◇药物分析◇

高效液相色谱法同时测定地桃花提取物中杨梅苷、异槲皮苷和木犀草素的含量

王健

(扬州市食品药品检验检测中心,江苏 扬州 225000)

摘要:目的 建立地桃花提取物中杨梅苷、异槲皮苷和木犀草素的高效液相色谱法(HPLC)同时测定方法。**方法** 采用 HPLC 法,Kromasiol-C_{18}(250 mm×4.6 mm,5 μm),乙腈-0.25% 醋酸水(31:69)等度洗脱,检测波长:351 nm,流速:1 mL·min^{-1};柱温 30 ℃。**结果** 杨梅苷、异槲皮苷和木犀草素分别在 6.97~278.80 mg·L^{-1}、7.29~291.50 mg·L^{-1}和 2.96~118.40 mg·L^{-1}范围内线性关系良好,平均回收率分别为 98.39%、98.53% 和 97.41%。**结论** 该方法准确、可靠,重复性好,可用于地桃花提取物的质量评价与控制标准。

关键词:色谱法,高压液相;地桃花提取物;木犀草素;杨梅苷;异槲皮苷

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.03.013

Simultaneous determination of myricitrin, isoquercitrin luteolin in extract of *Urena lobata* L. by HPLC

WANG Jian

(*Yangzhou Municipal Food and Drug Inspecting and Testing Center, Yangzhou, Jiangsu* 225000, *China*)

Abstract: Objective To establish a HPLC method for simultaneous determination of the content of myricitrin, isoquercitrin and luteolin in extract of *Urena lobata* L. **Methods** The HPLC analysis was carried out on Kromasiol-C_{18} column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.25% acetic acid solution (31:69) as the mobile phase for isocratic elution at a flow rate of 1 mL·min^{-1}. The detection wavelength was 351 nm and the column temperature was 30 ℃. **Results** Good linear relationship were found in the the range of 6.97-278.80 mg·L^{-1} for myricitrin, 7.29-291.50 mg·L^{-1} for isoquercitrin, 2.96-118.40 mg·L^{-1} for luteolin. Their average recoveries were 98.39%, 98.53% and 97.41%, respectively. **Conclusion** The method is accurate, reliable, and can be used for the quality control and evaluation of extract of *Urena lobata* L.

Key words: Chromatography, high pressure liquid; Extract of *Urena lobata* L.; Luteolin; Myricitrin; Isoquercitrin

地桃花为锦葵科梵天花属 *Urena* L. 植物地桃花 *Urena lobata* L. 的干燥地上部分,具有祛风利湿、清热解毒的功效,常用于治疗风寒感冒、痢疾、泌尿系结石、风湿痹痛、水肿、吐血、外伤出血、毒蛇咬伤等[1-2]。现代药理研究也表明,地桃花提取物具有抗菌、抗炎及抗氧化等药理作用[3-7]。黄酮类成分为地桃花中的主要活性成分[8-11],本研究采用高效液相色谱法(HPLC)同时测定地桃花提取物中杨梅苷、异槲皮苷和木犀草素的含量,为地桃花的新药开发及功能性保健产品的开发奠定前期实验基础。

1 仪器与材料

岛津 LC-20A 和 SPD-20AT 检测器(日本岛津株式会社),N2000 双通道色谱站(浙江大学智能信息工程研究所),RE2000A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),微量移液器(大龙仪器公司),KH3200 超声清洗机(昆山禾创超声)。

杨梅苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:111860-201001)、异槲皮苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:111809-201001)、木犀草素对照品(中国药品生物制品检定所,批号:111520-200504)。地桃花提取物(自制,批号:20160613、20160620、20160627),乙腈(色谱纯)(美国天地色谱试剂),纯净水(娃哈哈集团),其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Kromasiol-C_{18}(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.25% 醋酸水(31:69);流速:1 mL·min^{-1};柱温 30 ℃;进样量:20 μL;检测波长:351 nm。

2.2 地桃花提取物的制备 称取地桃花适量进行粉碎,过 40 目筛,加 10 倍量水 100 ℃回流提取 2 次,抽滤,合并 2 次提取液,加 5 mol·L^{-1}盐酸调节 pH 至 1.0,酸沉静置 12 h,离心,沉淀依次用 2 倍量

水和2倍量50%乙醇各洗涤1次以去除一些无机盐、水溶性杂质及部分醇溶杂质,而后用95%乙醇洗至pH值为中性,回收95%乙醇洗脱液中乙醇并真空干燥即得,干燥后经粉碎机粉碎,并过80目筛备用。

