

HPLC 测定黑草中木犀草素和芹菜素的含量

刘吉成*

(广西玉林食品药品检验所, 广西 玉林 537000)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱测定黑草药材中木犀草素和芹菜素的含量的方法。方法: 样品用甲醇回流提取 90 min, 用 Agilent Extend-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱分离, 以乙腈-0.7% 冰醋酸 (30:70) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 350 nm; 柱温 35 °C, 进样量 10 μL, 以外标法定量。结果: 木犀草素在 1.126 ~ 112.6 mg·L⁻¹ 呈良好的线性关系 ($r = 0.9997$), 平均回收率 101.3%, RSD 1.2% ($n = 6$); 芹菜素在 0.886 ~ 88.6 mg·L⁻¹ 呈良好的线性关系 ($r = 0.9995$), 平均回收率 99.4%, RSD 2.2% ($n = 6$)。结论: 该法操作简便, 结果准确可靠, 重复性及稳定性良好, 可作为控制黑草药材质量的方法。

[关键词] 黑草; 木犀草素; 芹菜素; 高效液相色谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0072-03

Determination of the Content of Luteolin and Diosmetin in *Buchnera cruciata* by HPLC

LIU Ji-cheng*

(Yulin of Guangxi Institute For Food and Drug Control, Yulin 537000, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC method for determination of the content of luteolin and diosmetin in *Buchnera cruciata*. **Method:** Samples were extracted for 90 minutes with methanol, a Agilent Extend-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used for composition separation and the mobile phase consisted of acetonitrile-0.7% acetic acid (30:70) with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was at 350 nm, column temperature was at 35 °C. Sample volume is 10 μL, The content of luteolin and diosmetin in *B. cruciata* was determined by external standard method. **Result:** The linear of luteolin and diosmetin concentrations were within 1.126-112.6 mg·L⁻¹ ($r = 0.9997$), 0.886-88.6 μg·ml⁻¹ ($r = 0.9995$), the average recoveries of luteolin and diosmetin were 101.3% (RSD 1.2%, $n = 6$), 99.4% (RSD 2.2%, $n = 6$). **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible with good stability, can be used as quality control methods for *B. cruciata* medicinal materials.

[Key words] *Buchnera cruciata*; luteolin; diosmetin; HPLC; determination

黑草系玄参科植物鬼羽箭属植物 *Buchnera cruciata* Hamlt. 干燥的全草, 又名幼克草、克草、黑骨草、羽箭草^[1], 分布于广西、湖南、江西、福建、云南、广东、海南等省区^[2]。其味微苦、寒, 性凉, 具有清热、凉血、解毒等功效, 用于治疗流行感冒、中暑腹

痛、蛛网膜下腔出血、暑热口渴、腹痛、荨麻疹等疾患^[1-2]。钟正贤等^[3]报道黑草具有抗凝、抗炎、镇痛、抗过敏等药理作用; 卢文杰^[4]已经从黑草中分离出有木犀草素、芹菜素、香叶木素、*d*-甘露醇、 β -谷甾醇、正二十七烷醇等 11 种化学成分, 陈家源等^[5]已经鉴定出 33 种长链脂肪烃和脂肪酸类化合物; 目前还没有发现有关黑草的质量标准方面的研究。为了有效的控制黑草的质量, 本文采用 HPLC 对其主要成分木犀草素和芹菜素进行含量测定。

1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公

[收稿日期] 20120220(015)

[基金项目] 广西自然科学基金项目 (桂科自 0991068)

[通讯作者] * 刘吉成, 主管药师职称, 硕士学位, 从事食品药品分析及药品质量标准研究, Tel: 13877502503, E-mail: liujichenggood@126.com

司); XS-205Du 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司); KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Millipore Synergy-UV 型超纯水机(美国密理博公司)。

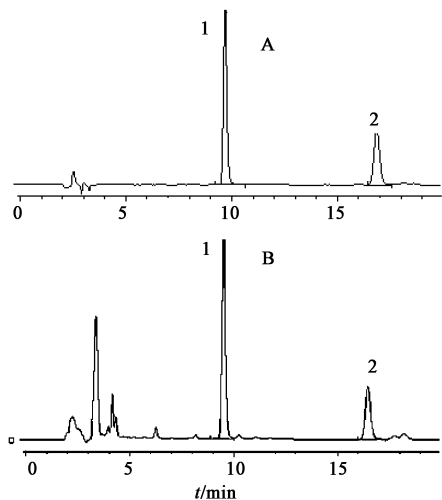
黑草药材采集于广西桂林、柳州、河池、南宁和贵州等地,经广西中医药研究院卢文杰教授鉴定为玄参科鬼羽箭属植物黑草 *Buchnera cruciata* Hamit. 的干燥全草,使用前粉碎过 2 号筛。

木犀草素对照品(批号 111520-200201,购自中国生物制品检定所)。芹菜素对照品,由广西中医药研究院卢文杰教授提供。

甲醇、乙腈均为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性试验 Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.7% 冰醋酸(30:70), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 350 nm, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL。在此条件下,木犀草素的理论塔板数 > 7 000。对照品及样品色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 样品; 1-木犀草素; 2-芹菜素

