

棉花花总黄酮片中黄酮类化合物的测定

吴涛¹, 蒋岚², 阿吉艾克拜尔·艾萨^{1,2*}

1. 中国科学院 干旱区植物资源化学重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011

2. 中国科学院新疆理化技术研究所 新疆植物资源化学重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011

摘要: 目的 建立棉花花总黄酮片中总黄酮、金丝桃苷、异槲皮素的测定方法。方法 利用紫外分光光度计, 以芦丁为对照品测定总黄酮, HPLC 同时测定黄酮类化合物金丝桃苷和异槲皮素。结果 3批棉花花总黄酮片中总黄酮分别为 71.6、73.5、75.2 mg/片, 金丝桃苷分别为 4.28、4.35、4.23 mg/片, 异槲皮素分别为 18.55、18.73、18.31 mg/片。结论 该方法专属性强, 灵敏度高、重现性好, 可用于棉花花总黄酮片中黄酮类化合物的测定。

关键词: 棉花花总黄酮片; 金丝桃苷; 异槲皮素; 总黄酮; 高效液相色谱; 分光光度法

中图分类号: R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)04-0713-03

Determination of flavonoids in Mianhuahua Flavonoids Tablets

WU Tao¹, JIANG Lan², AISA Haji Akber^{1,2}

1. Key Laboratory of Chemistry of Plant Resources in Arid Regions, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China

2. Xinjiang Key Laboratory of Plant Resources and Natural Products Chemistry, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China

Key words: Mianhuahua Flavonoids Tablets; hyperoside; isoquercetin; total flavonoids; HPLC; spectrophotometry

棉花花系我国维吾尔族习用药材, 为草棉 *Gossypium herbaceum* L. 或陆地棉 *G. hirsutum* L. 的干燥花, 收载于《中华人民共和国卫生部部颁标准·维吾尔药分册》。传统维吾尔医学认为其性湿热, 味微苦, 具有生湿生热、安神催眠、芳香开窍、营养神经、补心悦志的功效。主治干寒性或黑胆质性疾, 如各种干寒性神经疾病, 失眠、心悸、心慌、心神不安、抑郁不解、脑力下降、神经衰弱等^[1]。

棉花花中含有丰富的黄酮类化合物^[2], 本研究室曾将棉花花总黄酮提取物经 AB-8 大孔树脂纯化, 运用 LC-MS 在棉花花总黄酮提取物中鉴定出金丝桃苷和异槲皮素, 金丝桃苷与异槲皮素具有脑血管保护作用等多种生理活性^[3-4], 这与药理实验结果证实的棉花花总黄酮提取物具有抗血管性痴呆的功效较吻合。棉花花总黄酮提取物与微晶纤维素、微粉硅胶、羧甲基淀粉钠一并制成棉花花总黄酮片, 本实验以紫外分光光度计测定棉花花总黄酮片中总黄

酮, 并以 HPLC 测定其中的两个代表性化合物金丝桃苷和异槲皮素, 为棉花花总黄酮片申报中药、天然药物新药打下基础。

1 材料

岛津 2550 紫外可见分光光度计; Sartorius—CP225D 电子天平; 美国戴安高效液相色谱: P680 四元梯度泵, ASI100 自动进样器, TCC100 柱温箱, UV170 紫外检测仪, Chromeleon 6.8 色谱工作站; KQ—100DE 型数控超声波清洗器 (功率 100 W, 频率 40 kHz)。

芦丁 (批号 0080-200505)、金丝桃苷 (批号 1521-200502) 对照品均购于中国药品生物制品检定所, 异槲皮素对照品 (中国科学院新疆理化技术研究所自制, 质量分数 > 99%)。棉花花总黄酮片 (中国科学院新疆理化技术研究所自制, 规格 0.3 g/片, 批号分别为 050125、060103、060207)。乙腈为色谱纯; 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

收稿日期: 2010-07-07

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2007BAI30B02); 国家自然科学基金资助项目 (30873455)

作者简介: 吴涛 (1982—), 男, 新疆乌鲁木齐人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为中药与民族药开发。

Tel: (0991)3838635 E-mail: wutao82112@126.com

*通讯作者 阿吉艾克拜尔·艾萨 Tel: (0991)3835679

2 方法与结果

2.1 总黄酮的测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取在 120 °C 干燥至恒定质量的芦丁对照品 30 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声溶解, 放冷, 加乙醇至刻度, 摇匀。精密量取 20 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 即得芦丁质量浓度为 0.24 mg/mL 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取棉花花总黄酮片 10 片, 研成细粉, 取 0.3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 摇匀, 超声 15 min, 用甲醇补足减失的质量, 滤过, 精密量取续滤液 4 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 再精密量取 2 mL, 置 25 mL 量瓶中, 即得。

