

HPLC 同时测定裸花紫珠药材中 毛蕊花糖苷和木犀草素

蔡金平¹, 董琳², 盛琳², 刘明生^{1,3*}, 杨艳¹, 胡波¹, 叶小玲¹

(1. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 2. 海南医学院, 海口 571101;

3. 海南省南药黎药研究院, 海口 571101)

[摘要] 目的: 建立同时测定裸花紫珠药材中毛蕊花糖苷和木犀草素的方法。方法: 采用高效液相色谱法, Phenomenex Gemini C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱, 以甲醇(A)-0.3% 磷酸水溶液(B) 为流动相线性梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 350 nm, 柱温 30 °C。结果: 毛蕊花糖苷和木犀草素线性范围分别在 29.6 ~ 740.0, 1.0 ~ 25.0 μg (r = 0.999 9), 平均回收率分别为 99.08%, 99.93%, RSD 分别为 1.53%, 1.65%。结论: 方法精密度高, 重复性好, 可用于裸花紫珠药材中毛蕊花糖苷和木犀草素的含量测定。

[关键词] 裸花紫珠; 毛蕊花糖苷; 木犀草素; HPLC; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0081-04

Determination of Acteoside and Luteolin in *Callicarpa nudiflora* by HPLC

CAI Jin-ping¹, DONG Lin², SHENG Lin², LIU Ming-sheng^{1,3*}, YANG Yan¹, HU Bo¹, YE Xiao-ling¹

(1. School of Traditional Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine,

Guangzhou 510006, China; 2. Hainan Medical University, Haikou 571101, China;

3. Institute of South Herbs and Li nationality Medicines of Hainan Province, Haikou 571101, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for determination of acteoside and luteolin in *Callicarpa nudiflora*. **Method:** HPLC method was applied on Phenomenex Gemini C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at 30 °C under the condition of gradient elution with mobile A (methanol) and mobile B (0.3% phosphate). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was set at 350 nm. **Result:** Two components had a good liner relationship in concentration of 29.6-740.0, 1.0-25.0 μg (r = 0.999 9). The average recoveries were 99.08%, 99.93% and the RSD was 1.53%, 1.65% respectively. **Conclusion:** The method is accurate and reproducible for determination of acteoside and luteolin in *C. nudiflora*.

[Key words] *Callicarpa nudiflora*; acteoside; luteolin; HPLC; determination

裸花紫珠 *Callicarpa nudiflora* Hook. Et Arn. 为

马鞭草科紫珠属植物, 别名贼子叶, 黎药名补阔, 是一种海南大宗性地道药材, 同样是海南黎族医生常用药材之一^[1]。药用部位为干燥地上部分, 化学成分主要包括黄酮类、萜类、挥发油和酚类等, 具有抗菌止血、消炎解毒、散瘀消肿、驱风祛湿之功效^[2]。本课题组从裸花紫珠的水提取物中分离出含量较大的 5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮、木犀草素及其配糖体等黄酮成分^[3]。近年研究表明, 黄酮类化合物木犀草素具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、免疫调节等作用^[4-5]。酚苷类成分毛蕊花糖苷等可能是裸花紫珠止血作用的主要活性成分^[6], 且有研究者对该类

[收稿日期] 20120717(002)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2011BAI01B07); 海南省重点科技计划项目(ZDXM20100040); 2010 年度海南省自然科学基金项目(310048)

[第一作者] 蔡金平, 研究生, 从事热带药用植物(南药黎药)研究与开发, Tel: 020-39358312, E-mail: caijinping01@163.com

[通讯作者] *刘明生, 教授, 博士生导师, 从事南药黎药研究与开发, Tel: 0898-66893826, E-mail: mingsliu2002@yahoo.com

成分的提取工艺进行优化^[7]。目前在裸花紫珠药材质量控制研究方面主要测定黄酮类的木犀草素^[8-9], 萜类的熊果酸与齐墩果酸^[10]及酚苷类的毛蕊花糖苷^[11]等单一类成分的含量。为了很好地控制该药材质量, 本文选择了黄酮类的木犀草素和酚苷类的毛蕊花糖苷作为指标成分, 并采用高效液相色谱法同时测定裸花紫珠药材中毛蕊花糖苷和木犀草素的含量。

