

木芙蓉提取物中金丝桃苷的 HPLC 法测定

郑林, 刘毅*, 高洁, 危莉

贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002

摘要: 目的 建立 HPLC 法测定木芙蓉提取物中金丝桃苷的方法, 为木芙蓉提取物的开发利用提供科学依据。方法 色谱柱为 Diamonsil TM 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.3%磷酸溶液 (18:82), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测波长 360 nm。结果 金丝桃苷与其他成分分离良好, 在 29.2~292.0 ng 线性关系良好, $r=0.999\ 9$, 平均回收率为 98.7%, RSD 为 2.03%。结论 所建立的定量方法简便、准确、专属性好、灵敏度高。

关键词: 木芙蓉提取物; 金丝桃苷; HPLC; 黄酮类; 锦葵科

中图分类号: R286.02

文献标志码: B

文章编号: 0253-2670(2011)08-1541-02

Determination of hyperoside in extract of *Hibiscus mutabilis* by HPLC

ZHENG Lin, LIU Yi, GAO Jie, WEI Li

Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China

Key words: extract of *Hibiscus mutabilis* L.; hyperoside; HPLC; flavones; Malvaceae

木芙蓉来源于锦葵科植物木芙蓉 *Hibiscus mutabilis* L. 的新鲜或干燥叶, 夏、秋两季采收, 鲜用或晒干, 为贵州省少数民族用药^[1]。其性味辛、微苦, 凉, 归肾、肝经, 具有清热凉血、解毒消肿、排脓的功效^[1-2]。木芙蓉中化学成分较多, 主要含有黄酮类化合物、植物甾醇类、酚类、氨基酸、鞣质、还原糖等物质, 以黄酮类物质为其主要的功效成分, 其中包括黄酮醇苷类化合物金丝桃苷^[3]。金丝桃苷分布广泛, 具有抗炎、解痉、利尿、止咳、降压、降低胆固醇、蛋白同化、局部和中枢镇痛以及对心、脑血管的保护作用等多种生理活性, 是一种重要的天然产物^[4-6]。本实验采用 HPLC 法对木芙蓉提取物中的金丝桃苷进行定量研究, 为其进一步开发利用提供科学依据。

1 仪器与材料

Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector, 威玛龙 515 型色谱工作站(贵州安科公司), UV-2501PC 紫外分光光度计(日本岛津), DT-2000 型电子天平(美国双杰), AUY200 电子天平(日本岛津), BT124S 电子天平(Sartorius 公司)。金丝桃苷对照品(批号 111521-200303)由中国药品生物制品检

定所提供。乙腈、甲醇为色谱纯, 水为娃哈哈饮用纯净水, 乙醇、甲酸、冰醋酸、醋酸乙酯、磷酸均为分析纯。

木芙蓉购于贵阳市花果园药材市场(产地贵阳), 经贵阳中医学院王悦云副教授鉴定为锦葵科植物木芙蓉 *Hibiscus mutabilis* L. 的干燥叶。

木芙蓉提取物为贵阳中医学院药剂实验室自制(批号 091108、091109、091110)。取粉碎成粗粉的木芙蓉叶 150 g 置圆底烧瓶内, 用 70%乙醇回流提取 3 次(1 800 mL 3 h、1 500 mL 2 h、1 200 mL 1.5 h); 合并 3 次滤液, 置 60 ℃水浴旋转蒸发至无醇味; 剩余药液置蒸发皿中于水浴上挥干得稠膏, 再将稠膏置真空干燥箱中, 在-0.08 MPa 70 ℃条件下干燥 24 h, 取出, 称定质量, 得 1 g 提取物相当于生药 3.88 g 的干膏。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil TM 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.3%磷酸水溶液 (18:82), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 360 nm, 柱温 30 ℃。理论板数按金丝桃苷峰计算大于 3 000。在此色谱条

收稿日期: 2010-11-18

作者简介: 郑林 (1964—), 男, 贵阳中医学院药理学系副教授, 研究方向为中药资源的综合开发与利用。

Tel: (0851)3606797 13809414837 E-mail: zhenglin_zy@yahoo.com.cn

*通讯作者 刘毅 Tel: 13984016122 E-mail: liuyi6604@126.com

件下, HPLC 法专属性考察结果见图 1。

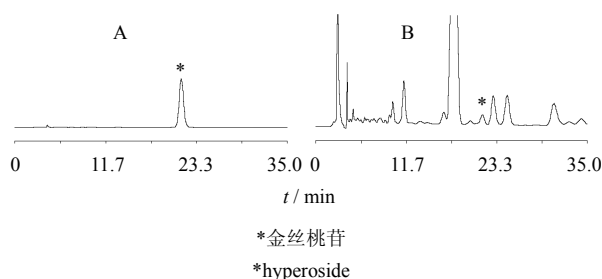


图 1 对照品 (A) 和木芙蓉提取物 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A) and extract of *H. mutabilis* (B)

