

HPLC 法测定牡荆中牡荆素的含量

罗娅君, 边清泉, 陈佳, 蒋云福, 陈驹

(绵阳师范学院 化学与化学工程学院, 四川 绵阳 621000)

摘要: 建立了牡荆中牡荆素含量的高效液相色谱测定方法, 对牡荆资源进行评价, 为牡荆的质量标准的建立提供参考。样品采用超声波提取法提取, 色谱柱为菲罗门柱(5 μm , 250 mm \times 4.6 mm), 流动相为甲醇-水溶液(4:6), 流速为 1.0 mL \cdot min⁻¹, 检测波长为 340 nm, 进样量为 5 μL , 在柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 时对牡荆中牡荆素的含量进行检测。结果表明, 待测组分与其他组分分离度良好, 牡荆素在 0.04520~0.4068 μg 范围内呈良好的线性关系, $r=0.9998$; 平均回收率为 100.4%, RSD 为 1.63%。该方法简便、准确、重现性好, 适用于牡荆中牡荆素的含量测定及药材质量控制。

关键词: 超声提取; 高效液相色谱; 牡荆; 含量测定

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)03-0418-04

Determination of vitexin in *Vitex negundo* var. *cannabifolia* by HPLC

LUO Ya-Jun, BIAN Qing-Quan, CHEN Jia,
JIANG Yun-Fu, CHEN Ju

(College of Chemistry & Chemical Engineering, Mianyang Normal University, Mianyang 621000, China)

Abstract: A method was established for determining contents of vitexin in *Vitex negundo* var. *cannabifolia* (Sieb. et Zucc.) by HPLC in order to evaluate this resource. Vitexin was obtained by ultrasonic extraction, separated on Filo door column (5 μm , 250 mm \times 4.6 mm) with a mixture of methanol-water (volume ratio 4:6) as mobile phase at flow rate 1.0 mL \cdot min⁻¹. The UV detective wavelength was 340 nm, injection volume was 5 μL , and the column temperature was set at 30 $^{\circ}\text{C}$. Vitexin content showed a good linear relationship within 0.04520-0.4068 μg . ($r=0.9998$) and the average recovery was 100.4%, RSD was 1.63%. This method is simple, accurate and can be used for quality control of *Vitex negundo* var. *cannabifolia*.

Key words: ultrasonic extraction; HPLC; *Vitex negundo* var. *cannabifolia*; determination

牡荆素(vitexin)又称牡荆苷,是一种天然植物黄酮苷类化合物,它广泛分布于自然界几十种植物的叶茎中,例如牡荆、蔓荆子、算盘子、山楂,小叶榕、桫欏叶、海金沙、乌蕨、构树叶、山里红、大青叶等,其中最主要来源是马鞭草科牡荆素植物的叶、茎和山楂。牡荆素具有多种生理活性,临床主要用于治疗

心血管疾病,具有防癌抗肿瘤(Diaz等,2003;谢晶等,2010)、活血化瘀,理气通脉、抗炎、解痉、降压等作用。用于瘀血阻脉所致的胸痹,症见胸闷憋气,心前区刺痛、心悸健忘、眩晕耳鸣、冠心病心绞痛、高脂血症、心动脉供血不足等症候者(Wang等,2005; Haidara等,2006)。

收稿日期: 2010-10-19 修回日期: 2011-01-25

基金项目: 四川省教育厅重点项目(092A180); 绵阳师范学院科研项目(MA2009017)[Supported by the Scientific Research Foundation of Education Department of Sichuan Province(092A180); the Scientific Research Foundation of Mianyang Normal University(MA2009017)]

作者简介: 罗娅君(1973-),女,四川资中人,博士,教授,研究方向为现代分离分析方法,(E-mail)luolaowu@126.com.

