维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)06 - 0862 - 02

HLPC 法测定木芙蓉提取物中芦丁含量

沈钦海,陈国民

(重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:建立木芙蓉中芦丁含量的 RP - HLPC 定量测定方法。方法:以芦丁标准品为对照进行反向高效液相法测定:Ubondpak C_{18}色谱柱,柱温 25℃,在 370nm 波长处紫外检测;流动相:以 0.02mol/L 磷酸二氢钾缓冲液(含 1% 冰醋酸) - 甲醇(体积比为 73:27)组成流动相,流速为 1.0ml/min;SPD - 2ASUV 检测器,于波长 370nm 检测。结果:芦丁与木芙蓉中其他成分基线分离良好,进样量在(0.5 ~ 5)μg/20μl 范围内,峰面积 X 与进样浓度 Y 呈良好的线性关系,回归方程为 Y = 0.0001X + 0.1208,相关系数 r = 99.8%,加样回收率为 99.88%,RSD 为 1.54%(n = 5),结论:该方法处理方法简单,准确率高,分离效能高,适合于木芙蓉中芦丁含量的测定。

【关键词】反相高效液相色谱;木芙蓉;芦丁

【中国图书分类法分类号】R33 - 33, R282 【文献标识码】A 【收稿日期】2005 - 03 - 24

Content determination of Rutin in Hibiscus mutabilis L by HLPC

SHEN Qinhai, et al

(*Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University*)

【Abstract】Objective: To establish a method for content determinate of Rutin in H ibiscus mutabilis L by RT - HLPC. Methods: The chromatographic conditions were as follows: Column: Ubondpak C_{18}; the column temperature was 25℃ and the detection wavelength was 370nm; Mobil phase consisted of 0.02mol/L KH_2PO_4 solution cotaining 1.0% glacial acetic acid - methanol (73:27, v:v). The flow rate was 1.0ml/min. SPD - 2ASUV detector was used. The standard sample was used as control. Results: Good linearity was obtained for Rutin and other components in the range of (0.5 ~ 5) μg/20μl. Peak area was favorable liner between the concentration of Rutin in range. The regression equation was Y = 0.0001X + 0.1208, correlation coefficient r = 99.8%, The recovery rate was 99.88%, RSD was 1.54% (n = 5). Conclusion: The method is convenient, precise, resulting in high separate efficacy, and suited for the content determination of Rutin in H ibiscus mutabilis L.

【Key words】 RT - HLPC; H ibiscus mutabilis L; Rutin

木芙蓉属槿葵科木属植物,其花、叶和根均可入药。具有清热解毒、消肿排毒、凉血止血之功用,在民间广泛用于治疗痈肿疮疥。文献记载该药外用和口服有很好的抗炎、消肿作用,可以治疗阑尾炎、腮腺炎,也可以治疗关节炎、丹毒等。符诗聪等[1]研究发现木芙蓉有效成分具有明显的抗炎作用。陈文吟等[2]通过研究发现木芙蓉叶提取液对 2.2.15 细胞表达 HBsAg、HBeAg 均有抑制作用。近年研究证明,其主要化学成分为黄酮甙,包括槲皮甙(quercitrin)、异槲皮甙(isoqercitrin)、金丝桃甙(hyperoside)和绣线菊甙(piracoside),及花色甙等[3]。陈邕[4]用 HPLC 测定朱砂莲胶囊中马兜铃酸 A 含量的方法,效果好,定量准确,快速。本实验采用 HPLC 法测定木芙蓉提取物中芦丁含量也达到同样效果。

作者介绍:沈钦海(1966 -),男,主治医师,博士,主要研究方向:病毒性肝炎的治疗。

1 材料和方法

1.1 药品和试剂

样品:木芙蓉(重庆市三峡库区)。

对照品:芦丁(安徽省甙尔天然有机化物信息中心)。

试剂:磷酸二氢钾、甲醇、冰醋酸(重庆西南化学试剂有限公司)。

1.2 仪器和色谱条件

仪器:Beckman 114M Solvent Delivery Module 色谱仪。

色谱条件:色谱柱 C_{18};流动相:含 1% 冰醋酸的磷酸二

维普资讯 http://www.cqvip.com

氢钾 - 甲醇(73:27, v:v);流速:1.0ml/min;检测波长:370nm;柱温:25℃。检测器:SPD - 2AS UV 检测器;进样体积 20ul,受动进样,AUFS = 0.8。色谱图如图 1、图 2。

