

HPLC同时测定裸花紫珠中4种黄酮

董琳¹, 关薇薇¹, 盛琳¹, 王金辉^{2*}, 刘明生^{3*}

(1. 海南医学院药学院, 海口 571199; 2. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016;
3. 海南省南药黎药研究院, 海口 571199)

[摘要] 目的: 建立同时测定裸花紫珠药材中木犀草素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷、木犀草素、5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮和5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮含量的反相高效液相色谱法。方法: 采用HPLC, Venusil XBP-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μ m), 流动相甲醇-体积分数为0.1%磷酸水系统, 梯度洗脱, 流速1.0 mL · min⁻¹, 柱温室温, 检测波长350 nm。结果: 在上述色谱条件下测得木犀草素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷、木犀草素、5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮和5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮的质量浓度分别在0.000 8 ~ 0.016, 0.001 6 ~ 0.032, 0.004 ~ 0.08, 0.002 4 ~ 0.048 g · L⁻¹时与色谱峰面积之间线性关系良好; 平均回收率为98.5% (RSD 1.7%), 98.6% (RSD 1.6%), 98.6% (RSD 1.4%), 98.6% (RSD 1.7%)。结论: 该方法精密度高, 重复性好, 可用于裸花紫珠药材中木犀草素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷、木犀草素、5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮和5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮的含量测定。

[关键词] 裸花紫珠; 木犀草素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷; 木犀草素; 5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮; 5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0052-04

[doi] 10.11653/syfy2014030052

Simultaneous Determination of Four Flavonoids in *Callicarpa nudiflora* by HPLC

DONG Lin¹, GUAN Wei-wei¹, SHENG Lin¹, WANG Jin-hui^{2*}, LIU Ming-sheng^{3*}

(1. Faculty of Pharmacy, Hainan Medical College, Haikou 571199, China;

3. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

3. Institutent of South Herbs and Li Nationality Medicines of Hainan Province, Haikou 571199, China)

[Abstract] **Objective:** To develop HPLC for the simultaneous determination of four flavonoids in *Callicarpa nudiflora*. **Method:** The separation was performed on a Venusil XBP-C₁₈ column (4.6 mm × 200 mm, 5 μ m), the analytes were separated efficiently using the mobile phase consisted of MeOH-H₂O [w (H₃PO₄) = 0.1%] in a gradient program. The flow rate was maintained at 1.0 mL · min⁻¹. The detective wavelength was set at 350 nm and the column temperature was 25 °C. **Result:** There were good linear relationships between the concentrations and the peak area of luteolin-7-*O*- β -D-glucopyranoside, luteolin, 5,4'-dihydroxy-3,7,3'-trimethoxyflavone and 5-hydroxy-3,7,3',4'-tetramethoxyflavone in the ranges of 0.000 8-0.016 g · L⁻¹ ($r = 0.999 1$), 0.001-0.032 g · L⁻¹ ($r = 0.999 1$), 0.004-0.08 g · L⁻¹ ($r = 0.999 2$), 0.002 4-0.048 g · L⁻¹ ($r = 0.999 1$), respectively. The recoveries were found to be 98.5% with RSD of 1.7% ($n = 9$), 98.6% with RSD

[收稿日期] 20130813(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81060367); 海南省重点科技计划项目(ZDXM20100040); 海南省自然科学基金项目(813192)

[第一作者] 董琳, 硕士, 助理研究员, 从事热带药用植物的研究与开发, Tel: 0898-66893826, E-mail: donglin793@126.com

[通讯作者] * 刘明生, 博士, 教授, 从事热带药用植物的研究与开发, Tel: 0898-66893826, E-mail: mingsliu2002@yahoo.com;

* 王金辉, 博士, 教授, 从事天然药物化学的研究, Tel: 024-23986478, E-mail: wjh.1972@yahoo.com.cn

of 1.6% ($n=9$), 98.6% with RSD of 1.4% ($n=9$) and 98.6% with RSD of 1.7% ($n=9$), respectively.

Conclusion: The method is accurate and reproducible for determination of luteolin-7-*O*- β -D-glucopyranoside, luteolin, 5, 4'-dihydroxy-3, 7, 3'-trimethoxyflavone and 5-hydroxy-3, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone in *C. nudiflora*.

