

DOI:10.13718/j.cnki.xsxb.2017.08.015

HPLC 法测定仙桃草中芦丁、木犀草苷、木犀草素的含量^①

李洁玉^{1,2}, 周 浓³, 阳文武⁴, 张德伟⁴, 陈燕飞³

1. 重庆三峡医药高等专科学校 药理学系, 重庆 万州 404000; 2. 重庆市抗肿瘤天然药物工程技术研究中心, 重庆 万州 404000; 3. 重庆三峡学院 生命科学与工程学院, 重庆 万州 404000; 4. 重庆市万州食品药品检验所 中药室, 重庆 万州 404000

摘要: 建立 HPLC 法同时测定仙桃草中芦丁、木犀草苷、木犀草素 3 种黄酮含量的方法。采用 Venusil MP C₁₈ (2) 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.2%磷酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 350 nm, 柱温为 35 °C。方法学验证结果表明, 3 种黄酮类化合物的分离度良好, 且在各自质量浓度范围内线性关系良好, $r \geq 0.999 1$, 平均加样回收率($n=6$) 在 96.76%~98.03%, RSD 为 1.62%~1.93%。3 种黄酮类化合物在不同批次仙桃草中的含量存在较大的差异, 仙桃草中 3 种黄酮总量在 373.458~673.413 μg/g 之间。由此表明, 不同生产批次的仙桃草药材, 其内在品质存在较大差异, 本方法可用于仙桃草药材中多种黄酮类成分同步测定, 同时可以为仙桃草的质量控制提供科学依据。

关键词: 仙桃草(蚊母草); 芦丁; 木犀草苷; 木犀草素; 高效液相色谱法

中图分类号: R282.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2017)08-0080-05

仙桃草为玄参科植物蚊母草 *Veronica peregrine* L. 的干燥带虫瘿的全草, 在万州、忠县、丰都、江津等三峡库区广泛分布, 为临床伤科疾病习用的一味中药材, 具有化瘀止血、清热解毒、消肿止痛之功效, 常用于治疗跌打损伤、瘀血肿痛、出血证及骨折等^[1-2]。据报道, 仙桃草主要含黄酮类、酚酸类等活性成分^[3-4]。其中含有 0.27% 的黄酮类化合物^[5], 主要包括木犀草素、金圣草素等黄酮类化合物^[4-5]。生物活性研究表明, 仙桃草中黄酮类提取物具有良好的促进骨折愈合、止血的作用^[6-7], 黄酮类化合物的生物活性具有协同作用^[8], 推测其含量水平的高低可能会影响仙桃草制剂的疗效和质量。而仙桃草中 3 种黄酮类化合物含量同时测定尚未报道。为此, 本实验采用 HPLC 法对 5 批次原料药材仙桃草中芦丁、木犀草素、木犀草苷进行含量测定, 以期全面客观地认识仙桃草药材物质基础, 为完善和提高仙桃草质量标准提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 仪器、试剂与材料

岛津 LC-20A 高效液相色谱仪。

芦丁、木犀草苷、木犀草素对照品(购自中国食品药品检定研究院, 批号分别为: 100080-201409、111720-201609、111520-201605); 色谱纯乙腈(德国默克), 纯净水(娃哈哈牌), 其他试剂均为分析纯。

① 收稿日期: 2017-03-15

基金项目: 重庆市万州区科委自然科学基金项目(201403067、201501024)。

作者简介: 李洁玉(1978-), 女, 重庆开县人, 讲师, 主要从事中药品质与质量分析研究。

通信作者: 张德伟, 副主任药师。

仙桃草 5 份样品于 2016 年 3—6 月收集于重庆东方药业股份有限公司不同生产批次原料药材, 并经重庆市万州食品药品检验所孟家安教授鉴定为玄参科植物蚊母草 *Veronica peregrine* L. 的干燥带虫瘿的全草。

1.2 色谱条件

色谱柱 Agela Venusil MP C₁₈ (2) 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈(A)—0.2%磷酸溶液(B), 进行梯度洗脱(0~15 min, 16% A~16% A; 15~35 min, 16% A~38% A; 35~36 min, 38% A~16% A; 36~45 min, 16% A~16% A); 检测波长 350 nm; 柱温为 35 °C; 流速 1.0 mL/min.