1 材料

1.1 仪器 Prostar 240 SDM control, Prostar 335 PDA detector (美国 VARIAN), 柱温箱 DT-203A (江苏汉邦科技有限公司), DTS 超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司), SHB-III 型循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司), BS210S 型电子天平 (210 g/0.000 1 g, 西德北京赛多利斯公司)。

1.2 试药 毛蕊花糖苷 (批号 111530-2010007), 木犀草素 (批号 111520-200504) 对照品均购于中国药品生物制品检定所, 甲醇 (色谱纯, TEDIA 公司), 甲醇 (AR, 汕头市西陇化工厂有限公司), 磷酸 (AR, 广州化学试剂), 水为自制双蒸馏水。裸花紫珠药材均由李伟高级工程师鉴定为马鞭草科植物裸花紫珠 *C. nudiflora* 的干燥叶。

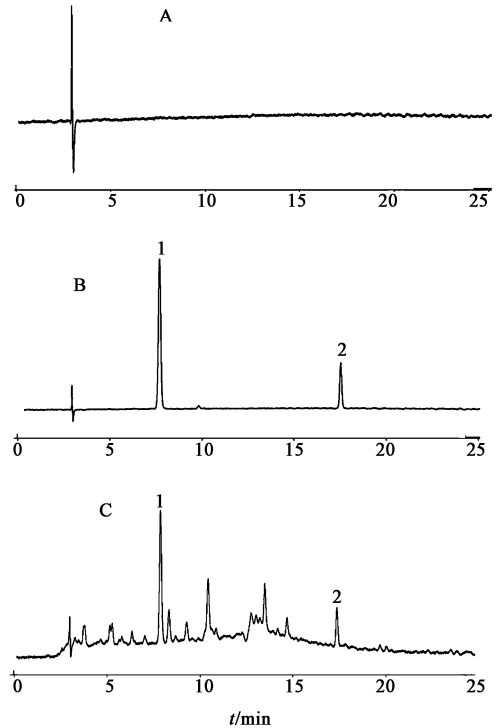
2 方法和结果

2.1 色谱条件和系统适用性试验 色谱柱为 Phenomenex Gemini C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇 (A), 0.3% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱程序为 0 ~ 10 min, 40% ~ 50% A; 10 ~ 15 min, 50% ~ 60% A; 15 ~ 25 min, 60% ~ 70% A。流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 350 nm, 柱温 30 °C, 见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 取毛蕊花糖苷和木犀草素对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇溶解制成每 1 mL 各含毛蕊花糖苷 1.48 mg, 木犀草素 0.05 mg 的混合溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取干燥裸花紫珠药材粉末约 1.0 g, 置于 100 mL 具塞锥形瓶, 精密加入 50% 甲醇溶液 50 mL, 称定质量, 超声处理 (500 W, 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇溶液补足减失的质量, 摇匀, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察 分别精密量取 2.2 项下混合对照品溶液 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mL 置于 10 mL 量瓶, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得系列对照品混合液 ①, ②, ③, ④, ⑤。在上述色谱条件下测



A. 基线; B. 对照品; C. 供试品; 1. 毛蕊花糖苷; 2. 木犀草素

图 1 基线 (A)、对照品 (B) 和供试品 (C) 的 HPLC

定, 精密吸取 5 μL 进样, 测定峰面积, 以浓度 (X , mg·L⁻¹) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 计算回归方程, 分别为毛蕊花糖苷 $Y = 51\ 078X - 534\ 543$ ($r = 0.999\ 9$), 线性范围 29.6 ~ 740.0 μg, 木犀草素 $Y = 387\ 351X - 150\ 903$ ($r = 0.999\ 9$), 线性范围 1.0 ~ 25.0 μg。

2.5 精密度试验 吸取对照品混合液④连续进样 6 次, 进样量 5 μL。测定二组分的峰面积, 结果毛蕊花糖苷 RSD 0.77%, 木犀草素 RSD 1.10%。

2.6 重复性试验 取同一批药材细粉, 按 2.3 项方法平行制备供试品溶液 6 份, 分别进样, 每次进样 5 μL。测定二组分质量浓度结果毛蕊花糖苷 RSD 1.71%, 木犀草素 RSD 1.69%。

