

RP-HPLC 同时测定金刚藤 4 个黄酮类成分含量

范银洲¹, 向海艳¹, 罗艳琴², 宋路瑶², 谢扬^{1*}

(1. 南方医科大学药学院, 广州 510515; 2. 南方医科大学南方医院, 广州 510515)

[摘要] **目的:**建立 RP-HPLC 同时测定金刚藤中落新妇苷、新异落新妇苷、槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷、黄杞苷 4 个黄酮类成分的含量。**方法:**Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 流动相乙腈-0.04% 磷酸水溶液, 检测波长 290 nm, 流速 0.7 mL·min⁻¹; 分别采用外标测定法(以落新妇苷、新异落新妇苷、槲皮素-3-O- α -L-Rha、黄杞苷为对照品), 一测多评法(以落新妇苷为内标), 测定金刚藤中 4 个黄酮类化合物的含量。**结果:**外标法测定 4 个黄酮类成分在标准曲线范围内均呈现良好线性关系($r > 0.9999$); 平均加样回收率分别为:落新妇苷 100.8%、新异落新妇苷 100.3%、槲皮素-3-O- α -L-Rha 101.4%、黄杞苷 101.4%, RSD 分别为 1.8%、2.0%、1.4%、1.6%。一测多评法, 新异落新妇苷、槲皮素-3-O- α -L-Rha、黄杞苷相对落新妇苷对照品的校正因子 f 分别为 0.726、0.264、0.801, RSD 分别为 0.62%、0.18%、0.66%。两种方法测得的 4 个黄酮化合物含量相对偏差无显著差异。**结论:**本实验建立 HPLC 外标法同时测定金刚藤中 4 个黄酮化合物含量简便、准确。同时以落新妇苷对照品为内标的一测多评法测得金刚藤中 4 个黄酮化合物的含量与外标法没有显著性差异, 可替代外标法用于金刚藤的质量分析, 为全面评价金刚藤药材的质量提供了依据。

[关键词] 落新妇苷; 新异落新妇苷; 槲皮素-3-O- α -L-Rha; 黄杞苷; 金刚藤

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0062-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100062

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000088.html>

[网络出版时间] 2014-03-07 10:57

Determination of Four Flavonoids in *Smilax china* by RP-HPLC

FAN Yin-zhou¹, XIANG Hai-yan¹, LUO Yan-qin², SONG Lu-yao², XIE Yang^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Science, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an RP-HPLC method for simultaneous determination of contents of the four flavonoids, astilbin, neoisoastilbin, quercetin-3-O- α -L-rhamnoside, engeletin, contained in *Smilax china*. **Method:** Hypersil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m) column was used with the mobile phase of acetonitrile-water (0.04% phosphoric acid) at a flow rate of 0.7 mL·min⁻¹ and the detection wavelength of 290 nm. External standard method (astilbin, neoisoastilbin, quercetin-3-O- α -L-rhamnoside, engeletin used as the reference substance) and quantitative analysis on multi-components by single marker method (astilbin used as the internal reference substance) were adopted to determinate the contents of the four flavones in *S. china*. **Result:** The four flavonoids showed good linear relationship ($r > 0.9999$) within the linear range of calibration curve by the external standard method. The average recoveries of astilbin, neoisoastilbin, quercetin-3-O- α -L-rhamnoside, engeletin were 100.8%, 100.3%, 101.4%, 101.4%, respectively; and the RSD of the above four components were 1.8%, 2%, 1.4%, 1.6%, respectively. The relative correlation factors (RCF) of neoisoastilbin, quercetin-3-O- α -L-

[收稿日期] 20131212(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31240045)

[第一作者] 范银洲, 硕士生, 从事药用植物中生物活性成分的化学研究, Tel:15626462899, E-mail: yzfan2013@126.com

[通讯作者] * 谢扬, 教授, Tel:020-61648593, E-mail: yxie201203@126.com

rhamnoside, engeletin were 0.726, 0.264, 0.801, respectively and the RSD were 0.6%, 0.7%, 1.2%, 1.1%, respectively by the quantitative analysis on multi-components by single marker (QAMS) method. No significant difference between the contents of QAMS method and external standard method was observed. **Conclusion:** The present research established an HPLC method proved to be easy and accurate to determine the contents of the four flavones in *S. china*. There is no significant difference between the contents of the four flavones in *S. china*. in the results of QAMS method and external standard method. The QAMS method could replace the external standard method to determine the contents of the four flavones in *S. china* and can be used for the quality control of *S. china*.

