表儿茶素、牡荆苷、异牡荆苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷和水仙苷峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 0.7%, 0.2%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 均 < 2%, 表明供试品溶液 24 h 内稳定。

**2.7 重复性试验** 按拟定的含量测定方法, 对同一批样品(L-20130318), 按 2.3 项下方法制备 6 份供

试品溶液, 分别进样 10 μL, 测得表儿茶素、牡荆苷、异牡荆苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷和水仙苷的平均质量分数分别为 3.78%, 1.95%, 2.19%, 0.84%, 0.87%, 4.25%, RSD 分别为 0.3%, 0.5%, 0.7%, 0.9%, 0.9%, 0.3%, 均 < 2%, 表明方法重复性良好。

**2.8 回收率试验** 精密取已知含量的样品(L-20130318) 0.05 g, 分别精密加入一定量的对照品, 按 2.3 项下方法平行制备 9 组供试品溶液, 照 2.1 项下色谱条件测定, 计算回收率。结果见表 2。

表 2 布渣叶总黄酮提取物中 6 种成分的回收率测定 (n=2)

Table 2 Result of 6 constituent recovery test in extract of *Microtis Folium* (n=2)

	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 (RSD) /%		称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 (RSD) /%
表儿茶素	0.052 3	1.977	1.509	3.450	97.65	98.13 (1.3)	山柰酚-3- O-芸香糖苷	0.052 3	0.439	0.330	0.764	98.27	98.22 (1.0)
	0.050 2	1.898	1.509	3.402	99.72			0.050 2	0.422	0.330	0.743	97.49	
	0.051 2	1.935	1.509	3.442	99.88			0.051 2	0.430	0.330	0.756	98.67	
	0.050 6	1.913	1.902	3.755	96.82			0.050 6	0.425	0.440	0.865	99.97	
	0.051 1	1.932	1.902	3.773	96.81			0.051 1	0.429	0.440	0.860	97.88	
	0.050 7	1.917	1.902	3.762	97.03			0.050 7	0.426	0.440	0.854	97.37	
	0.051 2	1.935	2.230	4.102	97.15			0.051 2	0.430	0.506	0.921	97.14	
	0.050 7	1.917	2.230	4.132	99.35			0.050 7	0.426	0.506	0.922	97.99	
	0.050 3	1.901	2.230	4.104	98.73			0.050 3	0.423	0.506	0.925	99.24	
牡荆苷	0.052 3	1.020	0.749	1.740	96.19	97.41 (1.0)	异鼠李素- 3-O-葡萄 糖苷	0.052 3	0.455	0.421	0.865	97.57	97.37 (1.0)
	0.050 2	0.979	0.749	1.703	96.70			0.050 2	0.437	0.421	0.844	96.85	
	0.051 2	0.998	0.749	1.724	96.81			0.051 2	0.445	0.421	0.851	96.49	
	0.050 6	0.987	0.899	1.865	97.70			0.050 6	0.440	0.447	0.880	98.34	
	0.051 1	0.997	0.899	1.874	97.66			0.051 1	0.445	0.447	0.886	98.69	
	0.050 7	0.989	0.899	1.856	96.53			0.050 7	0.441	0.447	0.876	97.25	
	0.051 2	0.998	1.198	2.165	97.38			0.051 2	0.445	0.526	0.950	95.96	
	0.050 7	0.989	1.198	2.175	98.95			0.050 7	0.441	0.526	0.951	96.92	
	0.050 3	0.981	1.198	2.164	98.74			0.050 3	0.438	0.526	0.954	98.29	
异牡荆苷	0.052 3	1.145	0.893	2.013	97.22	96.93 (0.6)	水仙苷	0.052 3	2.223	1.682	3.902	99.84	97.82 (1.1)
	0.050 2	1.099	0.893	1.973	97.82			0.050 2	2.134	1.682	3.784	98.15	
	0.051 2	1.121	0.893	1.982	96.46			0.051 2	2.176	1.682	3.820	97.73	
	0.050 6	1.108	1.091	2.164	96.81			0.050 6	2.151	2.136	4.234	97.56	
	0.051 1	1.119	1.091	2.173	96.63			0.051 1	2.172	2.136	4.231	96.42	
	0.050 7	1.110	1.091	2.163	96.53			0.050 7	2.155	2.136	4.214	96.43	
	0.051 2	1.121	1.289	2.361	96.17			0.051 2	2.176	2.537	4.654	97.71	
	0.050 7	1.110	1.289	2.365	97.35			0.050 7	2.155	2.537	4.651	98.43	
	0.050 3	1.102	1.289	2.357	97.35			0.050 3	2.138	2.537	4.625	98.07	

