

甲醇为提取溶媒 在确定了甲醇为提取溶媒之后,进一步对提取溶媒用量 20 25 30 mL 甲醇进行了比较试验,结果表明,提取溶媒用量为 25 mL时测得各成分含量较高 试验中对加热回流、超声处理及冷浸 3种提取方法进行了比较,结果表明,加热回流法测得各成分含量略高于其他二法。确定选用加热回流法为提取方法后,分别又对加热回流不同时间 30 min, 1 2 h 的提取结果进行了比较试验,结果表明,加热回流 1 h 测得各成分含量较高。

References

- [1] Liu L M, Chen L, Wang R H, *et al.* Studies on chemical constituents of Qinpi [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(12): 1073-1074.

- [2] Liu L M, Wang R H, Chen L, *et al.* Studies on chemical constituents of Qinpi [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(10): 889-890.
- [3] Guo X S, Zhang Y Z. Thin-layer separation and determination of thin-layer chromatographic densitometry of some coumarin in Qinpi [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1983, 18(6): 446-452.
- [4] Guo X S, Zhang Y Z. HPLC separation and determination of active components in Qinpi [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1983, 18(7): 525-528.
- [5] Wu J L, Fu G L, Zen M L. Studies on quality and resources of Qinpi [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1983, 3(1): 12-18.
- [6] Information Center of Chinese Herbal Medicine, State Pharmaceutical Administration of China. *Handbook of Active Constituents in Phytomedicine* (植物药有效成分手册) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1986.

RP-HPLC法测定芫花叶中 3种黄酮苷的含量

李 尧尧¹, 刘 延泽^{2*}

(1. 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700; 2. 河南中医学院, 河南 郑州 450008)

芫花叶为瑞香科植物芫花 *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. 的干燥叶。为了扩大芫花及芫花根的药用植物资源, 河南中医学院冀春茹教授等自 20 世纪 80 年代以来对其化学成分进行了较系统研究, 从中发现了多种黄酮苷元及苷类^[1]、绿原酸类化合物^[2]及木脂素类成分^[3], 并发现其水溶性部位对心血管系统有良好的作用, 能明显增加冠脉流量, 而对心率的影响不明显, 并对心肌缺氧有保护作用, 还能降低麻醉猫的血压, 抑制麻醉猫在结扎左冠状动脉前降支血清磷酸激酶 (CPK) 活性的升高, 静脉注射以后还可产生短暂但明显的降压作用^[4]。该部位除含有已分离得到的绿原酸类化合物及其他糖类、无机成分等小分子化合物外, 可能含有较多的黄酮苷类化合物。为了进一步探讨其活性成分和为开发新的药用部位提供科学依据, 本实验采用 RP-HPLC 法同时测定了芫花叶中芫花叶苷、木犀草苷和异槲皮苷的含量。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪 (Waters 600E 泵, Waters 996DAD 检测器, 美国 Waters 公司); 乙腈、甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为高纯水。

芫花叶采自河南信阳地区, 经河南中医学院刘

若壖教授鉴定为瑞香科植物芫花 *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. 的干燥叶。

芫花叶苷、木犀草苷及异槲皮苷均为自制, 其光谱数据与文献中 3 种黄酮苷的数据一致^[1,5,6], 经 HPLC 归一化法测定, 三者的纯度均在 99% 以上。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Kromasil-C₁₈ 柱 (250 mm× 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-甲醇-水-冰醋酸 (11: 21: 68: 0.4), 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 25℃; 检测波长为 254 nm。该条件下芫花叶苷、木犀草苷及异槲皮苷与其他干扰成分能基线分离。按外标法以峰面积定量。

2.2 对照品溶液的制备: 称取芫花叶苷、木犀草苷及异槲皮苷适量, 精密称定, 用甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 即得 3 个黄酮苷的对照品溶液, 质量浓度分别为 0.246 8、0.087 和 0.060 6 mg/mL。

2.3 供试品溶液的制备: 取本品于 60℃ 烘 6 h, 粉碎后取约 2 g, 精密称定, 加入甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 称质量, 用甲醇补足损失质量, 摇匀, 滤过, 弃去初滤液, 取续滤液过微孔滤膜 (0.45 μm) 作为供试品液。

2.4 线性关系考察: 在上述色谱条件下, 分别精密

* 收稿日期: 2003-08-12

作者简介: 李尧尧 (1974-), 女, 2001 年毕业于河南中医学院中药系, 获硕士学位, 现攻读中国中医研究院中药专业博士学位。
Tel (010) 64014411-2975 E-mail leemorad@hotmail.com

吸取对照品溶液 6 8 10 12 14 μ L 进样,测定色谱峰面积。以芫花叶苷、木犀草苷及异槲皮苷的进样量为横坐标,峰面积积分为纵坐标绘制标准曲线。芫花叶苷回归方程为 $Y = 2746746.6X - 48601.7$, $r = 0.9996$,线性范围 1.480 8~3.455 2 μ g;木犀草苷回归方程为 $Y = 2550893.1X + 21882.6$, $r = 0.9997$,线性范围: 0.522 0~1.218 0 μ g;异槲皮苷回归方程为 $Y = 3045830.8X - 3439.5$, $r = 0.9997$,线性范围 0.363 6~0.848 4 μ g。