1.3 溶液的制备

1.3.1 对照品溶液的制备

分别精密称取室内减压干燥至恒重的芦丁、木犀草苷和木犀草素对照品适量, 用甲醇配成浓度分别为 0.40, 0.80, 0.60 mg/mL 的对照品贮备液。

1.3.2 供试品溶液的制备

取 5 批次仙桃草粉末(过 3 号筛)2.0 g, 精密称定, 置于 250 mL 圆底烧瓶中, 加 70% 甲醇 100 mL, 回流提取 2 h, 滤过, 滤渣重复操作 1 次, 合并 2 次滤液, 减压浓缩回收溶剂至干, 残渣加 70% 甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中, 摇匀, 用前以 0.45 μm 微孔滤膜过滤即得。

1.4 线性关系考察

分别精密量取上述对照品溶液各 0.5, 0.2, 1.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 即得芦丁、木犀草苷和木犀草素质量浓度分别为 20, 16, 60 μg/mL 混合对照品溶液。并逐级稀释为一系列不同浓度的 3 种黄酮混合对照品溶液, 用前以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 分别精密吸取混合对照品溶液 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 得对照品浓度(C, μg/mL)与峰面积的线性回归方程、相关系数和线性范围。

1.5 精密度实验

取同一供试品溶液(S4), 按 1.2 项下色谱条件连续进样 6 次, 测定 3 种黄酮的色谱峰面积, 考察本仪器的精密度。

1.6 重复性实验

取同一仙桃草样品 6 份(S4), 每份 2.0 g, 精密称定, 依 1.3.2 项下方法制备供试品溶液及 1.2 项下色谱条件进行分析, 测定 3 种黄酮的色谱峰面积, 考察本实验方法的重复性。

1.7 稳定性实验

取制备好的仙桃草供试品溶液(S4), 在室内常温密闭放置, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进行分析, 测定 3 种黄酮的色谱峰面积, 考察本样品的稳定性。

1.8 加样回收率实验

精密称取已知含量的仙桃草样品约 1.0 g(S4), 共 6 份, 分别精密量取芦丁、木犀草苷、木犀草素对照品溶液适量, 按 1.3.2 项下方法平行制备供试品溶液及 1.2 项下色谱条件进行分析, 测定 3 种黄酮的色谱峰面积, 验证本方法的准确性, 计算方法学的加样回收率和 RSD。

1.9 样品测定

5 批次仙桃草药材分别按 1.3.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按 1.2 项下色谱条件测定, 测定 3 种黄酮的色谱峰面积, 测定仙桃草中 3 种黄酮类化合物的含量。

2 结果与分析

2.1 样品的液相色谱测定结果

混合对照品和仙桃草药材(S4)HPLC 色谱图如图 1, 在本实验色谱条件下 3 种黄酮类成分能有效分离, 且峰形良好, 杂质峰干扰较少, 因此该流动相是可行的。仙桃草样品 HPLC 色谱图显示, 除已知的 3 种黄酮类化合物外, 还存在大量未知的黄酮类化合物, 有待继续深入研究。

