

不同产地叶下珠药材中总酚含量测定

王坤凤, 林琛, 吴玲芳, 李淑青, 张兰珍*
(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 建立不同产地叶下珠药材中总酚的含量测定方法。方法: 以柯里拉京为对照品, 三氯化铁-铁氰化钾为显色剂, 检测波长 744 nm, 采用 UV 测定 11 个不同产地叶下珠药材中总酚的含量。结果: 柯里拉京在 0.604 ~ 3.02 mg·L⁻¹ 线性关系良好 ($r=0.9991$), 平均加样回收率 99.79%, RSD 2.72%。不同产地叶下珠药材中总酚质量分数 5.00% ~ 12.16%。结论: 该方法简单准确、重复性好, 可用于叶下珠药材中总酚含量的测定。

[关键词] 叶下珠; 总酚; 含量测定; 不同产地

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0110-03

[doi] 10.11653/syjf2013130110

Determination of Total Phenols from *Phyllanthus urinaria* in Different Locations

WANG Kun-feng, LIN Chen, WU Ling-fang, LI Shu-qing, ZHANG Lan-zhen*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of total phenols from *Phyllanthus urinaria* in different locations. **Method:** Total phenols was determined by UV-Vis spectrophotometer with corilagin as reference substance and FeCl₃-K₃[Fe(CN)₆] as chromogenic agent, the detection wavelength was at 744 nm. **Result:** A good linear relationship of corilagin was achieved in the range of 0.604-3.02 mg·L⁻¹ ($r=0.9991$), the average recovery was 99.79% with RSD of 2.72% ($n=6$). The content of total phenols from *P. urinaria* in different locations was different from 5.00% to 12.16%. **Conclusion:** This established method was simple, accurate and stable which was suitable for determination the content of total phenols from *P. urinaria*.

[Key words] *Phyllanthus urinaria*; total phenols; determination; different locations

叶下珠具有平肝清热、利水解毒之功效, 民间主要用于治疗小儿疳积、黄疸、肝炎、肠炎、痢疾、肾炎水肿、蛇咬伤等症; 现代研究证明, 叶下珠具有抗 HBV、抗癌、抗病毒等药理作用, 临床用于治疗肝炎、高血脂症等^[1]。其主要化学成分包括多酚、鞣质、

黄酮、生物碱等, 其中多酚类成分是其治疗急性慢性乙型肝炎的主要药效物质之一。研究发现叶下珠抗病毒作用的强弱与产地有关^[2-5]。

目前, 测定叶下珠中单体成分^[6-9]和总成分含量^[10-14]的研究已有报道, 而对不同产地叶下珠药材中主要药效成分总酚含量的测定和比较还未见报道。在前期研究基础上^[15-16], 本实验旨在建立 UV 测定不同产地叶下珠药材中总酚含量的方法, 为叶下珠的质量控制和合理应用提供参考。

1 材料

UV-2000 型紫外-可见分光光度计 (尤尼科公司), Sartorius BT 25S 型电子分析天平 (北京赛多利斯仪器有限公司)。叶下珠 (购自陕西商洛、以岭药业、北京同仁堂等, 经陕西中医研究院郭五保副研

[收稿日期] 20130125(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30171197); 北京市自然科学基金项目(7073093); 北京中医药大学大创新团队项目(2011-CXTD-12)

[第一作者] 王坤凤, 在读硕士, 从事中药质量控制研究, E-mail: fengqiwu66463@sina.com

[通讯作者] *张兰珍, 博士, 教授, 从事中药药效物质基础与质量控制研究, Tel: 010-84738629, E-mail: zhanglanzhen01@126.com

究员和北京中医药大学刘春生教授鉴定为大戟科植物叶下珠 *Phyllanthus urinaria* L. 的干燥全草,样品保存于北京中医药大学中药化学系),柯里拉京对照品(实验室自制,经 UV, IR, MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 鉴定结构, HPLC 检测峰面积归一化法测定,纯度 $>98.50\%$),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 取柯里拉京对照品 10 mg,精密称定,置于 25 mL 量瓶中,加 50% 乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2 供试品溶液的制备 叶下珠药材粉碎,过 60 目筛,取 300 mg,精密称定,加 50% 乙醇 150 mL,称定质量,100 MHz 超声 20 min,称定质量,放冷后用 50% 乙醇补足质量,过滤,取续滤液,即得。