2.1.3 阴性对照溶液的制备 按棉花花总黄酮片的配方制备缺棉花花总黄酮的阴性样品, 按“2.1.2”项方法制备阴性对照溶液。

2.1.4 测定波长选择 取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液, 显色后, 于 200~600 nm 波长扫描, 结果对照品溶液和供试品溶液吸收曲线变化趋势基本相符, 且在 510 nm 处均有明显吸收; 而阴性对照溶液在 510 nm 处无吸收, 故选择测定波长为 510 nm。

2.1.5 线性关系 精密量取对照品溶液 0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 各加水至 6 mL, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL, 混匀, 放置 6 min, 再加 10% 硝酸铝溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 4% 氢氧化钠试液 10 mL, 再加水至刻度, 摇匀, 放置 15 min。以 0 mL 对照品溶液为空白, 照分光光度法, 在 510 nm 波长处测定吸光度 (A), 以 A 为纵坐标, 芦丁质量浓度为横坐标进行回归, 得回归方程 $A=10.823 C+0.000 8$ ($r=0.999 6$), 结果表明芦丁在 19.36~58.09 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.1.6 精密度试验 取批号 060103 样品制备的供试品溶液, 照“2.1.5”项方法测定吸光度, 连续 5 次, 计算 RSD 为 0.25%。

2.1.7 重现性试验 取批号 060103 样品 6 份, 制备供试品溶液, 测定吸光度, 计算其质量分数的 RSD 为 1.52%。

2.1.8 稳定性试验 取批号 060103 样品制备的供试品溶液, 照“2.1.5”项方法, 分别于 0、5、10、20、40 min 测定吸光度, 计算 RSD 为 1.09%, 表明供试品溶液在 40 min 内稳定。

2.1.9 加样回收率试验 精密称取批号 060103 样品粉末 6 份, 每份 100 mg, 置 50 mL 棕色量瓶中, 分别加入相当于样品中总黄酮量 100% 的芦丁对照品 24.5 mg, 制备供试品溶液, 依法测定, 计算回收率。结果平均回收率为 98.4%, RSD 为 1.36%。

2.1.10 样品的测定 结果见表 1。

表 1 棉花花总黄酮片中总黄酮测定结果 ($n=3$)
Table 1 Determination of total flavonoids in Mianhuahua Flavonoids Tablets ($n=3$)

批号	总黄酮/(mg·片 ⁻¹)
050125	71.6
060103	73.5
060207	75.2

2.2 金丝桃苷与异槲皮素的测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex Synergi Fusion-RP 80A (250 mm×4.60 mm, 4 μm), 流动相为甲醇-乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (19:6:75), 柱温 30 °C, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 360 nm, 进样量 10 μL 。

2.2.2 对照品贮备液的制备 精密称取 60 °C 减压干燥 3 h 的金丝桃苷和异槲皮素对照品适量, 加甲醇分别制成金丝桃苷质量浓度为 0.376 mg/mL 的对照品贮备液和异槲皮素质量浓度为 1.500 mg/mL 的对照品贮备液, 备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 取棉花花总黄酮片, 研成粉末, 取 1.0 g, 精密称定, 置 50 mL 棕色量瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 15 min, 冷却至室温, 再称定, 用甲醇补足减失的质量, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2.4 阴性对照试验 取除去棉花花总黄酮以外的辅料, 按制备方法制成空白对照溶液。取供试品溶液、空白对照溶液、对照品溶液, 注入高效液相色谱仪中测定。在上述色谱条件下, 金丝桃苷、异槲皮素能够达到基线分离, 与对照品出峰时间一致, 阴性对照无干扰, 专属性强。色谱图见图 1。

2.2.5 线性关系 吸取金丝桃苷对照品贮备液适量, 用甲醇配制成质量浓度分别为 0.075、0.113、0.150、0.188、0.376 mg/mL 的系列对照品溶液, 0.45 μm 滤膜滤过后进样, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 以金丝桃苷质量浓度为横坐标, 色谱峰面积为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.003 4 X-0.002 8$, $r=0.999 4$, 表明金丝桃苷在 0.075~0.376 mg/mL

