

RP-HPLC 测定急性子中 2 种黄酮苷成分的含量

裴慧^{1,2}, 朱玲英², 钱士辉^{1,2*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210046; 2. 江苏省中医药研究院, 南京 210028)

[摘要] 目的: 建立急性子药材中 2 种新黄酮苷类成分槲皮素-3-*O*-[(6''-*O*-咖啡酸酯)- α -L-鼠李糖-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖基]-5-*O*- β -D-葡萄糖苷(化合物 I)和槲皮素-3-*O*-[α -L-鼠李糖-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖基]-5-*O*- β -D-葡萄糖苷(化合物 II)的含量测定方法。方法: 采用反相高效液相色谱法, AlltimaTM-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 甲醇-0.1% 冰醋酸水溶液为流动相进行梯度洗脱(0~10 min, 25%~28% A; 11~12 min, 28%~34% A; 13~20 min, 34%~35% A; 21~28 min, 35%~41% A; 29~35 min, 41~25% A), 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹, 柱温 35 $^{\circ}$ C, 检测波长 345 nm。结果: 化合物 I、II 的线性范围分别为 0.210~4.200 μ g($r=0.999\ 0$), 0.206~4.120 μ g($r=0.999\ 8$); 加样回收率($n=6$)分别为 98.26%, 101.73%, RSD 分别为 1.44%, 1.84%。结论: 首次采用 RP-HPLC 对急性子药材中这 2 种黄酮苷类成分进行了含量测定, 该方法准确、简便, 具有良好的重复性和稳定性, 为急性子药材质量标准的建立提供了参考。

[关键词] 急性子; 黄酮苷; 反相高效液相色谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0131-04

RP-HPLC Determination of Two Flavonoids in Seeds of *Impatiens balsamina* L.

PEI Hui^{1,2}, ZHU Ling-ying², QIAN Shi-hui^{1,2*}

(1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a RP-HPLC method for simultaneous determination of two flavonoids, quercetin-3-*O*-[(6''-*O*-caffeoyl)- α -L-rhamnose-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl]-5-*O*- β -D-glucopyranoside (compound I) and quercetin-3-*O*-[α -L-rhamnose-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl]-5-*O*- β -D-glucopyranoside (compound II) in the seeds of *Impatiens balsamina*. **Method:** An AlltimaTM-C₁₈ column(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) was used at 35 $^{\circ}$ C with the mobile phases of methanol-water(containing 0.1% acetic acid) in gradient manner(0-10 min, 25%-28% A, 11-12 min, 28%-34% A, 13-20 min, 34%-35% A, 21-28 min, 35%-41% A, 29-35 min, 41-25% A). The flow rate was 1.0 mL \cdot min⁻¹, and the detection wavelength was 345 nm. **Result:** The linearity was in the range of 0.210-4.200 μ g and 0.206-4.120 μ g, the correlation coefficients($n=6$) were 0.999 0 and 0.999 8; the average recoveries($n=6$) were 98.26% and 101.73% for two flavonoids respectively. **Conclusion:** Determination of two flavonoids in the seeds of *Impatiens balsamina* was developed for the first time, and provided a reference for the quality standard of it.

[Key words] *Impatiens balsamina*; flavonoids; RP-HPLC; quantitative determination

[收稿日期] 20101207(004)

[基金项目] 江苏省公益研究项目(BM2006104)

[第一作者] 裴慧, 硕士研究生, 研究方向: 中药品质评价, E-mail: njph1987@126.com

[通讯作者] * 钱士辉, 研究员, Tel: 025-85639644, E-mail: njqsh2005@126.com

急性子为凤仙花科凤仙花属植物凤仙花 *Impatiens balsamina* L. 的干燥成熟种子, 为一常用传统中药, 被历年版《中国药典》所收载。急性子始载于《救荒本草》, 在小桃红条下记载有: “人家园圃多种, 今处处有之。苗高尺许, 叶似桃叶而旁边有细锯齿。开红花, 结实形类桃样, 极小, 有子似萝卜子, 取