[**Key words**] astilbin; neoastilbin; quercetin-3-*O*- α -L-rhamnoside; engeletin; RP-HPLC; *Smilax china*

金刚藤具有利湿去浊、祛风除痹、解毒散瘀等功效^[1],临床主要用于治疗慢性盆腔炎^[2-4]。金刚藤含有皂苷类、黄酮类、甾醇类等成分^[5-6],有关金刚藤中黄酮类成分的研究已有较多报道^[7-10]。药理学研究表明,黄酮类化合物可能是金刚藤发挥药效的主要物质基础^[11-12],其中,落新妇苷、新异落新妇苷、槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷、黄杞苷为金刚藤的主要黄酮类成分,因此测定金刚藤中主要的黄酮化合物含量来控制其质量具有重要意义,而目前未见相关文献报道。本研究采用 HPLC 同时对金刚藤中此 4 个黄酮化合物定量分析,同时比较与以落新妇苷为内标,测定此 4 个黄酮含量的一测多评法的区别。可同时测定金刚藤 4 个黄酮化合物成分的含量。同时以落新妇苷为内标的一测多评法,与外标法测得的 4 个黄酮化合物成分含量无显著性差异,可替代外标法用于金刚藤的质量分析,两种方法均为全面评价金刚藤药材的质量提供了科学依据。

1 材料

1.1 仪器 Shimadzu LC-20A 型高效液相色谱仪(岛津),UV-3100PC 型紫外-可见分光光度计(上海美普达仪器有限公司),HH-S6 型数字恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂),DZF-6050 型真空干燥箱(巩义市英峪予华仪器厂),FA2204B 型 1/万分析天平(上海佑科仪器仪表有限公司),KH-500B 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

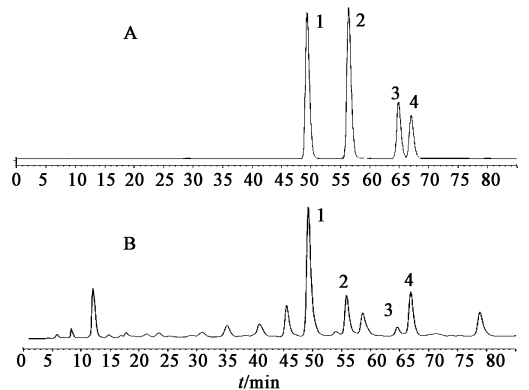
1.2 试药 乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为超纯水。落新妇苷、新异落新妇苷、黄杞苷、槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷对照品(均自制,经结构确证及 HPLC 面积归一法测定,纯度 > 98%)。药材由南方医院药剂科采购部门采购,经南方医科大学中医药学院彭康教授鉴定为百合科植物金刚藤 *Smilax china* L. 的干燥根茎,样本保存在南方医科大学药

学院天然药物化学学科陈列柜,编号为 201206201。

2 方法与结果

2.1 外标测定法

2.1.1 色谱条件 Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.04% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 15 min, 12% ~ 13% B; 15 ~ 85 min, 13% ~ 21% B),检测波长 290 nm,体积流量 0.7 mL·min⁻¹,柱温为室温,见图 1。



A. 对照品; B. 样品; 1. 落新妇苷; 2. 新异落新妇苷;
3. 槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷; 黄杞苷

图 1 金刚藤 HPLC

2.1.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取干燥至恒重的落新妇苷、新异落新妇苷、槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷、黄杞苷对照品,加甲醇制成落新妇苷 0.40 g·L⁻¹、新异落新妇苷 0.40 g·L⁻¹、槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷 0.42 g·L⁻¹、黄杞苷 0.16 g·L⁻¹的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取金刚藤药材 2 g,每次加 70% 乙醇 10 mL,加热回流提取 3 次,时间分别为 2, 2, 1 h,合并提取液,旋转蒸发回收乙醇得金刚藤浸膏,置于冰箱中冷藏 24 h。用适量热水分散金刚藤乙醇浸膏,滤除残渣,滤液用乙醇定容至

