

HPLC 同时测定布渣叶提取物中 3 种黄酮苷的含量

孙冬梅^{1,2*}, 陈雪婷², 谭志灿²

(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: 建立布渣叶提取物中牡荆苷、异牡荆苷和水仙苷的含量测定方法。方法: 采用 Waters Xbridge™ C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水溶液, 二元梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 320 nm, 柱温 25 °C。结果: 牡荆苷、异牡荆苷和水仙苷分别在 8.512 ~ 29.79, 8.208 ~ 28.73, 41.60 ~ 145.6 mg·L⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系, 平均加样回收率分别为 96.30%, 97.32%, 102.22%。结论: 方法简便、可行, 重复性好, 结果准确, 可作为布渣叶提取物的含量测定方法, 为其质量控制提供参考依据。

[关键词] 布渣叶; 高效液相色谱; 牡荆苷; 异牡荆苷; 水仙苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0102-03

[doi] 10.11653/syfy2013110102

Simultaneous Determination of Three Flavonoids in Extract of *Microcos paniculata* by HPLC

SUN Dong-mei^{1,2*}, CHEN Xue-ting², TAN Zhi-can²

(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 vitexin, isovitexin and narcissin in extract of *Microcos paniculata*. **Method:** Waters Xbridge™ C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with a step gradient of methanol-1% phosphoric acid at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 320 nm, and the column temperature was at 25 °C. **Result:** There was good linear relationship in the range of 8.152-29.79 mg·L⁻¹ for vitexin, 8.208-28.73 mg·L⁻¹ for isovitexin and 41.60-145.6 mg·L⁻¹ for narcissin. The average recoveries of vitexin, isovitexin and narcissin were 96.30%, 97.32% and 102.22% respectively. **Conclusion:** This method is simple, accurate and can be used for quality control of extract of *M. paniculata*.

[Key words] *Microcos paniculata*; HPLC; vitexin; isovitexin; narcissin

布渣叶为椴树科植物破布叶的干燥叶, 主产于我国岭南地区, 亦称为破布叶, 属于广东道地药材, 具有清热解毒、消食导滞、解渴开胃等功效, 常在广东凉茶的原料中出现^[1]。近年来随着对布渣叶药材研究的深入, 发现黄酮类化合物在布渣叶中含量较高, 为其主要活性成分^[2-6], 故本文选取布渣叶

提取物中 3 种黄酮苷类成分作为质量控制指标, 采用高效液相色谱法对 3 者含量同时进行测定, 以期建立布渣叶提取物简便快捷准确的质量控制方法。

1 材料

Waters e2695-2998 高效液相色谱仪, Waters Xbridge™ C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, Mettler-Toledo XS205DU 型电子分析天平, KQ5200DE 型数控超声波清洗器。

牡荆苷对照品 (批号 111687-200602) 购于中国药品生物制品检定所, 异牡荆苷对照品 (批号 Y-

[收稿日期] 20120425(005)

[基金项目] 广东省中医药局建设中医药强省课题(20111131)

[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: tcmgdp@163.com

127-110705, HPLC分析纯度 $\geq 98\%$)、水仙苷对照品(批号 S-127-110705, HPLC分析纯度 $\geq 98\%$)均购于成都瑞芬思生物科技有限公司,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植物破布叶 *Microcos paniculata* L. 的干燥叶,其提取物为自制(1 g 提取物相当于 25 g 药材)。

甲醇为色谱纯试剂(默克),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),流动相为甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min, 25~30% A; 10~25 min, 30~30% A; 25~50 min, 30~35% A; 50~60 min, 35% A),检测波长 320 nm,柱温 25℃,流速 0.8 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 分别取牡荆苷、异牡荆苷、水仙苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 分别含牡荆苷 212.8 μg、异牡荆苷 205.2 μg、水仙苷 1 040 μg 的混合对照品储备液。精密量取储备液 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制得牡荆苷、异牡荆苷、水仙苷质量浓度分别为 8.512, 8.208, 41.60, 12.77, 12.31, 62.40, 17.02, 16.42, 83.20, 21.28, 20.52, 104.0, 25.54, 24.62, 124.8, 29.79, 28.73, 145.6 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液 6 份。