之易进散俗称急性子”。夏、秋季果实成熟而未开裂时采收,晒干,搓出种子,除去果皮及杂质而得。其微苦、辛,温;有小毒。归肺,肝经。具有破血,软坚,消积的功效^[1],急性子在临床上可用于避孕^[2]、终止早孕^[3]、癌症、肿瘤^[4]、闭经、骨质增生^[5]等的治疗。现代药理学研究表明,急性子具有促透皮^[6]、抗生育、抗肿瘤、抗癌、抗菌^[7]、抗氧化^[8]等作用。本课题组从急性子中分离得到 2 种新黄酮苷类化合物,经理化性质和波谱学数据分析鉴定了它们的结构,分别为槲皮素-3-O-[(6"-O-咖啡酸酯)- α -L-鼠李糖-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖基]-5-O- β -D-葡萄糖苷(化合物 I)和槲皮素-3-O-[\mathbf{\alpha}-L-鼠李糖-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖基]-5-O- β -D-葡萄糖苷(化合物 II),这 2 种化合物为急性子中主要的黄酮苷类成分。本文首次采用 RP-HPLC 测定急性子药材中这 2 种黄酮苷类成分的含量,为急性子药材质量标准的建立提供了参考。

1 材料

Waters 2695 高效液相色谱仪;Waters 996 二极管阵列紫外检测器;Empower 化学工作站(美国沃特世公司);AlltimaTM-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m);METTLER TOLEDO AT-201 1/10 万电子天平

(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);BUCHI R-200 旋转蒸发仪(瑞士步琪公司);甲醇为色谱纯(江苏汉邦科技有限公司);水为重蒸馏水(Milli-Q 纯水器)。

不同来源急性子药材共 11 批,购于南京市各大药房,经江苏省中医药研究院钱士辉研究员鉴定为凤仙花属植物凤仙花 *I. balsamina* 的种子。

2 化合物 I、II 的提取与分离

急性子 16 kg,用 80% 和 60% 乙醇加热回流分别提取 2 次,减压回收乙醇至无醇味,用水分散后用正丁醇萃取。得到正丁醇部分浸膏 160 g,用热水溶解,经 D101 大孔树脂吸附,依次用水、10%,30%,50%,70%,95% 乙醇洗脱。取 30% 乙醇部分浸膏 40 g 上硅胶柱色谱,用氯仿-甲醇(100:0,95:5,10:1,8:2,7:3,6:4,5:5)及纯甲醇洗脱,各部分再经硅胶谱、凝胶柱色谱、反相柱色谱分离。反复分离纯化、重结晶得化合物 I (70 mg)、化合物 II (50 mg)。经¹H-NMR、¹³C-NMR,MS,IR 和 UV 等光谱鉴定其结构(图 1),相关信息及波谱数据的归属见表 1。归一化法测得它们的纯度均大于 98%。

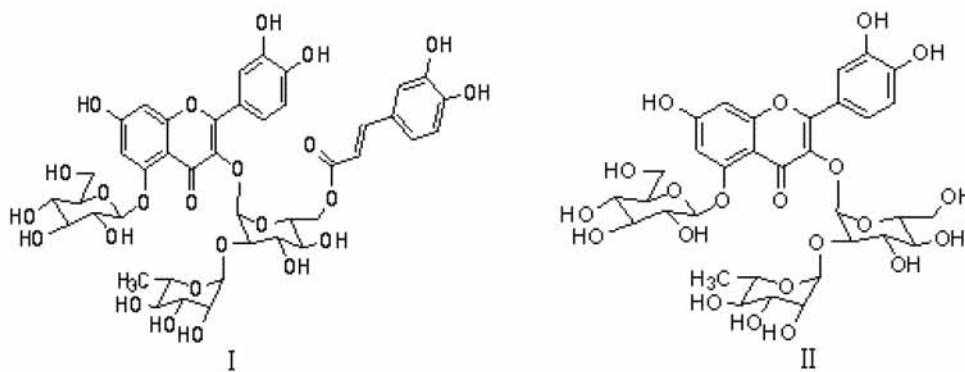


图 1 槲皮素-3-O-[(6"-O-咖啡酸酯)- α -L-鼠李糖-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖基]-5-O- β -D-葡萄糖苷(I);
槲皮素-3-O-[\mathbf{\alpha}-L-鼠李糖-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖基]-5-O- β -D-葡萄糖苷(II)

