

## 高效液相色谱法同时测定槲寄生中4种黄酮

王欣杨<sup>1</sup>,于治国<sup>1</sup>,高晓霞<sup>1</sup>,宋爽<sup>1</sup>,李颖辉<sup>2</sup>,赵云丽<sup>1</sup>

(1. 沈阳药科大学药学院,辽宁 沈阳 110016; 2. 辽宁省医药实业有限公司,辽宁 沈阳 110005)

**摘要:**目的 建立同时测定槲寄生药材中高圣草素、槲皮素-3,3-二甲醚、商陆素和藜香黄酮醇量的反相高效液相色谱法。方法 固定相为 Diamonsil C<sub>18</sub>柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(40:60)(A)和乙腈(B)梯度洗脱,体积流量为1.0 mL/min,柱温为30℃,检测波长为280 nm。结果 在上述条件下测得高圣草素、槲皮素-3,3-二甲醚、商陆素和藜香黄酮醇的质量浓度分别在0.041 2~0.824、0.007 6~0.152、0.036 0~0.720、0.003 20~0.064 0 mg/mL时与色谱峰面积之间线性关系良好;平均回收率分别为97.63%(RSD为1.6%),96.4%(RSD为1.9%),97.5%(RSD为1.7%),98.1%(RSD为2.5%)。结论 该方法准确、灵敏,可作为槲寄生药材质量控制的一个有效方法。

**关键词:**槲寄生;高圣草素;槲皮素-3,3-二甲醚;商陆素;藜香黄酮醇;高效液相色谱法

**中图分类号:**R282.6 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2010)01-0135-03

槲寄生为桑寄生科植物槲寄生 *Viscum coloratum* (Komar.) Nakai 的干燥带叶茎枝,其味苦、平,归肝、肾经,有祛风湿、补肝肾、强筋骨、安胎作用<sup>[1]</sup>。现代药理研究发现槲寄生在治疗心血管系统疾病、抗肿瘤等方面疗效较好,其中黄酮类化合物发挥重要作用<sup>[2,3]</sup>。如高圣草素具有抑制血小板聚集和增加冠脉流量的作用<sup>[4]</sup>,且能够抗真菌、抑制子宫癌细胞的生长<sup>[5-7]</sup>;商陆素有抗氧化、细胞毒素活性<sup>[8]</sup>;藜香黄酮醇有抗真菌活性<sup>[9]</sup>。鉴于黄酮类化合物是槲寄生发挥药效的主要成分,对该类成分在药材中的量进行研究的重要性就显得尤为突出。目前关于槲寄生药材的定量测定,《中国药典》2005年版以齐墩果酸为对照进行薄层色谱扫描测定,其他文献报道<sup>[10,11]</sup>以单一黄酮苷成分或某类成分总量控制槲寄生药材的质量。本研究采用高效液相色谱法,首次对槲寄生中高圣草素、槲皮素-3,3-二甲醚、商陆素和藜香黄酮醇4种黄酮苷元量进行同时测定。该方法具有灵敏度高、结果准确的特点,可用于槲寄生的质量控制。

## 1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(日本岛津公司),包括LC-10A Tvp 输液泵,SPD-10Avp 可变波长紫外检测器;HT-130 柱温箱;N2010 色谱数据处理系统。

高圣草素(赵云丽惠赠,HPLC 归一化质量浓度98.5%);槲皮素-3,3-二甲醚、商陆素和藜香黄

酮醇(自制,HPLC 归一化质量浓度98.5%),以上标准物质均通过核磁共振和质谱数据确证。槲寄生药材部分采购于全国各地药材公司或药店,部分采集于长白山余脉张广才岭(经沈阳药科大学孙启时教授鉴定为正品)。甲醇(色谱纯),乙腈(色谱纯),二次蒸馏水(自制),磷酸(分析纯)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件:**色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub> 柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm);流动相:A 相为甲醇-0.1%磷酸溶液(40:60),B 相为乙腈;洗脱程序:0~5 min,25%B;5~25 min,25%B~55%B;体积流量:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长:280 nm;进样量:10 μL。各峰与相邻峰的分离度均大于1.5,理论板数按藜香黄酮醇峰计算不低于3 000。供试品及对照色谱图见图1。

**2.2 对照品溶液的制备:**取高圣草素、槲皮素-3,3-二甲醚、商陆素、藜香黄酮醇适量,精密称定,置同一10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得混合对照储备液(高圣草素2.06 mg/mL、槲皮素-3,3-二甲醚0.380 mg/mL、商陆素1.80 mg/mL、藜香黄酮醇0.160 mg/mL)。