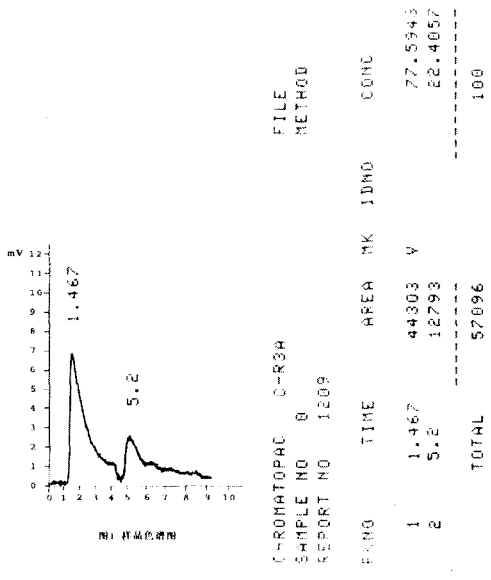


图 1 样品色谱图

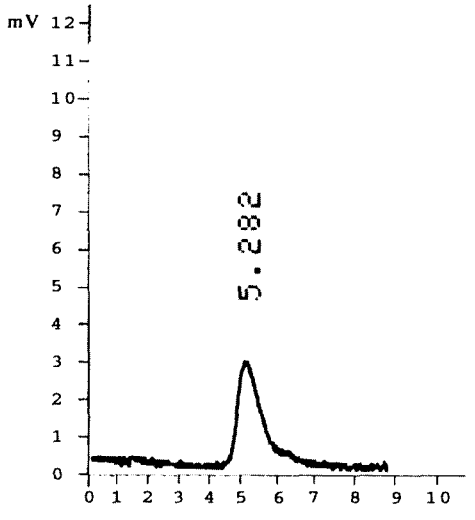


图 2 芦丁对照品色谱图

1.3 样品处理

将木芙蓉叶 10g 用 70% 乙醇 100ml 浸泡,然后以 2000 r/min 离心 5min,收集浸出液至一容量瓶中,边搅拌边加热直至呈浸膏状,用甲醇定容至 10ml,然后以 15000 r/min 再次离心,最后用滤膜过滤备用。

1.4 标准品溶液的配制

准确称取芦丁标准品 20.00mg 于 10ml 容量瓶中,用甲醇定容得储备液浓度为 2.0mg/ml,装入棕色瓶中保存待用,吸取标准平储备液 1.25ml,用甲醇稀释定容至 10ml 得浓度为 0.25mg/ml 溶液备用。

2 方法学评价

2.1 波长的选择

取标准溶液及样品提取液在 RF - 540 检测器上进行光谱扫描,发现在 300 ~ 400nm 间有最大吸收值,而本次实验选用 370nm 处为检测波长。

2.2 标准曲线的绘制

准确吸取浓度为 0.25mg/ml 芦丁标准溶液 1.0,2.0,4.0,6.0,8.0,10.0ml 分别于 10ml 容量瓶,然后用甲醇定容至刻度,混匀,按色谱条件分别进样分析,以 X 峰面积分值为横坐标,进样浓度 Y 为纵坐标,绘制标准曲线,其回归方程为 Y = 0.0001 X + 0.1208,相关系数为 99.8%,该方法再进样量为 (0.5 ~ 5)μg/20ml范围内线性关系良好(如图 3)。

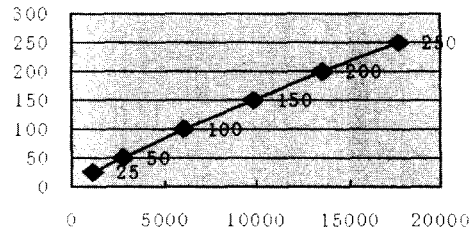


图 3 芦丁的标准曲线 Y = 0.0001X + 0.1208

2.3 稳定性试验

取供试样品溶液 10μl,分别在 0,2,4,6,8,16h 进样,测定芦丁的峰面积 RSD 为 1.03%,表明样品在 16h 内稳定。

2.4 精密度测定

以 0.1mg/ml(2.0μg/20μl)标准溶液为样品,在上述色谱条件下重复进样 6 次分析测定芦丁的峰面积,计算保留时间,进行统计分析,结果表明保留时间与芦丁峰面积的 RSD 均在 5% 以下,具有很好的重现性,色谱条件合理。

2.5 回收率的测定

采用加样回收法,以固定浓度样品溶液为基液,加入对照品溶液,进样 20μl 后测定芦丁峰面积,6 份实验品的回收率,芦丁的回收率为 99.88%,RSD 为 1.54%。