3 含量测定

3.1 色谱条件 采用 AlltimaTM-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),流动相甲醇(A)-0.1% 冰醋酸(B)梯度洗脱(0~10 min,25%~28% A;11~12 min,28%~34% A;13~20 min,34%~35% A;21~28 min,35%~41% A;29~35 min,41~25% A;36~45 min,25% A);流速 1.0 mL \cdot min⁻¹,检测波长 345 nm,柱温 35 $^{\circ}$ C,进样量 20 μ L。在选定的色谱条件下,对照品和样品的 HPLC 图见图 2。

3.2 对照品储备液的制备 分别精密称取对照品化合物 I,II 适量,置同一 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,制成浓度分别为 0.105(化合物 I),0.103 g \cdot L⁻¹(化合物 II)的混合对照品储备液。
3.3 供试品溶液的制备 称取干燥急性子药材粉末(40 目筛)1.0 g 于滤纸筒内,置于索氏提取器中,加石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)80 mL,加热回流提取至无色,弃去石油醚液。药渣挥干溶剂,再加甲醇 100 mL,加热回流提取至无色,回收甲醇,浓缩提取液,残渣用

表 1 化合物 I 和 II 的波谱数据(DMSO- d_6)

No.	I		II	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
2	154.4		154.2	
3	134.6		135.2	
4	172.9		173.3	
5	158.9		159.2	
6	103.8	6.75(1H, d, 2.1)	103.7	6.73(1H, d, 2.0)
7	162.8		162.9	
8	97.6	6.56(1H, d, 2.1)	97.8	6.59(1H, d, 2.0)
9	157.4		157.8	
10	108.2		108.4	
1'	121.4		121.9	
2'	116.0	7.49(1H, s)	116.3	7.50(1H, d, 2.0)
3'	144.9		145.3	
4'	148.1		148.4	
5'	115.1	6.80(1H, d, 8.5)	115.5	6.82(1H, d, 8.5)
6'	121.4	7.51(1H, d, 8.5)	121.8	7.58(1H, dd, 8.5, 2.0)
5-O-glucose				
1''	104.5	4.75(1H, d, 7.5)	104.4	4.78(1H, d, 8.0)
2''	73.8	3.38(1H, m)	74.0	3.37(1H, m)
3''	75.8	3.30(1H, m)	76.2	3.32(1H, m)
4''	69.8	3.21(1H, m)	70.1	3.23(1H, m)
5''	77.8	3.34(1H, m)	78.0	3.36(1H, m)
6''	61.0	3.76(1H, m)	61.1	3.75(1H, m)
		3.57(1H, m)		3.57(1H, m)
3-O-glucose				
1'''	97.7	5.67(1H, d, 7.5)	98.0	5.65(1H, d, 7.5)
2'''	76.9	3.55(1H, m)	77.7	3.43(1H, m)
3'''	77.1	3.49(1H, m)	77.8	3.50(1H, m)
4'''	70.2	3.29(1H, m)	71.1	3.44(1H, m)
5'''	77.8	3.34(1H, m)	77.8	3.10(1H, m)
6'''	63.1	4.22(1H, m)	61.0	3.32(2H, m)
		4.08(1H, m)		
rhamnose				
1''''	100.5	5.09(1H, s)	100.9	5.09(1H, s)
2''''	70.7	3.44(1H, m)	70.8	3.12(1H, m)
3''''	70.7	3.74(1H, m)	71.1	3.74(1H, m)
4''''	72.0	3.09(1H, m)	72.4	3.11(1H, m)
5''''	68.3	3.69(1H, m)	68.6	3.69(1H, m)
6''''	17.1	0.70(3H, d, 6.0)	17.5	0.72(3H, d, 6.0)
caffeoyl				
1	166.3			
2	113.7	6.07(1H, d, 15.8)		
3	145.1	7.25(1H, d, 15.8)		
4	125.5			
5	114.9	6.95(1H, d, 1.5)		
6	145.6			
7	148.4			
8	116.0	6.72(1H, d, 8.3)		
9	121.3	6.73(1H, dd, 1.5, 8.3)		

