HPLC 测定龙须藤中 2 种多甲氧基黄酮的含量

易荆丽,张嘉家,周毅生*,赵永恒,王嵩
(广东药学院,广州 510006)

[摘要] **目的**:建立 HPLC 测定龙须藤中 5,7,3′,4′,5′-五甲氧基黄酮和 5,6,7,5′-四甲氧基-3′,4′-亚甲二氧基含量的方法。**方法**:DIKMA PlatisilODS C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0 min,25% A;15 min,45% A;40 min,50% A),流速 0.8 mL·min^{-1},检测波长 324 nm。**结果**:5,7,3′,4′,5′-五甲氧基黄酮和 5,6,7,5′-四甲氧基-3′,4′-亚甲二氧基分别在 0.008 4 ~ 0.336 0 μg(r = 0.999 9),0.013 4 ~ 0.536 0 μg(r = 0.999 7)与峰面积呈良好的线性关系,平均回收率分别为 99.41%,98.65%,RSD 分别为 0.57%,1.01%。**结论**:该方法操作简单准确,分离效果、精密度和重复性好,适合于测定该药材中 5,7,3′,4′,5′-五甲氧基黄酮和 5,6,7,5′-四甲氧基-3′,4′-亚甲二氧基的含量。

[关键词] 高效液相色谱;龙须藤;多甲氧基黄酮;含量测定
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)18-0155-03
[doi] 10.11653/syfj2013180155

Determination of Two Polymethoxylated Flavonoids in *Bauhinia championii* by HPLC

YI Jing-li, ZHANG Jia-jia, ZHOU Yi-sheng, ZHAO Yong-heng, WANG Song*
(*Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou* 510006, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To establish a quantitative determination method of HPLC for two polymethoxylated flavonoids in *Bauhinia championii*. **Method**: The determination was performed on a DIKMA Platisil ODS column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.1% phosphoric acid as the mobile phase by gradint elution (0 min, 25% A; 15 min, 45% A; 40 min, 50% A). The flow rate was 0.8 mL·min^{-1} and the detection wavelength was set at 324 nm. **Result**: The calibration curves were linear in the range of 0.008 4-0.336 0 μg (for 5, 7, 3′, 4′, 5′-pentamethoxy flavone, r = 0.999 9), 0.013 4-0.536 0 μg (for 3′, 4′-methylenedioxy-5′, 5, 6, 7-tetramethoxyflavone, r = 0.999 7). The average recoveries were 99.41% (RSD 0.57%) and 98.65% (RSD 1.01%) respectively. **Conclusion**: This method is simple and accuracy with good separation and reproducibility. It can be used as the quality control of the polymethoxylated flavonoids in *Bauhinia championii*.

[**Key words**] HPLC; *Bauhinia championii*; polymethoxylated flavonoids; quantitative determination

龙须藤为豆科苏木亚科羊蹄甲属植物龙须藤的干燥藤茎,别名过岗圆龙、羊蹄藤、九龙藤、五花血藤、梅花入骨丹、燕子尾、黑皮藤,性味甘、微苦、温,具有祛风除湿、行气活血的功效[1]。该药在我国多个少数民族广泛用于治疗风湿性关节炎,跌打损伤,疗效显著[2]。但目前对龙须藤的基础研究还不够深入,其抗风湿性关节炎的有效成分不清,缺乏以有效成分为基础的质量标准,疗效难以保证。鉴于龙须藤的化学成分主要为黄酮类、氰苷、没食子酸等[3-4],多甲氧基黄酮类成分具有镇痛抗炎作用[5],且目前龙须藤中 5,7,3′,4′,5′-五甲氧基黄酮和 5,6,7,5′-四甲氧基-3′,4′-亚甲二氧基的含量情况未见

[收稿日期] 20121024(008)
[第一作者] 易荆丽,硕士研究生,从事中药新剂型与新技术研究,Tel:020-39352168,E-mail:yijingli2008@163.com
[通讯作者] *周毅生,教授,从事药物新剂型与新技术研究,Tel:020-39352168,E-mail:yishzhou@yahoo.com.cn