图 1 对照品及黑草样品的 HPLC

2.2 对照品储备液的制备 精密称取木犀草素对照品 11.26 mg, 芹菜素对照品 8.86 mg, 置同一 100 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声 10 min 并用甲醇稀释至刻度, 即为对照品储备液, 质量浓度木犀草素 0.112 6 g·L⁻¹, 芹菜素 0.088 6 g·L⁻¹。

2.3 供试品溶液的制备 取粉碎的药材约 1 g, 精密称定其质量, 再精密加入 50 mL 甲醇, 称定质量, 放水浴上回流 90 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 混匀, 过滤, 取续滤液作为供试品

溶液^[6]。

2.4 线性关系考察 分别精密量取对照品储备液 0.1, 1.25, 2.5, 5, 7.5, 10 mL 分别置 10 mL 的量瓶中, 加入甲醇定容至刻度, 摇匀, 分别取上述 6 个不同浓度的对照品溶液 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 以对照品溶液的质量浓度为横坐标, 以色谱峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得木犀草素线性方程 $A = 4\ 220.6C + 27.98$ ($r = 0.999\ 7$); 芹菜素的线性方程 $A = 13.85C - 5.52$ ($r = 0.999\ 5$)。结果表明木犀草素对照品溶液在质量浓度为 1.126 ~ 112.6 mg·L⁻¹ 呈良好的线性关系; 芹菜素在质量浓度为 0.886 ~ 88.6 mg·L⁻¹ 呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密量取混合对照品 10 μL (木犀草素质量浓度为 56.3 mg·L⁻¹, 芹菜素质量浓度为 44.3 mg·L⁻¹), 注入高效液相色谱仪, 按 2.1 的色谱条件, 连续进样 6 次, 测定木犀草素和芹菜素峰面积。结果木犀草素峰面积 RSD 0.3%, 芹菜素的峰面积的 RSD 0.6%, 结果表明所用液相色谱仪的精密度非常好。

2.6 稳定性试验 取黑草药材粗粉约 1 g, 精密称定, 按照 2.3 项下供试品溶液的制备方法制备, 室温下保存, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 精密吸取供试品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 按照 2.1 项下的色谱条件测定, 考察其稳定性, 木犀草素的峰面积的 RSD 0.89%, 芹菜素峰面积的 RSD 0.68%。结果表明供试品溶液在 24 h 内保持稳定。

2.7 重复性试验 取黑草药材粗粉约 1 g (产地为桂林荔浦), 共取 6 份, 精密称定, 按照 2.3 项下供试品溶液的制备方法制备, 精密吸取供试品溶液 10 μL, 按照 2.1 项下的色谱条件进行测定, 计算木犀草素和芹菜素的含量, 木犀草素的含量为 1.48 mg·g⁻¹, RSD 0.84%; 芹菜素的含量为 0.51 mg·g⁻¹, RSD 1.23%。结果表明, 用上述方法重复性良好。

2.8 加样回收试验 精密加入混合对照品溶液 (木犀草素质量浓度为 1.493 g·L⁻¹, 芹菜素质量浓度为 0.536 5 g·L⁻¹) 0.5 mL 至 100 mL 的具塞三角瓶中, 水浴上挥干溶剂, 平行制备 6 份, 再在每一份中加入已知含量的黑草药材粗粉约 0.5 g, 按照 2.3 项下供试品溶液的制备方法制备, 精密吸取供试品溶液 10 μL, 按照 2.1 项下的色谱条件分别测定其木犀草素和芹菜素的含量, 计算回收率 (黑草药材含量以 1.48 mg·g⁻¹ 计, 芹菜素的含量以 0.51 mg·g⁻¹ 计), 结果见表 1。

表 1 黑草药材木犀草素和芹菜素加样回收试验

| 成分 | 取样量 /g | 样品 含量 /mg | 加入量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均 回收率 /% | RSD /% |
|------|-----------|-----------------|------------|------------|-----------|-----------------|-----------|
| 木犀草素 | 0.503 3 | 0.744 9 | 0.746 5 | 1.501 2 | 101.31 | 101.3 | 1.2 |
| | 0.500 4 | 0.740 6 | | 1.492 2 | 100.68 | | |
| | 0.504 0 | 0.745 9 | | 1.490 1 | 99.69 | | |
| | 0.503 2 | 0.744 7 | | 1.510 1 | 102.53 | | |
| | 0.501 7 | 0.742 5 | | 1.496 2 | 100.96 | | |
| | 0.506 1 | 0.749 0 | | 1.516 8 | 102.85 | | |
| 芹菜素 | 0.503 3 | 0.256 7 | 0.268 2 | 0.526 5 | 100.60 | 99.4 | 2.2 |
| | 0.500 4 | 0.255 2 | | 0.524 3 | 100.34 | | |
| | 0.504 0 | 0.257 0 | | 0.518 0 | 97.32 | | |
| | 0.503 2 | 0.256 6 | | 0.523 3 | 99.44 | | |
| | 0.501 7 | 0.255 9 | | 0.530 1 | 102.24 | | |
| | 0.506 1 | 0.258 1 | | 0.516 8 | 96.46 | | |