[**Key words**] *Callicarpa nudiflora*; luteolin-7-*O*- β -D-glucopyranoside; luteolin; 5, 4'-dihydroxy-3, 7, 3'-trimethoxyflavone; 5-hydroxy-3, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone; HPLC

裸花紫珠为马鞭草科紫珠属植物,主产于海南、广东和广西,其叶味微苦、涩,性平;有抗菌止血、消炎解毒、散瘀消肿的功能;用于化脓性炎症、急性传染性肝炎、呼吸道及消化道出血;外用治烧、烫伤及外伤出血等,是海南黎族医生常用药材之一^[1-2]。黄酮类成分是裸花紫珠的主要成分之一,并具有良好的抗炎和止血作用^[3]。本课题组前期对裸花紫珠的化学成分进行了研究^[4-7],其中4个黄酮类成分的含量较大,鉴于黄酮类化合物是裸花紫珠发挥药效的主要成分,对该类成分在药材中的量进行研究的重要性就显得尤为突出。目前关于裸花紫珠药材的定量测定,有文献^[8]以齐墩果酸和熊果酸为含量测定指标或以单一黄酮成分或采用分光光度法测定其总黄酮的含量^[9-13]。本研究采用高效液相色谱法,首次对裸花紫珠中木犀草素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷,木犀草素,5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮和5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮4种黄酮量进行同时测定。

1 材料

1.1 仪器 6000 PVW 型高效液相色谱仪(美国 Cometro 公司),包括 6000 PVW UV/VIS 紫外检测器(美国 Cometro 公司),Ezchrom Elite Client/server (version 3.1.6) 色谱工作站(Thermo Electron Corporation)。

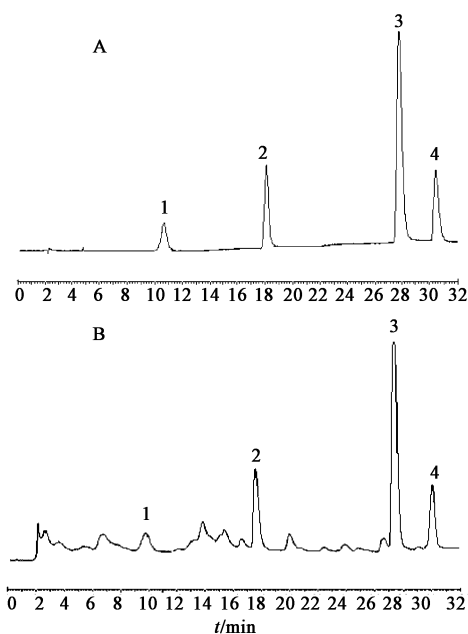
1.2 试剂 木犀草素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷,木犀草素,5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮和 5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮对照品(自制,HPLC 归一化质量浓度 98.5%),以上标准物质均通过核磁共振和质谱数据确证。甲醇(色谱纯),乙腈(色谱纯),纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),磷酸(分析纯)。

药材在海南五指山采集,由中国医学科学院药用植物研究所海南分所陈伟平研究员鉴定为马鞭草科植物裸花紫珠 *Callicarpa nudiflora* Hook. Et Arn.。

2 方法和结果

2.1 色谱条件和系统适用性试验 Venusil XBP-C₁₈ 色谱(4.6 mm × 200 mm, 5 μ m),流动相 A 为甲

醇,B 为 0.1% 磷酸水,梯度洗脱(0~10 min,40%~50% B;10~10.1 min,50%~60% B;10.1~30 min,60%~85% B;30~32 min,85% B);检测波长 350 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温室温,进样量 10 μ L。木犀草素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷,木犀草素,5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮和 5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮的保留时间分别为 9.7,17.6,27.3,29.9 min,相邻峰均达到基线分离,且重复性好,理论板数按 5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮峰计算不低于 5 000。供试品及对照品色谱图见图 1。



1. 木犀草素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷;2. 木犀草素;
3. 5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮;
4. 5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮;
A. 混合对照品;B. 供试品

图1 裸花紫珠 HPLC

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取木犀草素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷,木犀草素,5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮,5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮对照品,用甲醇溶解,制成对照品储备液浓度分别为 1.0,1.0,1.6,1.0 g·L⁻¹。依次精密吸取对照品储备液 0.8,1.6,2.5,2.4 mL,混合置于 10 mL 量瓶