3 结 果

采用 HPLC 法测定木芙蓉中芦丁的样品含量,其样品及标准品基线分离良好;本方法测定在 6h 内稳定,RSD = 1.73%;精密度试验(n = 6)RSD 均在 5

(下转第 883 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

整个治疗过程中,肺泰胶囊无不良事件发生。血常规、肝肾功能、尿常规治疗前后比较均无明显变化。

3 讨论

目前全球范围内肺结核的发病呈增多趋势,尤其是耐药结核的增多使疫情更加严重,遵循结核病的治疗原则,重视初治肺结核的治疗,寻求更有效的抗结核治疗方法和开发新药成为迫切需要。抗结核治疗需要多种药物联合长期使用,不良反应增加,病人依从性差。近年来,寻求有效的毒副反应小的抗结核中药制剂为一个新的研究方向。

肺泰胶囊是湖南泰来药业公司在民间验方的基础上研制而成的一种中药制剂,由百部、黄芩、白及、瓜蒌、川贝母等多味中药组成。白及在试管内对人型结核杆菌有显著的抑制作用,在体外对结核杆菌的生长也有抑制作用[1]。百部醇浸剂在 1:80 浓度下 10min 内可将人型结核杆菌杀死[2]。该制剂具有润肺杀虫、清热化痰的功效,基础实验及Ⅰ、Ⅱ期临床试验证实该药具有良好的抗结核菌作用。在抗结核新药的临床疗效考查中,现常用"早期杀菌活性"这一指标,即观察治疗 2 个月时痰菌阴转率,从而估量药物的灭菌活性[3]。本文临床研究结果表明:肺泰胶囊与抗结核化疗药物(西药)联合治疗初治活动性肺结核,治疗 2 月后痰结核菌阴转率明显高于对照组,表明肺泰胶囊能提高痰结核菌阴转率,加快痰菌阴转速度。结核病为一种传染病,早期的有效治疗可以缩短传染期,减弱痰结核菌阳性病人的传染性,尽早达到控制传染源的目的,从而可能减少结核病的新发病例。本研究中试验组和对照组的耐药病例治疗 6 月后痰结核菌均全部阴转可能与方案中有两种敏感西药有关,肺泰胶囊对耐药结核是否有效还需进一步研究。肺结核的临床疗效考核指标除了痰菌阴转情况外,X 线胸片上病灶和空洞的吸收变化也是非常重要的。本研究中试验组治疗 2 月后 X 线胸片上病灶显吸率明显高于对照组,治疗 6 月后全吸率也高于对照组($P<0.05$),表明肺泰胶囊能提高病灶吸收率,加快病灶吸收好转速度。试验组空洞闭合率在治疗 2 月和 6 月后均明显高于对照组($P<0.001$),表明肺泰胶囊能提高空洞闭合率,加快空洞闭合速度。因此,肺泰胶囊协同化疗药物(西药)能提高抗结核疗效。整个治疗过程中,服用肺泰胶囊的试验组病例未出现不良反应。

本研究结果说明肺泰胶囊用于初治肺结核的辅助治疗是有效的,安全的,与化疗药物联合治疗初治肺结核能增强疗效,加速痰结核菌阴转和病灶吸收好转,提高空洞闭合率。

参 考 文 献

[1] 王本祥. 现代中药药理学[M]. 天津:天津科学技术出版社,1997;802.
[2] 王本祥. 现代中药药理与临床[M]. 天津:天津科技翻译出版公司,2004;579.
[3] 谢惠安,阳国太,林善梓,等. 现代结核病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2000;527.

(上接第 863 页)

以下;芦丁的回收率 99.88%, RSD = 1.54%。

4 讨 论

用 HPLC 法测定木芙蓉中芦丁的样品含量尚未见报道,本文建立了木芙蓉提取物中有效成分的定量方法,与紫外分广度法比较,该方法简单,且能快速、简便、准确地测定木芙蓉中的芦丁的含量,方法的精密度和回收率都较好。

参 考 文 献

[1] 符诗聪,张凤华,史炜锾,等. 木芙蓉有效成分的抗炎实验研究初步报告[J]. 上海第二医科大学学报,2001;21(1):14-16.
[2] 陈文吟,李 锐,叶木荣,等. 肝毒清方单味药水提物的体外抗 HBV 作用[J]. 中药材,1999;22(9):463-465.
[3] 林宇星,施俊人,庄 捷,等. HLPC 法测定木芙蓉中槲皮甙的含量[J]. 福建中医学,2000;12(31):43-44.
[4] 陈 邕. HPLC 测定朱砂莲胶囊中马兜铃酸 A 的含量[J]. 重庆医科大学学报, 2003;28(1):84-86.