

- [7] JIANG L, XU X Q, CHEN L, et al. Study on dynamic changes of ferulic acid in *Ferula sinkiangensis* in different phenological period [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(8): 705-707.
- [8] WANG G, ZHANG X H, YANG J X, et al. Protective effects of ferulic acid on human keratinocyte [J]. Her Med(医药导报),

2011, 30(8): 982-984.

- [9] XIAO P Y, YANG Y S, LIU G M. Determination of ferulic acid in Seselopsis of Bai people's medicine [J]. Yunnan J Tradit Chin Mater Med(云南中医中药杂志), 2007, 28(12): 29-30.

收稿日期: 2012-08-29

微乳液相色谱法测定广东紫珠中 5 种黄酮成分

朱兰寸¹, 刘志华¹, 李高², 杨光忠³, 马廷升^{1*} (1.怀化医学高等专科学校药系, 湖南 怀化 418000; 2.华中科技大学同济医学院药学院, 武汉 430030; 3.中南民族大学药学院, 武汉 430074)

摘要: 目的 建立微乳液相色谱法同时测定广东紫珠中 5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮、鼠李秦素、华良姜素、岳桦素、毡毛美洲茶素 5 种黄酮成分。方法 微乳体系组成的流动相为: 2.2%SDS -1.5%正辛烷-7.75%正丁醇-0.5%三乙胺-88%水(用 H₃PO₄ 调节 pH3.7), 色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm)柱; 检测波长 350 nm; 流速 0.8 mL·min⁻¹; 进样量 10 μL; 柱温为 30 °C。结果 广东紫珠中 5 种黄酮成分在 30 min 内达到完全分离, 在 1.520~72.25 μg·mL⁻¹ 内, 5 个黄酮成分的线性相关系数 $r \geq 0.999 5$, 平均回收率 99.6%~100.5%。结论 本方法可应用于中广东紫珠中 5 种黄酮成分的含量分析。

关键词: 微乳液相色谱法; 广东紫珠; 黄酮

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)06-0651-04

Simultaneous Determination of Five Flavonoids in *Callicarpa Kwangtungensis* Chun. by Microemulsion Liquid Chromatography

ZHU Lancun¹, LIU Zhihua¹, LI Gao², YANG Guangzhong³, MA Tingsheng^{1*} (1. Pharmacology Department of Huaihua Medical College, Huaihua 418000, China; 2. Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 3. Pharmacology Department of South-central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an efficient microemulsion liquid chromatography(MELC) method and validate for simultaneous determination of five flavonoids (5,4'-dihydroxy-3,7,3'-trimethoxyflavone, rhamnatin, kumatakenin, ermanine and velutin) in *Callicarpa kwangtungensis* Chun.. **METHODS** The MELC separation was performed on a Hypersil BDS C₁₈ column(4.6 mm×150 mm, 5 μm) with the mixture of 2.2% SDS-1.5% octane-7.75% *n*-butanol-0.5% triethylamine-88% water, the pH was adjusted to 3.7 with phosphoric acid as the mobile phase. The flow rate was set at 0.8 mL·min⁻¹ and the eluent was detected at 350 nm for the five flavonoids. **RESULTS** The calibration curves of the five flavonoids were linear ($r \geq 0.999 5$) over the concentration range of 1.520–72.25 μg·mL⁻¹. The mean recoveries were 99.6%–100.5%. **CONCLUSION** The results indicate that the optimized method is successfully applied to the analysis of five important flavonoids in *Callicarpa kwangtungensis* Chun..