10 mL, 得 0.2 g·mL⁻¹ 供试品溶液。

2.1.4 线性关系考察 取混合对照品液, 分别进样 3, 5, 8, 11, 14, 17, 20 μL, 按上述色谱条件测定色谱峰面积, 以对照品进样量 X 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 计算线性回归方程。线性关系见表 1。

表 1 对照品的回归方程、相关系数和线性范围

化合物	回归方程	r	线性范围 /μg
落新妇苷	$Y_1 = 4\ 659\ 806X_1 - 268\ 049$	0.999 9	1.20 ~ 8.00
新异落新妇苷	$Y_2 = 3\ 376\ 709X_2 - 221\ 429$	0.999 9	1.20 ~ 8.00
槲皮素-3- <i>O</i> - α -L-鼠李糖苷	$Y_3 = 1\ 232\ 989X_3 - 130\ 817$	0.999 9	1.26 ~ 8.40
黄杞苷	$Y_4 = 3\ 736\ 133X_4 - 90\ 554$	0.999 9	0.49 ~ 3.24

2.1.5 精密度试验 取对照品混合溶液, 按 2.1.1 下色谱条件, 进样 10 μL, 平行测定 5 次, 测得落新妇苷、新异落新妇苷、槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷、黄杞苷峰面积 RSD 分别为 0.15%, 0.17%, 0.23%, 0.11%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液, 按 2.1.1 下色谱条件, 分别在 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 各进样 10 μL, 测定峰面积, 测得落新妇苷、新异落新妇苷、槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷、黄杞苷峰面积 RSD 分别为 0.16%, 0.22%, 0.27%, 0.18%, 表明供试品液在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一批金刚藤药材 6 份, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件, 进样 10 μL, 测定落新妇苷、新异落新妇苷、槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷、黄杞苷 4 个黄酮的含量分别为 8.1, 5.7, 3.5, 4.5 mg·g⁻¹; RSD 分别为 1.52%, 1.34%, 1.15%, 1.12%, 表明该法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的落新妇苷、新异落新妇苷、槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷、黄杞苷 6 份, 每份 1 g, 再分别精密加入一定量的对照品, 按 2.1.3 项制备样品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件, 进样 10 μL, 测定落新妇苷、新异落新妇苷、槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷、黄杞苷 4 个黄酮的含量并计算平均加样回收率, 结果见表 2。4 个黄酮化合物平均回收率在 100.3% ~ 101.4%, RSD 均 < 2%。

2.1.9 外标法含量测定 取 3 份金刚藤药材, 每份 2 g, 按 2.1.3 项方法配制供试品溶液, 分别精密吸取 4 个黄酮对照品液和供试品液各 15 μL, 注入高效液相色谱仪中, 记录色谱图。由供试品液 4 个黄

酮的峰面积, 根据回归方程分别计算供试品液中 4 个黄酮的含量。落新妇苷、新异落新妇苷、槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷、黄杞苷含量结果分别见表 3。

表 2 金刚藤 4 个黄酮化合物加样回收率

成分	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均 回收率/%	RSD /%
落新妇苷	7.9	8.0	16.0	100.8	1.8
	7.9	8.0	16.1		
	7.9	8.0	15.8		
	7.9	8.0	15.7		
	7.9	8.0	16.0		
	7.9	8.0	16.1		
新异落新妇苷	5.7	5.8	11.4	100.3	2
	5.7	5.8	11.6		
	5.7	5.8	11.4		
	5.7	5.8	11.7		
	5.7	5.8	11.4		
	5.7	5.8	11.6		
槲皮素-3- <i>O</i> - α -L-鼠李糖苷	3.5	3.5	7.0	101.4	1.4
	3.5	3.5	7.0		
	3.5	3.5	7.1		
	3.5	3.5	7.0		
	3.5	3.5	7.1		
	3.5	3.5	7.1		
黄杞苷	4.5	4.5	9.1	101.4	1.6
	4.5	4.5	9.0		
	4.5	4.5	9.0		
	4.5	4.5	9.0		
	4.5	4.5	9.1		
	4.5	4.5	9.2		

表 3 金刚藤 4 个黄酮化合物的含量 ($n=3$)