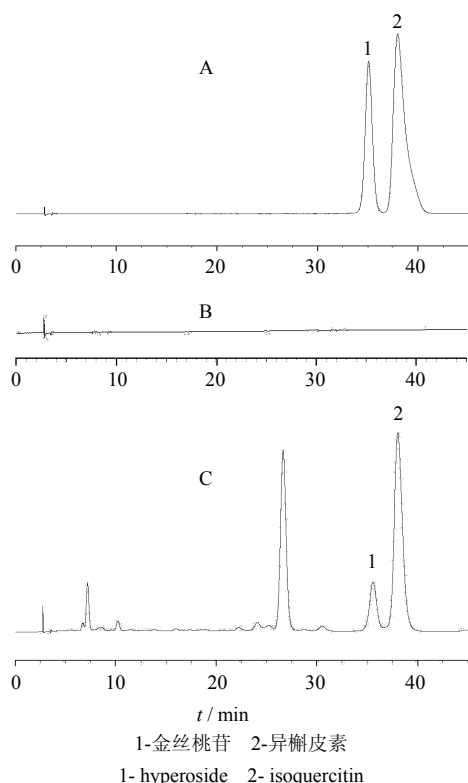


图 1 金丝桃苷和异槲皮素混合对照品 (A)、阴性对照品 (B) 及棉花花总黄酮片样品 (C) 色谱图

Fig. 1 Chromatograms of hyperoside and isoquercetin mixed reference subslances (A), negative reference substance (B), and Mianhuahua Flavonoids Tablets (C)

线性关系良好；同法配制质量浓度分别为 0.15、0.30、0.60、0.90、1.20 mg/mL 的系列异槲皮素对照品溶液，同上操作得回归方程 $Y=279.84 X-15.693$ ， $r=0.999 0$ ，表明异槲皮素在 0.15~1.20 mg/mL 线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 分别精密吸取 0.150 mg/mL 金丝桃苷对照品溶液和 0.60 mg/mL 异槲皮素对照品溶液，各重复进样 5 次，以峰面积计算，金丝桃苷 RSD 为 1.12%，异槲皮素 RSD 为 0.28%。

2.2.7 重现性试验 取批号 060103 样品，依法制成 5 份供试品溶液，各进样 10 μ L，测定峰面积，计算其质量分数，金丝桃苷 RSD 为 0.88%，异槲皮素 RSD 为 0.39%。

2.2.8 稳定性试验 取批号 060103 样品，依法制备供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8 h 进样测定，以峰面积计，金丝桃苷 RSD 为 0.93%，异槲皮素 RSD 为 0.37%。

2.2.9 加样回收率试验 取批号 060103 样品 9 份，均分为 3 份，每份 0.5 g，精密称定，每份分别精密加入对照品贮备液适量（约为样品中相应成分量的 80%、100%、120%），按“2.2.3”项方法制备，测定峰面积，分别计算金丝桃苷和异槲皮素的加样回收率，结果金丝桃苷平均加样回收率为 99.02%，RSD 为 1.87%，异槲皮素平均加样回收率为 102.27%，RSD 为 1.06%。

2.2.10 样品的测定 取 3 个批次的棉花花总黄酮片，制备供试品溶液，进样测定，结果见表 2。

表 2 棉花花总黄酮片金丝桃苷和异槲皮素测定结果 ($n=3$)
Table 2 Determination of hyperoside and isoquercitin in Mianhuahua Flavonoids Tablets ($n=3$)

批号	金丝桃苷/(mg·片 ⁻¹)	异槲皮素/(mg·片 ⁻¹)
050125	4.28	18.55
060103	4.35	18.73
060207	4.23	18.31

3 结论

利用紫外分光光度法测定了棉花花总黄酮片中总黄酮的量，建立了 HPLC 法测定棉花花总黄酮片中金丝桃苷、异槲皮素的方法。金丝桃苷和异槲皮素的化学结构较相似，虽然 LC-MS 在棉花花总黄酮提取物中鉴定出二者化学结构，但是 2 个化合物峰重叠度较大，给质量控制研究中定量测定带来较大困难。

在尝试了不同比例甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-磷酸水溶液等多种分离体系后，最终摸索出甲醇-乙腈-0.1%磷酸水溶液能够较好的分离样品，可满足样品中 2 种成分的测定，但还存在分离时间较长的缺陷。

参考文献

- [7] 中华人民共和国卫生部药品标准·维吾尔药分册 [S]. 1999.
- [8] 帕尔哈提·克里木, 蔡 宇, 阿斯亚·拜山伯. 新疆草棉花总黄酮的提取工艺研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2005, 28(3): 193-195.
- [9] 张成伟, 周亚秋, 陈 磊. 金丝桃苷药理作用研究进展 [J]. 安徽医药, 2007, 11(11): 961-962.
- [10] 金 越, 吕 勇, 韩国柱, 等. 槲皮素及异槲皮素、芦丁抗自由基活性的比较研究 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 408-412.