2.3 检测波长的选择 分别精密吸取柯里拉京对照品溶液、供试品溶液 0.5, 0.2 mL,各置于 25 mL 量瓶中,依次加入 50% 乙醇溶液、0.3% 十二烷基磺酸钠溶液、混合显色剂(0.6% 铁氰化钾溶液-0.9% 三氯化铁溶液 1:0.9)5, 1, 1 mL,摇匀,暗处静置 5 min;加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸定容至刻度,摇匀,暗处放置 20 min,于 450~900 nm 扫描,结果对照品与供试品溶液显色后峰形相似,最大吸收波长均为 744 nm,且阴性无干扰,故选定 744 nm 为检测波长。

2.4 三氯化铁-铁氰化钾比色法测定总酚含量的方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密量取柯里拉京对照品溶液(0.075 5 g·L⁻¹)0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,按 2.3 项下方法显色后于 744 nm 处测定吸光度(A),以对照品质量浓度为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程 $Y=0.3266X+0.0156$ ($r=0.9991$),表明在 0.604~3.02 mg·L⁻¹ 与 A 呈良好线性关系。

2.4.2 精密度考察 精密吸取同一份供试品溶液 6 份,按 2.3 项下方法显色,测定 A,计算总酚含量的 RSD 1.78%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性考察 按 2.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按 2.3 项下方法显色,测定 A,计算总酚含量的 RSD 1.75%,表明该方法重复性良好。

2.4.4 稳定性考察 按 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别于配制后 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 精密吸取 0.5 mL,按 2.3 项下方法显色,测定 A,计算总酚含量的 RSD 2.86%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4.5 加样回收率试验 取叶下珠药材粉末(过

60 目筛,总酚质量分数 14.53%)6 份,每份 150 mg,精密称定,分别精密加入 4.4 g·L⁻¹ 柯里拉京对照品溶液 5.0 mL,加 50% 乙醇 100 mL,称定质量,100 MHz 超声 20 min,用 50% 乙醇补足减失的质量,过滤,取续滤液,按 2.3 项下方法显色,测定 A,计算总酚含量,结果见表 1。

表 1 叶下珠中总酚含量测定的加样回收率试验

No.	称样量 /mg	样品中 质量/mg	测得量 /mg	加样回 收率/%	平均回 收率/%	RSD /%
1	149.8	21.77	44.06	101.23	99.79	2.72
2	150.0	21.80	43.47	98.42		
3	150.1	21.81	43.77	99.69		
4	149.9	21.78	42.74	95.15		
5	149.7	21.75	44.36	102.63		
6	150.2	21.82	44.21	101.63		

注:柯里拉京对照品加入量均为 22.0 mg。

2.5 样品测定 取 11 个不同产地叶下珠药材粉末(60 目)300 mg,精密称定,每个产地称取 3 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液。吸取供试品溶液适量,置于 25 mL 量瓶中,按 2.3 项下方法显色,于 744 nm 处测定 A,计算总酚含量,结果见表 2。

表 2 不同产地叶下珠中总酚含量测定($n=3$)

No.	产地(购)	总酚质量分数/%	RSD/%
1	安徽(同仁堂)	6.08	2.47
2	安徽	6.31	2.73
3	陕西安康	9.13	1.95
4	广西(以岭药业)	7.98	2.28
5	广东	8.98	2.25
6	河南	8.01	1.95
7	四川	10.19	1.48
8	福建	10.55	1.05
9	陕西商洛	12.16	1.38
10	云南	5.04	2.19
11	湖南	5.00	2.73

由表 2 可知,11 个不同产地的叶下珠药材中总酚含量差别较大,其中以福建、四川、陕西商洛产地叶下珠总酚含量较高,云南、湖南、安徽叶下珠总酚含量较低。不同产地叶下珠中 4 个成分(没食子酸、柯里拉京、短叶苏木酚酸、鞣花酸)的含量测定中^[14],4 个成分含量总和以福建、陕西商洛、安徽(同仁堂)含量较高(4.2%~4.96%),河南、广西、湖南、云南叶下珠中含量较低(1.5%~2.5%)。说明叶下珠药材中总酚含量和 4 种成分总量均以陕西