KEY WORDS: microemulsion liquid chromatography; *Callicarpa kwangtungensis* Chun.; flavonoid

广东紫珠(*Callicarpa kwangtungensis* Chun.)为马鞭草科紫珠属植物, 具有止血、止痛之功效, 在民间主要用于治疗偏头痛、吐血、跌打肿痛、外伤出血等^[1], 药用部位为广东紫珠的干燥茎枝, 是抗宫炎片等中成药的主要原料药材。近年来,

广东紫珠的化学成分研究, 发现了众多的化合物和多方面的药理活性, 其主要化学成分为二萜类、三萜类、环烯醚萜苷、黄酮类等, 其中总黄酮类化合物主要为 5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮(5,4'-dihydroxy-3,7,3'- trimethoxyflavone, DT)、鼠

基金项目: 湖南省教育厅自然科学基金资助项目(11C1012)

作者简介: 朱兰寸, 女, 实验师 Tel: (0745)2381210 E-mail: zhulc111@163.com *通信作者: 马廷升, 男, 硕士, 教授 Tel: 15274555695 E-mail: matingsheng1111@163.com

李秦素(rhamnatin, RH)、华良姜素(kumatakenin, KU)、岳桦素(ermanine, ER)、毡毛美洲茶素(velutin, VE), 被认为是具有抗炎镇痛功能的有效成分^[2-4], 因此通过测定黄酮含量来控制药材及其制剂质量。目前广东紫珠及其制剂有效成分的分析方法有高效液相色谱法^[5]、紫外-可见分光光度法^[6-7]等, 由于广东紫珠有效成分较复杂, 分离条件难以达到理想效果。微乳液相色谱(microemulsion liquid chromatography, MELC)是在胶束液相色谱(MLC)基础上发展起来的一种新型液相色谱技术, 在 MELC 分离过程中, 溶质的保留由其固定相、微乳分散相和水相之间的分配平衡决定, 尤其是微乳分散相(油相)对亲脂性化合物洗脱能力更强, 使其色谱分离具有新的机理, 同时其可控参数较多, 易改善溶质的保留行为, 提高分离度。微乳流动相含水约 90%, 减少了污染, 降低了分析成本, 并缩短了分析时间, 被誉为绿色色谱。近年来微乳液相色谱技术应用主要体现在多组分化学药物的分离、药物制剂以及生物样品的分析, 在中药分析方面报道不多^[8-12]。本实验采用微乳液相色谱技术, 检测广东紫珠 5 种黄酮成分, 通过优化色谱条件, 在短时间内完成了多组分的快速检测。

1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); QT-330 柱温箱(天津旗美科技有限公司); SB-2200 超声波仪(上海必能信超声有限公司); LBXZ-20 旋转式蒸发仪(上海申玻仪器公司)。

DT(批号: 111956-200405, 纯度为 99%)、RH(批号: 110712-200516, 纯度为 99%)、KU(批号: 110815-200302, 纯度为 99%)、ER(批号: 110831-200415, 纯度为 99%)、VE(批号: 111857-200501, 纯度为 99%), 均购自中国药品生物制品检定所; 广东紫珠干燥茎枝(怀化正好制药有限公司提供, 由怀化正好制药有限公司技术部部长宋思才高级工程师鉴定为正品广东紫珠); 十二烷基硫酸钠(SDS, 广东汕头西陇化工公司); 甲醇为色谱纯; 正丁醇、正辛烷、三乙胺等为市售分析纯, 水为色谱用超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 混合对照品溶液 取真空干燥至恒重的

DT 4.25 mg、RH 4.10 mg、KU 3.64 mg、ER 3.31 mg、VE 3.04 mg 对照品, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加适量甲醇超声溶解, 再加甲醇至刻度, 摇匀, 作为混合对照品贮备液。

2.1.2 供试品溶液 将广东紫珠药材干燥打粉, 取粉末(过 60 目筛)约 2 g, 精密称定, 置具塞烧瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定重量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足失重, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 5 mL, 置烧瓶中, 挥去溶剂, 加 8% 盐酸溶液 10 mL, 超声使溶解, 再加氯仿 10 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 转移至分液漏斗中, 分取氯仿层, 挥去溶剂, 残渣加少量甲醇使溶解, 定量转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。临用前用 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液进样。