许多植物提取厂家都在生产牡荆素类植物提取物,但多以山楂(陈钟等,2009;朱思遥等,2006)、小叶榕(陈化等,2008)、乌韭(任冰如等,2007)、蔓荆子(田振坤等,2005)、千针万线草(谭瑞璞等,2009)等为研究对象,而牡荆叶和牡荆子都为富含黄酮类牡荆素天然化合物,但牡荆目前还处于野生状态,在北方地区和南方山区分布广、生长零散,大规模种植的牡荆几乎没有。使用高效液相色谱法测定牡荆中牡荆素的含量未见报道。本论文采用高效液相色谱法测定牡荆中牡荆素的含量,以期为牡荆的药用价值的进一步开发利用提供科学依据和良好的理论指导。

1 仪器和试剂

FW-177 中草药高速粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);LC-6AD 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),包括 SPD-10AUP 检测器,CLASS-vp5.0 色谱数据处理工作站,CTD-6A 色谱柱温箱;KQ-250DE 型医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。牡荆素对照品(上海永恒生物科技有限公司,经 HPLC 检测纯度 $>98.5\%$)甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯,实验用水为二次重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为非罗门色谱柱($5\ \mu\text{m}$, $250\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$),流动相为甲醇-水溶液(4:6),流速为 $1.0\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,UV 检测,检测波长为 $340\ \text{nm}$,柱温为 $30\ ^\circ\text{C}$,进样量为 $5\ \mu\text{L}$,灵敏度为 $0.050\ \text{AUFS}$ 。

2.2 对照品溶液的配制

精密称取牡荆素对照品 $22.6\ \text{mg}$,置于 $50\ \text{mL}$ 烧杯中,加甲醇溶液 $20\ \text{mL}$,溶解后转入 $50\ \text{mL}$ 容量瓶,用甲醇溶液稀释至刻度,超声至完全混匀,作为对照品溶液($452\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),待测。

2.3 供试品溶液的制备

将自绵阳森林公园采集的牡荆茎和叶洗净,自然风干后粉碎并过筛。精密称取样品,加入 $10\ \text{mL}$ 甲醇,再加入石油醚振荡,静置分层除去叶绿素等脂溶性物质后,将下层溶液过滤于 $25\ \text{mL}$ 比色管中,置于超声波清洗器中超声 $60\ \text{min}$,滤渣分别用约 $5\ \text{mL}$ 甲醇超声波萃取 2 次,合并滤液,用甲醇定容至

$25\ \text{mL}$,摇匀。用 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤头过滤,取续滤液待测。牡荆素对照品的色谱图见图 1、供试品的色谱图见图 2(其中, I 为目标组分),从图 1 和图 2 中可看出牡荆素的保留时间为 $10.40\ \text{min}$ 且分离效果好。

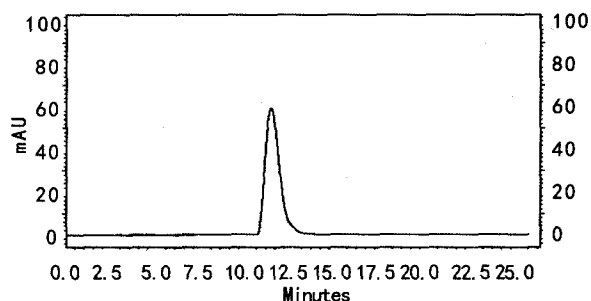


图 1 牡荆素对照品的色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of vitexin reference standard

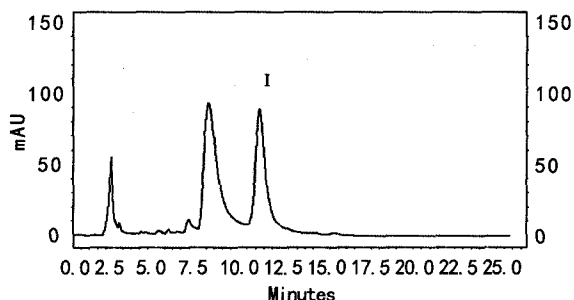


图 2 供试品的色谱图(I:牡荆素)

