

HPLC同时测定山腊梅清感茶中 4种黄酮苷的含量

白福祖¹, 王云洁¹, 周斌^{2*}

(1. 兰州佛慈制药股份有限公司, 兰州 730046; 2. 江西科技师范大学药学院, 南昌 330013)

[摘要] 目的:建立高效液相色谱方法同时测定山腊梅清感茶中4种黄酮苷含量的方法。方法:采用依利特hypersil ODS2色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈-0.1%冰醋酸为流动相进行梯度洗脱,流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长344 nm,柱温35℃。结果:芦丁在7.012~70.12 mg·L⁻¹线性关系良好($r=0.9996$),平均回收率为100.68%,RSD 3.3%,山柰酚-3-*O*-β-*D*-半乳糖-(6-1)-α-*L*-鼠李糖苷在5.126~51.26 mg·L⁻¹线性关系良好($r=0.9999$),平均回收率为98.48%,RSD 1.7%,山柰酚-3-*O*-芸香糖苷在2.631~26.31 mg·L⁻¹线性关系良好($r=0.9998$),平均回收率为101.82%,RSD 1.9%,紫云英苷在2.634~26.34 mg·L⁻¹线性关系良好($r=0.9999$),平均回收率为97.02%,RSD 1.7%。结论:该方法操作简便,准确,重复性好,可用于山腊梅清感茶的质量控制。

[关键词] 芦丁; 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷; 紫云英苷; 山柰酚-3-*O*-β-*D*-半乳糖-(6-1)-α-*L*-鼠李糖苷; 山腊梅清感茶

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)24-0064-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240064

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141106.1453.017.html>

[网络出版时间] 2014-11-06 14:53

Simultaneous Determination Content of Four Flavonoid Glycosides in Shanlamei Qinggan Cha by HPLC

BAI Fu-zu¹, WANG Yun-jie¹, ZHOU Bin²

(1. Lanzhou Foci Pharmaceutical Co., Ltd, Lanzhou 730046, China;

2. School of Pharmacy, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to establish an HPLC method for simultaneous determination of the content of four flavonoid glycosides in Shanlamei Qinggan Cha. **Method:** Using an Elite hypersil ODS2 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% acetic acid, with flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detective wavelength was at 344 nm and the column temperature was 35℃. **Result:** The standard curve presented a linear range from 7.012-70.12 mg·L⁻¹ for rutin ($r=0.9996$), the average recovery was 100.68% with RSD of 3.27%. The calibration curve was linear in the range of 5.126-51.26 mg·L⁻¹ for kaempferol-3-*O*-β-*D*-galactose-(6-1)-α-*L*-rhamnoside ($r=0.9999$), the average recovery was 98.48% with RSD of 1.7%. The calibration curve was linear in the range of 2.631-26.31 mg·L⁻¹ for kaempferol-3-*O*-rutinoside ($r=0.9998$), the average recovery was 101.82% with RSD of 1.9%. The standard curve presented a linear range from 2.634-26.34 mg·L⁻¹ for astragalgin ($r=0.9999$), the average recovery was 97.02% with RSD of 1.7%. **Conclusion:** The method was fast, accurate and simple in good reproducibility, which could be used to control the quality of Shanlamei Qinggan Cha.

[收稿日期] 20140217(013)

[基金项目] 江西省教育厅项目(12750)

[第一作者] 白福祖,工程师,从事中药新药研究,Tel:13919093307,E-mail:bfuzu@163.com

[通讯作者] *周斌,博士,副教授,从事中药活性成分研究,Tel:15870664871,E-mail:tju_zhoubin@163.com

[Key words] rutin; kaempferol-3-*O*-rutinoside; astragalgin; kaempferol-3-*O*- β -*D*-galactose-(6-1)- α -*L*-rhamnoside; Shanlamei Qinggan Cha

山腊梅清感茶是以山腊梅叶为原料制成的袋泡剂,主要用于治疗和预防外感风热引起的感冒及流行性感。而山腊梅为我国特有的蜡梅科植物,药用部位为其干燥的叶,主要分布于江西德兴、婺源和安徽徽州一带山区,具有清凉排毒、防抗感冒、防暑解暑、消脂降压、预防心脑血管等疾病的作用^[1],其化学成分主要有挥发油^[2]、生物碱^[3]、香豆素^[4]、黄酮类^[5],本课题组首次从山腊梅叶中分离鉴定了3个黄酮苷化合物即山柰酚-3-*O*- β -*D*-半乳糖-(6-1)- α -*L*-鼠李糖苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷和紫云英苷,该内容另文发表。目前未见有关山腊梅清感茶质量控制的文献报道。本文在前期研究的基础上^[6],建立HPLC同时测定山腊梅清感茶中4种黄酮苷含量的方法,可以用来对山腊梅清感茶的质量进行控制。

