

RP-HPLC 测定红丝线中香豆素的含量

蒋小华, 谢运昌*, 黄永林

(广西壮族自治区广西植物研究所, 广西桂林 541006)
中国科学院

摘要: 采用反相高效液相色谱法, 测定红丝线中香豆素的含量。色谱柱为 ZORBAX XDB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: V(甲醇): V(0.01 mol/L 磷酸二氢钠溶液 (pH 5.4)) = 45:55; 流速: 1 mL/min; 检测波长 278 nm。香豆素的线性范围为 2.5~30 mg/L (r=0.999 8), 回收率 97.5%~101%。该法简便、准确, 重复性好, 适用于测定红丝线中香豆素的含量。

关键词: 反相高效液相色谱法; 爵床科; 红丝线; 香豆素

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2006)04-0451-02

Analysis of coumarin in *Peristrophe baphica* by RP-HPLC

JIANG Xiao-hua, XIE Yun-chang*, HUANG Yong-lin

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and Academia Sinica, Guilin 541006, China)

Abstract: To establish a method for the determination of coumarin in *Peristrophe baphica*, RP-HPLC was conducted on a ZORBAX XDB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with MeOH-NaH₂PO₄ (0.01 mol/L, pH=5.4) = 45:55, flow rate 1.0 mL/min, the detection wavelength was set at 278 nm. The linear range of coumarin was 2.5~30 mg/L (r=0.999 8). The recoveries were 97.5%~101%. The method is simple, and accurate with good reproducibility, it is suitable for determination of the content of coumarin in *P. baphica*.

Key words: RP-HPLC; Acanthaceae; *Peristrophe*; coumarin

红丝线 (*Peristrophe baphica*) 为爵床科观音草属植物, 主要分布于我国南部, 药用全草, 有清肺热、止咳、凉血止血、消肿止痛等功效 (国家中医药管理局中华本草编委会, 1999)。香豆素又称邻羟基桂酸内酯和 1,2-苯并吡喃酮, 在爵床科观音草属植物中有分布, 它曾被用作治疗淋巴水肿的药物, 有消肿作用 (周荣汉, 1988)。我们从红丝线中分离鉴定了香豆素, 但红丝线中香豆素含量测定方法未见报道。为制定药材的质量标准提供依据, 本文建立了测定红丝线中香豆素的反相高效液相色谱方法。

1 仪器与材料

Agilent-1100 分析型高效液相色谱仪 (配备二级管阵列检测器、四元梯度泵、在线真空脱气机、7725i 手动进样器、HP 化学工作站, Agilent 公司); R-3000 型旋转蒸发器 (瑞士 Büchi 公司); 超纯水仪 (Millipore 公司)。

香豆素为分析纯 (佛山市化工实验厂), 甲醇为色谱纯 (上海生化工助剂厂), 水为超纯水 (自制),

收稿日期: 2005-07-14 修回日期: 2005-10-17

基金项目: 国家自然科学基金 (30360117); 广西自然科学基金 (0342002-2); 国家科技攻关计划课题 (2005BA901A10) (“西部开发”重大项目) 资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (30360117); Natural Science Foundation of Guangxi (0342002-2); National Key Technologies Research and Development Program of China (2005BA901A10)]

作者简介: 蒋小华 (1977-), 女, 广西临桂人, 研究实习员, 从事天然药物研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: yuc018@163.com)

其它试剂均为分析纯。

红丝线分别采自广西宜州、靖西、宁明,经广西植物研究所韦发南鉴定。采集其枝叶部分,置于室内通风处阴干,再置于内装变色硅胶干燥器中存放。

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱:ZORBAX XDB-C18柱(4.6 mm×150 mm,5 μm);柱温:室温;流动相:V(甲醇):V(0.01 mol/L 磷酸二氢钠溶液(pH5.4)),流速:1 mL/min;三维光谱扫描确定检测波长 278 nm;进样量:20 μL。定量方法:外标法。在上述条件下香豆素色谱峰与其它组分达到了良好分离(陈捷等,1999)。

2.2 供试品的制备

精密称取经粉碎的红丝线样品(过二号筛)1.0 g,置于100 mL具塞锥形瓶中,精密加入石油醚100 mL,密塞,称定质量,超声提取40 min,取出,待冷却后称重,用石油醚补足减失质量,摇匀静置。精密吸取上清液10 mL于40℃水浴上真空浓缩干,放冷,精密加入甲醇,水分别1 mL,9 mL,超声20 s使溶解,用微孔滤膜过滤后,取续滤液备用。视香豆素含量高低,酌情稀释或加倍取样。

