

· 药剂与工艺 ·

RP-HPLC法测定密蒙花中毛蕊花苷的含量

韩 澎¹, 崔亚君², 郭洪祝^{1*}, 果德安^{1*}

(1. 北京大学药学院 北京大学中医药现代研究中心, 北京 100083; 2. 首都医科大学中医药学院, 北京 100013)

摘要: 目的 测定密蒙花中毛蕊花苷的含量, 为药材及其制剂的质量控制提供依据。方法 采用 RP-HPLC法测定药材中毛蕊花苷含量。色谱条件: Inertsil ODS-3 C₁₈ 色谱柱 (5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm); 流动相: 甲醇-乙腈-1% 醋酸水溶液 (8: 16: 76); 检测波长: 254 nm。通过正交实验确定最优提取方案为: 20倍量的 70% 乙醇回流提取 1.0 h。结果 该分析方法可以使样品达到基线分离, 毛蕊花苷的保留时间约 14 min。该方法具有良好的精密度、重现性和稳定性, 平均回收率为 100.71%, RSD= 1.41%; 线性关系良好, 相关系数为 0.9999。用同样方法测定了 10个不同产地密蒙花药材中毛蕊花苷的含量, 在 0.79% ~ 2.30%。结论 该分析方法快速、简单, 无需对样品进行太多柱前处理, 即可达到基线分离, 测量结果准确, 适用于密蒙花药材中毛蕊花苷的含量测定, 为密蒙花药材及制剂的质控提供依据。

关键词: 密蒙花; 毛蕊花苷; 含量测定; 高效液相色谱; 正交试验

中图分类号: R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2003)12-1082-03

Quantitative determination of verbascoside in *Buddleja officinalis* by RP-HPLCHAN Peng¹, CUI Ya-jun², GUO Hong-zhu¹, Guo De-an¹

(1. School of Pharmacy, Peking University, Beijing 100083, China; 2. School of TCM, Capital University of Medical Science, Beijing 100013, China)

Abstract Object To establish an HPLC method for the quantitative determination of verbascoside in *Buddleja officinalis* Maxim. for its quality control. **Methods** To determine the content of verbascoside in *B. officinalis* by RP-HPLC. Chromatographic condition C₁₈ column (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), a mobile phase of methanol-acetonitrile-water containing 1% acetic acid (8: 16: 76) and wavelength of 254 nm. The condition for the extraction of verbascoside was optimized by the orthogonal test as continuous extraction by 20 times of hot 70% ethanol solution for 1 h. **Results** This chromatographic condition was applicable for the quantitative determination of verbascoside in *B. officinalis*. Verbascoside was separated successfully from other constituents, and the retention time was 14.25 min. The average recovery rate of verbascoside was 100.71% with RSD 1.41% ($n=6$). The correlation coefficient of standard curve was 0.9999 ($n=7$). The verbascoside content in *B. officinalis* from ten different locations was determined to be in the range of 0.79%—2.30%. **Conclusion** This analytical method is proved to be sensitive, quick, simple, and accurate for the quantity determination of verbascoside with good repeatability, reproducibility, and stability. The recovery rate and the linear correlation are perfect. This RP-HPLC method is reliable and recommendable for the quality control of both material and preparation of *B. officinalis*.

Key words *Buddleja officinalis* Maxim.; verbascoside; quantitative determination; HPLC; orthogonal test

密蒙花为常用中药,性微寒、味甘,归肝经。具有清热养肝、明目退翳的攻效,用于目赤肿痛、多泪羞明、眼生翳膜、肝虚目暗、视物昏花^[1]。密蒙花中含有黄酮类、苯乙醇苷类、皂苷类及环烯醚萜类等^[2-4]。其中,黄酮、苯乙醇苷类化合物的含量比较高《中华

人民共和国药典》2000版一部规定密蒙花为马钱科植物密蒙花 *Buddleja officinalis* Maxim. 的干燥花蕾及其花序,并收载了其性状和显微鉴别。在特征成分的含量测定方面,只收载了其中一个成分蒙花苷的 HPLC 的测定方法^[1],而另一个主要成分毛蕊花

* 收稿日期: 2003-04-16

基金项目: 国家重点科技攻关项目 (99-929-01-29)

* 通讯作者: Tel (010) 82802024 E-mail: guoh@bjmu.edu.cn

苷的测定方法还未见报道 本实验以毛蕊花苷为指标,建立了密蒙花的 RP-HPLC含量测定方法,并测定了 10份不同地区的密蒙花商品药材中毛蕊花苷的含量,为密蒙花药材及其制剂的质量控制提供依据