1 材料

1.1 仪器 1100系列高效液相色谱仪(包括G-1332A在线脱气机,G-1312A高压二元泵,二极管阵列检测器,G-1313A自动进样器,G-1316A智能化柱温箱,1100 series色谱工作站,美国安捷伦科技公司),XS205型电子分析天平(Mettler Toledo, 0.01 mg)。

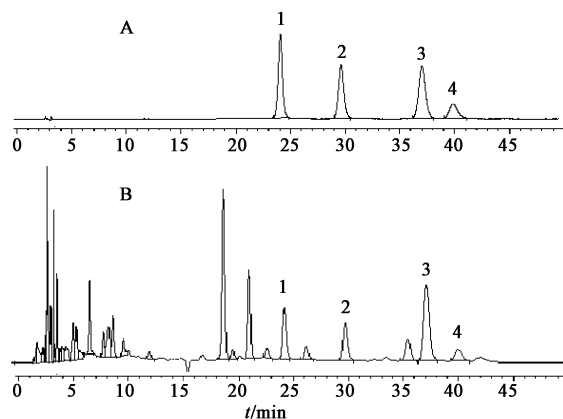
1.2 试剂 芦丁对照品(批号100080-200707)购自中国食品药品检定研究院,山柰酚-3-*O*- β -*D*-半乳糖-(6-1)- α -*L*-鼠李糖苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷和紫云英苷均为本实验室自制,纯度经HPLC检测达到98%以上。山腊梅清感茶由江西新和药业有限公司提供(批号130209)。乙腈和甲醇为色谱纯,购自天津市大茂化学试剂厂,水为超纯水,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Elite hypersil ODS2色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μ m),流动相乙腈(A)-0.1%冰醋酸(B)梯度洗脱(0~11 min,12% A;11~16 min,12%~14% A;16~35 min,14% A;35~40 min,14%~12% A;40~50 min,12% A),柱温35 $^{\circ}$ C,检测波长344 nm,流速1.0 mL \cdot min⁻¹。对照品和样品的色谱图见图1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密称山柰酚-3-*O*- β -*D*-半乳糖-(6-1)- α -*L*-鼠李糖苷,山柰酚-3-*O*-芸香糖苷,紫云英苷和芦丁各14.02,9.86,17.32,11.38 mg置于4个10 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,



1. 芦丁;2. 山柰酚-3-*O*- β -*D*-半乳糖-(6-1)- α -*L*-鼠李糖苷;
3. 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷;4. 紫云英苷

图1 对照品(A)和山腊梅清感茶样品(B)的HPLC

摇匀,作为高浓度贮备液。再依次量取以上贮备液适量于50 mL同一量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀即得低浓度混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取山腊梅清感茶样品粉末(过40目筛)约1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入75%的乙醇25.00 mL,称定质量,超声(100 W, 45 Hz)提取1 h,放冷,再称定质量,补足缺失的质量,摇匀,0.45 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 线性关系考察 精密量取低浓度混合对照品溶液1.0,2.0,4.0,6.0,10.0 mL分别置10 mL量瓶中,用甲醇溶解,定容至刻度,摇匀,作为系列对照溶液。取上述溶液各10 μ L注入色谱仪,以对照品浓度 C (mg \cdot L⁻¹)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,求得回归方程,山柰酚-3-*O*- β -*D*-半乳糖-(6-1)- α -*L*-鼠李糖苷,山柰酚-3-*O*-芸香糖苷,紫云英苷和芦丁分别 $A = 18.16C - 2.27$ ($r = 0.9999$), $A = 19.23C - 0.46$ ($r = 0.9998$), $A = 22.18C - 0.38$ ($r = 0.9999$), $A = 4.26C - 10.52$ ($r = 0.9996$),表明4种黄酮苷化合物分别在5.126~51.26,2.631~26.31,2.634~26.34,7.012~70.12 mg \cdot L⁻¹线性关系良好。

2.4 精密度试验 精密量取混合对照品溶液10 μ L,注入液相色谱仪,连续进样6次,山柰酚-3-*O*- β -*D*-半乳糖-(6-1)- α -*L*-鼠李糖苷,山柰酚-3-*O*-芸香糖苷,紫云英苷和芦丁的峰面积RSD分别为0.8%,0.8%,0.4%,1.3%,结果表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 h 时进样 10 μL , 山柰酚-3-*O*- β -*D*-半乳糖-(6-1)- α -*L*-鼠李糖苷, 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷, 紫云英苷和芦丁的峰面积 RSD 分别为 3.0%, 1.4%, 1.3%, 2.2%, 结果表明, 样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6 重复性试验 称取同一山蜡梅样品粉末 6 份, 按 2.2.2 项下制备供试品溶液, 测定, 结果山柰酚-3-*O*- β -*D*-半乳糖-(6-1)- α -*L*-鼠李糖苷, 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷, 紫云英苷和芦丁含量的 RSD 分别为 1.9%, 1.5%, 2.8%, 2.0%, 表明本方法重复性很好。