甲醇转移溶解并定容至 10 mL 量瓶,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

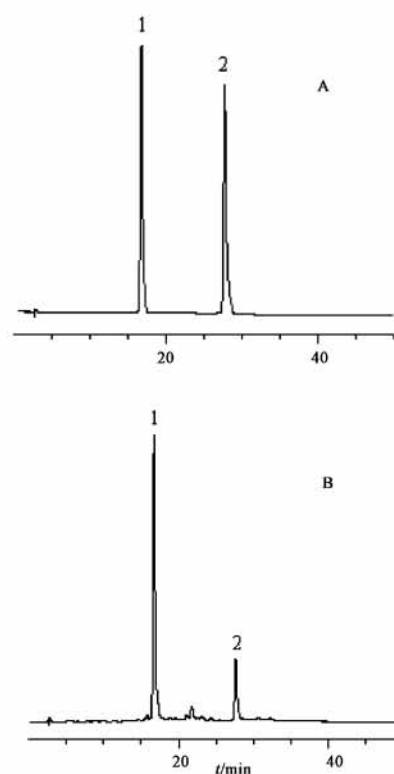


图 2 对照品(A)及急性子样品(B)HPLC

1. 槲皮素-3-O-[(6''-O-咖啡酸酯)- α -L-鼠李糖-(1~2)- β -D-葡萄糖基]-5-O- β -D-葡萄糖苷(化合物 I); 2. 槲皮素-3-O-[\mathbf{\alpha}-L-鼠李糖-(1~2)- β -D-葡萄糖基]-5-O- β -D-葡萄糖苷(化合物 II)

3.4 线性关系的考察 依次精密吸取混合对照品储备液 2, 5, 10, 20, 30, 40 μL 注入高效液相色谱仪, 测定峰面积。以峰面积积分为纵坐标 (Y), 对照品进样量 (μg) 为横坐标 (X), 进行线性回归。回归方程分别为化合物 I $Y = 1.18 \times 10^6 X + 1.13 \times 10^5$ ($r = 0.9990$), 线性范围 0.210 ~ 4.200 μg ; 化合物 II $Y = 1.22 \times 10^6 X - 2.09 \times 10^4$ ($r = 0.9998$), 线性范围 0.206 ~ 4.120 μg 。

3.5 精密度试验 精密吸取混合对照品储备液 20 μL , 连续进样 6 次, 测定峰面积, 以峰面积计算化合物 I、II 峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 0.884%, 0.893%。表明仪器精密度良好。

3.6 稳定性试验 取同一批号(江苏盱眙 070301) 供试品溶液分别于 0, 2, 4, 8, 12 h 进样 20 μL , 测定峰面积, 化合物 I, II 峰面积的 RSD ($n = 5$) 分别为 1.2%, 2.1%。结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

3.7 重复性试验 精密称取同一批号(江苏盱眙 070301) 急性子药材 1.0 g, 平行 6 份, 按 3.3 项下制

得供试品溶液,分别取 20 μL 注入色谱仪测定。化合物 I, II 含量的平均值($n=6$)分别为 0.131%, 0.025%, RSD 分别为 1.8%, 2.4%。表明本方法重复性良好。

3.8 加样回收率试验 取已知含量(化合物 I, II 含量分别为 0.131%, 0.025%)的急性子药材(江苏盱眙 070301)6 份,每份 0.5 g,分别向其中加入 2 种化合物的单一对照品甲醇溶液(化合物 I, II 浓度分别为 0.66, 0.21 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)各 1 mL,按 3.3 项下方法操作,制得 6 份加标溶液,进样 20 μL ,计算回收率。结果化合物 I, II 平均回收率分别为 98.26%, 101.73%, RSD 分别为 1.44%, 1.84% ($n=6$)。

