

皂角刺的高效液相指纹图谱分析及多组分测定

于金倩¹, 李 岗², 仙云霞², 刘 伟¹, 王 晓^{1*}

1. 山东省中药质量控制技术重点实验室, 山东省分析测试中心, 山东 济南 250014

2. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250014

摘 要: 目的 建立皂角刺的 HPLC 指纹图谱, 并同时测定皂角刺中 7,3',5'-三羟基-5-甲氧基二氢黄酮醇、3,3',5,5',7-五羟基二氢黄酮醇、槲皮素 3 种黄酮类成分的量。方法 采用 Waters symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈 (A) -0.1% 甲酸水 (B) 溶液, 梯度洗脱, 0~5 min, 5%~13% A; 5~20 min, 13%~16% A; 20~45 min, 16%~20% A; 45~50 min, 20%~25% A; 50~65 min, 25% A; 65~80 min, 25%~40% A; 体积流量 0.9 mL/min; 柱温 25 ℃; 检测波长 338 nm。结果 对 13 批皂角刺药材进行研究, 所得 HPLC 指纹图谱共标定 14 个共有峰, 并对其中 3 个成分进行了测定, 其质量浓度分别在 0.091 3~5.840 0、0.176 3~11.280 0、0.014 0~0.895 0 mg/mL 与峰面积呈良好线性关系 ($r \geq 0.999 2$), 平均加样回收率为 98.97%~99.66%, RSD<2.5%。结论 该法具有较好的稳定性和重复性, 为皂角刺药材的质量控制提供科学依据。

关键词: 皂角刺; 指纹图谱; 7,3',5'-三羟基-5-甲氧基二氢黄酮醇; 3,3',5,5',7-五羟基二氢黄酮醇; 槲皮素

中图分类号: R286.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)07-1416-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.07.026

HPLC fingerprint analysis and content determination of *Gleditsiae Spina*

YU Jin-qian¹, LI Gang², XIAN Yun-xia², LIU Wei¹, WANG Xiao¹

1. Shandong Key Laboratory of TCM Quality Control Technology, Shandong Analysis and Test Center, Jinan 250014, China

2. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China

Abstract: **Objective** An HPLC method was developed to evaluate the quality of *Gleditsiae Spina* through three components determination and fingerprint analysis. **Methods** The assay was performed on Waters symmetry C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column. The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% methanoic acid in water with gradient elution by PDA detection at 338 nm. **Results** Thirteen batches of *Gleditsiae Spina* were analyzed with the established method. In the fingerprint, 14 common peaks were marked and three of them were determined. The three compounds showed good linearity ($r \geq 0.999 2$) in the range of 0.091 3 — 5.840 0, 0.176 3—11.280 0, and 0.014 0—0.895 0 mg/mL, respectively. The average recoveries were 98.97% — 99.66% with RSD < 2.5%. **Conclusion** This method has good repeatability and stability and provides a new method for the quality control of *Gleditsiae Spina*.

Key words: *Gleditsiae Spina*; fingerprint; 7,3',5'-trihydroxy-5-methoxyflavanonol; 3,3',5,5',7-pentahydroflavanone; quercetin

皂角刺 *Gleditsiae Spina* 又称皂荚刺、皂角针和天丁等, 为豆科植物皂荚 *Gleditsia sinensis* Lam. 的干燥棘刺, 始载于《本草衍义补遗》, “治痈疽已溃, 能引至溃处”。其具有消肿托毒、排脓、杀虫、抗癌等功效, 临床常用于治疗痈疽初起和脓成不溃^[1]。其种质资源丰富, 全国多地区均有分布, 主产于江苏和湖北等地。现代研究发现, 皂角刺主要含有黄酮类、萜类、甾体类、酚酸类等多种化学成分^[2-5], 具有改善心血管系统、抗氧化、抗菌、抗炎和免疫调节等作用^[6], 同时皂角刺对多种癌细胞具有一定的

细胞毒活性^[7-9]。皂角刺作为我国传统中药材, 却极少有皂角刺质量控制方面的文献报道^[10-12], 《中国药典》也未规定其有效成分或指标性成分的测定。为了进一步开发利用皂角刺这一药用资源, 完善其质量控制标准, 本研究通过 HPLC 分析 13 批皂角刺药材, 首次建立其指纹图谱, 并同时测定药材中 7,3',5'-三羟基-5-甲氧基二氢黄酮醇、3,3',5,5',7-五羟基二氢黄酮醇、槲皮素 3 种黄酮类化学成分的量(其中化合物 7,3',5'-三羟基-5-甲氧基二氢黄酮醇为本实验组首次从皂角属植物中分离得到), 以期建立可

收稿日期: 2016-08-19

基金项目: 山东省科学院科学技术发展计划项目 (2014QN02); 山东省科学院——枣庄产学研联合基金; 泰山学者岗位专家; 山东省科学院先导项目

作者简介: 于金倩, 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为天然产物化学。E-mail: yujinqian87528@126.com