1 仪器与药品

Agilent 1100型高效液相色谱仪(包括在线脱气、四元泵、柱温箱、自动进样器、二极管阵列检测器、Hp Chem station), MA110型 1/10000电子分析天平(上海第二天平仪器厂), 1/10000电子分析天平(德国 Sartorius BP211D),超声波清洗器,旋转蒸发仪

三蒸水经 0.45 μ m水系微孔滤膜滤过,蒸馏水购于北京大学医学部分析中心,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯

毛蕊花苷对照品(自制,经 UV, IR, ESI-MS, ¹H-NMR和 ¹³C-NMR鉴定并确认结构,纯度>98%) 密蒙花药材经郭洪祝博士鉴定,干燥、粉碎,过 100目筛

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Inertsil ODS-3 C₁₈柱(5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm)(GLScience. Co. Ltd);流动相: 甲醇-乙腈-1%醋酸水溶液(8: 16: 76);流速: 1 mL/min;检测波长: 254 nm;柱温: 25 $^{\circ}$ C;进样量: 20 μ L

2.2 提取方法考察: 采用正交试验法优化提取方法。考察了提取溶剂(A)、提取时间(B)、提取方法(C)及溶剂用量(D)4个因素对提取结果的影响。因素水平表见表 1 L₉(3⁴)正交表设计及结果见表 2

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Different factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A	B/h	C	D倍
1	甲醇	0.5	超声	15
2	95%乙醇	1.0	回流	20
3	70%乙醇	1.5	冷浸	25

从极差(R值)可以直观地看出,毛蕊花苷提取率的影响因素: A> B> C> D;各因素的最优水平组合为 A₃C₂B₂D₂ 对上述结果进行方差分析(表 3),从方差分析结果可以看出,影响因素 A具有显著性,影响因素顺序为: A> C> B> D;各因素的最优水平组合为: A₃C₂B₂D₂ 与直观分析结果一致 最终确定提取方案为: 20倍量的 70%乙醇回流提取 1.0 h

2.3 线性关系考察: 精密称毛蕊花苷对照品 16.5 mg,置 10 mL量瓶中,用 70%乙醇溶解,稀释至刻度,混匀,得 1.65 mg/mL的对照品溶液 将对照品

溶液分别进样 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 μ L 以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,作图得到标准曲线。在 1~ 10 μ g时峰面积和进样量之间的线性关系良好。回归方程为 Y= 1 062. 2X- 192. 4, r= 0. 999 9

表 2 L₉(3⁴)正交设计及结果

Table 2 L₉(3⁴) orthogonal design and results

序号	A	B	C	D	毛蕊花苷峰面积
1	1	1	1	1	1 560
2	1	2	2	2	2 209
3	1	3	3	3	980. 9
4	2	1	2	3	1 036
5	2	2	3	1	251. 2
6	2	3	1	2	554. 2
7	3	1	3	2	1 968
8	3	2	1	3	2 140
9	3	3	2	1	2 228
K ₁	4 749	4 563	4 253	4 038	
K ₂	1 841	4 599	5 472	4 731	
K ₃	6 336	3 763	3 200	4 156	
R	4 495	836	2 272	692	

表 3 方差分析结果

Table 3 Variance analysis

变差来源	离差平方和	自由度	F值	P值	显著性
A	1 154 817	2	37. 8	0. 03	P< 0. 05
B	49 637	2	1. 6	0. 38	
C	287 287	2	9. 4	0. 10	
D(作为误差项)	30 548	2			

2.4 供试品溶液制备: 精密称取密蒙花 0. 5 g,用 10 mL 70%乙醇回流提取 1. 0 h,滤过,用少量 70%乙醇反复洗涤 3~ 4次,将滤液合并,转移至 25 mL量瓶中,以 70%乙醇稀释至刻度,摇匀。再经微孔滤膜滤过,即得

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验: 取同一份密蒙花药材的供试液连续重复进样 5次,测定毛蕊花苷峰面积值,其 RSD为 0. 67% (n= 5)

2.5.2 重现性试验: 精密称取 5份同一批密蒙花药材粉末,每份 0. 5 g,分别置于 50 mL茄形瓶中,并加入 10 mL 70%乙醇,于水浴中回流 1 h 滤过,定容至 25 mL,混匀。微孔滤膜(0. 45 μ m)滤过后,采用 HPLC分别检测,测定毛蕊花苷含量,其 RSD为 0. 65% (n= 5)

2.5.3 稳定性试验: 取一份密蒙花药材的供试液,在相同的色谱条件下分别在 0, 1, 2, 4, 8, 14, 24 h采用 HPLC检测,测定毛蕊花苷峰面积,其 RSD为 0. 25% (n= 7)

