HPLC 法测定紫背天葵中矢车菊素 - 3- O- 葡萄糖苷含量的研究

邵考珍，何淑莹

佛山市南海区第七人民医院药剂科，广东 佛山 528247

【摘要】 目的：建立紫背天葵中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷含量测定的高效液相色谱法（HPLC）。方法：采用 Shim-pack VP-ODS（250 mm×4.6 mm，5 μm）为色谱柱，0.5%磷酸-50%乙腈为流动相；检测波长为 280 nm；流速 0.8 mL/min；柱温 30℃。结果：矢车菊素-3-O-葡萄糖苷在 0.05 μg ~ 1 μg 的范围内与峰面积呈良好的线性关系（r=0.999 9），平均加样回收率为 100.4%，RSD 为 1.3%（n=6）。结论：该方法可准确测定紫背天葵中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的含量，重复性好，可作为控制紫背天葵质量的一个重要指标。

【关键词】 紫背天葵；HPLC 法；矢车菊素-3-O-葡萄糖苷；含量测定

【中图分类号】 R284 【文献标志码】 A 【文章编号】 0256-7415（2016）12-0204-03

DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2016.12.087

Research on Content Determination of Procyanidin -3 -O -glucoside in Begonia Fimbristipula Hance with HPLC

SHAO Kaozhen，HE Shuying

Abstract：Objective：To establish high performance liquid chromatography(HPLC) method for content determination of Procyanidin- 3- O- glucoside in Begonia Fimbristipula Hance. Methods：Adopted chromatographic column Shim- pack VP- ODS (250 mm× 4.6 mm，5 μm，mobile phase was 0.5% Phosphoric acid - 50% acetonitrile，detection wavelength was 280nm；flow rate was 0.8 mL/min and column temperature was 30℃). Results：Procyanidin- 3- O- glucoside and peak area were in a good linear relationship(r=0.999 9) in the range of 0.05 μg ~ 1 μg. The average sample recovery rate was 100.4%，RSD(relative standard deviation) was 1.3% (n=6). Conclusion：The therapy can determine contents of Procyanidin- 3- O- glucoside in Begonia fimbristipula Hance accurately，with good repeatability. It's an important indicator to control the quality of Begonia fimbristipula Hance.

Keywords：Begonia fimbristipula Hance；High Performance Liquid Chromatography(HPLC)；Procyanidin- 3- O- glucoside；Determination of content

紫背天葵是秋海棠科秋海棠属的多年生无茎草本植物，又名红天葵、红叶、红水葵、散血子等，分布于中国的广东、福建、江西、海南、香港、湖南、广西、福建、浙江等地，质量以肇庆鼎湖山出产的为佳。该药具有清热解毒、凉血、活血、润肺止咳的功效，主治暑热高烧，肺热咳嗽，咯血，跌打扭伤，血瘀疼痛，疮毒疥癣，水火烫伤等[1~2]。现代药理研究发现紫背天葵有抗氧化、自由基清除、扩张血管、抗血小板凝集、提高免疫力、抗癌等多方面的生物活性[3~6]。目前的紫背天葵成分研究表明，药材含有大量花色苷、黄酮苷和活性多糖化合物等有效成分，其中主要的成分是矢车菊素 - 3- O- 葡萄糖苷[7~12]。目前相关的研究报道主要集中在不同成分的提取及稳定性研究上，使用 HPLC 测定其成分的研究未见报道。本课题组采用 HPLC 法对 8 个不同产地的 10 批紫背天葵样品中的成分矢车菊素 - 3- O- 葡萄糖苷含量进行测定。

1 材料和仪器

1.1 仪器与设备 Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司)，包括：四元泵，脱气机，二极管阵列检测器，柱温箱，Chemstation 工作站。R 系列旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司)；HN- 1006 型超声波清洗机(广州市华南超声设备有限公司)。

1.2 药物与试剂 矢车菊素 - 3- O- 葡萄糖苷对照品(批号：20160201)购自 Hyphytochem 公司，纯度≥ 98 %；甲醇、乙腈为色谱纯(色谱试剂均购自德国默克股份公司)，其他试剂为分析纯，水为高纯水(高纯水为自制)。紫背天葵干品(干品的来