中,加甲醇至刻度,配成混合对照品储备液浓度分别为 0.08,0.16,0.4,0.24 g·L⁻¹。

2.3 供试品溶液的制备 取裸花紫珠药材,粉碎过 60 目筛,精密称取药材粉末 1.0 g,置于具塞锥形瓶中,加入甲醇 25 mL,称重,超声提取 15 min,放冷后,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 线性关系考察 精密量取混合储备液 0.1,0.2,0.5,1.0,1.5,2.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得系列标准溶液,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,分别进样 10 μL,以标准溶液浓度(*X*)为横坐标,色谱峰面积(*Y*)为纵坐标,绘制标准曲线,得木犀草素-7-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷回归方程为 $Y = 1.00 \times 10^6 X + 4.35 \times 10^3$ ($r = 0.999 1$);得木犀草素回归方程为 $Y = 2.00 \times 10^6 X + 5.52 \times 10^3$ ($r = 0.999 1$);得 5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮回归方程为 $Y = 2.00 \times 10^6 X + 1.63 \times 10^4$ ($r = 0.999 2$);得 5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮回归方程为 $Y = 7.92 \times 10^5 X + 5.74 \times 10^3$ ($r = 0.999 1$)。木犀草素-7-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷,木犀草素,5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮和 5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮分别在 0.000 8 ~ 0.016,0.001 6 ~ 0.032,0.004 ~ 0.08,0.002 4 ~ 0.048 g·L⁻¹ 内与其峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取同一对照溶液 10 μL,重复进样 6 次,记录色谱图,测量峰面积,4 种黄酮峰面积的 RSD 分别为 1.5%,1.6%,1.0%,1.3%,表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 按 2.3 项下方法平行制备 6 份供试溶液,进样,计算含量,4 种黄酮含量的 RSD 分别为 1.5%,1.6%,1.6%,1.1%,表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取新制备的同一份供试溶液,分别在室温放置 0,3,6,9,12 h 后进行测定,记录色谱图,测量峰面积,测得 4 种黄酮峰面积 RSD 分别为 1.3%,1.2%,1.4%,1.1% ($n = 6$),结果表明供试溶液在 12 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 称取已知含量的裸花紫珠叶样品 9 份,每份 0.5 g,精密称定,分别精密加入混合对照品溶液 0.3,0.6,0.9 mL,每个样品平行 3 份,按 2.3 项下的方法操作,在上述色谱条件下进样分析,计算木犀草素-7-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷,木犀草素,5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮和 5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮含量,并根据加入量计算回

收率,结果见表 1。

表 1 供试品中 4 种黄酮的加样回收率试验 ($n = 9$)

标记化合物	样品中 含量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
木犀草素-	0.039 4	0.025 0	0.063 6	96.8	98.5	1.7
7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -	0.039 8	0.025 0	0.064 9	100.4		
吡喃葡萄糖苷	0.039 6	0.025 0	0.064 2	98.4		
	0.039 5	0.050 0	0.088 5	98.0		
	0.039 3	0.050 0	0.087 4	96.2		
	0.039 6	0.050 0	0.089 7	100.2		
	0.039 7	0.075 0	0.113 6	98.5		
	0.039 1	0.075 0	0.114 9	101.1		
	0.039 2	0.075 0	0.112 0	97.1		
木犀草素	0.077 0	0.050 0	0.125 6	97.2	98.6	1.6
	0.077 2	0.050 0	0.126 1	97.8		
	0.077 4	0.050 0	0.127 5	100.2		
	0.077 1	0.100 0	0.175 9	98.8		
	0.077 5	0.100 0	0.178 5	101.0		
	0.077 3	0.100 0	0.174 6	97.3		
	0.076 9	0.150 0	0.221 9	96.7		
	0.077 6	0.150 0	0.224 8	98.1		
	0.077 1	0.150 0	0.227 3	100.1		
5,4'-二羟基-	0.238 9	0.125 0	0.364 4	100.4	98.6	1.4
3,7,3'-	0.239 1	0.125 0	0.363 8	99.8		
三甲氧基黄酮	0.238 7	0.125 0	0.360 7	97.6		
	0.238 8	0.250 0	0.482 7	97.6		
	0.239 0	0.250 0	0.486 6	99.0		
	0.239 3	0.250 0	0.489 5	100.1		
	0.238 9	0.375 0	0.599 1	96.1		
	0.239 2	0.375 0	0.611 6	99.3		
	0.238 6	0.375 0	0.605 9	97.9		
5-羟基-	0.126 0	0.075 0	0.199 6	98.1	98.6	1.7
3,7,3',4'-	0.126 2	0.075 0	0.200 6	99.2		
四甲氧基黄酮	0.125 8	0.075 0	0.202 0	101.6		
	0.125 9	0.150 0	0.270 7	96.5		
	0.126 3	0.150 0	0.272 6	97.5		
	0.126 1	0.150 0	0.275 6	99.7		
	0.126 0	0.225 0	0.351 2	100.1		
	0.126 5	0.225 0	0.348 2	98.5		
	0.126 7	0.225 0	0.343 7	96.4		