2.5.4 加样回收试验: 精密称取 15 mg毛蕊花苷对照品,以 70%乙醇定容于 25 mL量瓶中,配成

0.57 mg/mL的对照品溶液 精密称取 7份同一批的密蒙花药材粉末,每份 0.5 g 1号作为空白对照组,2~7号作为加样回收组 分别将 7份样品置于 50 mL茄形瓶中,加入 10 mL 70% 乙醇 其中 2~7号样品,每份均精密加入对照品溶液 4 mL 7份样品于水浴中回流 1 h 滤过,定容至 25 mL 微孔滤膜(0.45 μm)滤过后,采用 HPLC分别检测,结果平均加样回收率为 100.7%,RSD为 1.4% (n=6)

2.6 样品测定:将 10个不同产地密蒙花药材粉末配成供试品溶液,进样,测定峰面积,代入回归方程得到毛蕊花苷的含量 结果见表 4

表 4 不同地区密蒙花药材中毛蕊花苷含量

Table 4 Verbascoside in *B. officinalis* from different areas

序号	购买地	购买时间	毛蕊花苷含量 %
1	青海西宁	2002-01	1.32
2	河北宣化	2002-01	1.97
3	河北安国	2002-01	1.21
4	山西太原	2001-08	0.96
5	辽宁锦州	2001-08	1.47
6	云南曲靖	2001-08	2.30
7	吉林长春	2001-08	0.79
8	湖北黄冈	2001-08	0.79
9	福建福州	2001-08	1.22
10	广东深圳	2002-01	0.62

3 讨论

3.1 对于毛蕊花苷的含量测定,提取溶剂的选择最为关键,从峰面积上可以看出,随着水比例的增大,峰面积越大,表明毛蕊花苷的提取愈充分;然而,高

极性成分的比例亦相应增加,从而增大处理难度 为此,选用 70%乙醇作为提取溶剂,既可以较充分地提取出毛蕊花苷,又避免了以后的柱前预处理工作,简化操作步骤

3.2 在色谱条件的探索中,单纯用甲醇-水或乙腈-水系统均不能够得到最佳分离,而二者的合用可以达到较理想的分离度;加入醋酸可以有效地防止拖尾;毛蕊花苷在 254 nm处有较强的吸收,在该波长下检测还可以避免其他杂质峰的干扰,故选用 254 nm为检测波长。

3.3 《中华人民共和国药典》中尚无针对密蒙花中毛蕊花苷的含量测定方法。本实验建立的分析方法操作简单、快速,样品无需进行柱前处理即可达到基线分离,结果准确、可靠,可作为密蒙花药材及其制剂质量控制依据之一。从结果可以看出,不同产地密蒙花药材中毛蕊花苷含量差别较大,建议在今后药材及其制剂的质量标准上应该注意该项指标的考察。

References

- [1] Ch P (中国药典) [S]. 2000 ed. Vol II .
- [2] Li J S, Zhao Y Y, Ma L B. A phenylethanoid glucoside from *Buddleja officinalis* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 1997, 6(4): 178-181.
- [3] Ding N, Yahara S, Nohara T. Structure of mimengosides A and B, new triterpenoid glycosides from *Flos Buddlejae* produced in China [J]. *Chem Pharm Bull*, 1992, 40(3): 780-782.
- [4] Wang B, Li J S, Zhao Y Y, et al. Study of triterpenes from *Buddleja officinalis* [J]. *J Beijing Med Univ* (北京医科大学学报), 1996, 28(6): 472-473.

配伍对葛根芩连汤中甘草酸含量的影响

戴开金,罗佳波,吴昭晖,谭晓梅,任建生*

(第一军医大学 中药制剂研究重点实验室,广东 广州 510515)

摘要:目的 研究配伍对葛根芩连汤中甘草酸含量的影响 方法 采用 $L_8(2^7)$ 正交设计及统计软件 SPSS 10.0 统计处理,以 HPLC法测定配伍中甘草酸含量 结果 黄连对甘草酸的含量影响差异具有显著性 ($P < 0.05$),黄芩、葛根对甘草酸含量影响差异无显著性,三者两两交互作用不显著,黄连和甘草配伍煎液中产生沉淀,且其含有一定量的甘草酸 结论 黄连降低葛根芩连汤中甘草酸的含量,黄芩、葛根对其含量没有影响

关键词:葛根芩连汤;配伍;甘草酸;高效液相色谱

中图分类号:R283.2;R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2003)12-1084-04

Influence of compatibility on glycyrrhizic acid in Gegen Qinlian Decoction

DAI Kai-jin, LUO Jia-bo, WU Zhao-hui, TAN Xiao-mei, REN Jian-sheng

(Key Laboratory of Pharmaceutics of Chinese Materia Medica, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

* 收稿日期:2003-03-10

基金项目:国家自然科学基金面上重点资助项目(39970886);广东省自然科学基金资助项目(001070)