

HPLC 法测定乌韭的荜草苷和牡荆素含量



REN Bing-ru

任冰如, 夏冰, 李维林, 吴菊兰, 张涵庆

(江苏省中国科学院植物研究所; 江苏省迁地保护重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘 要: 建立乌韭地上部分荜草苷和牡荆素含量的测定方法, 检测不同产地乌韭中两种黄酮苷的含量, 对乌韭资源进行评价。用超声波提取法提取, 反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 测定, Gemini C₁₈ 色谱柱, 乙腈/1% 磷酸溶液 (体积比 15:85) 为流动相, 流速 1 mL/min, 检测波长 340 nm。荜草苷在 0.025~0.148 μg 范围内有良好的线性关系, 加样回收率为 100.61%, 相对标准偏差 (RSD)

2.18%; 牡荆素在 0.035~0.207 μg 范围内有良好的线性关系, 加样回收率为 99.77%, RSD 2.37%。云南丘北所产乌韭的荜草苷和牡荆素质量分数都是最高, 分别达到 0.1166% 和 0.1457%, 移栽到南京地区 1 年后荜草苷含量下降, 牡荆素含量增高。以荜草苷和牡荆素含量为指标, 云南丘北所产乌韭是较好的种源。

关键词: 乌韭; 荜草苷; 牡荆素

中图分类号: TQ91; Q94

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2007)05-0103-04

Determination of Orientin and Vitexin in *Stenoloma chusanum* by HPLC

REN Bing-ru, XIA Bing, LI Wei-lin, WU Ju-lan, ZHANG Han-qing

(The Provincial Key Laboratory for Plant Ex Situ Conservation; Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: A method was established for determining contents of orientin and vitexin in *Stenoloma chusanum* (Linn.) Ching and to measure the contents of the two flavonoids in different plants in order to evaluate this resource by HPLC. Flavonoids were obtained by ultrasonic extraction, separation was carried out on Gemini C₁₈ column with a mixture of acetonitrile/1% phosphoric acid (volume ratio 15:85) as mobile phase at flow rate 1.0 mL/min and detective wavelength 340 nm. Orientin content showed a good linear relationship within 0.025–0.148 μg ($R^2 = 0.9995$) and the average recovery was 100.61%, RSD was 2.18%. Vitexin content showed a good linear relationship also within 0.035–0.207 μg ($R^2 = 0.9999$) and the average recovery was 99.77%, RSD was 2.37%. The sample of the highest content is from Yunnan Qiubai which contained orientin 0.1166% and vitexin 0.1457%. Orientin content decreased but vitexin content increased when the plant was transplanted from Qiubai to Nanjing after one year. Plant from Qiubai is an excellent resource according contents of orientin and vitexin.

Key words: *Stenoloma chusanum* (Linn.) Ching; orientin; vitexin

乌韭 (*Stenoloma chusanum* (Linn.) Ching) 为陵齿蕨科乌蕨属植物^[1], 其全草或根状茎可作药用, 具清热、解毒、利湿、止血的功效, 广泛用于解食物和农药中毒, 治风热感冒、肝炎、痢疾, 外用治烧伤、烫伤、刀伤, 民间还用来治狂犬和毒蛇咬伤^[2]。但长期以来人们对乌韭的生物活性物质缺乏认识, 本实验室首先研究了它的化学成分, 从其地上部分分离得到荜草苷、牡荆素, 以及荜草苷-(2"→1")-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素吡喃葡萄糖苷、芹菜素等黄酮类化合物^[3]。为了进一步明确植物中有效成分的含量, 本实验建立了反相高效液相色谱法 (RP-HPLC), 同时测定乌韭中荜草苷和牡荆素的含量, 并用该法测定不同产地乌韭两种黄酮苷的含量, 据此对乌韭资源进行初步评价。

1 仪器、试剂与植物材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 1100VWD 型紫外检测器; METTLER AE-240 十万分之一电子天平;