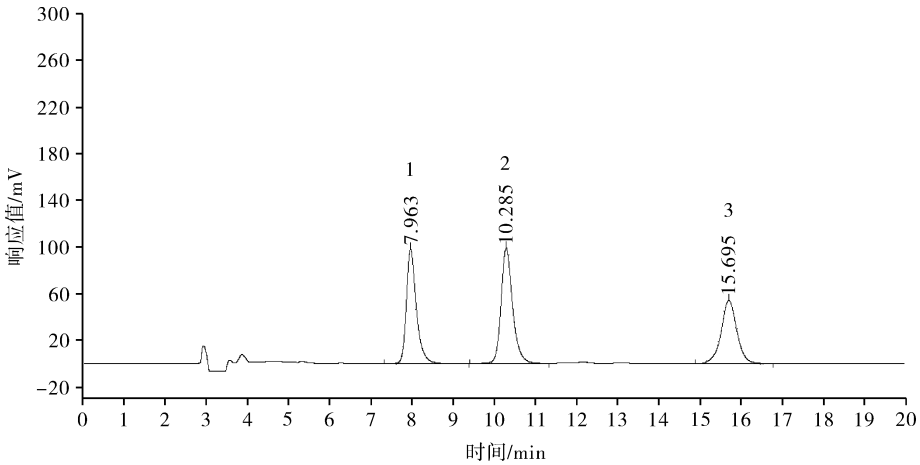
2.3 样品的制备

2.3.1 *对照品溶液的配制* 精密称取杨梅苷、异槲皮苷和木犀草素对照品适量于10 mL量瓶中,用乙腈溶解并定容,配成杨梅苷、异槲皮苷和木犀草素浓度分别为278.8 mg·L^{-1}、291.5 mg·L^{-1}和118.4 mg·L^{-1}的对照品溶液作为储备液,备用。

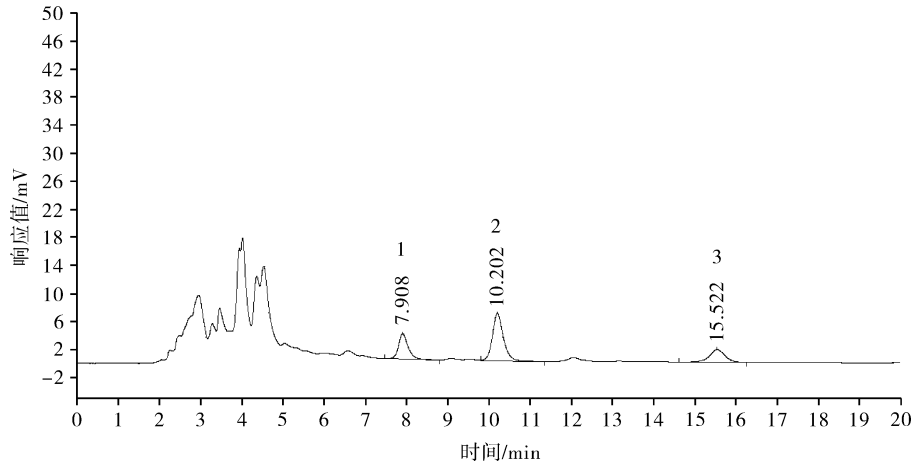
2.3.2 *供试品溶液的制备* 精密称取地桃花提取物100.26 mg置于10 mL量瓶中,用70%乙腈超声提取10 min并定容,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液,备用。

2.4 方法专属性 按"2.1色谱条件"进样分析,得到对照品和地桃花提取物的HPLC色谱图,在该色谱条件下,杨梅苷、异槲皮苷和木犀草素的分离度良好。见图1。

2.5 线性关系考察 精密量取对照品储备液适量,加乙腈分别制成杨梅苷、异槲皮苷和木犀草素浓度分别为278.80、139.40、69.70、27.88、13.94、6.97 mg·L^{-1}与291.50、145.75、72.88、29.15、14.58、7.29 mg·L^{-1}和118.40、59.20、29.60、11.84、5.92、2.96 mg·L^{-1}。按"2.1色谱条件"测定峰面积,并以峰面积(Y)对对照品溶液浓度(X)进行线性回归,得标准曲线,结果杨梅苷、异槲皮苷和木犀草素分别在6.97~278.80 mg·L^{-1}、7.29~291.50 mg·L^{-1}和2.96~118.40 mg·L^{-1}范围内线性关系良好,两者回归方程分别为Y = 21 563X − 2 147.5(R = 0.999 8)、Y = 23 147X − 1 847.2(R = 0.999 7)和Y = 37 512X − 16 314(R = 0.999 7)。