报道。本实验采用 HPLC 梯度洗脱法对龙须藤药材中这 2 种多甲氧基黄酮进行含量测定,为提高龙须藤药材的质量标准提供依据。

1 材料

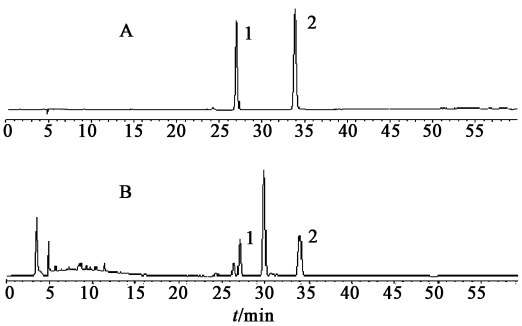
美国 Waters 2695-2996 高效液相色谱仪(包括 PDA 检测器、四元泵、在线真空脱气机、Empower 色谱工作站),SB-100D 型超声波清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司),AY120 型电子天平(日本岛津公司),微孔滤膜(上海市新亚净化器件厂)。

龙须藤药材由广东罗浮山国药股份有限公司提供,批号为 20110511,另 2 批采自广西隆安和桂林,批号分别为 20110523,20110528,经广东药学院中药鉴定教研室李书渊教授鉴定为豆科苏木亚科羊蹄甲属植物龙须藤 *Bauhinia championii* (Benth.) Benth. 的干燥藤茎。

5,7,3′,4′,5′-五甲氧基黄酮和 5,6,7,5′-四甲氧基-3′,4′-亚甲二氧基(实验室自制,面积归一化法计算纯度为 98%,97%),乙腈、甲醇为色谱纯(美国 DIKMA 公司),磷酸为分析纯(天津市大茂化学试剂厂),蒸馏水(屈臣氏基团有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适应性试验 DIKMA PlatisilODS C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0 min,25% A;15 min,45% A;40 min,50% A),流速 0.8 mL·min^{-1},检测波长 324 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。在此色谱条件下,5,7,3′,4′,5′-五甲氧基黄酮和 5,6,7,5′-四甲氧基-3′,4′-亚甲二氧基 2 种成分色谱峰理论板数不低于 26 000,峰间分离度良好。结果见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;1. 5,7,3′,4′,5′-五甲氧基黄酮;2. 5,6,7,5′-四甲氧基-3′,4′-亚甲二氧基

图 1 龙须藤 HPLC

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒质量的 5,7,3′,4′,5′-五甲氧基黄酮 4.20 mg,5,6,7,5′-四甲氧基-3′,4′-亚甲二氧基 5.36 mg 分别置于 2 个 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 2 种对照品的储备液,5,7,3′,4′,5′-五甲氧基黄酮(42.00 mg·L^{-1}),5,6,7,5′-四甲氧基-3′,4′-亚甲二氧基(53.60 mg·L^{-1})。取前者 2 mL、后者 2.5 mL 置同一 5 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液,其中 5,7,3′,4′,5′-五甲氧基黄酮质量浓度为 16.80 mg·L^{-1},5,6,7,5′-四甲氧基-3′,4′-亚甲二氧基质量浓度为 26.80 mg·L^{-1}。