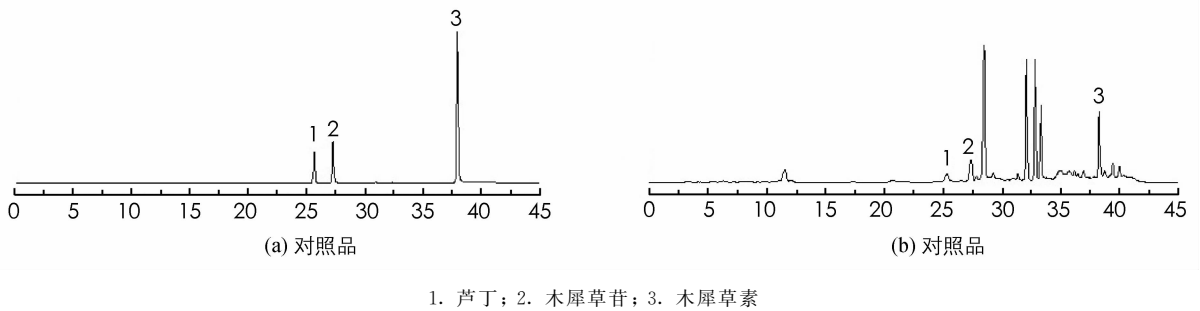


图 1 对照品及供试品的 HPLC 图谱

2.2 回归方程的确定

芦丁、木犀草苷、木犀草素线性回归方程分别为： $A=28\ 778\ C-922.44(r=0.999\ 9)$ ； $A=44\ 443\ C-10\ 427(r=0.999\ 7)$ ； $A=43\ 405\ C-12\ 552(r=0.999\ 1)$ 。芦丁、木犀草苷、木犀草素线性范围分别为 $1.0\sim 20.0, 0.8\sim 16.0, 3.0\sim 60.0\ \mu\text{g/mL}$ ，表明峰面积与 3 种黄酮含量之间存在显著的线性关系。

2.3 精密度实验

供试品溶液中芦丁、木犀草苷、木犀草素的 RSD 分别为 2.12% 、 1.85% 、 0.92% ，表明本仪器检测时精密度良好。

2.4 重复性实验

供试品溶液中芦丁、木犀草苷、木犀草素的平均质量分数分别为 $40.127, 29.654, 312.778\ \mu\text{g/g}$ ， RSD 分别为 2.65% 、 2.81% 、 1.93% 。表明建立的本实验方法重复性良好。

2.5 稳定性实验

供试品溶液中芦丁、木犀草苷、木犀草素的 RSD 分别为 1.22% 、 2.44% 、 0.88% 。表明仙桃草供试品溶液至少在 24 h 内稳定性良好。

2.6 加样回收率试验

仙桃草药材(S4)中芦丁、木犀草苷、木犀草素 3 种黄酮的平均回收率分别为 97.34% 、 98.03% 、 96.76% ， RSD 分别为 1.62% 、 1.93% 、 1.69% ，符合液相色谱分析要求，可应用于仙桃草药材及其制剂中 3 种黄酮的检测与分析，结果见表 1。

表 1 仙桃草中 3 种黄酮加样回收率测定 ($n=6$)

成分	样品中质量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD /%
芦丁	40.147	40.0	79.555	98.52	97.34	1.62
	40.131	40.0	80.083	99.88		
	40.159	40.0	78.607	96.12		
	40.139	40.0	79.039	97.25		
	40.135	40.0	78.687	96.38		
	40.131	40.0	78.479	95.87		
木犀草苷	29.669	32.0	61.362	99.04	98.03	1.93
	29.657	32.0	61.148	98.41		
	29.678	32.0	61.537	99.56		
	29.663	32.0	61.592	99.78		
	29.660	32.0	60.134	95.23		
	29.657	32.0	60.431	96.17		
木犀草素	312.934	300.0	598.714	95.26	96.76	1.69
	312.809	300.0	610.169	99.12		
	313.028	300.0	603.698	96.89		
	312.872	300.0	598.592	95.24		
	312.841	300.0	600.151	95.77		
	312.809	300.0	607.649	98.28		

2.7 样品的含量测定

按标准曲线法定量, 分别计算芦丁、木犀草苷、木犀草素的含量, 结果见表 2.

表 2 不同批次仙桃草样品中 3 种黄酮的质量分数

$\mu\text{g/g}$

No.	样品批号	芦丁	木犀草苷	木犀草素	总量
S1	201603001	66.463a	60.321a	320.339a	447.123a
S2	201604001	23.993a	23.418a	626.002a	673.413a
S3	201605001	49.027a	49.279a	335.204a	433.509a
S4	201606001	40.127a	29.654a	312.778a	382.558a
S5	201606002	11.778a	42.979a	318.702a	373.458a

注: 同组同列不同的小写字母代表 0.05 水平上显著性差异, 下同.