对照组



提取物

注:1为杨梅苷;2为异槲皮苷;3为木犀草素

图1 地桃花提取物及对照品色谱图

2.6 精密度试验 精密吸取杨梅苷 27.88 mg·L^{-1}、异槲皮苷 29.15 mg·L^{-1}和木犀草素 11.84 mg·L^{-1}20 μL,重复进样 6 次,记录三者的峰面积,结果杨梅苷、异槲皮苷和木犀草素峰面积的 RSD 分别为 0.65%、0.58%、0.79%,表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 称取地桃花提取物 6 份(每份约 100 mg),按"2.3.2 供试品溶液的制备"配制供试品溶液,再按"2.1 色谱条件"20 μL 进样,记录杨梅苷、异槲皮苷和木犀草素的峰面积,计算三者的含量。结果杨梅苷、异槲皮苷和木犀草素在地桃花提取物的质量分数分别为 0.327 6%、0.338 1% 和 0.125 4%,三者峰面积的 RSD 分别为 1.12%、0.97%、1.68%,表明方法重复性良好。

2.8 稳定性试验 精密吸取"2.3.2 供试品溶液的制备"的同一供试品溶液 20 μL,按"2.1 色谱条件"分别在 0,2,4,8,12,24 h 进样测定,记录杨梅苷、异槲皮苷和木犀草素峰面积,结果杨梅苷、异槲皮苷和木犀草素峰面积的 RSD 分别为 0.83%、0.95%、1.05%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验 称取已知含量的地桃花提取物(20160613 批)6 份(每份约 10 mg),加入 1 mL 杨梅苷、异槲皮苷和木犀草素为 27.88 mg·L^{-1}、29.15 mg·L^{-1}和 11.84 mg·L^{-1}对照品溶液,于 10 mL 容量瓶中定容,0.45 μm 滤过,20 μL 进样分析,记录峰面积,计算加样回收率及 RSD 值,结果见表 1。

2.10 耐用性试验 称取地桃花提取物(20160613 批)约 100 mg,精密称定,按"2.3.2 供试品溶液的制备"制备供试品溶液,分别用 Kromasiol-C_{18}(250 mm×4.6 mm,5 μm)、Phenomenex C_{18}(250 mm×4.6 mm,5 μm)及 Hypersil C_{18}(250 mm×4.6 mm,5 μm)3 个品牌的色谱柱按"2.1 色谱条件"进行测定,结果无明显差别。见表 2。

2.11 样品测定 精密称取 3 个批次地桃花提取物(每批约 100 mg),按"2.3.2 供试品溶液的制备"制备供试品溶液,分别进样 20 μL,按"2.1 色谱条件"测定各自的峰面积,按回归方程分别计算地桃花提取物中杨梅苷、异槲皮苷和木犀草素的含量。结果见表 3。

3 讨论

3.1 提取条件的选择 在本实验中,分别比较了不同提取方法(超声提取,回流提取)和不同提取时间(5 min、10 min、15 min)对成分的影响,最后确定超声提取 10 min 为提取条件。

3.2 检测波长的选择 杨梅苷在 257 nm 和 351 nm 波长处有最大吸收,异槲皮苷在 253 nm 和 352 nm 波长处有最大吸收,木犀草素在 237nm 和 335 nm 波长处有最大吸收,考虑到在短波长处样品中其他组分的干扰较大,综合考虑,故选择 351 nm 作为检测波长。

表 1 加样回收率结果

成分	称样量/mg	样品中含量/μg	加入量/μg	测得量/μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
杨梅苷	10.04	32.89	27.88	59.63	95.91	98.39	2.05
	9.99	32.73	27.88	60.51	99.64		
	10.05	32.92	27.88	60.84	100.14		
	9.98	32.69	27.88	59.62	96.59		
	10.02	32.83	27.88	59.98	97.38		
	10.01	32.79	27.88	60.86	100.68		
异槲皮苷	10.04	33.95	29.15	63.11	100.03	98.53	1.71
	9.99	33.78	29.15	62.19	97.46		
	10.05	33.98	29.15	62.82	98.94		
	9.98	33.74	29.15	61.61	95.61		
	10.02	33.88	29.15	62.92	99.62		
	10.01	33.84	29.15	62.85	99.52		
木犀草素	10.04	12.58	11.84	24.31	99.07	97.41	2.15
	9.99	12.53	11.84	23.85	95.61		
	10.05	12.60	11.84	24.47	100.25		
	9.98	12.51	11.84	23.85	95.78		
	10.02	12.57	11.84	24.22	98.40		
	10.01	12.55	11.84	23.84	95.35		