收稿日期: 2006-11-23

作者简介: 任冰如 (1964-), 女, 江苏宜兴人, 研究员, 硕士, 主要从事植物资源的研究与开发。

双圈牌 MP120-2 型电子天平; KQ-100DE 型数控超声波清洗器。

荜草苷和牡荆素对照品均由本实验室从乌韭中分离得到,经 HPLC 检测,荜草苷的纯度为 98.5%,牡荆素的纯度为 98.1%。乙醇、石油醚和磷酸为分析纯试剂,乙腈为色谱纯试剂。

乌韭样品分别采自浙江富阳(No. 1)、福建明溪(No. 2)、重庆黄角桎(No. 3)、云南丘北(No. 4)和 2004 年引自丘北在南京种植 1 年(No. 5),采样时间为 2005 年 9 月中下旬至 10 月上旬。

2 方法与结果

2.1 样品中荜草苷和牡荆素的提取

将采集的乌韭样品剪碎,60℃烘干,磨成细粉,过 1 mm 孔径的筛,置干燥器中备用。精密称取样品 0.500 g 于 100 mL 三角瓶中,加石油醚(60~90℃)20 mL,浸泡 30 min,超声波脱脂 20 min,重复一次,残渣挥干至无石油醚。在残渣中加入 70% 乙醇 20 mL,超声波提取 20 min,提 2 次,滤液合并,定容至 50 mL,为荜草苷和牡荆素的提取液,备用。

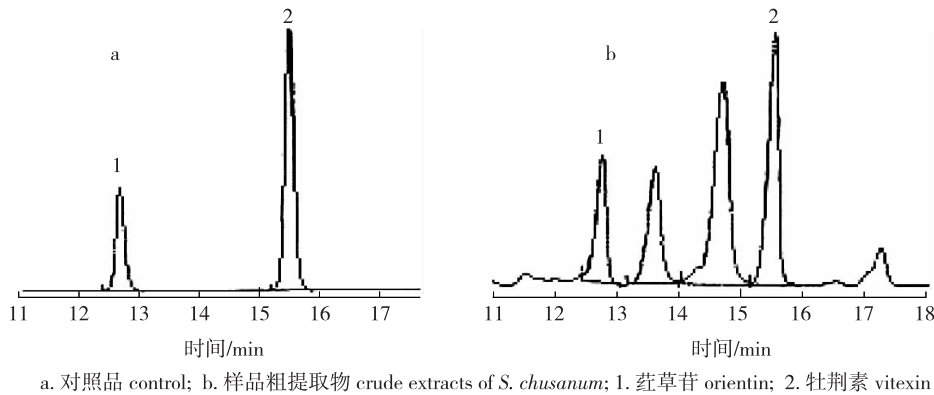
2.2 色谱条件

色谱柱:phenomenex Gemini 5 μ C₁₈ 110R, 250 mm \times 4.6 mm;柱温:35℃;流动相:乙腈/1%磷酸溶液(体积比=15:85);流速:1 mL/min;理论塔板数以牡荆素计算不低于 6 000。

检测波长:全波长扫描结果显示,在 70% 的乙醇水溶液中,荜草苷在 210.5 和 350.0 nm 处有吸收峰,牡荆素在 269.5 和 338.0 nm 处有吸收峰,因在 350.0 和 338.0 nm 处的吸收峰较宽,本实验选择 340 nm 同时检测荜草苷和牡荆素。

在上述条件下,测得对照品及样品中荜草苷和牡荆素的 HPLC 图如图 1 所示。

另外,除了荜草苷和牡荆素以外,乌韭中还存在其它多个黄酮类化合物,在试验测定条件下,面积较大的吸收峰(以出峰时间标记)还有 8.3、9.9、13.6、14.7、22.2、22.6、26.6、33.6 及 33.9 min(图 1 中未全部列出),这些峰的峰面积所占比例在不同种源中有很大的变化。



a. 对照品 control; b. 样品粗提取物 crude extracts of *S. chusanum*; 1. 荜草苷 orientin; 2. 牡荆素 vitexin

图 1 荜草苷和牡荆素的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC patterns of orientin and vitexin