2.2 对照品溶液的制备

精密称定金丝桃苷对照品适量, 置 25 mL 量瓶中, 加稀乙醇溶解并稀释至刻度, 制成含金丝桃苷 58.4 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液, 备用。测定时用流动相稀释成 14.6 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取木芙蓉提取物 1 g (相当于生药 3.88 g), 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声 30 min (功率 250 W, 频率 39 kHz) 使溶解, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察

取对照品储备液适量, 配制 29.2、23.36、17.52、11.68、5.84、2.92 $\mu\text{g/mL}$ 系列对照品溶液, 各取 10 μL , 进样测定, 记录色谱图, 以进样量为横坐标, 峰面积积分值为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y=2 \times 10^6 X - 4\,766.8$, $r=0.999\,9$, 表明金丝桃苷在 29.2~292.0 ng 线性关系良好。

2.5 精密度试验

精密吸取 14.6 $\mu\text{g/mL}$ 金丝桃苷对照品溶液 20 μL , 重复进样 5 次, 测定峰面积, 计算得金丝桃苷峰面积的 RSD 为 1.43%。

2.6 稳定性试验

取批号 091108 的木芙蓉提取物样品制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样测定, 记录峰面积, 计算得金丝桃苷峰面积的 RSD 为 2.70%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 重现性试验

取批号 091108 的木芙蓉提取物样品, 平行制备 5 份供试品溶液, 分别精密吸取 20 μL 进样分析, 记录峰面积, 计算得金丝桃苷质量分数的 RSD 为

1.58%。

2.8 加样回收率试验

取批号 091108 的木芙蓉提取物样品 6 份, 每份 0.5 g, 精密称定, 分别置 50 mL 量瓶中, 分别精密加入金丝桃苷对照品溶液适量 (相当于提取物中 100% 金丝桃苷的量), 制备供试品溶液, 进样测定, 计算金丝桃苷的回收率。结果金丝桃苷的平均回收率为 98.7%, RSD 为 2.03%。

2.9 样品测定

取 3 批 (批号 091108、091109、091110) 木芙蓉提取物样品, 分别制备供试品溶液, 各精密吸取 20 μL 进样测定, 外标法计算, 结果 3 批样品中金丝桃苷的量分别为 0.461 5、0.475 5、0.472 5 mg/g。

3 讨论

本实验曾比较了流动相分别为甲醇-乙腈-0.3% 磷酸 (27:9:64)、乙腈-甲醇-四氢呋喃-0.5% 冰醋酸 (1:1:19.4:78.6)、甲醇-0.1% 冰醋酸 (37:63)、乙腈-0.3% 磷酸 (18:82) 时, 各色谱峰的分离效果, 结果以乙腈-0.3% 磷酸 (18:82) 为流动相的分离效果最好, 且流动相组成简单。

黄酮类化合物由于具有交叉共轭体系, 所以在紫外-可见区产生特征性的 2 个吸收峰。本实验选择检测波长为 360 nm, 可获得高灵敏度、良好的峰形。

木芙蓉中的主要活性成分为黄酮类成分, 其中对芦丁的定量研究报道较多, 而对金丝桃苷定量的相关研究较少, 本实验以甲醇为溶剂提取木芙蓉提取物中的金丝桃苷, 利用 HPLC 法测定其量, 方法简便、准确、专属性好、灵敏度高, 为木芙蓉提取物的进一步开发利用奠定了基础。

参考文献

- [1] 龚一天. 木芙蓉的临床应用体会 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2007(4): 228-229.
- [2] 唐 鸥, 杨 东. 木芙蓉花及叶联合西药治疗眼睑带状疱疹 35 例 [J]. 四川中医, 2006, 24(1): 99.
- [3] 姚莉韵, 陆 阳, 陈泽乃. 木芙蓉叶化学成分研究 [J]. 中草药, 2003, 34(3): 201-203.
- [4] 王启海, 陈志武. 金丝桃苷对离体大鼠腹主动脉的舒张作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 766-770.
- [5] 李庆林, 陈志武, 马传庚. 金丝桃苷对原代培养的大鼠心肌细胞缺氧-再给氧损伤的影响 [J]. 中草药, 2006, 37(4): 575-577.
- [6] 张成伟, 周亚球, 陈 磊. 金丝桃苷药理作用研究进展 [J]. 安徽医药, 2007, 11(11): 961-963.