

◇ 药物分析 ◇

高效液相色谱法测定异叶爬山虎中异槲皮苷的含量

张颖^{1,2},李嘉^{1,2},何春欢^{1,2},陈锋^{1,2},姜平川^{1,2}

(1. 广西壮族自治区中医药研究院化学所,广西 南宁 530022;

2. 广西中药质量标准研究重点实验室,广西 南宁 530022)

摘要:目的 建立高效液相色谱法(HPLC)测定异叶爬山虎中异槲皮苷含量的方法,并测定广西不同地区的异叶爬山虎中异槲皮苷的含量。**方法** 采用 Inersil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×25 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.05% 磷酸溶液(46:54),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 258 nm,柱温 25 ℃,进样量 10 μL,分析时间 32 min。**结果** 异槲皮苷的进样量在 20~200 μg 范围内,与峰面积呈良好的线性关系,相关系数 $r=0.999\ 9$ ($n=6$);异槲皮苷的平均回收率为 98.53% ($n=6$),RSD 为 0.79%。**结论** 该法操作简便,重复性好,可用于测定异叶爬山虎中异槲皮苷含量。

关键词:异叶爬山虎;异槲皮苷;高效液相色谱法;含量测定

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.01.012

Determination of the content of isoquercitrin in *Parthenocissus heterophylla* (BL.) by HPLC

ZHANG Ying^{1,2},LI Jia^{1,2},HE Chunhuan^{1,2},CHEN Feng^{1,2},JIANG Pingchuan^{1,2}

(1. Department of Chemistry,Guangxi Institute of Chinese Medicine &Pharmaceutical Science,Nanning 530022,China;

2. Guangxi Key Laboratory of the Quality Standard of Traditional Chinese Medicine,Nanning 530022,China)

Abstract:Objective To establish a method for the determination of Isoquercitrin in EAE extract of *Parthenocissus heterophylla* (BL.) Merr. **Methods** The Component was separated on a Inersil C₁₈ column (4.6 mm×25 mm,5 μm) with a flow-rate of 1 mL·min⁻¹ at 25 ℃. The mobile phase consisted a mixture of methanol and 0.05% phosphoric acid (46:54). The total analysis time was 32 min. The detector was DAD and the detection wavelength was 258 nm. **Results** The linear range of Isoquercitrin was 20~200 μg, ($r=0.999\ 9$). The average recovery was 98.53%,RSD was 0.79% ($n=6$). **Conclusion** The method is simple and accurate,and can be used for the determination of content of Isoquercitrin in the EAE extract of *Parthenocissus heterophylla* (BL.) Merr.

Key words:*Parthenocissus heterophylla*;Isoquercitrin;HPLC;Content determination

基金项目:广西壮族自治区科技厅项目(桂科能 10100024-13;桂科重 1355001-4-7;桂科重 1598005-10);广西中药质量标准研究重点实验室课题(桂中重自 201410)

通信作者:李嘉,女,副主任医师,研究方向:中药新药研究,E-mail:1343157882@qq.com

[5] 张太阳,熊燕,李淑兵,等.丹红治疗糖尿病合并颈动脉硬化血管病理机制研究[J].中国中医基础医学杂志,2013,19(3):288-289.

[6] 吕晓静,周慧敏.糖尿病与认知损害:病理生理学机制[J].国际脑血管病杂志,2014,22(2):154-157.

[7] 刘玥,齐新,魏丽萍,等.中药及复方对糖尿病心肌病病理变化及发病机制影响的研究进展[J].中华中医药杂志,2014,29(3):823-826.

[8] 戴红,邹小娟,赵厚睿,等.不同 STZ 剂量造模对 2 型糖尿病动物模型证候属性影响的研究[J].时珍国医国药,2015,26(3):751-755.

[9] 郭松林,郝亚荣,朱刚艳,等.二甲双胍对 2 型糖尿病患者血管内皮功能的影响[J].中国老年学杂志,2015,35(11):26-29.

[10] 冯琴,李雪梅,彭景华,等.绞股蓝总皂苷对二甲基亚硝胺诱导的大鼠肝纤维化的防治作用[J].中国中药杂志,2012,37(4):

505-508.

[11] 郭莉,郭慧淑,刘越坚,等.糖化血红蛋白检测在糖尿病诊治中的临床价值[J].中国老年学杂志,2013,33(4):920-921.

[12] 王旭,赵澜,徐奚如.2 型糖尿病痰热证与脂代谢紊乱及糖尿病病程相关性研究[J].辽宁中医药大学学报,2013,15(7):5-6.

[13] TSAI YC,LIN C,CHEN BH. Preparative chromatography of flavonoids and saponins in *Gynostemma pentaphyllum* and their antiproliferation effect on hepatoma cell[J].Phytomedicine,2010,18(1):2-10.

[14] 庞玉萍.绞股蓝总皂苷对 2 型糖尿病大鼠游离脂肪酸代谢的影响及改善胰岛素抵抗相关机制研究[J].中华中医药学刊,34(4):960-963.

[15] 魏凤江,蔡春友,时文涛,等.2 型糖尿病合并高尿酸血症与胰岛素抵抗、血脂及血压相关性的研究[J].中国糖尿病杂志,2013,21(2):97-99.