【收稿日期】 2016-07-03

【作者简介】 邵考珍（1975-），女，主管中药师，研究方向：中药材的 HPLC 指纹图谱。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

源：广东肇庆 2 批，购自广州至信药业有限公司；广西桂林，广西玉林，网购自峻豪野生中药行；湖南永州、安徽亳州，网购自丰丰药行；福建南平 2 批、江西宜丰、广东阳江，网购自鑫淼中药材批发)，经广州市皮肤病防治所副主任中药师龙惠鉴定，均为秋海棠科秋海棠属的紫背天葵 Begonia fimbristipulate Hance[*B.cyclophylla Hook.f.*]干燥全草。

2 方法与结果

2.1 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷对照品溶液的制备 取矢车菊素 - 3- O- 葡萄糖苷对照品适量，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加甲醇适量溶解，超声溶解，放冷，定容，制成 0.1 mg/mL 的矢车菊素 - 3- O- 葡萄糖苷对照品贮备液。精密量取上述溶液 2 mL，置 10 mL 量瓶，加甲醇至刻度，摇匀，即得 0.02 mg/mL 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取不同产地的紫背天葵干品 10 批分别单独粉碎并过 40 目筛。精密称取不同产地的样品粉末各 1 g，分别按照如下方法制备：置锥形瓶中，精密加甲醇 25 mL，称定质量，超声处理 30 min。取出，放冷至室温，再称定质量，用甲醇补足减失的重量。摇匀，滤纸滤过，再以 0.45 μm 滤膜滤至进样瓶，即为供试品溶液。

2.3 色谱条件与系统适用性试验 采用色谱柱 Shim- pack VP- ODS(250 mm× 4.6 mm，5 μm)；以 0.5% H_3PO_4(V/V)为流动相 A，以 50% 乙腈为流动相 B(V/V)，按表 1 的程序进行梯度洗脱；流速为 0.8 mL/min；柱温 30℃；检测波长为 280 nm；进样量 10 μL；运行时间为 80 min。理论板数按矢车菊素 - 3- O- 葡萄糖苷计算，不得低于 3 000。不同产地来源的 10 批样品按照以下方法试验：分别精密吸取 2.1、2.2 项下的对照品溶液与供试品溶液各 10 μL 注入液相色谱仪，记录色谱图，另取空白甲醇同法进样。结果显示，在对照品主峰相应的位置(16.67 min)，供试品显示相同的色谱峰(分离度＞1.5)，空白甲醇对测定无干扰，见图 1~3。

表 1 梯度洗脱程序表

t/min	流动相 A%	流动相 B%
0- 15	88- 62	12- 38
15- 28	62- 75	38- 25
28- 47	75- 20	25- 80
47- 52	20- 80	80- 100
52- 58	0- 0	100- 100
58- 65	0- 88	100- 12
65- 80	88	12

2.4 线性关系考察 分别精密吸取“2.1”项下的对照品 0.5 mL、1 mL、2 mL、4 mL、8 mL、10 mL 置 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，得到浓度分别为 5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL、80 μg/mL、100 μg/mL 的溶液。分别精密吸取上述溶液各 10 μL 注入液相色谱仪，记录色谱图。以峰面积(*Y*)为纵坐标，进样量(*X*)为横坐标进行线性回归，得回归方程：Y=18.38X+0.8917(r= 0.999 9，n=6)。矢车菊素 - 3- O- 葡萄糖苷在 0.05 μg/mL～1 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