Fig. 2 HPLC chromatogram of vitexin sample(I: vitexin)

2.4 检测波长的选择

用二极管阵列检测器在本实验溶剂体系条件下,分析了牡荆素对照品色谱峰的紫外光谱,牡荆素对照品在 $270\ \text{nm}$ 和 $340\ \text{nm}$ 之间都有相应吸收,充分地考虑在 $270\ \text{nm}$ 处其它不明物组分有一定吸收,将对测定产生干扰,导致测定误差。且在 $340\ \text{nm}$ 处时吸收最强,所以选择 $340\ \text{nm}$ 为牡荆素的检测波长。

2.5 线性范围的考察

分别精密吸取一定量的对照品溶液,将其稀释 10 倍后($45.2\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)分别进样 $1, 3, 5, 7, 9\ \mu\text{L}$,重复测定 3 次,对相应色谱峰进行面积积分。以对照品进样量 $X(\mu\text{g})$ 对峰面积平均值 $Y(\mu\text{v. s})$ 绘制标准曲线并计算线性回归方程,得到牡荆素对照品的回归方程: $Y = 9.996 \times 105X - 3.007 \times 103$,相关系

数: $r = 0.9998$ 。结果表明, 牡荆素在 $0.04520 \sim 0.4068 \mu\text{g}$ 范围内与峰面积之间呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验

精密吸取牡荆素对照品溶液 $5 \mu\text{L}$, 按 2.1 中色谱条件, 注入高效液相色谱仪中, 平行测定 5 次, 比较色谱峰面积积分值, 牡荆素平均峰面积为 220 161, $\text{RSD} = 2.27\%$ ($n = 5$)。

2.7 稳定性考察

取同一供试品溶液, 按“2.1”所述色谱条件, 分别在 0, 2, 4, 6, 8 h 平行进样分析, 比较 5 次平行进样的峰面积积分值(表 1), 牡荆素的平均峰面积为 107 838, RSD 为 2.75%。结果表明, 供试品溶液的

峰面积积分值随放置时间的延长有明显的降低趋势, 但在 8 h 内满足含量测定方法对分析时间的要求, 说明测定溶液配制好后, 放置 8 h 内测定均可。

2.8 重现性试验

平行配制 5 份供试品溶液, 按“1.2”所述色谱条件进样平行测定 5 次, 计算牡荆素的质量分数, $\text{RSD} = 2.42\%$, 表明该方法重现性较好。

2.9 加标回收率试验

精确称取已知含量的样品预处理物 5 份, 分别精密加入 $452 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的牡荆素对照品适量, 制备供试品溶液, 进样 $5 \mu\text{L}$ 依色谱条件测定, 重复 3 次。牡荆素的回收率为 $98.85\% - 103.1\%$, 平均回收率

表 1 稳定性试验结果

Table 1 The stability test of vitexin sample

时间 Time	0	2	4	6	8	平均峰面积 Average	RSD(%)
峰面积 Peak area	110 392	110 235	109 267	105 172	104 126	107 838.4	2.75

表 2 回收率试验结果 ($n = 3$)

Table 2 The results of recovery experiments

序号 No.	取样量 Sample (g)	含量 Content (μg)	加入量 Added (μg)	测得量 Result (μg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average (%)	RSD (%)
1	0.2522	278.9	271.2	550.1	100.0	100.4	1.63
2	0.2522		226.0	502.3	98.85		
3	0.2522		271.2	551.4	100.5		
4	0.2522		226.0	503.7	99.47		
5	0.2522		316.4	605.1	103.1		

为 100.4%, $\text{RSD} = 1.63\%$ 。回收率试验结果见表 2。

2.10 含量测定

按“1.4”项制备供试品溶液, 精密吸取 $5 \mu\text{L}$, 注入 HPLC, 在波长 340 nm 处检测, 重复测定 3 次, 外标法计算牡荆素的含量, 含量测定结果见表 3。