2.3 供试品溶液的制备 取布渣叶提取物粉末约 30 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加入甲醇 20 mL,密塞,超声使溶解,放冷,用甲醇定容至刻度,即得。

2.4 线性关系考察 取 2.2 项下混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,由峰面积对浓度进行线性回归,得回归方程分别为 $Y_{\text{牡荆苷}} = 3.84 \times 10^3 X - 2.4 \times 10^4$ ($r = 0.9999$); $Y_{\text{异牡荆苷}} = 4.05 \times 10^3 X - 2.98 \times 10^4$ ($r = 0.9999$); $Y_{\text{水仙苷}} = 1.19 \times 10^3 X - 5.87 \times 10^4$ ($r = 0.9999$)。结果表明牡荆苷、异牡荆苷、水仙苷分别在 8.512~29.79, 8.208~28.73 和 41.60~145.6 mg·L⁻¹ 呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取 2.2 项下混合对照品溶液(牡荆苷 21.28 mg·L⁻¹、异牡荆苷 20.52 mg·L⁻¹、水仙苷 104.0 mg·L⁻¹),按 2.1 项下色谱条件,重复进样 6 次,进样量 10 μL,测定峰面积,结果牡荆苷、异牡荆苷、水仙苷峰面积的 RSD 分别为 0.54%, 0.88%, 0.24%, 表明仪器的精密度良好。

2.6 重复性试验 取提取物(批号 20111108),按

2.3 项下方法制备供试品溶液,平行 6 份,按 2.1 项下色谱条件测定。结果布渣叶提取物中牡荆苷、异牡荆苷、水仙苷的平均含量分别为 1.60%, 1.76%, 5.44%, RSD 分别为 1.52%, 1.58%, 1.01%, 表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,室温下按 2.1 项下色谱条件,分别于供试品溶液制备后的 0, 2, 4, 6, 8 h 进样,测定峰面积。结果供试品溶液中牡荆苷、异牡荆苷、水仙苷的 RSD 分别为 0.43%, 0.52%, 0.36%, 表明供试品溶液在室温下 8 h 内稳定。

2.8 加样回收试验 取已知含量的布渣叶提取物 6 份(批号 20111108),各约 15 mg 精密称定,分别加入牡荆苷、异牡荆苷、水仙苷对照品溶液适量,按 2.3 项下条件制备供试品溶液,进样测定,计算回收率。见表 1。

表 1 牡荆苷、异牡荆苷和水仙苷加样回收率

成分	取样量	样品	加入量	测得量	回收率	平均	RSD
	/mg	中量	/μg	/μg	/%	回收率	
		/μg				/%	
牡荆苷	16.24	259.84	250.4	500.55	96.13	96.30	1.26
	15.80	252.80	250.4	492.66	95.79		
	15.87	253.92	250.4	499.66	98.14		
	15.51	248.16	250.4	488.59	96.02		
	15.35	245.60	250.4	488.76	97.11		
	15.17	242.72	250.4	479.55	94.58		
异牡荆苷	16.24	285.82	275.2	556.73	98.44	97.32	1.54
	15.80	278.08	275.2	545.55	97.19		
	15.87	279.31	275.2	547.85	97.58		
	15.51	272.98	275.2	546.41	99.36		
	15.35	270.16	275.2	532.37	95.28		
	15.17	266.99	275.2	531.38	96.07		
水仙苷	16.24	883.46	850.6	1770.04	104.23	102.22	1.77
	15.80	859.52	850.6	1728.07	102.11		
	15.87	863.33	850.6	1718.01	100.48		
	15.51	843.74	850.6	1727.69	103.92		
	15.35	835.04	850.6	1683.68	99.77		
	15.17	825.25	850.6	1699.50	102.78		

2.9 样品含量测定 取不同批号的布渣叶提取物,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,并按 2.1 项下色谱条件测定供试品溶液中指标成分的含量,结果见表 2,图 1。