2.2.2 供试品溶液的制备 取龙须藤药材于 60 ℃下烘 3 h,粉碎,过 40 目筛,精确称取约 3 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,超声处理(功率 100 W,频率 50 kHz)60 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 线性关系的考察 分别精密吸取 **2.2.1** 项下的混合对照品溶液 0.5,1,2,5,10,15,20 μL,注入高效液相色谱仪,按 **2.1** 项下色谱条件测定各色谱峰峰面积。以峰面积 Y 为纵坐标,成分的含量 X(μg)为横坐标进行线性回归,得 5,7,3′,4′,5′-五甲氧基黄酮和 5,6,7,5′-四甲氧基-3′,4′-亚甲二氧基的回归方程分别为 $Y = 4.823\ 8 \times 10^6 X - 6.249\ 4 \times 10^3$ ($r = 0.999\ 9$),$Y = 4.451\ 6 \times 10^6 X - 7.193\ 2 \times 10^3$ ($r = 0.999\ 7$)。结果表明 5,7,3′,4′,5′-五甲氧基黄酮进样量在 0.008 4 ~ 0.336 0 μg,5,6,7,5′-四甲氧基-3′,4′-亚甲二氧基进样量在 0.013 4 ~ 0.536 0 μg 与峰面积线性关系良好。

2.4 精密度考察 精密吸取对照品溶液 10 μL 连续进样 5 次,测定 5,7,3′,4′,5′-五甲氧基黄酮、5,6,7,5′-四甲氧基-3′,4′-亚甲二氧基色谱峰峰面积的 RSD 分别为 1.10%,1.40%,表明精密度良好。

2.5 稳定性考察 取龙须藤药材供试品溶液于制备后 0,2,4,8,16,24 h 进样,测定 5,7,3′,4′,5′-五甲氧基黄酮、5,6,7,5′-四甲氧基-3′,4′-亚甲二氧基色谱峰峰面积,峰面积 RSD 分别为 0.98%,0.57%,表明龙须藤药材供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.6 重复性考察 取同一批龙须藤药材样品 6 份,按 **2.2.2** 项下方法操作,按 **2.1** 项下色谱条件,各取 10 μL 进样,测定峰面积,计算药材中 5,7,3′,4′,5′-五甲氧基黄酮、5,6,7,5′-四甲氧基-3′,4′-亚甲二氧基的平均含量分别为 0.429 8 mg·g^{-1}($n = 6$,RSD 1.20%),0.482 7 mg·g^{-1}($n = 6$,RSD 0.51%)。表明方法的重复性良好。

2.7 回收率试验 取已知浓度的龙须藤样品粉末

约 1 g,共 12 份,精确称定,按表 2 所示,样品中分别精确加入质量浓度为 42.00 mg·L^{-1}的 5,7,3′,4′,5′-五甲氧基黄酮对照品溶液 10 mL[6],质量浓度 53.60 mg·L^{-1}的 5,6,7,5′-四甲氧基-3′,4′-亚甲二氧基对照品溶液 9 mL,按 **2.2.2** 项下方法制备供试品溶液,按 **2.1** 项下色谱条件测定,计算 2 种成分的平均回收率,结果见表 1。

表 1　龙须藤样品中 2 种成分加样回收率试验

成分	称药量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测定量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
A	1.003 6	0.431 3	0.420 0	0.851 7	100.10	99.41	0.57
	1.002 4	0.430 8	0.420 0	0.848 7	99.50		
	1.002 8	0.431 0	0.420 0	0.845 0	98.57		
	1.006 1	0.432 4	0.420 0	0.852 2	99.95		
	1.001 3	0.430 4	0.420 0	0.847 3	99.26		
	1.007 9	0.433 2	0.420 0	0.849 3	99.07		
B	1.004 6	0.484 9	0.482 4	0.958 8	98.24	98.65	1.01
	1.003 9	0.484 6	0.482 4	0.962 3	99.03		
	1.002 7	0.484 0	0.482 4	0.966 7	100.06		
	1.005 4	0.485 3	0.482 4	0.964 2	99.27		
	1.006 8	0.486 0	0.482 4	0.959 2	98.09		
	1.004 1	0.484 7	0.482 4	0.953 6	97.20		

注:表中 A 为 5,7,3′,4′,5′-五甲氧基黄酮,B 为 5,6,7,5′-四甲氧基-3′,4′-亚甲二氧基。表 2 同。

2.8　不同产地龙须藤药材含量测定　取 3 个不同产地龙须藤样品,按 **2.2.2** 项下方法操作,按 **2.1** 项色谱条件测定,计算这 2 种多甲氧基黄酮的含量,结果见表 2。