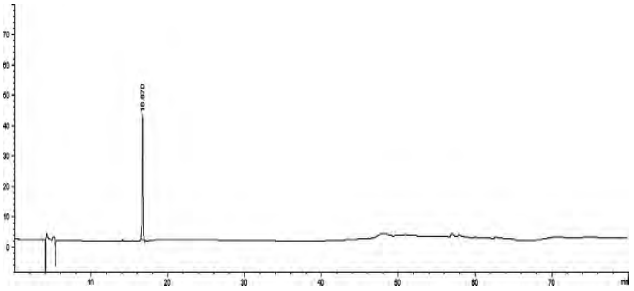

图 1 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷对照品 HPLC 图

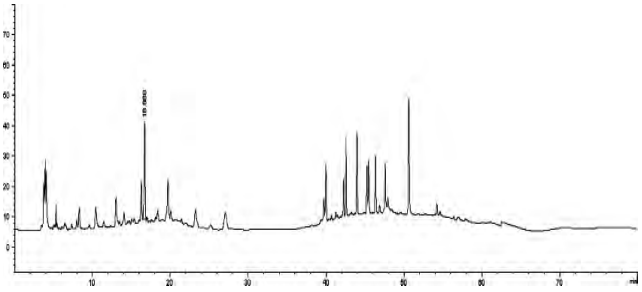

图 2 产地广东肇庆的紫背天葵供试品 HPLC 图

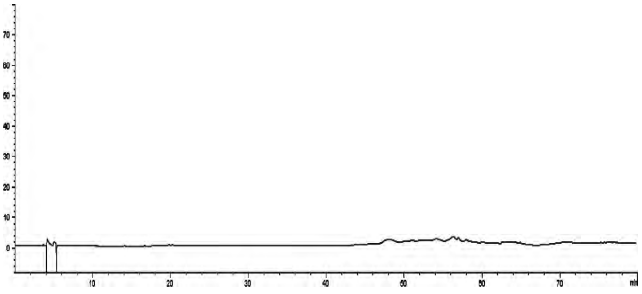

图 3 空白甲醇的 HPLC 图

2.5 精密度试验 精密吸取矢车菊素 - 3- O- 葡萄糖苷对照品溶液 10 μL，连续进样 6 次，测定峰面积。结果矢车菊素 - 3- O- 葡萄糖苷峰面积平均值为 363.376，RSD 为 0.23%。表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批紫背天葵样品约 1 g，精密称定，按照 2.2 项下的方法制备 6 份供试品溶液，依法进行测定。结果测得平均含量为 0.039%，RSD 为 1.4%，表明本方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液各 10 μL，分别于 0、2、4、8、12、24 小时注入液相色谱仪进测定，测得矢车菊素 - 3- O- 葡萄糖苷平均含量为 0.040%，RSD 为 0.9，表明供试品溶液在 24 h 内测定结果稳定。

2.8 加样回收率试验 见表 2。取已知含量的同一批紫背天

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

葵样品约 0.5 g，各 6 份，精密称定，置三角瓶中，分别精密加入矢车菊素 - 3- O- 葡萄糖苷对照品溶液各 2 mL(0.1 mg/mL)，照供试品溶液方法处理，计算回收率。

表 2　加样回收率测定结果

编号	取样量(g)	样品中含量(mg)	加入对照品量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.521 4	0.203 3	0.196 8	0.399 7	99.8		
2	0.501 1	0.195 4	0.196 8	0.396 7	102.3		
3	0.496 5	0.193 6	0.196 8	0.393 1	101.4	100.4	1.3
4	0.536 4	0.209 2	0.196 8	0.404 8	99.4		
5	0.550 0	0.214 5	0.196 8	0.412 6	100.7		
6	0.512 0	0.199 7	0.196 8	0.394 1	98.8		

2.9　样品的含量测定　见表 3。取不同产地的紫背天葵，按照 2.2 项下方法制备供试品溶液，依法测定矢车菊素 - 3- O- 葡萄糖苷的含量。

表 3　不同产地紫背天葵样品的矢车菊素–3–O–葡萄糖苷含量

产地	含量(%)
广东肇庆	0.068
广西桂林	0.042
湖南永州	0.033
福建南平	0.051
江西宜丰	0.025
广东阳江	0.054
广西玉林	0.043
安徽亳州	0.038