*通信作者 王 晓, 男, 博士, 研究员, 研究方向为中药资源。E-mail: wangx@sdas.org

以较为全面地反映皂角刺质量的方法, 弥补现有标准的不足, 为皂角刺药材质量标准的建立及其开发利用提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1100 型高效液相仪 (美国 Agilent 公司); 冷冻干燥机 (德国 CHRIST 冻干机有限公司); SB-5200D 超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); DT-100 分析天平 (北京医用仪器厂); Mettler Toledo MS205DU 分析天平, 瑞士梅特勒-托利多 (上海) 有限公司。

1.2 材料

对照品 7,3',5'-三羟基-5-甲氧基二氢黄酮醇、3,3',5,5',7-五羟基二氢黄酮醇、槲皮素均由本实验室自制, 经 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 以及 ESI-MS 鉴定结构, 并经峰面积归一化法检测质量分数均大于 98%。甲醇、乙腈为色谱纯 (美国 Tedia 公司), 其他试剂均为分析纯, 娃哈哈纯净水。13 批皂角刺药材分别购于济南市各大药店售皂角刺饮片 (建联中药店、宏济堂、平嘉大药房、漱玉平民大药房 1、漱玉平民大药房 2、中鲁医院、神农本草大药房、国泰大药房, 编号 G1~G8) 以及采于山东枣庄皂荚基地 (编号 G9~G13), 经山东中医药大学周洪雷教授鉴定为豆科植物皂荚 *Gleditsia sinensis* Lam. 的干燥棘刺。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters symmetry C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A)-0.1%甲酸水溶液 (B); 梯度洗脱, 0~5 min, 5%~13% A; 5~20 min, 13%~16% A; 20~45 min, 16%~20% A; 45~50 min, 20%~25% A; 50~65 min, 25% A; 65~80 min, 25%~40% A; 体积流量 0.9 mL/min; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长为 338 nm; 进样量 4 μL 。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取 7,3',5'-三羟基-5-甲氧基二氢黄酮醇、3,3',5,5',7-五羟基二氢黄酮醇、槲皮素 3 个对照品适量, 用 75% 甲醇配制成质量浓度为 5.84、11.28、0.895 mg/mL 的混合对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取药材粉末约 1.0 g, 精密称定, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 75% 乙醇 30 mL 回流提取 2 h, 滤过, 静置 24 h, 冷冻干燥, 用

75% 甲醇定容至 1 mL, 过 0.45 μm 滤膜, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.3 指纹图谱的建立

2.3.1 精密度试验 取同一供试品溶液 (G1), 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果相对保留时间 $\text{RSD}<1.0\%$, 相对峰面积 $\text{RSD}<2.8\%$, 表明精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取同一皂角刺样品 (G1), 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行分析, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果相对保留时间 $\text{RSD}<1.1\%$, 相对峰面积 $\text{RSD}<3.0\%$, 结果表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品 (G1) 溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果相对保留时间 $\text{RSD}<1.2\%$, 相对峰面积 $\text{RSD}<2.6\%$, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.4 皂角刺指纹图谱的建立 将 13 批皂角刺药材, 按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行分析, 记录色谱图。采用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版进行数据处理, 设定 S1 为参照图谱, 将其他样品的色谱峰与参照图谱自动匹配, 以中位数法生成其对照图谱, 并建立皂角刺指纹图谱叠加图和对照品指纹图谱 (R), 见图 1。与对照图谱匹配, 13 批样品的相似度均 >0.90 , 符合指纹图谱技术要求。

2.3.5 共有峰的标定 根据 13 批药材的指纹图谱检测结果, 选择图谱中峰面积较大、峰形较好的色谱峰为共有峰, 在对照图谱上共标定了 14 个共有峰。

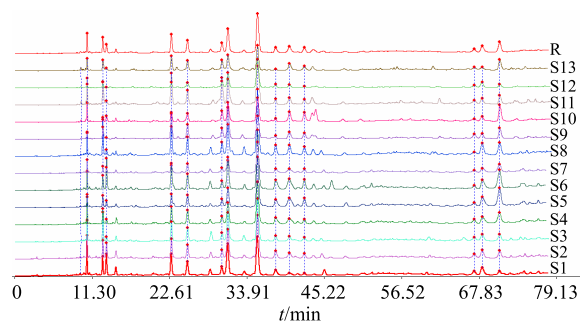


图 1 13 批皂角刺药材 HPLC 色谱图叠加

Fig. 1 HPLC specific chromatograms layout chart of 13 batches of *Gleditsiae Spina*