2.3 线性范围

精密称取荜草苷对照品 25.1 mg,牡荆素对照品 35.2 mg,分别用 70% 的乙醇定容至 100 mL,再分别从两个容量瓶中各吸取溶液 1 mL,混合,定容至 10 mL,根据所测定的对照品纯度,计算混合溶液中两种黄酮苷的质量浓度分别为荜草苷 24.69 g/L,牡荆素 34.57 g/L。分别吸取混合溶液 1、2、4、5 和 6 μ L 进样,按以上色谱条件洗脱,两种黄酮苷得以分离。两种黄酮苷的进样体积、化合物质量、出峰时间及峰面积如表 1 所示。

以 x 为黄酮苷的质量(μ g), y 为峰面积进行计算,荜草苷的回归方程为 $y = 1\ 167.5x$ ($R^2 = 0.9995$),牡荆素的回归方程为 $y = 2\ 211.2x$ ($R^2 = 0.9999$),荜草苷在 0.025~0.148 μ g 范围内有良好的线性关系,牡荆素在 0.035~0.207 μ g 范围内有良好的线性关系。

表1 荜草苷和牡荆素的标准曲线数据

Table 1 Data of standard curves of orientin and vitexin

化合物名称 compounds	进样体积/ μL volume	化合物质量/ μg quantity	出峰时间/min time	峰面积 peak area
荜草苷 orientin	1	0.02469	12.749	28.48755
	2	0.04938	12.799	58.34125
	4	0.09876	12.765	115.97709
	5	0.12345	12.759	145.74790
	6	0.14814	12.740	170.98343
牡荆素 vitexin	1	0.03457	15.544	75.02069
	2	0.06914	15.584	154.27641
	4	0.13828	15.570	305.05646
	5	0.17285	15.557	384.41410
	6	0.20742	15.552	457.06879

2.4 精密度试验

取同一份对照品混合溶液 $5 \mu\text{L}$, 重复测定 5 次, 测得荜草苷峰面积的相对标准偏差 (RSD) 为 0.10%, 牡荆素峰面积的 RSD 为 0.17% (见表 2)。

2.5 重复性试验

取同一份供试品溶液, 重复进样 5 次, 荜草苷和牡荆素峰面积的 RSD 分别为 1.09% 和 0.49% (见表 3)。

表2 对照品中两种黄酮苷含量的精密度试验

Table 2 Precision test on orientin and vitexin in control sample

化合物 compounds	峰面积 peak area
荜草苷 orientin	145.89667
	145.81685
	145.75067
	145.49342
	145.78166
平均值 average	145.74800
牡荆素 vitexin	385.37747
	384.58109
	384.27707
	383.54108
	384.29376
平均值 average	384.41400

表3 供试品溶液中两种黄酮苷含量的重复性试验

Table 3 Repeatability test on orientin and vitexin in extracts of *S. chusanum*

化合物 compounds	峰面积 peak area
荜草苷 orientin	140.23314
	137.59445
	138.40218
	139.52092
	136.44304
平均值 average	138.43900
牡荆素 vitexin	248.15033
	249.29027
	250.19675
	250.81497
	248.00768
平均值 average	249.29200

2.6 回收率试验

精密量取已知荜草苷和牡荆素含量的乌韭样品提取液 3 mL, 加入对照品混合溶液 1 mL, 定容到 10 mL, 重复 6 次, 取 $10 \mu\text{L}$ 进样, 测定峰面积, 计算结果见表 4。荜草苷的加样回收率为 100.61%, RSD 2.18%, 牡荆素的加样回收率为 99.77%, RSD 2.37%。

2.7 稳定性试验

取供试样品溶液于室温下放置 0、1、2、3、4、5 和 6 h, 依法测定荜草苷峰面积的 RSD 为 0.96%, 牡荆素峰面积的 RSD 为 1.20%, 表明样品在 6 h 内稳定。