2.1.3 微乳流动相 将微乳成分表面活性剂、油相、助表面活性剂及水按顺序和比例混合, 微乳流动相为: 2.2% SDS-1.5% 正辛烷-7.75% 正丁醇-0.5% 三乙胺-88% 水(用 H₃PO₄ 调节 pH 3.7), 超声 30 min, 0.45 μm 滤膜过滤后, 即得透明稳定的微乳液。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm)柱; 流动相为微乳流动相; 检测波长 350 nm; 流速 0.8 mL·min⁻¹; 进样量 10 μL; 柱温 30 °C。在此色谱条件下混合对照品溶液和供试品溶液的色谱图见图 1。

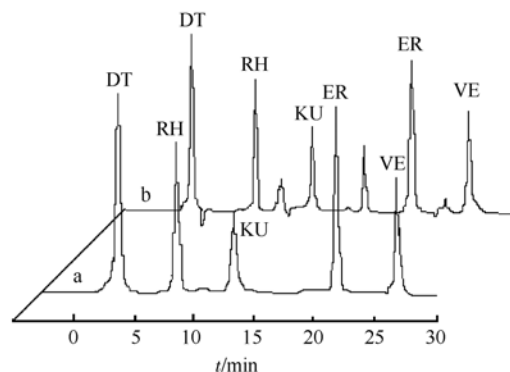


图 1 微乳液相色谱图

a-混合对照品; b-供试品

Fig 1 Microemulsion liquid chromatogram

a-mixed control solution; b-sample

2.3 标准曲线、定量限和检出限

取混合对照品贮备液, 用微乳流动相稀释成

一系列浓度的混合标准溶液, DT、RH、KU、ER、VE 的系列混合浓度分别为: 1 号: 2.125, 2.051, 1.821, 1.653, 1.520 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 2 号: 6.375, 6.153, 5.463, 4.959, 4.560 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 3 号: 10.63, 10.26, 9.105, 8.265, 7.600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 4 号: 21.25, 20.51, 18.21, 16.53, 15.20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 5 号: 31.88, 30.77, 27.32, 24.80, 22.80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 6 号: 42.50, 41.02, 36.42, 33.06, 30.40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 7 号: 53.13, 51.28, 45.53, 41.33, 38.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 8 号: 63.38, 61.53, 54.63, 49.59, 45.60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 9 号: 72.25, 69.73, 61.91, 56.20, 51.68 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。按“2.2”项下色谱条件, 进样分析, 以峰面积(y)对浓度 $x(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 进行线性回归, 5 种黄酮成分的线性回归方程、定量限(LOQ)($n=6$, RSD 分别为 DT 0.76%, RH 0.52%, KU 0.93%, ER 0.85%, VE 0.61%)和检出限(LOD)结果见表 1。

2.4 仪器精密度试验

取“2.3”项下 4 号和 5 号混合对照品溶液适量, 连续进样 6 次。各化合物峰面积的 RSD($n=6$)分别为 DT 0.65%, 0.81%; RH 0.58%, 0.92%; KU 0.61%, 0.85%; ER 0.72%, 0.95%; VE 0.91%, 1.05%, 表明仪器精密度良好。

表 2 广东紫珠 5 种黄酮成分的加样回收率及日内、日间精密度结果($n=6$)

Tab 2 Spiked recoveries, Intra- and interday precision for the quantitative determination of five flavonoids in *Callicarpa kwangtungensis* Chun. by MELC ($n=6$)

化合物	已知量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	加入量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	测得量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%	RSD/%	日内精密度/%	日间精密度/%
DT	30.16	30.32	60.45	99.6	1.7	0.65	2.8
RH	25.31	25.16	50.52	100.2	2.1	0.26	2.5
KU	15.12	15.61	30.65	99.6	1.9	0.52	2.3
ER	22.27	22.52	44.68	99.8	1.8	0.45	1.9
VE	20.15	20.27	40.51	100.5	2.3	0.46	2.1

2.7 重复性试验

取同一批广东紫珠 6 份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样分析, 各黄酮成分平均含量的 RSD($n=6$)分别为 DT 0.56%, RH 0.45%, KU 0.81%, ER 0.62%, VE 0.57%, 表明本方法重复性良好。