2.9 样品含量测定 分别取不同产地的黑草药材,粉碎,取粉末约 1 g,精密称定,按照 2.3 项下供试品溶液的制备方法制备,精密吸取供试品溶液 10 μL,按照 2.1 项下的色谱条件测定其木犀草素的含量。结果见表 2。

表 2 各产地黑草药材中木犀草素和芹菜素的含量 mg·g⁻¹

| No. | 产地 | 木犀草素 | 芹菜素 |
|-----|------|------|------|
| 1 | 贵州 | 0.63 | 0.37 |
| 2 | 桂林阳朔 | 1.24 | 0.34 |
| 3 | 柳州融水 | 1.79 | 0.28 |
| 4 | 桂林龙胜 | 1.61 | 0.42 |
| 5 | 广西柳州 | 1.16 | 0.29 |
| 6 | 桂林恭城 | 1.08 | 0.31 |
| 7 | 广西南宁 | 1.08 | 0.31 |
| 8 | 桂林荔浦 | 1.48 | 0.51 |
| 9 | 桂林兴安 | 1.33 | 0.42 |
| 10 | 广西河池 | 1.14 | 0.25 |

3 讨论与分析

3.1 色谱条件的选择

3.1.1 流动相的选择 曾考虑分别用甲醇-0.2%磷酸溶液(50:50)^[7-8],乙腈-0.4%磷酸水溶液(25:75)^[9],甲醇-水(50:50),乙腈-0.05%磷酸水溶液(30:70)^[10],乙腈-0.7%冰醋酸溶液(30:70)^[11]等作为流动相。用乙腈-0.05%磷酸水溶液(30:70)和甲醇-水(50:50)作流动相出现峰形拖尾,峰形不美观;而用甲醇-0.2%磷酸水溶液(50:50)和乙腈-0.4%磷酸水(25:75)作流动相出现出峰时间不稳定并且峰面积变化大;最终发现峰形最好,不拖尾的,并且出峰时间适中,条件稳定的只有乙腈-0.7%冰醋酸溶液(30:70)。最终选择乙腈-0.7%冰醋酸溶液(25:75)作为流动相。

3.1.2 检测波长的选择 检测波长对于含量测定方法,通常选用被测物质最大的,干扰少的吸收波长,木犀草素在 350,267,254 nm 等波长处均有最大吸收,用这几个波长都可以达到分离效果好,由于在 350 nm 波长处有较高的吸收值,干扰少,峰型好,最终选择了 350 nm 作为最大吸收波长。

3.2 提取条件的选择 传统的中药提取有效成分的方法有溶剂浸渍法、直接超声提取,加热回流提取等方法,本实验考察了直接超声提取^[7]和加热回流提取 2 种方法在不同提取时间的提取效果,结果表明加热回流提取远比超声提取的效果要好,考察了回流提取 10,20,30,60,90,120 min,考虑提取效能,节约能源等因素,最终选择了加热回流提取 90 min 的提取方法。

[参考文献]

- [1] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区中药饮片炮制规范[M]. 南宁:广西科学出版社,2007:357.
- [2] 吴征镒著. 新华本草纲要[M]. 上海:上海科学技术出版社,1990:306.
- [3] 钟正贤,李燕婧,张颖,等. 黑草水提取物的药理作用的研究[J]. 云南中医中药杂志,2010,31(10):50.
- [4] 卢文杰,牙启康,陈家源,等. 黑草的化学成分研究[J]. 中草药,2012,43(6):1079.
- [5] 陈家源,牙启康,卢文杰,等. GC-MS 法分析黑草石油醚部位中的成分[J]. 中国民族民间医药,2009(13):1.
- [6] 杨亮,张亚峰,王新立,等. HPLC 法测定北败酱中木犀草素的含量[J]. 陕西中医药,2008,29(3):345.
- [7] 黄志勤,程齐来,李洪亮. RP-HPLC 测定细梗胡枝子中 3 种黄酮类有效成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(4):70.
- [8] 朱晓勤,彭玉梅,吴锦忠. HPLC 测定截叶铁扫帚不同药用部位中槲皮素、山奈酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):80.
- [9] 李伟光,李长新. HPLC 法测定筋骨草胶囊中木犀草素含量[J]. 中国医药指南,2009,7(13):39.
- [10] 刘菲,杨洋,谭晓杰,等. RP-HPLC 同时测定野菊花中 6 种黄酮的含量[J]. 中国中药杂志,2009,34(16):2067.
- [11] 张凌,张道英,刘亚丽,等. 藏药打箭菊中总黄酮及木犀草素的含量测定[J]. 药物分析杂志,2008,28(5):755.

[责任编辑 顾雪竹]