2.7 稳定性试验 取同一份供试品溶液分别在 0, 2, 4, 8, 12 h 进样测定, 每次进样 5 μL, 测定二组分峰面积, 结果毛蕊花糖苷 RSD 2.19%, 木犀草素 RSD 1.31%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 取同批含毛蕊花糖苷, 木犀草素质量分数分别为 2.448 9, 0.091 0 mg·g⁻¹ 药材粉末约 0.5 g, 9 份, 3 份一组, 3 组分别加入适量对照品溶液, 按 2.3 项方法制备, 在上述色谱条件下, 进样 5 μL 测定并计算回收率 % = [(测得量 - 样品

中含量)/加入量]×100%。结果见表1,2。

表1 毛蕊花糖苷加样回收率试验

No.	称样量 /g	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.501 2	1.227 4	0.979 5	2.207 7	100.09		
2	0.500 8	1.226 4	0.979 5	2.203 0	99.71		
3	0.501 0	1.226 9	0.979 5	2.205 9	99.95		
4	0.501 0	1.226 9	1.224 4	2.405 3	96.25		
5	0.501 5	1.228 1	1.224 4	2.455 1	100.21	99.08	1.53
6	0.501 1	1.227 1	1.224 4	2.445 1	99.48		
7	0.500 9	1.226 6	1.469 3	2.664 7	97.87		
8	0.501 1	1.227 1	1.469 3	2.659 3	97.47		
9	0.501 0	1.226 9	1.469 3	2.706 5	100.70		

表2 木犀草素加样回收率试验

No.	称样量 /g	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.501 2	0.045 6	0.036 4	0.082 3	100.82		
2	0.500 8	0.045 6	0.036 4	0.082 6	101.74		
3	0.501 0	0.045 6	0.036 4	0.082 7	101.97		
4	0.501 0	0.045 6	0.045 5	0.090 2	98.06		
5	0.501 5	0.045 6	0.045 5	0.091 4	100.60	99.93	1.65
6	0.501 1	0.045 6	0.045 5	0.090 9	99.58		
7	0.500 9	0.045 6	0.054 6	0.098 7	97.30		
8	0.501 1	0.045 6	0.054 6	0.100 6	100.75		
9	0.501 0	0.045 6	0.054 6	0.099 4	98.56		

2.9 含量测定 取海南不同地区所产裸花紫珠样品,分别按照2.3项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件测定,进样量5 μL。结果见表3。

表3 裸花紫珠药材含量的测定(n=3)

药材批次	毛蕊花糖苷 /mg·g ⁻¹	木犀草素 /mg·g ⁻¹
海南五指山 2011-07	2.448 9	0.091 0
海南白沙 2011-03	8.068 7	0.212 0
海南白沙 2011-12	12.119 0	0.157 1
海南临高 2012-04	16.822 6	0.203 4
平均值	9.864 8	0.165 9

3 讨论

3.1 色谱条件的选择和优化 选用了Agilent TC-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), Grace C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), Phenomenex Gemini C₁₈(4.6 mm×

250 mm, 5 μm)3种液相柱进行了考察, Phenomenex Gemini C₁₈柱分离效果及峰形最佳。考察了乙腈-磷酸水, 甲醇-磷酸水流动相系统, 磷酸加入量(0.1%, 0.2%, 0.3%), 柱温(25, 30, 35, 40℃)对分离效果的影响。结果显示, 温度及pH对峰型对称及保留时间影响明显。检测波长经过VARIAN液相色谱工作站光谱分析, 毛蕊花糖苷的最大吸收波长为332 nm, 木犀草素有两个较大吸收波长分别为255, 350 nm, 因木犀草素的含量相对较低, 为兼顾木犀草素的灵敏度, 故采用350 nm为检测波长。故以Phenomenex Gemini C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 甲醇-0.3%磷酸梯度洗脱, 柱温30℃, 检测波长350 nm, 流速1.0 mL·min⁻¹为测定条件。

3.2 供试品的提取条件考察 考察了提取方法(超声提取, 水浴加热回流提取), 提取溶媒(水, 50%甲醇, 甲醇, 30%乙醇, 60%乙醇, 90%乙醇), 提取时间(15, 30, 60 min)和提取溶剂量(25, 50, 100 mL), 测定样品中毛蕊花糖苷和木犀草素的量。结果显示, 两种方法提取所测得的成分含量基本一致, 故采用相对简便的超声提取, 50%甲醇作为溶媒时主成分含量较大, 基线持平且峰型对称行良好, 提取30 min, 提取溶剂量50 mL为佳。综上所述, 确定供试品的适宜提取条件为加入50%甲醇50 mL进行超声提取30 min。

