

HPLC法同时测定鹅绒藤中2种黄酮类成分的含量

冯建勇^{1*}, 孙燕¹, 陈虹², 刘江云^{1#}, 敖桂珍¹(1.苏州大学药学院, 江苏苏州 215123; 2.石河子大学药学院, 新疆石河子 832000)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)23-2175-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.23.22

摘要 目的:建立同时测定鹅绒藤中小麦黄素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷和紫云英苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Cosmosil AR-II-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为0.6%磷酸水溶液-乙腈(梯度洗脱), 流速为1 ml/min, 柱温为35 $^{\circ}$ C, 检测波长为360 nm。结果:小麦黄素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷、紫云英苷的进样量分别在1.188~9.504、0.087 12~0.871 2 μ g范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(r 分别为0.999 9、0.999 7);精密度、重复性、稳定性试验的RSD均<3%;平均加样回收率分别为97.66%、97.86%, RSD分别为1.24%、1.10%(n 均为6)。结论:该方法准确、简便,具有良好的重复性和稳定性,适合于鹅绒藤中小麦黄素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷和紫云英苷的含量测定。

关键词 高效液相色谱法; 鹅绒藤; 小麦黄素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷; 紫云英苷; 含量测定

Simultaneous Determination of 2 Flavonoids in *Cynanchum chinense* by HPLC

FENG Jian-yong¹, SUN Yan¹, CHEN Hong², LIU Jiang-yun¹, AO Gui-zhen¹(1.College of Pharmaceutical Science, Soochow University, Jiangsu Suzhou 215123, China; 2. School of Pharmacy, Shihezi University, Xinjiang Shihezi 832000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for simultaneous determination of tricin-7-*O*- β -D-glucuronide and astragalgin in *Cynanchum chinense*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Cosmosil AR-II-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μ m) column with mobile phase consisted of 0.6% phosphoric acid solution-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1 ml/min. The column temperature was maintained at 35 $^{\circ}$ C, and the detection wavelength was set at 360 nm. RESULTS: The linear ranges were 1.188-9.504 μ g for tricin-7-*O*- β -D-glucuronide($r=0.999 9$) and 0.087 12-0.871 2 μ g for astragalgin($r=0.999 7$); RSD of precision, reproducibility and stability tests were all lower than 3%; the average recoveries of two components were 97.66% (RSD=1.24%, $n=6$) and 97.86% (RSD=1.10%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The developed method is accurate and simple with high repeatability and stability, and it is suitable for content determination of tricin-7-*O*- β -D-glucuronide and astragalgin in *C. chinense*.

KEY WORDS HPLC; *Cynanchum chinense*; Tricin-7-*O*- β -D-glucuronide; Astragalgin; Content determination

鹅绒藤(*Cynanchum chinense* R. Br.)系萝藦科(Asclepiadaceae)鹅绒藤属植物,药用其根及新鲜茎的乳汁,根能祛风解毒、健胃止痛,乳汁外敷可治疗疣赘^[1],全草入蒙药^[2]。文献报道,鹅绒藤全草水提物对实验动物具有抗惊厥、中枢抑制^[3]和镇静催眠作用^[4],可见鹅绒藤除其块根部分外,其他没有充分利用的部分有可能含有有效药用成分,且地上部位作为一种可再生利用的植物资源,具有开发应用潜力。笔者的前期研究表明,该植物地上部位具有一定的抗炎活性,其主要活性成分为总黄酮。故本试验中,笔者建立了以高效液相色谱(HPLC)法同时测定鹅绒藤中2种主要黄酮类成分——小麦黄素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷、紫云英苷含量的方法,为进一步开发利用鹅绒藤资源提供依据。

1 材料

1.1 仪器

1260 Infinity Series HPLC仪,包括DEABL00396二元泵、

* 硕士研究生。研究方向:天然产物活性成分。E-mail: fjiyuan-1314@163.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:天然药物化学。电话:0512-65884301。E-mail:liujiangyun@suda.edu.cn