(收稿日期:2016-05-17,修回日期:2016-10-23)

异叶爬山虎为葡萄科爬山虎属异叶爬山虎 [*Parthenocissus heterophylla* (Bl.) Merr.] 的干燥茎叶。分布于广西、安徽、浙江等地区,具有祛风除湿,通龙路、火路,止血,解毒等功效。广西民间多用于风湿痹痛、偏头痛、风湿疮毒、骨折等病症的治疗^[1-2]。目前,仅见异叶爬山虎果皮中红色素的研究^[3],关于其药理活性及化学成分研究报道较少。本课题组研究发现异叶爬山虎的乙酸乙酯萃取部位对 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 、DPPH 有清除作用,清除率达到75%以上,说明其具有抗氧化活性;对乙酸乙酯萃取部位进行成分分离,得到芹菜素、木犀草素、槲皮素、异槲皮苷等黄酮类化合物^[4]。现代药理研究表明异槲皮苷具有抗氧化活性,临床上还可治疗心肌缺血、缺氧等,故选择异槲皮苷作为含量测定的指标性成分。本实验还测定了广西不同产地的异叶爬山虎中异槲皮苷的含量,为异叶爬山虎药材质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent);XS205 电子天平(梅特勒公司);B2200s 超声波清洗器(必能信超声有限公司)。

1.2 试剂 甲醇为色谱纯(Fisher 公司),水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。异叶爬山虎均采自广西壮族自治区内各地,异槲皮苷为自制(纯度>98%,¹HNMR、¹³CNMR、IR、UV、MS 等数据与文献一致^[5],符合要求)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Inersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.05%磷酸溶液(46:54),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 258 nm,柱温 25℃。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取异槲皮苷对照品约 5 mg,置于 25 mL 的容量瓶中,用甲醇超声溶解,再用甲醇稀释到刻度。

2.3 供试品溶液的制备 取异叶爬山虎粉末(过 60 目筛)2 g,精密测定,置锥形瓶中,精密加入甲醇 15 mL 称重,超声(80 W,50 kHz)提取 40 min,取出放冷、用甲醇补足失重,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 测定法 分别吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液各 10 μL 进样。在上述系统适应性的色谱条件下,供试品中异槲皮苷色谱峰与对照品异槲皮苷色谱峰保留时间一致,并与其它共存成分最小分离度大于 1.5,理论塔板数为大于 3 000,主峰与杂质峰达到基线分离,所得色谱图见图 1,2。

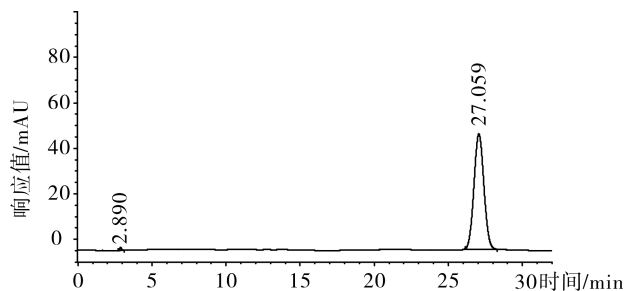


图1 对照品异槲皮苷色谱图

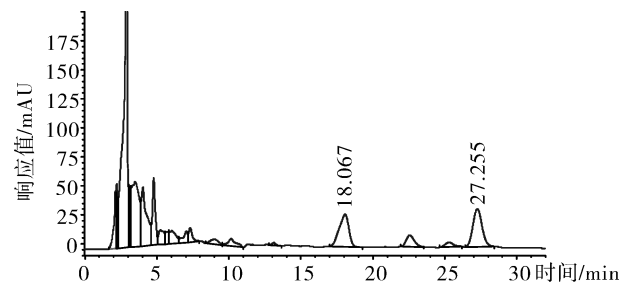


图2 异叶爬山虎药材(广西贵港)色谱图

2.5 线性关系考察 精密称取异槲皮苷对照品 5.00 mg,置于 25 mL 的容量瓶中,加甲醇超声溶解再用甲醇稀释到刻度,摇匀。制成浓度为 0.20 g·L⁻¹ 的对照品母液,并从上述的对照品溶液中精密吸取 0.5、1、2、4、5 mL,分别置于 5 mL 的容量瓶中并用甲醇稀释的刻度线摇匀,即得。再分别从容量瓶中吸取 10 μL,注入液相色谱仪。以对照品的进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标,进行回归计算,得异槲皮苷的回归方程 $Y = 14.774X - 13.525$, $r = 0.9999$ 。结果证明,异槲皮苷的进样量在 0.02~0.200 g·L⁻¹ 范围内,呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验 精密吸取“2.2”项中的对照品溶液 10 μL,按“2.1”项色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积。结果,RSD 为 1.42% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取同一份供试品溶液(广西贵港产),按照“2.3”项下方法配制在上述色谱条件下于 0、2、4、6、8、24 h 分别进样 10 μL 测定,记录峰面积。结果,RSD 为 0.14% ($n = 6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验 取同一批异叶爬山虎(广西贵港产,过 60 目筛)粉末 6 份,精密称量,按“2.3”项下方法操作,制得 6 份供试品溶液,在上述色谱条件下,分别吸取 10 μL 注入色谱仪测定含量。结果,异槲皮苷的平均含量为 0.04%,RSD 为 0.56%,表明该方法重复性较好。