样品含量测定结果发现不同产地及采收时间的毛蕊花糖苷和木犀草素含量存在一定的差异, 而毛蕊花糖苷的差异相对较大, 可能与地理土壤、气候及药材采收后储藏等条件因素有关。本研究建立了HPLC同时测定裸花紫珠药材中不同类成分毛蕊花糖苷和木犀草素的方法。该方法可以很好的测定裸花紫珠药材中毛蕊花糖苷和木犀草素的含量, 可为裸花紫珠的质量控制, 最佳产地及最佳采收期提供参考和科学依据。

[致谢]感谢海南九芝堂药业有限公司对本实验提供的仪器设备及裸花紫珠药材。

[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] 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.
- [4] Hu C, Kitts D D. Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activities of solvent fractionated dandelion flower extracts *in vitro* [J]. J Agric Food Chem, 2003, 52(2): 301.

HPLC-ELSD 同时测定枇杷叶中 6 种三萜酸成分的含量

蔡雪萍^{1,2}, 李松林², 华俊磊^{1,2}, 吕寒³, 李维林³, 鞠建明^{2*}

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2. 江苏省中医药研究院, 南京 210028;
3. 江苏省中科院植物研究所, 南京 210014)

[摘要] 目的: 建立 HPLC-ELSD 同时测定枇杷叶中 6 种三萜酸成分含量的方法。方法: 采用 Ultimate XB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-甲醇-0.5% 醋酸铵溶液, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 蒸发光散射检测器漂移管温度 95 °C, 氮气流速 2.5 L·min⁻¹。结果: 蔷薇酸、委陵菜酸、马斯里酸、科罗索酸、齐墩果酸、熊果酸分别在 0.436 ~ 2.180, 0.392 ~ 1.960, 0.39 ~ 1.960, 0.856 ~ 4.280, 0.424 ~ 2.120, 1.592 ~ 7.960 μg, 进样质量对数值与峰面积对数值呈良好线性关系; 平均回收率分别为 98.9% (RSD 3.8%), 96.3% (RSD 2.7%), 97.7% (RSD 2.6%), 97.6% (RSD 3.2%), 96.6% (RSD 1.9%), 102.5% (RSD 2.5%)。结论: 建立的含量测定方法简便、准确、分离效果好、重复性好, 为更好地控制枇杷叶药材质量提供试验依据。

[关键词] 枇杷叶; 蔷薇酸; 委陵菜酸; 马斯里酸; 科罗索酸; 齐墩果酸; 熊果酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0084-04

Simultaneous Determination of Content of Six Triterpene Acids in *Eriobotrya japonica* by HPLC-ELSD

CAI Xue-ping^{1,2}, LI Song-lin², HUA Jun-lei^{1,2}, LV Han³, LI Wei-lin³, JU Jian-ming^{2*}

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China;

3. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC-ELSD method for simultaneous quantitation of six triterpene

[收稿日期] 20120824(002)

[基金项目] 江苏省产学研前瞻性联合研究项目(BY2009144)

[第一作者] 蔡雪萍, 在读硕士, 从事中药新剂型新工艺研究, Tel: 15850500785, E-mail: caixueping880315@163.com

[通讯作者] * 鞠建明, 硕士, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药新剂型与新工艺及中药材质量控制研究, Tel: 025-85639640, E-mail: jjm405@sina.com

[5] Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, et al. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophage [J]. *J Pharm Exp Ther*, 2001, 296(1): 181.

[6] 张洁, 李宝泉, 冯峰, 等. 裸花紫珠的化学成分及其止血活性研究 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(24): 3297.

[7] 巩珺, 麦锦富, 彭素萍, 等. Doehlert 设计法优化紫珠中苯乙醇苷的提取工艺 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(17): 7.

[8] 胡蓉, 姚闯, 李玉云. 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.

[9] 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, 19(21): 2008.

[10] 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.

[11] 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.

[责任编辑 顾雪竹]