DEAAK04580柱温箱、DEABG00577紫外检测器、B.04.03色谱工作站(美国Agilent公司)。

1.2 试剂

小麦黄素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷、紫云英苷对照品由笔者通过对鹅绒藤的化学成分研究分离得到,¹H-NMR及¹³C-NMR数据与文献^[5-6]报道一致,通过HPLC面积归一化法检验,其纯度>98%;乙腈(色谱纯,瑞士Oceanpak公司);水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

鹅绒藤地上部位于2010年采自新疆维吾尔自治区石河子市郊,经苏州大学药学院刘春宇教授鉴定为鹅绒藤*C. chinense* R. Br.的茎和叶,标本存放于苏州大学药学院(标本号:CC20100901)。

2 方法与结果

2.1 对照品贮备液的制备

精密称取对照品小麦黄素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷、紫云英苷各适量,用甲醇-水(1:1, *V/V*)溶解并稀释制成质量浓度分别为1.188、0.217 8 mg/ml的单一成分对照品贮备液。

将上述已制备好的2种单一成分对照品贮备液按1:1(*V/V*)

V)混合,作为混合对照品贮备液。

2.2 供试品溶液的制备

取鹅绒藤粉末2 g,精密称定,用70%乙醇溶液回流提取2次,每次30 ml,合并滤液减压浓缩,滤过,上聚酰胺柱(内径为2 cm,柱高为10 cm),依次用水、20%乙醇、70%乙醇溶液各400 ml洗脱。收集70%乙醇洗脱液,浓缩,真空干燥。取干燥样品精密称定,用甲醇-水(1:1, V/V)溶解并稀释至刻度,即得供试品溶液。进样前用0.45 μm微孔滤膜滤过。

2.3 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Cosmosil AR-II-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.6%磷酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~12 min, 18% B; >12~15 min, 18% B→20% B; >15~30 min, 20% B);流速:1 ml/min;柱温:35 ℃;检测波长:360 nm。在选定的色谱条件下,各相邻色谱峰之间的分离度均>1.5,小麦黄素-7-*O*-β-D-葡萄糖醛酸苷、紫云英苷的理论板数均>4 000。色谱见图1。

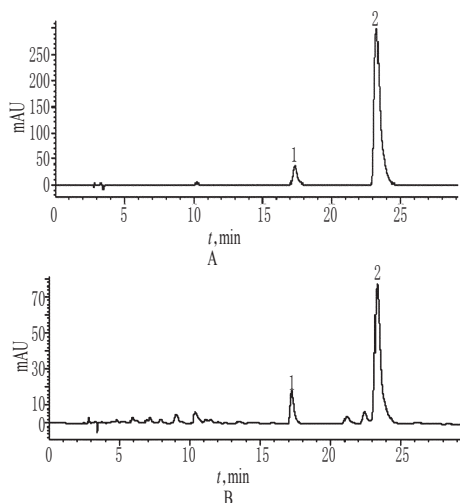


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;1.紫云英苷;2.小麦黄素-7-*O*-β-D-葡萄糖醛酸苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. test sample; 1. astragaloside; 2. tricin-7-*O*-β-D-glucuronide

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.1”项下的小麦黄素-7-*O*-β-D-葡萄糖醛酸苷对照品贮备液0.5、1、2、3、4 ml和紫云英苷对照品贮备液0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 ml,分别置于10 ml量瓶中,用甲醇-水(1:1, V/V)稀释至刻度,分别精密吸取20 μl,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积积分值(y)为纵坐标,进样量(x)为横坐标,进行线性回归,得小麦黄素-7-*O*-β-D-葡萄糖醛酸苷、紫云英苷的回归方程分别为 $y=601.36x+22.659$ ($r=0.9999$, $n=5$)、 $y=976.16x+27.976$ ($r=0.9997$, $n=5$)。结果表明,小麦黄素-7-*O*-β-D-葡萄糖醛酸苷、紫云英苷的进样量分别在1.188~9.504、0.087 12~0.871 2 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