表 1 异槲皮苷的加样回收试验结果($n=6$)

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/%
1.031 8	0.395 5	0.400 0	0.792 3	99.60	98.53	0.79
1.031 8	0.387 0	0.400 0	0.768 7	97.67		
1.031 8	0.390 2	0.400 0	0.779 9	99.10		
1.031 8	0.384 5	0.400 0	0.779 1	98.60		
1.031 8	0.376 8	0.400 0	0.766 0	98.61		
1.031 8	0.389 1	0.400 0	0.770 5	97.64		

2.9 加样回收率试验 精密称取已知含量(0.04%)的异叶爬山虎(广西贵港产)粉末6份,每份约1.000 0 g,分别精密加入对照品溶液(200 mg·L⁻¹)2 mL,再加入15 mL 甲醇,超声(80 W, 50 kHz)提取40 min,用甲醇补足失重,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,制得6份供试品溶液,在上述色谱条件下,分别取10 μL注入色谱仪测定含量,计算回收率,结果见表1。

2.10 样品测定 取广西不同产地的异叶爬山虎,晾干,打粉,过60目筛,各取约2 g,按照“2.3”项下方法操作,在上述的色谱条件下对样品进行测定,记录峰面积,计算含量。结果见表2。

表 2 异槲皮苷的含量测定结果

样品编号	产地来源	采集日期	异槲皮苷/%
1	广西南川县	2014-05-17	0.04
2	广西玉林1	2014-05-18	0.02
3	广西天峨县	2014-05-21	0.04
4	广西天峨县八腊乡	2014-05-21	0.02
5	广西玉林2	2014-05-20	0.02
6	广西贵港	2014-06-18	0.06
7	广西来宾	2014-02-19	0.07

3 讨论

3.1 检测波长的选择 本实验对异槲皮苷对照品进行紫外全波长扫描,结果显示在258 nm处有最大吸收,故选择258 nm作为检测波长。

3.2 流动相与流速的选择 参考文献[6],本实验考察了不同流动相系统的洗脱效果。采用甲醇-水(50:50)时,被测化合物峰形较宽,理论塔板数低,分离度低,出现拖尾的现象;采用甲醇-0.05%磷酸溶液(46:54)时,峰形尖锐、对称,分离度高,分离效果好。故选择甲醇-0.05%磷酸水(46:54)作为流动相。

3.3 色谱柱的选择 考察3根不同色谱柱:Kromasil 100-5 C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)、Alltima C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)、Inersil C₁₈(4.6 mm×

250 mm,5 μm)对供试品溶液的分离效果,结果表明供试品中异槲皮苷色谱峰与其他杂质均达到基线分离,分离度大于1.5。其中Inersil C₁₈色谱柱柱效最高,分离效果最好,故选择该色谱柱。

3.4 柱温的选择 在其他液相色谱条件相同(流动相、色谱柱、流速、进样量、检测波长)的情况下,分别考察了不同色谱柱柱温(25、30、35℃)对供试品分离度的影响。结果表明,在色谱柱温度为25℃时,各色谱峰分离较好,基线平稳,所以本实验选择色谱柱温度为25℃。

3.5 供试品制备方法的选择 分别采用渗漉法、超声波法和热回流法制备供试品溶液,结果表明超声波法和热回流法的提取率较高,且两者的提取率接近,综合考虑选择超声波法;又比较了药材超声提取30、40、60 min 异槲皮苷的提取率,结果表明超声提取40 min 的提取率较高。因此,供试品制备方法为超声提取40 min。

参考文献

[1] 梁启成,钟鸣.中国壮药学[M].南宁:广西民族出版社,2005:77.

[2] 中国科学院植物研究所中国植物志编委会.中国植物志(48卷下册)[M].北京:科学出版社,1998:12-27.

[3] 卜晓英,陈晓华,麻明友.野生异叶爬山虎果皮红色素提取及稳定性研究[J].食品科学,2010,31(2):17-21.

[4] 李嘉,张颖,何春欢,等.中药异叶爬山虎抗氧化活性部位化学成分研究[J].中南药学,2015,13(12):1274-1276.

[5] MACKHAM KP,TERNAL B,STANLEY R,et al. Carbon 13 NMR studies of flavonoids III[J]. Tetrahedron, 1978, 34(9): 1389-1397.

[6] 郑芳,朱雪松,李鹏,等. HPLC-DAD 法测定“武当三号金银花”不同部位中芦丁和木犀草素苷的含量[J]. 安徽医药,2015,19(12):2302-2306.

[7] 曹广尚,李芳,周鹏,等. HPLC 法测定白花蛇舌草中槲皮素-3-O-β-d-吡喃葡萄糖苷的含量[J]. 中国药房,2014,25(47):4453-4454.

(收稿日期:2016-08-31,修回日期:2016-10-21)