3.9 样品含量测定 取不同产地不同批号的急性子药材按 3.3 项下方法制备供试品溶液,平行 3 份,在上述色谱条件下进样,记录色谱图,按外标法以峰面积计算样品中化合物 I, II 的平均含量,结果见表 2。

表 2 11 批急性子药材中化合物 I, II 的平均含量($n=3$) %

样品来源	批号	化合物 I	化合物 II
安徽	011020	0.176	0.017
安徽	071201	0.196	0.034
安徽	081127	0.196	0.038
安徽	090315	0.184	0.037
安徽	100115	0.202	0.022
安徽	100129	0.116	0.023
安徽	100401	0.164	0.014
安徽	100410	0.190	0.031
河北	060310	0.124	0.015
江苏	060410	0.193	0.018
盱眙	070301	0.131	0.026

4 讨论

4.1 流动相的选择 本试验比较了甲醇-水、甲醇-0.1% 冰醋酸 2 种流动相体系对各组分分离的影响,结果表明在水相中加入 0.1% 的冰醋酸之后,各组分色谱峰的峰形和分离度均达到要求,梯度洗脱比等度洗脱分离效果好,分析时间短。化合物 I, II 分子中有酚羟基,呈酸性,在流动相中加入少量酸可以抑制分子解离,防止峰拖尾,获得好的峰形。

4.2 提取方法的选择 本试验分别比较了索氏提取、水浴加热回流提取、超声提取 3 种方法,结果表明索氏提取效果较好;比较了甲醇、乙醇、60% 甲醇和 60% 乙醇的提取效果,结果表明脱脂后以甲醇提

取效果最佳,杂质峰少,化合物 I, II 含量高;选择甲醇作为提取溶剂,进一步对不同提取时间 2, 4, 6 h 进行了考察,结果发现提取 4 h 后化合物 I, II 含量不再增加,就确定提取时间为 4 h。

4.3 检测波长的选择 分别对化合物 I, II 的对照品溶液做紫外波长扫描,发现化合物 I 在 347.6 nm、化合物 II 在 334.5 nm 处具有最大吸收波长。综合考虑,选取 345 nm 为检测波长,色谱的分离最为理想。

4.4 药材含量分析 对 11 批药材进行了含量测定,发现药材中均含有化合物 I 和 II,化合物 I 的平均含量为 0.170%, 最低为 0.116%, 最高为 0.202%。化合物 II 的平均含量为 0.025%, 最低为 0.014%, 最高为 0.038%, 不同产地及同产地不同批号的急性子药材中化合物 I, II 的含量差异较大,可能与药材的种植、采集、加工过程、气候密切相关,待进一步的研究。

4.5 小结 首次采用 RP-HPLC 对急性子药材中 2 种新黄酮苷类成分进行了含量测定,该方法简便、准确,化合物 I, II 均能达到基线分离,重复性及回收率较好,结果可靠,为急性子药材质量标准的建立提供了参考。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:247.
- [2] 王浴生. 中药药理与应用[M]. 北京:人民卫生出版社, 1983:799.
- [3] 赵良倩. 中西医结合终止早孕 120 例临床观察[J]. 江苏中医药, 2002, 23(9):25.
- [4] 李秉英. 自拟参河口服液结合化疗治疗晚期消化道肿瘤临床观察[J]. 山西中医, 1993, 9(5):11.
- [5] 马有运. 急性子临床应用举隅[J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(1):78.
- [6] 郝勇等. 急性子乙醇提取液促透皮实验研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(7):856.
- [7] 郭晓庄. 有毒中药大辞典[M]. 天津:天津科技翻译出版公司, 1992:399.
- [8] 徐艳, 张立军. 急性子提取物抗氧化活性的体外研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10):2598.

[责任编辑 蔡仲德]