2.9 样品含量测定 分别精密称取不同批次的同一产地裸花紫珠药材粗粉约 1.0 g,按 2.3 项下的方法操作,取供试溶液 10 μL,并按 2.1 项下色谱条件

测定,用峰面积按外标法计算木犀草素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷,木犀草素,5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮,5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮含量,结果见表2。

表2 裸花紫珠药材含量的测定($n=3$) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

药材 批次	木犀草素-7- <i>O</i> - β -D- 吡喃葡萄糖苷	木犀草素	5,4'-二羟基- 3,7,3'- 三甲氧基黄酮	5-羟基- 3,7,3',4'- 四甲氧基黄酮
	1	0.081 5	0.232 2	0.508 5
2	0.082 1	0.234 1	0.497 7	0.281 9
3	0.083 1	0.227 1	0.500 9	0.286 8

3 讨论

3.1 样品提取方法的选择 用甲醇为提取溶剂,比较了超声和回流两种提取方法,发现两者提取效率相差不大,考虑操作的简便程度,确定了超声的提取方法。提取时间比较了超声0.25,0.5,1.0 h,结果表明,随着超声时间的增加,所测黄酮的提取效率相差不大,但其他干扰峰也有所增加,故选用甲醇超声提取0.25 h的方法,其方法简便,干扰较少。

3.2 检测波长的选择 将5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮,5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮,木犀草素和木犀草素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷对照品溶液进行紫外全波长扫描,在350 nm时,4个指标成分有最大吸收,且干扰成分吸收较小,因此选择该波长为检测波长。

[参考文献]

- [1] 刘明生. 黎药学概论[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:165.
[2] 蔡金平,董琳,关薇薇,等. 裸花紫珠的研究进展[J].

现代药物与临床,2012,27(1):1.

- [3] 梁纪军,徐凯,李留法,等. 裸花紫珠总黄酮的抗炎、止血作用研究[J]. 现代中西医结合杂志,2009,18(26):3161.
[4] 董琳,刘明生,王金辉. 裸花紫珠的脂溶性化学成分[J]. 中国药物化学杂志,2009,19(5):371.
[5] 董琳,王金辉,刘明生. 裸花紫珠叶中的酚酸类化学成分[J]. 沈阳药科大学学报,2010,27(4):290.
[6] 董琳,刘明生,王金辉,等. 黎药-裸花紫珠氯仿萃取部位的化学成分[J]. 中国医药导报,2012,9(31):21.
[7] Dong Lin, Zhang Xiao-Po, Liu Ming-Sheng, et al. Two new ent-3,4-seco-labdane diterpenoids from *Callicarpa nudiflora*[J]. J Asian Nat Prod Res,2013,15(1):30.
[8] 张艳秋,洪金波,刘文林. HPLC法测定裸花紫珠中齐墩果酸与熊果酸的含量[J]. 海南医学院学报,2009,15(1):5.
[9] 胡蓉,姚闽,李玉云,等. HPLC法测定裸花紫珠药材中木犀草素的含量[J]. 中药新药与临床药理,2009,20(3):271.
[10] 李才堂,文萍,虞金宝,等. 高效液相色谱法测定裸花紫珠药材中游离子型和结合型木犀草素的含量[J]. 中国新药杂志,2010,21(19):2008.
[11] 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.
[12] 李才堂,文萍,郭琦丽,等. HPLC测定裸花紫珠药材中毛蕊花糖苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):84.
[13] 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.

[责任编辑 顾雪竹]