表 3 含量测定结果

Table 3 Determination results of vitexin

序号 No.	①	②	③	平均含量 Average (%)	RSD (%)
含量 Content (%)	0.107	0.112	0.107	0.109	2.33

3 讨论

3.1 流动相的选择

试验比较了下列几种流动相, 分别为乙腈—1% 醋酸(1:9)、甲醇—0.5% 醋酸(6.5:3.5)、甲醇—水(4:6), 前两种流动相分离的待测组分峰形较差, 有拖尾现象, 且待测组分与其它组分峰的分度度偏小,

操作复杂, 成本偏高。考察发现甲醇—水(4:6)条件下检测得到的牡荆素峰形好, 对称, 保留值适宜, 且牡荆素样品中干扰物能达到较好基线分离效果, 满足分析要求。所以将流动相定为甲醇—水(4:6)。

3.2 提取溶剂的选择

牡荆素为极性化合物, 提取一般采用水或极性强的有机溶剂提取。常用的提取溶剂有: 水、甲醇、甲醇—水、乙醇、乙酸乙酯、正丙醇、二氯甲烷—乙醇等。实验结果表明甲醇提取牡荆素有着较好的提取率。

3.3 提取方法的确定

比较了热回流、索氏和超声提取 3 种提取方法对牡荆素提取的影响, 结果发现 3 种方法总皂苷提取率没有明显差异, 考虑到超声提取方法简单, 耗时短, 所以选择超声提取法。

3.4 提取时间以及提取次数的优化

将经石油醚萃取除去叶绿素等脂溶性物质后的牡荆残渣, 分别用甲醇超声提取 40、60、80 min, 各再重复提取 2 次, 测定牡荆素含量。结果表明: 甲醇

提取 3 次, 超声处理 60 min 以后目标组分含量无明显变化, 因此选择超声提取 60 min, 重复提取 3 次为试验条件。对样品提取目标组分后的残渣进行 HPLC 测定, 无待测组分特征峰出现, 说明样品中的牡荆素已提取完全。

3.5 流动相流速的优化

本实验对流动相的流速分别进行了比较, 在 $0.2 \sim 2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 范围内改变流动相流速, 发现在流速为 $0.6 \sim 1.20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时牡荆素出峰时间合适, 峰形较好; 然后从 $0.7, 0.9, 1.0, 1.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 四组实验条件下筛选最优条件, 经过实验筛选, 得出对其有效成分分离效果最恰当的流速是 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

参考文献:

Diaz F, Chavez D, Lee D, et al. 2003. Cytotoxic flavone analogues of vitexicarpin, a constituent of the leaves of *Vitex negundo* [J]. *J Nat Prod*, **66**(6): 865-867

Xie J(谢晶), Bai J(白军), Sheng XF(盛习锋), et al. 2010. Inhibition of proliferation of human cervical cancer HeLa cells by casticin in vitro(紫花牡荆素体外抑制人宫颈癌 HeLa 细胞增殖的研究)[J]. *China Oncol*(中国癌症杂志), **20**(6): 406-410

Wang HY, Cai B, Cui CB, et al. 2005. Vitexicarpin, a flavonoid from *Vitex trifolia*, induces apoptosis in K562 cells via mitochondria controlled apoptotic pathway[J]. *Acta Pharm Sin*, **40**(1): 27-31

Haidara K, Zamir L, Shi QW, et al. 2006. The flavonoid casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action[J]. *Cancer Lett*, **242**(2): 180-190

Chen Z(陈钟), Lu SJ(卢树杰), Zhang WK(张维库), et al. 2009. Determination of vitexin-rhamnoside in total flavone of Hawthorn Leafon(TFHL) by HPLC(HPLC 测定山楂叶总黄酮中牡荆素鼠李糖苷含量)[J]. *Chin Trad Patent Med*(中成药), **31**(10): 1 615-1 616