2.8 样品含量测定

取 2.1 节中备用的乌韭样品 No. 1 ~ No. 5 的荜草苷和牡荆素提取液 $10 \mu\text{L}$ 进样, 根据 2.2 节色谱条件测定, 得峰面积, 依照 2.3 节测得的回归方程计算, 得乌韭地上部分荜草苷和牡荆素的质量分数, 分别为 0.0648% ~ 0.1166% 和 0.0745% ~ 0.1966%, 结果见表 5。

从测定结果看出, No. 4, 即云南丘北所产乌韭的荜草苷和牡荆素含量都是最高, 而 No. 5 为移栽到南京地区 1 年后的乌韭, 其荜草苷含量下降, 牡荆素含量增高。

表 4 乌韭中荜草苷和牡荆素回收率试验结果 ($n=6$)

Table 4 Determination of recovery of orientin and vitexin in *S. chusanum*

对照品加入量/ μg amount of control	对照品测得值/ μg measured value of control	回收率/% recovery	平均值/% average	相对标准偏差/% RSD
荜草苷 orientin	24.69	24.60	99.64	100.61
	24.69	24.31	98.46	
	24.69	24.84	100.61	
	24.69	24.31	98.46	
	24.69	25.48	103.20	
	24.69	25.50	103.28	
牡荆素 vitexin	34.57	33.17	95.95	99.77
	34.57	34.18	98.87	
	34.57	35.15	101.67	
	34.57	34.36	99.39	
	34.57	34.58	100.04	
	34.57	35.51	102.72	

表 5 不同产地乌韭中荜草苷和牡荆素的含量

Table 5 Contents of orientin and vitexin in *S. chusanum* from different places

编号 No.	荜草苷 orientin		牡荆素 vitexin	
	峰面积 peak area	质量分数/% mass fraction	峰面积 peak area	质量分数/% mass fraction
1	98.01855	0.0836	263.6129	0.1187
2	122.79478	0.1039	249.5357	0.1115
3	76.72136	0.0648	167.1334	0.0745
4	137.46977	0.1166	325.4505	0.1457
5	129.35043	0.1097	438.9788	0.1966

3 结论

3.1 采用 RP-HPLC, 以荜草苷和牡荆素为对照品, 首次测定了乌韭中这两种化合物的含量。作者建立的测定荜草苷和牡荆素含量的方法灵敏、准确、专属性强、重现性好, 荜草苷在 $0.025 \sim 0.148 \mu\text{g}$ 范围内有良好的线性关系 ($R^2 = 0.9995$), 牡荆素在 $0.035 \sim 0.207 \mu\text{g}$ 范围内有良好的线性关系 ($R^2 = 0.9999$); 样品的重复性试验表明, 荜草苷和牡荆素峰面积的相对标准偏差 (RSD) 分别为 1.10% 和 0.49% ; 荜草苷和牡荆素的加样回收率分别为 100.61% (RSD 2.18%) 和 99.77% (RSD 2.37%); 样品在 6 h 内保持稳定, 荜草苷峰面积的 RSD 0.96% , 牡荆素峰面积的 RSD 1.20% 。

3.2 测定的 5 个样品均含有荜草苷和牡荆素, 质量分数分别为 $0.0648\% \sim 0.1166\%$ 和 $0.0745\% \sim 0.1966\%$, 云南丘北所产的乌韭荜草苷和牡荆素含量都最高, 以这两种黄酮苷为指标, 丘北产的乌韭品质较好。

3.3 乌韭中牡荆素含量均高于荜草苷, 但两种黄酮苷的比例在不同产地的材料中是不一定的, 丘北所产乌韭移栽到南京种植, 1 年后牡荆素含量增高, 荜草苷含量有所下降。

3.4 乌韭中除了荜草苷和牡荆素, 还存在其它多个黄酮类化合物, 在色谱图中表现为较大面积的吸收峰, 这些峰的峰面积所占比例在不同种源中有很大变化, 它们所对应的化合物种类及其含量有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 秦仁昌. 中国植物志 (2 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1959: 275-279.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典 上册 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 157-158.
- [3] 任冰如, 夏冰, 李维林, 等. 乌韭的化学成分研究 [J]. 中草药, 2007, 38(1): 20-23.