2.8 样品含量测定

取不同批次广东紫珠药材干燥粉末(过 60 目筛)约 2 g, 精密称定, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样分析, 计算广东紫珠中 5 种黄酮成分的含量, 结果见表 3。

表 1 MELC 法测定 5 种黄酮成分的标准曲线、定量限和检出限

Tab 1 Calibration, LOQ and LOD data of five flavonoids determined by MELC

化合物	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	线性方程	r	LOQ/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	LOD/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
DT	2.125~72.25	$y=95.21x-6.152$	0.999 6	0.85	0.27
RH	2.051~61.53	$y=75.15x-5.523$	0.999 5	0.62	0.16
KU	1.821~56.45	$y=45.18x-3.216$	0.999 6	0.48	0.15
ER	1.653~46.28	$y=62.35x-4.152$	0.999 6	0.56	0.22
VE	1.520~45.60	$y=61.65x-4.351$	0.999 9	0.51	0.21

2.5 稳定性试验

取同一批“2.1.2”项下方法制备的广东紫珠供试品溶液, 于 0, 2, 4, 8, 10, 12 h 分别进样一次, 各化合物峰面积的 RSD($n=6$)分别为 DT 0.56%, RH 0.51%, KU 0.57%, ER 0.45%, VE 0.62%, 表明 5 种黄酮成分在 12 h 内稳定。

2.6 加样回收率及日内、日间精密度试验

取已知含量的样品适量, 共 6 份, 精密称定, 精密加入一定量的混合对照品溶液, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样分析, 计算加样回收率及日内、日间误差, 结果见表 2。

3 讨论

3.1 不同表面活性剂的选择

本实验考察了 SDS、Brij35 表面活性剂对 5 种黄酮成分的分离效果, 结果表明, 在流动相中加入 SDS, 可使 5 种药物在较短时间内达到基线分离, 而加入 Brij35, 样品的分析时间较长, 故选择 SDS 作为表面活性剂。

3.2 表面活性剂浓度对分离的影响

在微乳稳定区域范围内, 考察 SDS 浓度在 1.5%~3.0% 内变化时的试验结果, 发现随着 SDS 浓度增加, 分离度降低, 保留时间相应缩短; 当

表 3 广东紫珠 5 种黄酮成分的含量结果

Tab 3 Contents of five flavonoids in *Callicarpa kwangtungensis* Chun.

批号	DT		RH		KU		ER		VE	
	含量/ mg·g ⁻¹	RSD/%	含量/ mg·g ⁻¹	RSD/%	含量/ mg·g ⁻¹	RSD/%	含量/ mg·g ⁻¹	RSD/%	含量/ mg·g ⁻¹	RSD/%
20101201	17.25	2.6	15.16	2.1	8.51	2.5	13.27	2.3	12.05	2.6
20101202	17.61	2.3	15.32	2.8	8.85	1.9	13.54	2.1	12.26	2.5
20101203	17.06	1.9	15.07	2.3	8.53	2.2	13.03	1.9	12.12	2.3
平均值	17.31		15.18		8.63		13.28		12.14	
总黄酮含量					66.54 mg·g ⁻¹					

SDS 浓度在 2.2% 时, 分离效果和保留时间最为理想, 故确定 SDS 的试验浓度为 2.2%。

3.3 助表面活性剂含量对分离的影响

改变助表面活性剂正丁醇的含量, 对保留时间和分离效果有影响。笔者考察了正丁醇含量在 4.0%~15.0% 内变化时的试验结果, 发现随着正丁醇含量的增加, 保留时间相应缩短。综合考虑组分分离度和保留时间, 确定助表面活性剂正丁醇的浓度为 7.75%。

3.4 不同油相及含量对分离的影响

考察了正辛醇、正庚烷、正辛烷作为油相对分离的影响, 结果表明, 油相对 5 种黄酮成分的洗脱能力为: 正辛烷>正庚烷>正辛醇, 故选择正辛烷为油相。改变油相正辛烷的含量, 可以改变物质的保留时间和分离度, 当正辛烷的含量为 1.5% 时, 分离效果最理想, 故确定油相正辛烷的含量为 1.5%。