精密量取混合储备液1.0 mL,置10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得混合对照溶液。

**2.3 供试溶液的制备:**取槲寄生药材粉末(过80目筛)约4.0 g,精密称定,加乙醇100 mL 回流2 h,滤

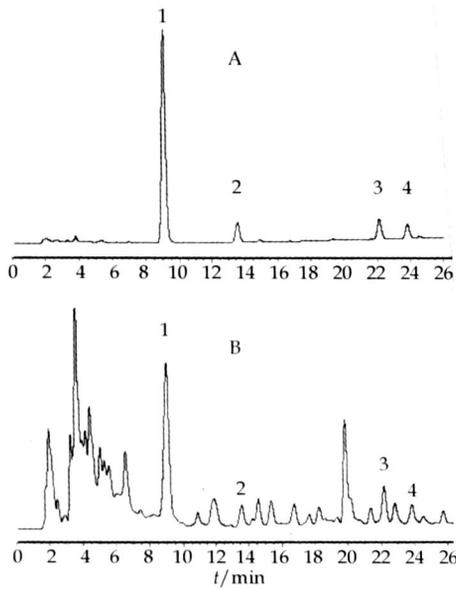
收稿日期:2009-03-25

基金项目:国家自然科学基金(30901967);辽宁省博士科研启动基金(20091078);辽宁省教育厅科学技术研究项目(2009A684)

作者简介:王欣杨(1980—),女,黑龙江人,沈阳药科大学药物分析专业硕士研究生,主要进行中药提取及质量控制研究。

Tel: (024) 23986295, 13080718807 E-mail: 4150609wang@sohu.com

\*通讯作者 赵云丽 Tel: (024) 23986295 E-mail: Yunli76@163.com



1-高圣草素 2-槲皮素-3,3-二甲醚 3-商陆素 4-藜香黄酮醇  
1-hmoeiodictyol 2-quercetin 3,3-dimethyl ether 3-omaine  
4-pachypodol

图 1 对照品溶液(A)和供试溶液(B)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of reference solution (A) and sample solution (B)

过,收集滤液,残渣用乙醇洗涤 3 次,每次 5 mL,合并洗液与滤液,减压回收乙醇,蒸干;残渣加氯仿 5 mL 溶解,置预处理过的聚酰胺小柱(60~80 目,5 g,内径 0.9 cm),用水 50 mL 洗涤,弃去洗液,再用甲醇 50 mL 洗脱,收集洗脱液,回收甲醇至干,残渣用甲醇溶解并定量稀释至 2 mL,摇匀,经 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.4 标准曲线的制备:精密量取混合储备液 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL,分别置 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得系列标准溶液,分别进样 10  $\mu$ L,以标准溶液浓度(X)为横坐标,色谱峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,得高圣草素回归方程为: $Y = 5.41 \times 10^6 X - 4.92 \times 10^4$  ( $r = 0.9994$ );槲皮素-3,3-二甲醚回归方程为: $Y = 2.94 \times 10^6 X - 5.41 \times 10^3$  ( $r = 0.9990$ );商陆素回归方程为: $Y = 7.20 \times 10^5 X - 1.42 \times 10^4$  ( $r = 0.9990$ );藜香黄酮醇  $Y = 4.75 \times 10^6 X - 4.95 \times 10^3$  ( $r = 0.9990$ )。高圣草素、槲皮素-3,3-二甲醚、商陆素、藜香黄酮醇分别在 0.041 2~0.824、0.007 6~0.152、0.036 0~0.720 和 0.003 2~0.064 0 mg/mL 呈良好线性关系。

2.5 精密度试验:精密吸取同一对照品溶液 10  $\mu$ L,重复进样 6 次,记录色谱图,测量峰面积,4 种黄酮量的 RSD 分别为 0.8%、0.9%、1.2%、1.3%,表明色谱系统重现性良好。

2.6 重现性试验:按“2.3 供试溶液的制备”项下方法平行制备 6 份供试品溶液(寄生于杨树,产地:延吉),进样,测定峰面积,计算质量分数,4 种黄酮的 RSD 分别为 1.7%、1.9%、1.9%、1.8%,表明方法精密度良好。