分别精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液20 μl,连续进样6次,按上述色谱条件测定,记录峰面积。结果,小麦黄素-7-*O*-β-D-葡萄糖醛酸苷、紫云英苷的RSD分别为1.24%、

2.16%(n 均为6),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液20 μl,分别于0、2、4、6、8 h按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,小麦黄素-7-*O*-β-D-葡萄糖醛酸苷、紫云英苷的RSD分别为1.34%、1.36%(n 均为5),表明供试品溶液稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批鹅绒藤粉末适量,共6份,精密称定,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样20 μl测定,记录峰面积,计算小麦黄素-7-*O*-β-D-葡萄糖醛酸苷、紫云英苷的含量。结果,每1 g样品平均含小麦黄素-7-*O*-β-D-葡萄糖醛酸苷、紫云英苷分别为2 731、69.37 μg, RSD分别为2.16%、1.99%(n 均为6),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量(每1 g样品平均含小麦黄素-7-*O*-β-D-葡萄糖醛酸苷、紫云英苷分别为2 731、69.37 μg)的同一批样品适量,共6份,分别加入对照品小麦黄素-7-*O*-β-D-葡萄糖醛酸苷4.752 mg、紫云英苷0.108 9 mg,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样20 μl测定,计算小麦黄素-7-*O*-β-D-葡萄糖醛酸苷、紫云英苷的加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

组分	称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
小麦黄素-7- <i>O</i> -β-D-葡萄糖醛酸苷	2.011	5.492	4.752	10.121	97.41		
	2.005	5.476	4.752	10.082	96.89		
	2.008	5.484	4.752	10.231	99.89		
	2.012	5.495	4.752	10.154	98.04	97.66	1.24
	2.011	5.492	4.752	10.112	97.22		
	2.013	5.498	4.752	10.083	96.49		
紫云英苷	2.000	0.138 7	0.108 9	0.246 0	98.53		
	2.005	0.139 1	0.108 9	0.243 9	96.24		
	2.008	0.139 3	0.108 9	0.246 1	98.07		
	2.012	0.139 6	0.108 9	0.246 3	97.98	97.86	1.10
	2.011	0.139 5	0.108 9	0.247 6	99.27		
	2.013	0.139 6	0.108 9	0.245 3	97.06		

2.9 样品含量测定

精密称取鹅绒藤样品粉末3份,每份约2 g,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,以峰面积计算样品中小麦黄素-7-*O*-β-D-葡萄糖醛酸苷、紫云英苷的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of content determination of samples($n=3$)

组分	称样量, g	样品含量, μg/g	\bar{x} , μg/g	RSD, %
小麦黄素-7- <i>O</i> -β-D-葡萄糖醛酸苷	2.003	2 701		
	2.012	2 756	2 734	1.28
	2.009	2 745		
紫云英苷	2.003	70.91		
	2.012	68.74	69.57	1.94
	2.009	69.36		

3 讨论

3.1 样品处理方法的选择

本试验对鹅绒藤样品的前处理方法进行了考察,利用聚酰胺柱对样品进行了初步纯化,使得目标峰有较好的分离度,

香枫舒颗粒的质量标准研究

易廷平^{1*}, 谭安军²(1.重庆市永川区人民医院, 重庆 402160; 2.重庆市永川区中医院, 重庆 402160)

中图分类号 R283.627; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)23-2177-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.23.23

摘要 目的:建立香枫舒颗粒的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法定性鉴别香枫舒颗粒中白术、金钱草、广藿香;用高效液相色谱法测定广藿香中毛蕊花糖苷的含量。结果:TLC斑点清晰、分离度好,阴性对照无干扰。毛蕊花糖苷的进样量在0.042~0.350 μg范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD均 $<1\%$;平均加样回收率为98.40%,RSD=0.66%($n=9$)。结论:所建标准可用于香枫舒颗粒的质量控制。