3.5 pH 值对分离的影响

在微乳体系中, 用磷酸调节流动相 pH 值在 2.5~6.5, 考察试验结果, 发现改变 pH 值影响黄酮成分的保留时间, 随着 pH 值的增加, 黄酮成分的保留时间相应缩短, 当 pH 值为 3.7 时, 效果最为理想, 故选择流动相 pH 值为 3.7。

3.6 广东紫珠中黄酮成分的质量控制

广东紫珠黄酮成分含量既受到自身的遗传因素和生化因素的影响, 也受到植物生长发育进程及其所处的环境条件影响, 使得广东紫珠不同部位、不同采集时间, 其含黄酮成分量有较大变化^[5-6], 因此广东紫珠中黄酮成分检测和控制是确保其制剂质量的前提。本实验建立的 MELC 测定广东紫珠中 5 种黄酮成分, 不仅为广东紫珠药材质量控制提供新的方法和思路, 也为广东紫珠的种植和管理提供了指导依据。

REFERENCES

- [1] ZHOU B T, LI X Z, ZHONG G R, et al. Elementary pharmacodynamical studies of aerial part of *Callicarpa kwangtungensis* Chun [J]. Chin J Mod Med(中国现代医学杂志), 2006, 16(2): 204-206.
- [2] CHEN Y H, FENG F, REN D C, et al. Chemical constituents from the aerial part of *Callicarpa kwangtungensis* Chun[J]. Chin J Nat Med(中国天然药物), 2008, 6(2): 120-122.
- [3] ZHOU B T, LI X Z, XU P S, et al. Chemical constituents from the upground of *Callicarpa kwangtungensis* Chun (II) [J]. J Hunan Coll Tradit Chin Med(湖南中医学院学报), 2005, 25(1): 20-22.
- [4] ZHOU B T, LI X Z, XU P S, et al. Chemical constituents from the upground of *Callicarpa kwangtungensis* Chun (I) [J]. Cent South Pharm(中南药学), 2004, 2(4): 238-239.
- [5] ZHOU G P, XIE E L, SHENG J C, et al. HPLC determination of forsythiaside B and poliumoside in *Callicarpa kwangtungensis* Chun. from different habitats of Jiangxi [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2008, 28(10): 1623-1625.
- [6] HUANG L L, JIN X C, ZHU P L. Nutrient content analysis of *Callicarpa kwangtungensis* total flavone by different harvest times and plant parts [J]. Chin Forest By-Product and Speciality(中国林副特产), 2009, 15(3): 10-12.
- [7] ZHU P L, HUANG L L, LIN X H, et al. Study on the Total Flavonoids Content in *Callicarpa kwangtungensis* Chun. [J]. Jiangxi Forest Sci Tech(江西林业科技), 2010, 21(6): 12-15.
- [8] LIU J F, XUN J, HE Z G. Microemulsion liquid chromatography and recent application progresses [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2007, 35(10): 1529-1534.
- [9] EL-SHERBINY D, EID M, EL-WASSEEF D, et al. Analysis of flunarizine in the presence of some of its degradation products using micellar liquid chromatography(MLC) or microemulsion liquid chromatography(MELC)-application to dosage forms [J]. J Sep Sci, 2005, 28(2): 197-202.
- [10] MARSH A, ALTRIA K, CLARK B. Oil-in-water microemulsion high performance liquid chromatographic analysis of pharmaceuticals [J]. Chromatographia, 2004, 59(11): 531-542.
- [11] MARSH A, CLARK B, ALTRIA K. Oil-in-water microemulsion LC determination of pharmaceuticals using gradient elution [J]. Chromatographia, 2005, 61(11/12): 539-547.
- [12] HANG B B, HE S. Simultaneous determination of three compounds in Shuanghuanglian freeze-dried powder for injection by microemulsion liquid chromatography [J]. Her Med(医药导报), 2013, 32(1): 92-95.

收稿日期: 2012-10-12