2.3 线性关系考察

精密称取香豆素对照品50.0 mg,置于50 mL棕色容量瓶中,用甲醇溶液(V甲醇:V水=9:1)的溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,此溶液A质量浓度为1.00 g/L。准确吸取溶液A 5.0 mL于50 mL棕色容量瓶中,用甲醇溶液(V甲醇:V水=9:1)溶解并稀释至刻度,摇匀,制成对照品溶液,质量浓度为0.10 g/L。精密吸取对照品溶液0.25、0.50、1.0、2.0、3.0 mL分别置于10 mL棕色容量瓶中,加入甲醇溶液(V甲醇:V水=9:1)稀释至刻度,摇匀,制成系列浓度的对照品溶液。微孔滤膜过滤,取滤液按上述色谱条件进行测定。以峰面积Y对进样质量浓度X(mg/L)绘制标准曲线。计算得回归方程为: $Y=61.016X+0.2585$, $R=0.9998$,结果表明:香豆素质量浓度在2.5~30 mg/L范围内线性关系良好。

2.4 精密度试验

精密移取上述对照品溶液,按上述色谱条件进行测定。连续进样5次,测定峰面积积分值,代入回归方程,计算香豆素含量,考察仪器精密度。结果表

明仪器精密度良好。其RSD为0.92%。

2.5 重复性试验

精密称取5份红丝线(宜州)样品,按“2.2”项方法制备后,在上述色谱条件下进行分析,计算香豆素含量,考察方法重复性,结果表明方法重复性良好,其RSD值为0.31%。

2.6 回收率试验

精密称取红丝线(宜州)样品3份,分别精密加入高、中、低3种浓度的对照品溶液,按“2.2”项方法制备后,在上述色谱条件下进行分析,计算回收率,结果见表1。

表1 回收率测定结果(n=3)
Table 1 Determination results of recovery

成分 Component	加入量(mg) Added	平均回收率(%) Average recovery	RSD (%)
香豆素 Coumarin	3.0	101	1.1
	9.0	97.5	0.9
	12.0	98.0	2.0

2.7 稳定性试验

取红丝线(宜州)供试品,放置24 h后,按上述色谱条件进样分析,记录色谱峰面积,结果表明样品在24 h内稳定性良好。

2.8 最低检测线

在选定色谱条件下,当信噪比为3时,香豆素最低检测限为0.05 mg/L。

3 结果

取供试品按上述色谱条件进行分析,记录色谱图(图1),计算香豆素的含量。测定结果见表2。

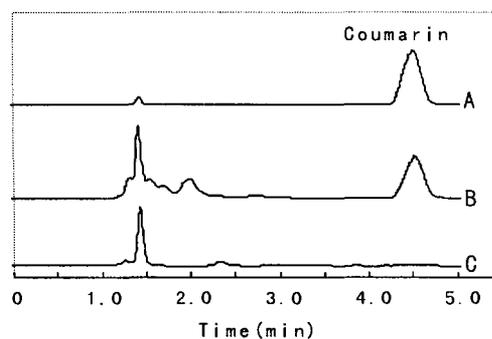


图1 红丝线中香豆素的HPLC分析
Fig. 1 Analysis of coumarin in *Peristrophe baphica* by HPLC

A. 香豆素 Coumarin; B. 红丝线 *P. baphica*; C. 空白 Control.

(下转第455页 Continue on page 455)

定吸收值,测得平均回收率为 99.7%,RSD 为 2.3%。

表 3 重复性实验结果
Table 3 Results of parallel tests

编号 No.	1	2	3	4	5
含量 Content (%)	2.97	2.91	2.94	2.90	2.95
平均含量 Average (%)	2.93				
RSD (%)	1.0				

3 讨论

(1)在总黄酮提取时,有人采用乙醚提取后再用甲醇提取药材中的总黄酮(单鸣秋等,2002),本实验曾采用乙醚提取后再用甲醇提取药材中的总黄酮与用甲醇直接提取药材中的总黄酮制备供试品溶液进行含量检测比较,结果表明两者相差较小,因此本实验选用操作简便的单一甲醇作提取溶剂。