从表 2 可以看出, 5 批仙桃草之间黄酮类化合物质量分数积累相似, 均含有芦丁、木犀草苷和木犀草素, 不同批次仙桃草中木犀草素含量远大于已知成分芦丁和木犀草苷, 高达 0.06%, 木犀草素是仙桃草黄酮类成分中的主要成分之一, 这个结果与宋光伟等^[4]对仙桃草的研究结果相一致.

3 讨 论

3.1 提取溶剂和方法的选择

本实验中分别以不同体积分数的甲醇、乙醇提取, 结果显示采用 70% 甲醇水溶液提取量最高. 采用 70% 甲醇水溶液, 相同提取时间, 不同的提取方法(超声波辅助提取、回流提取、索氏提取), 结果表明回流提取的方法提取量较高且较索氏提取法简便易行. 回流提取法中, 以 70% 甲醇水溶液为提取溶剂, 分别比较了不同料液比(1:10, 1:30, 1:50, 1:70 g/mL)、不同回流提取时间(1, 2, 3 h)、不同回流提取次数(1 次、2 次、3 次)对仙桃草中 3 种黄酮的总提取量, 研究结果以 70% 甲醇为提取溶剂, 料液比 1:50 g/mL, 单次回流提取 2 h, 总提取 2 次即可将仙桃草中 3 种黄酮基本提取完全, 较宋光伟等^[4]报道的提取方法简便.

3.2 流动相比例、色谱柱及检测波长的选择

本实验分别比较 Durashell C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Venusil XBP C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和 Venusil MP C₁₈(2) 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)3 种类型色谱柱对仙桃草药材中 3 种黄酮的分离效果, Venusil MP C₁₈(2) 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)能对 3 种黄酮进行有效分离. 同时比较了乙腈、甲醇不同比例的流动相系统, 结果以乙腈-0.2% 磷酸水溶液的分离效果最佳. 采用 PDA 考察 190~400 nm 不同检测波长下的 HPLC 色谱图, 结果芦丁、木犀草苷和木犀草素均在 350 nm 处有较大的吸收峰. 因此, 本实验最终选择在检测波长 350 nm 下运用 Venusil MP C₁₈(2) 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和乙腈-0.2% 磷酸水溶液的梯度洗脱, 与黄艳梅等^[9]的研究结果相似.

3.3 含量测定结果分析

采用本实验建立的色谱条件对制药企业不同来源的 5 批仙桃草进行含量测定. 结果表明, 5 批次仙桃草商品药材中芦丁、木犀草苷、木犀草素和 3 种黄酮总量的质量分数范围分别为 11.778~66.463 $\mu\text{g/g}$, 23.418~60.321 $\mu\text{g/g}$, 312.778~626.002 $\mu\text{g/g}$, 373.458~673.413 $\mu\text{g/g}$, 分别最大相差 5.64 倍、2.58 倍、2.01 倍和 1.80 倍, 存在较大的差异, 但未达到显著性差异($p < 0.05$), 且不同批次仙桃草药材中芦丁、木犀草苷和木犀草素 3 种黄酮内在的结构比均存在较大差异, 分别为 1.00:0.91:4.82, 1.00:0.98:26.09, 1.00:1.01:6.84, 1.00:0.74:7.79, 1.00:3.65:27.06, 表明市场流通的仙桃草商品药材, 在品质上存在较大差异, 可能与产地、采收期等不同有关^[4], 故有必要对仙桃草药材的质量进行规范化评价, 以期建立统一规范的质量控制方法, 本方法可作为《药品标准》质量控制的定量评价指标之一.

本实验建立的 HPLC 法同时测定仙桃草商品药材中芦丁、木犀草苷、木犀草素 3 种黄酮含量的方法, 特别是木犀草素的质量分数相对较高, 对其进行质量分数测定是非常必要的, 具有简便可靠, 方法学验证结果符合分析要求, 可作为仙桃草药材的一个重要鉴别和质量评价手段之一, 同时为阐明仙桃草及其相关成药的质量综合评价提供了坚实的基础.