**2.9 样品测定** 精密称取不同批次本品粉末约

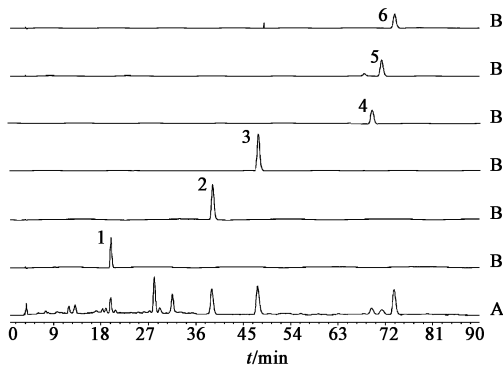
0.1 g, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 精密吸取

对照品及供试品溶液 10 μL, 按 2.1 项下色谱条件测定表儿茶素、牡荆苷、异牡荆苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷和水仙苷的含量。结果见表 3, 图 1。

表 3 布渣叶总黄酮提取物中 6 种成分含量测定 (n=2)

Table 3 Determination result of extract of *Microtis Folium* (n=2)

样品批号	表儿茶素	牡荆苷	异牡荆苷	山柰酚-3-O-芸香糖苷	异鼠李素-3-O-葡萄糖苷	水仙苷
L-20130318	3.79	1.95	2.18	0.85	0.86	4.24
L-20130520	3.76	1.94	2.18	0.84	0.86	4.23
L-20130625	3.81	1.96	2.20	0.85	0.88	4.27



A. 布渣叶总黄酮提取物; B. 对照品; 1. 表儿茶素; 2. 牡荆苷; 3. 异牡荆苷; 4. 山柰酚-3-O-芸香糖苷; 5. 异鼠李素-3-O-葡萄糖苷; 6. 水仙苷  
图 1 布渣叶总黄酮提取物及对照品色谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of extract of *Microtis Folium* and reference substance

### 3 讨论

本课题组前期研究表明, 布渣叶具有明显的调血脂活性, 而总黄酮是其主要的有效部位<sup>[9]</sup>, 为了对布渣叶药材及其提取物进行质量控制, 本课题组已对布渣叶药材中牡荆苷<sup>[11]</sup>、槲皮素、山柰素、芹菜素、异鼠李素<sup>[12]</sup>的含量测定方法; 以及布渣叶提取物中的牡荆苷、异牡荆苷、水仙苷<sup>[3]</sup>的含量测定方法进行研究。本试验结合布渣叶总黄酮中的化学组成, 将总黄酮提取物中的指标性成分增加至 6 个, 分

别为表儿茶素、牡荆苷、异牡荆苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷和水仙苷, 几乎涵盖了提取物 HPLC 色谱图中所有的主要色谱峰, 从而更全面地对布渣叶总黄酮的质量进行分析评价。所建立的布渣叶总黄酮中表儿茶素、牡荆苷、异牡荆苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷和水仙苷的同时测定方法快速、准确, 重复性高, 可作为布渣叶总黄酮提取物的质量评价与控制标准。

### [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: 中国医药科技出版社, 2010: 88.  
[2] 胡婷, 李军, 屠鹏飞. 布渣叶的化学成分研究[J]. 中草药, 2012, 43(5): 844-846.  
[3] 孙冬梅, 陈雪婷, 谭志灿. HPLC 同时测定布渣叶提取物中 3 种黄酮苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 102-104.  
[4] 何蓉蓉, 栗原博, 宝丽, 等. 王老吉凉茶对氧化应激负荷小鼠脂代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(10): 31-33.  
[5] 杨茵, 李硕果, 叶文才, 等. 布渣叶的化学成分研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 2790-2792.  
[6] 罗集鹏, 张丽萍, 杨世林, 等. 布渣叶的生物碱类成分研究[J]. 药学学报, 2009, 44(2): 150-153.  
[7] 孙冬梅, 汪梦霞. 布渣叶化学成分和药理作用研究进展[J]. 世界中医药, 2015, 10(1): 143-147.  
[8] 孙冬梅, 谭志灿, 罗文汇, 等. 布渣叶药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 84-87.  
[9] 谭志灿. 广东道地药材布渣叶质量评价及调血脂物质基础研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.  
[10] 程青云. 布渣叶总黄酮调血脂谱效关系研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.  
[11] 罗文汇, 谭志灿, 李养学, 等. HPLC 测定布渣叶中牡荆苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 110-111.  
[12] 孙冬梅, 陈雪婷, 徐文杰. RP-HPLC 同时测定布渣叶中 4 种黄酮类成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(15): 72-74.

[责任编辑 顾雪竹]