表 2　不同产地龙须藤中多甲氧基黄酮类成分的平均含量($n=3$)

mg·g^{-1}

产地及批号	A	B
广东惠州(20110511)	0.429 8	0.482 7
广西隆安(20110523)	0.315 9	0.353 6
广西桂林(20110528)	0.355 7	0.341 5

3　讨论

3.1　检测波长的选择　HPLC-PDA 分析结果表明,2 个黄酮指标成分最大吸收波长分别为 324,332.4 nm,相差不是很大,两种成分在 324 nm 检测条件下能满足灵敏度要求,色谱峰数量较多,峰型较好且基线稳定,故选择 324 nm 为检测波长。

3.2　提取方法的选择　供试品溶液的配置为对龙须藤中 2 种多甲氧基黄酮的提取,曾采用超声、热回流、酸水解提取法[7],结果酸水解法效果最好,热回流提取效果差于超声提取(可能因为多甲氧基黄酮在加热条件下结构会发生变化),考虑到超声提取法简便快捷,故最终选择超声提取法。分别以不同提取时间(20,40,60 min)提取[8]的结果无明显差异,但为保证提取完全,故采用超声处理 60 min 为提取方法。

3.3　流动相的选择　考察了甲醇-水[9]、乙腈-水[9]及乙腈-不同浓度的磷酸[10]溶液对样品分离的影响,发现乙腈-磷酸溶液对多甲氧基黄酮类成分的分离较好:保留时间适宜,峰型好,有效改善拖尾效应;采用梯度洗脱可明显改善特征峰的分离度,故最终选用乙腈-0.1% 磷酸溶液梯度洗脱法。

采用此含量测定方法对 3 个产地的龙须藤药材中 2 种多甲氧基黄酮成分进行测定,由结果看出不同产地的药材中这 2 种黄酮含量存在差异,这可能与生长环境、采收时间、加工过程等因素有关。这对龙须藤药材质量标准的建立和龙须藤制剂的开发利用提供了有益的参考。

[参考文献]

[1] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准. 第 2 册[M]. 广州:广东科技出版社,2004:114.

[2] 贾敏如,李星炜. 中国民族药志要[M]. 北京:中国医药科技出版社,2005:85.

[3] CHIEN C C, YUH P C, HONG Y H, et al. New flavones from *Bauhinia championii* Benth[J]. Chem Pharm Bull, 1984, 32(1):166.

[4] CHIEN C C, YUH P C, HONG Y H, et al. Bauhinin, A new nitrile glucoside from bauhinia championii[J]. J Nat Prod, 1985, 48(6):933.

[5] 周芳,彭朵花,杜方麓,等. 多甲氧基黄酮的化学成分及药理作用[J]. 中南药学,2008,6(6):734.

[6] 邹兵,刘玉强,才谦. 不同地区锁阳药材及饮片中儿茶素的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):69.

[7] 叶蕻芝,陈鹏程,杨建萍,等. HPLC 测定梅花入骨丹中的没食子酸和槲皮素含量[J]. 福建中医药大学学报,2011,21(1):35.

[8] 梁美宜,黄韵然,周毅生,等. HPLC 法测定黄藤素结肠定位片中盐酸巴马汀的含量及有关物质的检查[J]. 西北药学杂志,2012,27(4):324.

[9] 徐欢,陈海芳,介磊,等. HPLC 法测定枳壳中川陈皮素、红橘素的含量[J]. 药物分析杂志,2009,29(9):1411.

[10] 徐伟,郑海音,洪振丰,等. RP-HPLC 测定龙须藤中 4 种黄酮类成分的含量[J]. 中国现代应用药学杂志,2009,26(9):763.

[责任编辑　顾雪竹]