Zhu SY(朱思遥), Yang SS(杨松松), Cai Q(才谦). 2006. The HPLC system column used for determination the content of vitexin in Yixintong Table(HPLC 法测定益心酮片中牡荆素的含量)[J]. *Chin Archives of Trad Chin Med*(中医药学刊), **24**(4): 680-681

Chen H(陈化), Chen MY(陈明颖), Liang B(梁斌). 2008. Content determination of vitexin in Xiaoyerong by HPLC(高效液相色谱法测定小叶榕中牡荆素的含量)[J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*(时珍国医国药), **9**(9): 2 122-2 123

Ren BR(任冰如), Xia B(夏冰), Li WL(李维林), et al. 2007. Determination of orientin and vitexin in *Stenoloma chusanum* by HPLC(HPLC 法测定乌韭的荜草苷和牡荆素含量)[J]. *Chem Ind Fore Products*(林产化学与工业), **27**(5): 103-106

Tian ZK(田振坤), Wang LZ(王连芝), Yun YQ(尹永琴), et al. 2005. Determination of Casticin in *Vitex trifolia* var. *simplicifolia* cham by HPLC(HPLC 法测定蔓荆子中的紫花牡荆素)[J]. *Chin Trad Herb Drugs*(中草药), **36**(5): 766-767

Tan RP(谭瑞璞), Liu HZ(刘海周), Liang XY(梁晓原). 2009. Determination of vitexin in *Stellaria yunnanensis* by HPLC(HPLC 法测定千针万线草中牡荆素的含量)[J]. *J Yunnan Univ Trad Chin Med*(云南中医学院学报), **32**(4): 29-32

(上接第 382 页 Continue from page 382)

Effects of Cr(VI) on physiological and ultrastructural changes in leaves of *Ottelia alismoides* Pers(六价铬污染对水车前叶片生理生化及细胞超微结构的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物), **22**(1): 92-96

Schitzendiibel A, Nikolova P, Rudolf C, et al. 2002. Cadmium and H_2O_2 -induced oxidative stress in *Populusx canescens* roots[J]. *Plant Physiol Biochem*, **40**: 577-584

Shi GX(施国新), Du KH(杜开和), Xie KB(解凯彬), et al. 2000. Ultrastructural study of leaf cells damaged from Hg^{2+} and Cd^{2+} pollution in *Hydrilla verticillata*(汞、镉污染对黑藻叶细胞伤害的超微结构研究)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **42**(4): 373-378

Sun SQ, He M, Cao T, et al. 2010. Antioxidative responses related to H_2O_2 depletion in *Hypnum plumaeforme* under the combined stress induced by Pb and Ni[J]. *Environ Monit Assess*, **163**: 303-312

Somashekaraiah BV, Padmaja K, Prasad Rk. 1992. Phytotoxicity of Cadmium ions on germination seedling of mung bean(*Phaseo-*

lus vulgarize): Involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation[J]. *Physiol Plant*, **85**: 85-89

Stobart AK, Griffiths WT, Ameen B. 1985. The effects of Cd^{2+} on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley[J]. *Plant Physiol*, **63**: 293-298

Wang AG(王爱国), Luo GH(罗广华). 1990. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine superoxide anion radicals in plants(植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), (6): 55-57

Yang DT(杨顶田), Shi GX(施国新), You WP(尤文鹏), et al. 2000. The effect of Cr^{6+} pollution on ultramicroscopic structure of top stem cell of *Brasenia schreberi* winter-bud(Cr^{6+} 污染对莼菜冬芽茎尖细胞超微结构的影响)[J]. *J Nanjing Normal Univ*(南京师大学报·自然科学版), **3**(23): 91-95

Yuan Y(袁燕), Sheng JY(生吉萍), Wang HD(王捍东), et al. 2004. Callus induction and root differentiation from *Alternanthera philoxeroides*(水花生愈伤组织的诱导及根的分化)[J]. *Acta Hydrobiol Sin*(水生生物学报), **28**(6): 622-628