(2)从显色稳定性试验可见其吸收值在 30 min 内基本稳定,提示吸收值的测定在显色后 30 min 内完成较好,本实验选用显色后 15 min 检测。本实验方法简便、可靠、准确,可作为艾纳香中不同部位及提取物的检测方法。

(3)从表 2 的结果来看,艾纳香中三个不同部位叶、小枝条、茎中总黄酮的含量有比较大的差别,其中叶中总黄酮的含量最高,达 2.94%,小枝条的含量最低只有 1.21%,只要通过叶、小枝条、茎的药理试验结果,可以初步判断黄酮类成分与临床功效之

间的相互关系,为今后对艾纳香中黄酮类成分与临床功效间相互关系的深入研究奠定了基础。

参考文献:

- 广西壮族自治区卫生厅. 1996. 广西中药材标准(第二册)[M]. 南宁:广西科学技术出版社:256.
- 江苏新医学院. 1997. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社:562-563.
- 许实波,赵金华. 1998. 艾纳香二氢黄酮对大鼠实验性肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,14(2):191-192.
- 苏代芬,胡玉泉,刘劭华. 1997. 妇血康冲剂治疗药物流产后出血的临床观察[J]. 首都医科大学学报,18(4):380-381.
- 陈德莲,段秀蓉,王玉琼. 2000. 妇血康用于药物流产后的疗效观察[J]. 黑龙江护理杂志,6(2):37.
- 林永成,龙康侯,邓一军. 1988. 中药艾纳香化学成分研究[J]. 中山大学学报(自然科学版),27(2):77-78.
- 傅红专. 2001. 妇血康冲剂治疗妇产科血症疗效观察[J]. 时珍国医国药,12(2):147.
- Deng QY(邓芹英),Ding CM(丁丛梅),Zhang WH(张维汉), et al. 1996. Studies on the flavonoid constituents in *Blumea balsamifera* (艾纳香中黄酮化合物的研究)[J]. *Chin J Magnetic Resonance* (波谱学杂志),13(5):76-78.
- Shan MQ(单鸣秋),Zhang L(张丽),Zhou CY(周春燕), et al. 2002. Quantitative analysis of flavonoid in different sections of *Schizonepe tatenui folia* Briq. and from different areas(不同产地及不同部位荆芥中总黄酮的含量测定)[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research* (时珍国医国药),13(3):138-139.
- Zhao JH(赵金华),Xu SB(许实波). 1997. Effects of *Blumea flavanones* on lipid peroxidation and active oxygen radicals(艾纳香二氢黄酮对脂质过氧化及活性氧自由基的作用)[J]. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报),13(5):438-441.

(上接第 452 页 Continue from page 452)

表 2 红丝线中香豆素的含量测定结果
Table 2 Contents of coumarin in *Peristrophe ba phica*

编号 No.	采集地 Locality	香豆素含量(g/kg) Coumarin content
1	广西宜州 From Yizhou, Guangxi	3.42
2	广西靖西 From Jingxi, Guangxi	4.3×10^{-3}
3	广西南明 From Ningming, Guangxi	7.5×10^{-3}

4 讨论

(1)曾对提取溶剂(石油醚、甲醇)、提取方法(超声处理、回流提取、浸渍)、提取时间(20,40,60 min)作了对比试验,结果以本文提取方法为最佳。

(2)本试验用二极管阵列检测器对香豆素色谱峰在 200~600 nm 范围内进行光谱扫描,在 278 nm

处有最大吸收,选择 278 nm 作为检测波长。

(3)测定结果表明,香豆素在观音草属植物中分布是不均匀的。爵床科植物是分类难度很大的植物,该 3 种植物现在作为同名植物,但有分类学家认为该 3 种植物为不同的种。本研究结果支持了宜州产红丝线不同于其他两种红丝线的分类学观点。

参考文献:

- 国家中医药管理局中华本草编委会. 1999. 中华本草(第 7 卷)[M]. 上海:上海科学技术出版社:466-467.
- Zhou YH(周荣汉). 1988. Chemotaxonomy of Medicinal Plants(药用植物化学分类学)[M]. 上海:上海科学技术出版社:11-12.
- Chen J(陈捷),Hu GC(胡国昌). 1999. The determination of coumarin in foods by High Performance Liquid Chromatography(HPLC)(高效液相色谱法测定食品中的香豆素)[J]. *Chin J Chromatography* (色谱),17(2):203-205.