表 2 不同品牌色谱柱的对含量影响的测定结果

成分	色谱柱	保留时间/min	分离度	不对称度	理论含量/mg·g^{-1}	实测含量/mg·g^{-1}	实测占理论百分含量/%	RSD/%
杨梅苷	Kromasiol-C_{18}	7.963	7.107	1.410	3.276	3.271	99.85	0.245 4
	phenomenexC_{18}	8.465	7.452	1.300		3.263	99.60	
	Hypersil C_{18}	8.720	7.301	1.312		3.279	100.09	
异槲皮苷	Kromasiol-C_{18}	10.285	4.375	1.355	3.381	3.375	99.82	0.236 8
	phenomenexC_{18}	10.915	4.663	1.339		3.359	99.35	
	Hypersil C_{18}	11.355	4.675	1.278		3.368	99.62	
木犀草素	Kromasiol-C_{18}	15.695	7.980	1.029	1.254	1.256	100.16	0.501 6
	phenomenexC_{18}	16.632	8.384	1.113		1.247	99.44	
	Hypersil C_{18}	17.138	8.101	1.082		1.244	99.20	

表 3 地桃花提取物中杨梅苷、异槲皮苷和木犀草素的含量

成分	批号	含量/mg·g^{-1}	平均含量/mg·g^{-1}	RSD/%
杨梅苷	20160613	3.277	3.275	0.51
	20160620	3.291		
	20160627	3.258		
异槲皮苷	20160613	3.369	3.379	0.28
	20160620	3.387		
	20160627	3.382		
木犀草素	20160613	1.254	1.255	0.96
	20160620	1.243		
	20160627	1.267		

3.3 流动相的选择 在选择流动相比例时,曾尝试采用甲醇-水系统同时分离测定杨梅苷、异槲皮苷和木犀草素 3 种成分,以便达到成分分离,结果保留时间相对较长。因此,采用了乙腈-水系统对地桃花中各成分进行检测,结果较为理想,同时加醋酸调整了峰型,结果峰型良好。

本研究建立 HPLC 法同时测定地桃花提取物中杨梅苷、异槲皮苷和木犀草素的含量,实验测定地桃花提取物中杨梅苷、异槲皮苷和木犀草素的含量分别为 3.275 mg·g^{-1}、3.379 mg·g^{-1}和 1.255 mg·g^{-1}。该方法快速、准确,重复性高,可作为地桃花提取物的质量评价与控制标准,为地桃花功能性产品的研究开发奠定基础。

参考文献

[1] 中药辞海审编工作委员会. 中药辞海[M]. 北京:中国医药科技出版社,1998.

[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(第 5 册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:329-330.

[3] 黄小理,邹小琴,杨玉芳,等. 广西地桃花对金黄色葡萄球菌肺炎小鼠的体内抗菌作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(11):116-120.

[4] 覃巧. 地桃花水提物的体内抗炎和体外抗菌作用研究[D]. 南宁:广西医科大学,2014.

[5] 陈勇,谢臻,韦韬,等. 地桃花水提物的体外抗菌实验研究[J]. 亚太传统医药,2011,7(10):29-30.

[6] 薛井中,刘帅兵,王立升,等. 地桃花提取物体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业,2013,34(10):162-165.

[7] 蒙小菲,黄振光,杨玉芳,等. 广西地桃花水提物的急性毒性和体内抗炎作用的研究[J]. 广西医科大学学报,2015,32(6):901-904.

[8] 苏聪,杨万青,蒋丹,等. 地桃花中黄酮类成分研究[J]. 中草药,2015,46(14):2034-2039.

[9] 贾陆,敬林林,周胜安,等. 地桃花化学成分研究. Ⅰ. 黄酮类化学成分[J]. 中国医药工业杂志,2009,40(9):662-665.

[10] 贾陆,毕跃峰,敬林林,等. 地桃花化学成分研究[J]. 中国药学杂志,2010,45(14):1054-1056.

[11] JIA L,A YM,JING LL,et al. Three new flavonoid glycosides from Urena lobata[J]. J Asian Nat Prod Res,2011,13(10):907-914. DOI:10.1080/10286020.2011.599802.

(收稿日期:2016-08-30,修回日期:2016-09-16)