4 结 论

仙桃草所含黄酮类化合物可作为该药材质量综合评价的指标性成分,黄酮类化合物已被证实为中药材中重要的生物活性物质,与仙桃草生物活性(促进骨折愈合、止血等)^[6-7]具有一定的关联性.鉴于3种黄酮在仙桃草商品药材中质量分数范围为373.458~673.413 $\mu\text{g/g}$,深入研究其黄酮含量高低,探讨3种黄酮作为仙桃草药材品质优劣的衡量指标具有必要性.

参考文献:

- [1] 刘正宇. 重庆市三峡库区药用植物资源名录 [M]. 重庆: 重庆出版社, 2007: 472.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志第 67 卷第 2 分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [3] 刘华本, 李晓维, 潘 旖, 等. HPLC 法测定仙桃草中原儿茶酸的含量 [J]. 中国医药指南, 2015, 13(22): 54-55.
- [4] 宋光伟, 邢 茂, 王 伟, 等. HPLC 法测定仙桃草中木犀草素的含量 [J]. 中国药房, 2009, 20(15): 1166-1167.
- [5] 肖秋香, 彭湘君, 李银保. 正交试验优化仙桃草总黄酮提取工艺 [J]. 湖北农业科学, 2016, 55(21): 5588-5590.
- [6] 都述虎, 金继曙. 仙桃草主要化学成分体外促凝血作用 [J]. 中草药, 1996, 27(7): 416-417.
- [7] 方 芳, 王平珍, 邱 芸. 仙桃草促进骨折愈合机制探讨 [J]. 中国民族民间医药, 2014, 23(21): 15-15.
- [8] KIMURA M, YAMADA H. Interaction in the Antibacterial Activity of Flavonoids from *Sophora Japonica* L. to *Propionibacterium* [J]. *Yakugaku Zasshi-journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 1984, 104(4): 340-346.
- [9] 黄艳梅, 石 岩, 胡云飞, 等. HPLC 结合化学计量学对不同产地菊花中化学成分的比较分析 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(11): 1941-1951.

Determination of Rutin, Luteolin-7-O-glucoside and Luteolin from Purslane Speedwell with HPLC

LI Jie-yu^{1,2}, ZHOU Long³,
YANG Wen-wu⁴, ZHANG De-wei⁴, CHEN Yan-fei³

1. Department of Pharmacy, Chongqing Three Gorges Medical College, Wanzhou Chongqing 404000, China;

2. Chongqing Engineering Research Center of Antitumor Natural Drugs, Wanzhou Chongqing 404000, China;

3. College of Life Science and Engineering, Chongqing Three Gorges University, Wanzhou Chongqing 404000, China;

4. Traditional Chinese Medicine (TCM) Section, Wanzhou Institute for Drug and Food Control, Wanzhou Chongqing 404000, China

Abstract: An HPLC procedure is established to simultaneously determine the contents of three flavonoids (rutin, galuteolin and luteolin) in purslane speedwell (*Veronica peregrina* L.). Using the Venusil MP C₁₈(2) column (4.6mm×250mm, 5 μm) and acetonitrile-0.2% phosphoric acid as the mobile phase, gradient elution was performed at a flow rate of 1.0 mL/min, a column temperature of 35°C, and a detection wavelength of 350nm. The results of methodological validation suggested that all the three flavonoids presented good resolution and good linearity within their respective concentration range (by mass), r being ≥ 0.9991 , the mean recovery ($n=6$) being 96.76%—98.03% and RSD being 1.62%—1.93%. The contents of the three flavonoids varied significantly in different batches of purslane speedwell, and their total content varied between 373.458 and 673.413 $\mu\text{g/g}$, thus indicating a substantial variability of quality of different batches of purslane speedwell. In conclusion, this method is applicable to simultaneous determination of various flavonoids in purslane speedwell, which could provide evidences for the quality control of purslane speedwell.

Key words: purslane speedwell (*Veronica peregrina* L.); rutin; luteolin-7-O-glucoside; luteolin; HPLC

责任编辑 汤振金