表 2 布渣叶提取物中各成分含量测定 %

批号	牡荆苷	异牡荆苷	水仙苷
20110815	1.19	1.34	6.11
20111102	1.61	1.89	5.08
20111108	1.62	1.76	5.48

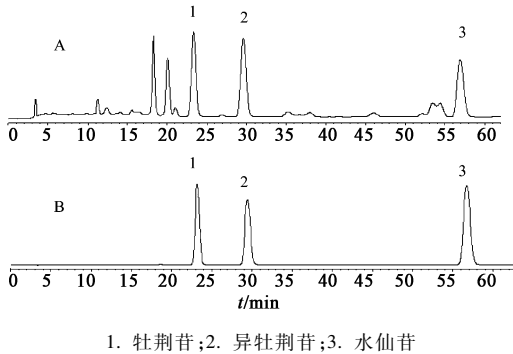


图 1 布渣叶提取物 (A) 和混合对照品 (B) HPLC

3 讨论与结论

分别对甲醇-0.05% 磷酸水溶液、甲醇-0.1% 磷酸水溶液、甲醇-0.4% 磷酸水溶液 3 种洗脱体系进行考察。所测成分在甲醇-0.05% 磷酸水溶液系统中分离效果不理想,适当增加酸的比例,分离效果、峰型均得以改善。试验发现甲醇-0.1% 磷酸水溶液、甲醇-0.4% 磷酸水溶液的分离效果相当,为了延长色谱柱的使用寿命及减少仪器的损耗,故选择甲醇-0.1% 磷酸水溶液为流动相。

通过 DAD 检测器在 200 ~ 400 nm 对 3 种成分对照品进行扫描,根据紫外吸收光谱,牡荆苷、异牡荆苷在 268, 338 nm 均有较大吸收,而水仙苷在 254, 354 nm 有较大吸收,同时参考文献[7-10],比较了不同波长下各成分的分离效果、峰型以及基线的漂移情况,最后选定 320 nm 作为检测波长。

不同产地的布渣叶药材总黄酮含量差异较大,这可能是造成批号为 20110815 的提取物中牡荆苷、异牡荆苷含量较低的原因。

布渣叶作为两广地区的习用草药,其质量标准研究还有欠全面,《中国药典》2010 年版虽收载有薄层鉴别项,并规定了其中牡荆苷的含量限度,但显然单一指标成分的定量分析并不足以满足日益发展的

中药质量控制要求。本实验选取了牡荆苷、异牡荆苷和水仙苷作为对照品,前二者是布渣叶药材中典型的黄酮碳苷,目前多用于心脑血管疾病的治疗,同时是防癌抗肿瘤的天然药物成分,水仙苷是黄酮氧苷,具有显著抑制肿瘤 EVB-EA 病毒活性的作用,且三者布渣叶及其提取物中含量均较高,故本实验对 3 种黄酮苷成分进行了同时测定,以期为其质量标准的完善提供数据支持,实现对布渣叶及其提取物质量的合理控制,并为课题组后期研究布渣叶药材的药理作用奠定了药效物质研究基础。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] 罗集鹏. 布渣叶黄酮类成分的研究[J]. 中药材, 1990, 13(3): 33.
- [3] 冯世秀,刘梅芳,魏孝义,等. 布渣叶中三萜和黄酮类成分的研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2008, 16(1): 51.
- [4] 曾聪彦,戴卫波. 布渣叶化学成分研究新进展[J]. 海峡药学, 2010, 22(7): 12.
- [5] 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.
- [6] 李洁,罗文汇,尹建华,等. 布渣叶中黄酮类成分薄层色谱指纹图谱研究[J]. 江西中医药, 2012, 43(351): 67.
- [7] 李坤平,潘天玲,高崇凯,等. HPLC 法测定布渣叶中牡荆苷和异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(9): 1746.
- [8] 陈丰连,张文进,徐凯华. 不同采收期及不同产地广金钱草地上部分 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(04): 98.
- [9] 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.
- [10] 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.

[责任编辑 顾雪竹]