2.5 稳定性试验:取新鲜制备的供试品溶液,在上述色谱条件下,分别在第 0 1 2 4 8 h 各进样 10 μ L,芫花叶苷、木犀草苷及异槲皮苷质量分数的 RSD 分别为 0.96%、0.83% 和 0.88%,表明供试液的含量在 8 h 内基本无变化。

2.6 精密度试验:精密吸取供试品溶液 10 μ L,分别在上述色谱条件下,连续进样 6 次,测得峰面积,经计算芫花叶苷、木犀草苷及异槲皮苷的 RSD 分别为 0.54%、0.62% 和 0.43%。

2.7 重现性试验:取同一批样品 5 份,分别按 2.3 项下方法操作,进样测定,结果芫花叶苷、木犀草苷及异槲皮苷质量分数的 RSD 分别为 1.27%、1.53% 和 2.11%。

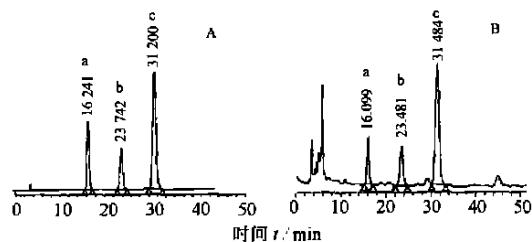
2.8 回收率试验:取已知含量的同一批样品 6 份,每份 1 g,精密称定。分别加入适量混合对照品,按 2.3 项下的方法进行制备和测定,结果芫花叶苷平均回收率 99.4%, RSD= 2.26%;木犀草苷平均回收率 99.7%, RSD= 1.29%;异槲皮苷平均回收率 100.3%, RSD= 1.58%。

2.9 样品测定:取 3 份样品溶液按上述色谱条件进行分析,精密吸取上述对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L,注入液相色谱仪记录峰面积,测得芫花叶苷、木犀草苷及异槲皮苷的质量分数分别为 0.34%、0.18%、0.09%, RSD 分别为 0.94%、0.63%、0.87% ($n=3$)。芫花叶与 3 种对照品的 HPLC 色谱图见图 1。

3 讨论

3.1 检测波长的确定:经 UV 全波长扫描,3 种成分的最大吸收均在 254 nm,故选择在 254 nm 作为检测波长。

3.2 提取溶剂选择:供试品溶液的制备过程中,曾考察不同体积分数的乙醇和甲醇作为提取溶媒对 3 种黄酮类成分提取效果的影响,结果发现各不同体积分数乙醇提取液中 3 种苷类的含量均低于甲醇提取液中的含量,故最终选用甲醇作为提取溶媒。



a-木犀草苷 b-异槲皮苷 c-芫花叶苷
a-galuteolin b-isoquercetin c-Yuan huanin

图 1 对照品 (A) 和样品 (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 RP-HPLC of reference substances (A) and samples (B)

3.3 提取方法的选择:实验中曾考察超声提取和回流提取对 3 种黄酮类成分含量的影响,结果发现两种方法对实验结果的影响不大,考虑到方法简捷性,最终选择超声处理 20 min 作为样品的提取方法。

3.4 流动相的选择:曾选择甲醇-水、冰醋酸和甲醇-水、磷酸作为流动相,样品色谱图中 3 种成分的色谱峰峰形较钝且分离效果不理想;逐渐增大流动相中乙腈的含量,结果以乙腈-甲醇-水、冰醋酸 (11:21:68:0.4) 较好,3 种成分均可以和其他杂质峰完全分离,并且可以得到理想的保留时间。

3.5 未见花、根或其他部位分离得到这 3 种黄酮苷的报道,芫花叶苷未见到在其他植物中的报道,目前可作为叶中的特征性成分。

致谢:实验过程中,得到中药研究所仪器室冯伟红的指导和帮助。

References

- [1] Ji C R, Liu Y Z, Feng W S, *et al.* Study on flavonoids from the leaves of *Daphne genkwa*—the structure of yuankanin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1986, 17(11): 7-9.
- [2] Liu Y Z, Xie J X, Ji C R, *et al.* Isolation and identification of the water-soluble compounds from the leaves of *Daphne genkwa* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1989, 20(2): 57-60.
- [3] Wang M T, Li Y Z, Zhao T Z, *et al.* New lignans from the leaves of *Daphne genkwa* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1990, 25(11): 866-868.
- [4] Chen C X, Wang J M, Jin R M, *et al.* Some pharmacological property on heart and vein system of the extract from the leaves of *Daphne genkwa* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1986, 16(5): 22-23.
- [5] Zhang D, Jiang H L, Yang X D, *et al.* Studies on flavones of *Siphonostegia chinensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(11): 974-975.
- [6] Tang Y P, Wang Y, Lou F C, *et al.* Flavonol glycosides from the leaves of *Ginkgo biloba* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, 35(5): 363-366.