经过与对照品比对得知 5 号峰为 7,3',5'-三羟基-5-甲氧基二氢黄酮醇, 8 号峰为 3,3',5,5',7-五羟基二氢黄酮醇, 13 号峰为槲皮素, 结果见图 2。

2.4 定量测定

2.4.1 专属性考察 取混合对照品溶液和皂角刺供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行检测, 记录色谱图, 见图 2, 混合对照品及皂角刺供试品溶液 3 种黄酮类成分均达到基线分离。

2.4.2 线性关系考察 分别精密量取“2.2.1”项混合对照品溶液适量, 分别稀释 1、2、4、8、16、32 和 64 倍, 得到一系列质量浓度的对照品混合溶液, 在“2.1”项色谱条件下进行检测, 记录色谱图。以峰面积积分值 (Y) 对质量浓度 (X) 进行回归计算, 各成分的回归方程、相关系数、线性范围见表 1。

2.4.3 精密度试验 取同一混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 7,3',5'-三羟基-5-

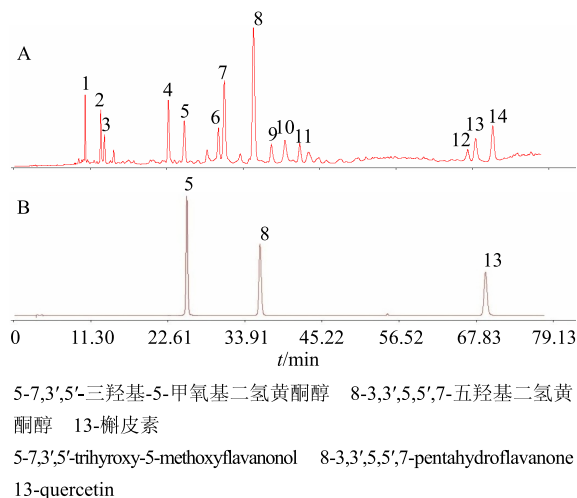


图 2 皂角刺药材的 HPLC 对照指纹谱 (A) 和混合对照品 HPLC 色谱图 (B)

Fig. 2 Reference fingerprint of *Gleditsiae Spina* (A) and HPLC of mixed reference substances (B)

表 1 3 种对照品的回归方程及线性范围

Table 1 Standard curves and linear ranges of three components

对照品	回归方程	r	线性范围/(mg·mL ⁻¹)
3,3',5,5',7-五羟基二氢黄酮醇	$Y=1\,489.78\,X+195.48$	0.999 2	0.176 3~11.280
7,3',5'-三羟基-5-甲氧基二氢黄酮醇	$Y=1\,875.41\,X+35.33$	0.999 9	0.091 3~5.840
槲皮素	$Y=1\,6973.47\,X+0.37$	0.999 9	0.014 0~0.895

甲氧基二氢黄酮醇、3,3',5,5',7-五羟基二氢黄酮醇、槲皮素峰面积的 RSD 值分别为 0.46%、0.51%、0.62%。

2.4.4 重复性试验 取同一皂角刺样品 (G1), 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行分析, 计算 7,3',5'-三羟基-5-甲氧基二氢黄酮醇、3,3',5,5',7-五羟基二氢黄酮醇、槲皮素质量分数的 RSD 值分别为 1.52%、2.31%、1.92%。

2.4.5 稳定性试验 取同一供试品 (G1) 溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 结果 7,3',5'-三羟基-5-甲氧基二氢黄酮醇、3,3',5,5',7-五羟基二氢黄酮醇、槲皮素色谱峰面积的 RSD 值分别为 1.63%、1.72%、1.22%。

2.4.6 加样回收率试验 称取已测定的皂角刺样品 (G1) 约 0.5 g (7,3',5'-三羟基-5-甲氧基二氢黄酮醇 0.450 0 mg/g, 3,3',5,5',7-五羟基二氢黄酮醇 1.172 8 mg/g, 槲皮素 0.026 1 mg/g), 共 9 份, 分别加入低、中、高 3 个质量浓度的对照品溶液 (分别相当于药材原有质量的 50%、100%、150%), 每一质量浓度

取 3 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图, 计算回收率。结果化合物 7,3',5'-三羟基-5-甲氧基二氢黄酮醇的平均回收率为 98.97%, RSD 为 1.68%; 为 3,3',5,5',7-五羟基二氢黄酮醇平均回收率为 99.66%, RSD 为 1.24%; 槲皮素平均回收率为 99.10%, RSD 为 2.02%。结果表明回收率试验符合实验要求, 方法准确度良好。

2.4.7 定量测定 分别取 13 批皂角刺样品 1.0 g, 精密称定, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 平行 3 份, 再按“2.1”项色谱条件进行测定, 记录色谱峰面积。计算各批次皂角刺药材中 7,3',5'-三羟基-5-甲氧基二氢黄酮醇、3,3',5,5',7-五羟基二氢黄酮醇、槲皮素质量分数。不同批次皂角刺的测定结果见表 2。