关键词 香枫舒颗粒;质量标准;白术;金钱草;广藿香;毛蕊花糖苷;薄层色谱法;高效液相色谱法

Study on Quality Standard of Xiangfengshu Granules

YI Ting-ping¹, TAN An-jun²(1.The People's Hospital of Yongchuan District, Chongqing 402160, China; 2. Yongchuan District Hospital of TCM, Chongqing 402160, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of Xiangfengshu granules. METHODS: TLC method was used to qualitatively identify *Atractylodes macrocephala*, *Lysimachia christinae*, *Pogostemon cablin*; the content of verbascoside in *P. cablin* was determined by HPLC. RESULTS: TLC spots were fairly clear and well-separated without interference from negative control. The linear range of verbascoside was 0.042-0.35 μg ($r=0.999\ 9$) with average recovery of 98.40% (RSD=0.66%, $n=9$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1%. CONCLUSIONS: Established standard is suitable for the quality control of Xiangfengshu granules.

KEY WORDS Xiangfengshu granules; Quality standard; *Atractylodes macrocephala*; *Lysimachia christinae*; *Pogostemon cablin*; Verbascoside; TLC; HPLC

香枫舒颗粒来源于重庆永川区人民医院临床验方,由广藿香、白术、牛耳枫、金钱草等药材组成,具有除湿、化滞、理气的功效,对气滞湿困而致的急性胃肠炎及其所引起的腹胀、腹痛等消化不良症状有确切的治疗作用。香枫舒颗粒为传统煎剂改剂型而成的颗粒剂,为有效控制其质量,笔者采用薄层色

谱(TLC)法定性鉴别方中白术、金钱草、广藿香,并采用高效液相色谱(HPLC)法测定广藿香中有效成分毛蕊花糖苷的含量。

1 材料

1.1 仪器

LC-CLASS VP型HPLC仪(日本岛津公司);薄层成像色

且干扰峰较少,易于定量分析。

3.2 流动相的选择

本试验分别对0.1%磷酸水溶液-甲醇、0.1%磷酸水溶液-乙腈、0.6%磷酸水溶液-乙腈3种流动相体系进行了考察。结果表明,以0.6%磷酸水溶液-乙腈为流动相体系进行梯度洗脱,能够获得较好的分离效果。

3.3 检测波长的选择

笔者通过对对照品溶液进行紫外扫描,并参考相关文献^[7]结果,选择360 nm作为检测波长。

3.4 小结

本试验所建方法准确、简便,具有良好的重复性和稳定性,可作为鹅绒藤中小麦黄酮-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷和紫云英苷的含量测定方法。

参考文献

* 主管中药师。研究方向:药品质量及药事管理。电话:023-49571929。E-mail:734209743@qq.com

- [1] 苟占平,杨永建,赵汝能.甘肃鹅绒藤属药用植物资源调查[J].中草药,2001,32(1):69.
- [2] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会.中国植物志:第63卷[M].北京:科学出版社,1977:314.
- [3] 彭晓东,闫乾顺,闫琳,等.鹅绒藤对小鼠抗惊厥作用的观察[J].第四军医大学学报,2009,30(4):340.
- [4] 彭晓东,闫乾顺,王锐,等.鹅绒藤对小鼠镇静催眠作用的研究[J].中国中药杂志,2007,32(17):1174.
- [5] Yin JG, Yuan CS, Jia ZJ. A new iridoid and other chemical constituents from *Pedicularis kansuensis* forma albiflora Li. [J]. Arch Pharm Res, 2007, 30(4): 431.
- [6] 翁裕馨,刘占厚,陈湘宏.达乌里胡枝子化学成分研究[J].安徽农业科学,2011,39(25):15281.
- [7] 付远清,莫逢伟,廖厚知.HPLC法测定星宿菜中山柰酚的含量[J].中国药房,2012,23(15):1049.

(收稿日期:2012-07-09 修回日期:2012-08-28)