商洛和福建产较高,湖南、云南产叶下珠较低,临床用于抗病毒治疗时宜尽量选择药效成分含量较高产地的药材。

3 讨论

分别考察了提取方法(超声 1 h、回流 2 h、冷浸 24 h)、提取溶剂(30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇)、提取溶剂倍数(250, 500, 1 000 倍)、提取时间(10, 20, 40, 60 min)、药材粉碎粒度(20, 40, 60 目)对叶下珠药材中总酚提取的影响,最终优选出叶下珠药材粉碎过 60 目筛,加 500 倍量 50% 乙醇超声 20 min 的提取方法。

在预试验基础上,对显色剂浓度(三氯化铁、铁氰化钾:0.9% ~ 0.6%, 1% ~ 0.5%, 0.100 ~ 0.008 mol·L⁻¹),显色剂用量(0.9% 三氯化铁 1 mL, 0.6% 铁氰化钾 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 mL, 0.6% 铁氰化钾 1.1 mL, 0.9% 三氯化铁 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3 mL)、反应时间及测定时间(5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180 min)分别进行了考察,最终优选出 2.3 项下总酚显色条件。

[参考文献]

[1] 周宝华,李凌. 叶下珠辅助治疗慢性乙型肝炎 62 例[J]. 医药导报, 2012, 31(4): 427.

[2] 窦志华,施忠,吴陈军. HPLC 测定乙肝解毒口服液柯里拉京和没食子酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 71.

[3] 闫小玉,赵璞博,梁可,等. 叶下珠高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 108.

[4] 陈征途,李凤仙,邓文娣,等. 不同品种、不同产地叶下珠属植物在体外细胞培养中抗 HBV 作用的研究[J]. 中草药, 1997, 28(10): 616.

[5] 陈压西,郭树华,张定凤,等. 不同产地叶下珠及其联合用药抗鸭乙型肝炎病毒的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(4): 225.

[6] 孙敏. HPLC 法同时测定叶下珠中没食子酸、原儿茶醛、柯里拉京、鞣花酸、槲皮素的含量[J]. 青岛医药卫生, 2012, 44(5): 325.

[7] 闫小玉,孙蒙,杨国光,等. RP-HPLC 法同时测定叶下珠中没食子酸、柯里拉京和短叶苏木酚的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(1): 45.

[8] 严子军,钟智龙,韦寿莲,等. HPLC 法测定叶下珠中豆甾醇、 β -谷甾醇和羽扇豆醇[J]. 化学研究与应用, 2008, 20(10): 1335.

[9] 刘高,饶力群,范适,等. 高效液相色谱法测定叶下珠中叶下珠素含量[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2008, 34(3): 277.

[10] 李嘉珉,郑少文,袁小红. 紫外分光光度法测定叶下珠中多酚类成分的含量[J]. 今日药学, 2009, 19(1): 42.

[11] 冀德富,郭东艳,裴妙荣,等. 叶下珠的薄层鉴别及其多酚类成分的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(11): 14.

[12] 刘莹,熊富良,张雪琼,等. 叶下珠中鞣质的含量测定[J]. 医药导报, 2007, 26(10): 1222.

[13] 牛晓峰,赵锐山,李维凤,等. 叶下珠不同生长期及贮存期总黄酮含量测定[J]. 西北药学杂志, 2000, 15(2): 60.

[14] 邓光辉,胡炜,刘榕城,等. 溴麝香草酚蓝比色法测定叶下珠生物碱的含量[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1193.

[15] 袁永兵,张兰珍,郭亚健,等. RP-HPLC 法测定叶下珠中没食子酸、柯里拉京和鞣花酸的含量[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(1): 56.

[16] 林琛,袁永兵,张兰珍,等. 不同产地叶下珠中 4 种酚酸类成分的测定[J]. 中草药, 2012, 43(10): 2055.

[责任编辑 仝燕]