2.7 回收率试验 称取已知含量的山蜡梅样品粉末 6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 分别加入山柰酚-3-*O*- β -*D*-半乳糖-(6-1)- α -*L*-鼠李糖苷, 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷, 紫云英苷和芦丁对照品适量, 按 2.2.2 项下方法操作, 进样 10 μL 进行分析, 结果见表 1 所示。

表 1 山蜡梅清感茶中 4 种黄酮苷的回收率试验

样品	样品 中量 / μg	加入量	测得量	回收率	平均值	RSD /%
		/ μg	/ μg	/%	/%	
芦丁	303.31	300.46	593.31	96.52	100.68	3.3
	303.31	300.46	608.28	101.5		
	303.31	300.46	613.96	103.39		
	303.31	300.46	604.73	100.32		
	303.31	300.46	596.02	97.42		
	303.31	300.46	618.58	104.93		
山柰酚-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -半乳糖-(6-1)- α - <i>L</i> -鼠李糖苷	473.10	470.28	937.83	98.82	98.48	1.7
	473.10	470.28	931.67	97.51		
	473.10	470.28	950.81	101.58		
	473.10	470.28	928.75	96.89		
	473.10	470.28	936.42	98.52		
	473.10	470.28	931.95	97.57		
山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷	607.63	600.64	1226.11	102.97	101.82	1.9
	607.63	600.64	1204.79	99.42		
	607.63	600.64	1222.57	102.38		
	607.63	600.64	1231.88	103.93		
	607.63	600.64	1205.57	99.55		
	607.63	600.64	1224.37	102.68		
紫云英苷	192.81	190.28	380.69	98.74	97.02	1.7
	192.81	190.28	376.28	96.42		
	192.81	190.28	381.03	98.92		
	192.81	190.28	376.60	96.59		
	192.81	190.28	372.36	94.36		
	192.81	190.28	377.50	97.06		

2.8 样品测定 称取同一山蜡梅清感茶样品粉末 5 份, 按 2.2.2 项下方法操作, 进样 10 μL 进行分析, 4 种黄酮苷类化合物的含量见表 2 所示。

表 2 山蜡梅清感茶中 4 种黄酮苷的含量 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

样品	山柰酚-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -半乳糖-(6-1)- α - <i>L</i> -鼠李糖苷			紫云英苷
	芦丁	山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷	山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷	
1	549.88	900.27	1312.76	356.48
2	655.87	986.56	1229.58	412.92
3	614.13	951.78	1103.46	387.46

3 讨论

分别比较了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1% 冰醋酸水、甲醇-0.1% 冰醋酸水等流动相, 结果以乙腈-0.1% 冰醋酸水系统梯度洗脱为最佳, 样品中 4 种黄酮苷类物质的分离效果较好, 且与其他物质可达到基线分离。

在考察样品超声、回流和冷浸提取方法时, 发现超声提取方法较好; 在考察超声提取时间、溶剂体积时, 结果为加 25 倍量的甲醇超声提取 1 h, 效果较好。

黄酮及其苷类都是天然植物中具有明确药理作用的化合物^[7], 对其进行定性和定量分析具有重要意义。本试验建立高效液相色谱方法可以同时分析 4 个黄酮苷化合物, 重复性好, 操作简单, 结果准确, 可以作为控制山蜡梅清感茶质量的方法。

[参考文献]

- [1] 张尊敬, 刘忠达. 山蜡梅的成分及药理作用研究近况[J]. 浙江中医杂志, 2009, 44(11): 849.
- [2] 詹忠根, 徐程. 山蜡梅叶挥发油化学成分分析[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(8): 1168.
- [3] 肖炳坤, 刘耀明, 冯淑香, 等. 山蜡梅叶的化学成分研究(1)[J]. 中草药, 2005, 36(2): 187.
- [4] 舒任庚, 李莎莎, 胡浩武, 等. 山蜡梅化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(15): 1134.
- [5] 孙丽仁, 何明珍, 冯育林, 等. 山蜡梅叶的化学成分研究[J]. 中草药, 2009, 40(8): 1214.
- [6] Zhou Bin, Tan Miao, Lu Jing-feng, et al. Simultaneous determination of five active compounds in *Chimonanthus nitens* by double-development HPTLC and scanning densitometry[J]. Chem Cent J, 2012, 6: 46.
- [7] 易文实. 黄酮类化合物的生物活性研究进展[J]. 广州化工, 2012, 40(2): 47.

[责任编辑 顾雪竹]