3　讨论

3.1　吸收波长的选择　矢车菊素 - 3- O- 葡萄糖苷紫外可见光谱图显示，在 280 nm 及 520 nm 有最大吸收(见图 4)。供试品在该两处波长下，前者峰较多、分离度良好，较好地体现出了紫背天葵样品的特征，而后者有仅寥寥数个峰。因此选择 280 nm 作为测定波长。通过对不同来源的 10 批样品进行含量测定，结果表明不同来源的紫背天葵表现出了不同的 HPLC 特征，所含矢车菊素 - 3- O- 葡萄糖苷差异较大。其中以广东肇庆产的含量最高，达到 0.068%，该结论跟传统鉴定中的道地药材是一致的，表明以矢车菊素 - 3- O- 葡萄糖苷做为紫背天葵的主要成分做检测是可靠的，该方法可以准确测定紫背天葵中的矢车菊素 - 3- O- 葡萄糖苷的含量，重复性好，可作为控制紫背天葵质量的一个重要指标。

3.2　关于流动相的选择　本研究曾考察了甲醇－磷酸溶液、乙腈－磷酸溶液系统，结果以后者的峰形及分离较好。通过尝试不同比例的乙腈溶液与不同浓度的磷酸溶液进行梯度洗脱，最终确认了分离度较高的梯度洗脱程序。在设定的程序下，主峰分离度大于 1.5，符合测定要求。同时考察了不同浓度的甲醇及不同的提取方法，包括回流提取、超声波提取法。结果表明，使用 25 倍量(W/V)纯甲醇超声 30 min 后，主成分基本溶出，操作简便、快捷。

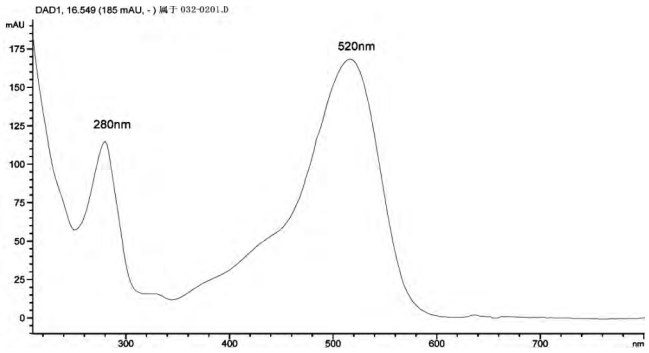

图 4　矢车菊素–3–O–葡萄糖苷 UV 吸收光谱图

参考文献

[1] 国家药典委员会．中华人民共和国药典[M]．北京：中国医药科技出版社，2010．
[2] 国家医药管理局《中华本草》编委会．中华本草[M]．上海：上海科技出版社，1999．
[3] 王红珊，曹毅敏，李国豪，等．紫背天葵提取物对糖尿病肾病大鼠的作用[J]．中国生化药物杂志，2012，33(3)：272- 274，277．
[4] 王红珊，曹毅敏，杨莹，等．紫背天葵联合复方丹参注射液治疗脑梗死的临床观察[J]．中国药房，2013，24(12)：1108- 1110．
[5] 黄伟刚，郑诗颖，叶大明，等．紫背天葵提取物对电离辐射损伤的保护作用[J]．实用医学杂志，2012，28(7)：1064- 1066．
[6] 段志芳，付莉，黄丽华，等．紫背天葵红色素与牛血清白蛋白的作用研究[J]．中国野生植物资源，2006，25(1)：50- 52．
[7] 段志芳，章炜中，黄丽华．紫背天葵多糖提取与含量测定[J]．中成药，2007，29(2)：274- 276．
[8] 许璇，卢忠，罗一帆．不同等级紫背天葵微量元素含量的测定[J]．广东微量元素科学，2000，7(4)：55- 57．
[9] 刘巍然，周法兴．紫背天葵水提液析出物化学成分研究[J]．中国药学杂志，1991，26(8)：467- 468．
[10] 李红缨，杨海贵，植中强．紫背天葵红色素理化性质的研究[J]．肇庆学院学报，2002，23(2)：76- 79．
[11] 崔蕊静，申淑琦，郭朔．复合酶协同微波处理提取紫背天葵叶片总黄酮工艺[J]．中国食品学报，2014，14(2)：72- 77．
[12] 谭雄斯，王景，唐铁鑫．紫背天葵药材质量标准研究[J]．广东药学院学报，2012，28(4)：415- 418．

(责任编辑：冯天保，郑锋玲)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net