3 讨论

同时本实验对皂角刺不同提取方式进行考察, 结果发现, 回流取法对 3 种待测组分的提取率优于冷浸取法和超声提取法; 用 75% 的乙醇提取的 3 种待测成分的量优于用甲醇和其他体积分数乙醇提取;

表 2 13 批皂角刺中 3 种化学成分的量 ($n=3$)
Table 2 Contents of three chemical compounds from 13 batches of *Gleditsiae Spina* ($n=3$)

样品号	质量分数/(mg·g ⁻¹)		槲皮素
	7,3',5'-三羟基-5-甲氧基二氢黄酮醇	3,3',5,5',7-五羟基二氢黄酮醇	
G1	0.900 0	2.345 6	0.052 1
G2	0.746 3	1.799 3	0.039 3
G3	0.682 9	1.736 7	0.030 7
G4	0.771 0	1.950 2	0.033 0
G5	0.648 9	2.270 7	0.047 9
G6	0.817 4	2.683 2	0.043 0
G7	0.492 6	1.642 7	0.040 4
G8	0.898 0	2.673 7	0.052 9
G9	0.817 0	0.982 9	0.025 1
G10	0.517 7	1.011 4	0.024 0
G11	0.751 3	1.805 8	0.029 3
G12	0.311 4	1.216 3	0.024 5
G13	0.565 5	0.950 3	0.012 1

回流提取 2 h 时所测定的成分基本提取完全, 故最终确定最佳提取工艺为 75%乙醇回流提取 2 h。

本实验首次建立了皂角刺的指纹图谱, 并标定出 14 个共有峰, 相似度均在 0.90 以上, 为皂角刺的定性鉴定提供了重要的依据。同时对皂角刺中的 3 种黄酮类化合物进行了测定, 弥补《中国药典》在中药皂角刺质量控制方面的空白。该方法成功检测了 13 批皂角刺药材, 结果表明不同批次的皂角刺中 3 种成分的量存在明显差异, 但皂角刺中 3,3',5,5',7-五羟基二氢黄酮醇量较大且稳定, 可作为皂角刺药材质量控制的指标性成分。鉴于本实验所采用的皂角刺药材多为药店市售饮片及枣庄皂荚基地皂角刺药材, 地域性不强, 所以要对皂角刺药材进行全面的质量标准的研究, 还需要扩大样本以及道地药材的考察研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Zhou L G, Li D, Wang J, *et al.* Antibacterial phenolic compounds from the spines of *Gleditsia sinensis* Lam. [J]. *Nat Prod Res*, 2007, 21(4): 283-291.
- [3] 徐哲, 赵晓昀, 王漪檬, 等. 皂角刺抗肿瘤活性成分的分鉴定与活性测定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(2): 108-112.
- [4] Zhou L G, Li D, Jiang W, *et al.* Two ellagic acid glycosides from *Gleditsia sinensis* Lam. with antifungal activity on *Magnaporthe grisea* [J]. *Nat Prod Res*, 2007, 21(4): 303-309.
- [5] 李万华, 李琴, 王小刚, 等. 皂角刺中 5 个白桦脂酸型三萜抗 HIV 活性研究 [J]. 西北大学学报: 自然科学版, 2007, 37(3): 401-403.
- [6] 蒋志平, 彭骞, 何周康. 皂角刺的现代研究进展 [J]. 儿科药理学杂志, 2008, 14(5): 57-59.
- [7] Shoemaker M, Hamilton B, Dairkee S H, *et al.* In vitro anticancer activity of twelve Chinese medicinal herbs [J]. *Phytother Res*, 2005, 19(7): 649-651.
- [8] 尹卫平, 刘华清, 高嘉屿, 等. 皂角刺中 3 个香豆素类化合物及其细胞毒活性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(14): 2424-2427.
- [9] 刘明华, 姚健, 李荣, 等. 皂角刺总黄酮诱导结肠癌 HCT116 细胞凋亡的作用 [J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(6): 643-646.
- [10] 李岗, 仙云霞, 王晓, 等. 皂角刺化学成分及其抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(19): 2846-2850.
- [11] 何峰, 何光志, 张利新, 等. 皂角刺含药血清诱导直肠癌细胞 SW-480 凋亡及其对 Bcl-2/Bax 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2013, 19(19): 217-221.
- [12] 田吉, 何兵, 李翹翔, 等. HPLC 法测定皂角刺提取物中槲皮素的含量 [J]. 中国药房, 2009, 20(15): 1156-1157.
- [13] 田吉, 陆松梅, 何兵. HPLC 测定皂角刺中的槲皮素 [J]. 华西药学杂志, 2009, 24(6): 667-668.
- [14] 徐哲. 皂角刺抗肿瘤活性成分与含量测定方法研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.