化合物	平均含量/mg·g ⁻¹
落新妇苷	8.0
新异落新妇苷	5.7
槲皮素-3- <i>O</i> - α -L-鼠李糖苷	3.5
黄杞苷	4.5

2.2 一测多评法 以落新妇苷为内标的一测多评法, 通过测定新异落新妇苷、槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷、黄杞苷的校正因子, 计算这 3 个黄酮的含量, 达到多指标(4 个黄酮的含量)同步测量的目的。

2.2.1 校正因子的测定 取绘制标准曲线的系列

浓度的对照品溶液,注入高效液相色谱仪,以落新妇苷为内标,测定新异落新妇苷、槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷、黄杞苷的校正因子,结果见表4。

表4 相对校正因子

No.	相对校正因子		
	$f_{\text{新异落新妇苷/落新妇苷}}$	$f_{\text{槲皮素-3-O-}\alpha\text{-L-鼠李糖苷/落新妇苷}}$	$f_{\text{黄杞苷/落新妇苷}}$
1	0.727	0.264	0.798
2	0.733	0.266	0.801
3	0.728	0.261	0.802
4	0.731	0.266	0.803
5	0.722	0.263	0.801
6	0.719	0.262	0.801
平均值	0.726	0.264	0.801
RSD/%	0.62	0.66	0.18

2.2.2 一测多评法含量测定结果 取金刚藤药材3份,按2.1.3项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取落新妇苷对照品液、供试品液各15 μL 注入高效液相色谱仪中,记录色谱图。根据相对校正因子,计算有效部位样品中各个成分的含量,落新妇苷、新异落新妇苷、槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷、黄杞苷含量分别如表5所示。

表5 一测多评法测定金刚藤4个黄酮化合物的含量

化合物	平均含量 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
落新妇苷	7.8
新异落新妇苷	5.7
槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷	3.4
黄杞苷	4.3

3 讨论

本研究建立了同时测定金刚藤4个主要黄酮类化合物含量的反相高效液相色谱法,使4个黄酮类化合物获得基线分离,且具有快速、准确、重复性好等特点,为金刚藤的质量控制提供了参考。

实验中还以落新妇苷为对照品,通过一测多评法来测定4个黄酮化合物的含量。结果显示与外标法相比两者没有显著性的差异。本实验中建立的以

落新妇苷对照品为内标的一测多评法具有可行性,只需用落新妇苷对照品,即可进行多指标的同步测定,可替代外标法用于此4个黄酮类化合物质量分析。

本研究建立外标法测定4个黄酮类化合物的含量的方法简便、专属性强、重复性及加样回收率好。在外标法的基础上建立的一测多评法经济实用,可为评价金刚藤药材的质量提供简便、科学的方法。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:290.
- [2] 郭艳. 金刚藤胶囊治疗慢性盆腔炎疗效观察[J]. 中外妇儿健康,2011,19(7):37.
- [3] 沈慧敏,杨越波,方莉,等. 金刚藤胶囊治疗慢性盆腔炎临床疗效观察[J]. 中药材,2007,30(10):1340.
- [4] 马云,罗艳琴,宋路瑶,等. 菝葜各化学部位对大鼠慢性盆腔炎模型的治疗作用[J]. 第三军医大学学报,35(12):1267.
- [5] 肖晶,魏锋,林瑞超. 菝葜属植物的研究进展[J]. 中国药学杂志,2001,36(6):369.
- [6] 徐燕,王海燕,蒋家月,等. 菝葜中的甾体皂苷及其细胞毒活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(11):92.
- [7] 徐秀卉,边聪,金朱明,等. 金刚藤化学成分研究[J]. 黑龙江医药,2011,4(3):387.
- [8] 冯锋,柳文媛,陈优生,等. 菝葜中黄酮和芪类成分的研究[J]. 中国药科大学学报,2003,34(2):119.
- [9] 许婧,李铤,张鹏,等. 金刚藤的黄酮类化学成分[J]. 沈阳药科大学学报,2004,21(6):424.
- [10] 徐燕,梁敬钰,邹忠梅. 菝葜的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(21):2497.
- [11] 舒孝顺,高中洪,杨祥良. 菝葜醋酸乙酯提取物对大鼠和小鼠的抗炎作用[J]. 中国中药杂志,2006,31(3):239.
- [12] 晏绿金,文莉,干国平,等. 菝葜抗炎活性物质筛选研究[J]. 中药材,2008,31(7):1054.

[责任编辑 顾雪竹]