2.7 稳定性试验:取新制备的同一份供试品溶液,分别在室温放置 0、1、2、4、8、12 h 后进样,记录色谱图,测量峰面积,4 种黄酮量的 RSD 分别为 1.5%、1.8%、1.4%、1.2% ( $n = 6$ ),结果表明供试溶液在 12 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验:称取已知量的槲寄生样品(寄生于杨树,产地:延吉)9 份,每份 2.0 g,精密称定,分别精密加入混合对照品溶液 0.5、1.0、1.5 mL,每个样品平行 3 份,按“2.3”项下的方法操作,在上述色谱条件下进样分析,计算高圣草素、槲皮素-3,3-二甲醚、商陆素和藜香黄酮醇的量,并根据加入量计算回收率,结果平均回收率分别为 97.63% (RSD 为 1.6%),96.4% (RSD 为 1.9%),97.5% (RSD 为 1.7%),98.1% (RSD 为 2.5%)。

2.9 样品测定:取不同寄主和产地的样品,按“2.3 供试溶液的制备”项下的方法操作,精密取供试溶液 10  $\mu$ L 进样分析,以外标法计算各成分的量,结果见表 1。

表 1 样品测定结果( $n = 3$ )

样品来源		质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )			
		高圣草素	槲皮素-3,3-二甲醚	商陆素	藜香黄酮醇
寄主	桦树	0.029 0	0.007 1	0.030 3	0.007 3
	榆树	0.101	0.003 3	0.033 4	0.003 2
	梨树	0.038 5	n. d.	0.035 1	0.007 4
	椴树	0.046 8	0.002 4	0.033 0	0.007 8
	杨树	0.098 3	0.019 7	0.107	0.008 2
产地	河北	0.060 2	0.005 1	0.029 8	0.004 6
	黑龙江	0.101	n. d.	n. d.	n. d.
	新疆	0.037 2	0.007 0	0.027 1	0.011 2
	内蒙古	0.065 4	0.006 8	0.023 3	0.003 2
	唐山	0.039 7	0.017 1	0.034 2	0.010 0
	上海	0.065 4	0.008 8	0.023 3	0.003 2
	宾县	0.038 9	0.008 0	0.035 5	0.007 5
	沈阳	0.075 5	0.095	0.034 0	0.006 5
鞍山	0.197	n. d.	n. d.	n. d.	
辽宁	0.039 0	0.010 3	0.020 6	0.005 9	

n. d. 代表低于定量限,未能检测到

n. d. not detected below quantitative limit

### 3 讨论

3.1 流动相的选择:分别对甲醇-水、甲醇-水-磷酸、乙腈-水、乙腈-水-磷酸、乙腈-甲醇-磷酸的等度与梯度条件进行考察,结果表明以乙腈-甲醇-磷酸梯度洗脱系统色谱峰峰形好,柱效高,可达到理想的分离度。

3.2 检测波长的选择:对待测成分进行了紫外扫

描,在 280 nm 时,4 个指标成分有最大吸收,且干扰成分吸收较小,因此选择该波长为检测波长。

3.3 柱温的选择:在选择柱温方面,分别选择了 25、30、35 的柱温进行比较,通过对比各种柱温的色谱图发现在 30 的柱温下有较好的峰形。所以选择了 30 的柱温进行 HPLC 分析。

3.4 样品提取条件的选择:对提取方式(煎煮、回流和超声)和提取溶媒(水、不同浓度的甲醇和乙醇溶液)进行同时考察,确定乙醇回流提取效果最好。但存在较多干扰峰,且本底高,因此对样品进一步处理。考虑所测成分均为黄酮类化合物,而聚酰胺对该类化合物有双重色谱作用,因此样品萃取后经聚酰胺柱色谱,结果显示干扰峰少,本底有所降低,分离度理想。

#### 参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.2005.  
[2] 孙艳秋,刘珂,王守愚,等. 槲寄生的研究进展[J]. 中草

- 药,2000,31(6):471-474.  
[3] 王志勇,初文峰,王玲,等. 槲寄生黄酮苷对大鼠心肌细胞钾离子通道的作用[J]. 哈尔滨医科大学学报,2005,39(3):244.  
[4] 何晓树,杨福秋. 高圣草素及其 B 环异构物的合成和结构特征[J]. 中国医药工业杂志,1987,18(12):534-536.  
[5] Mori A, Nishino C, Nnoki N, et al. Cytotoxicity of plant flavonoids against HeLa cells[J]. *Phytochemistry*, 1988, 27: 1017-1020.  
[6] Garo E, Maillard M, Antus S, et al. Five flavans from *mariscus psilostachys* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 43(6): 1265-1269.  
[7] Doostdar H, Burke M D, Mayer R T. Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1 [J]. *Toxicology*, 2000, 144(1-3): 31-38.  
[8] Rao Y K, Geethangili M, Fang S H, et al. Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: A [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45(9): 1770-1776.  
[9] 张广文,马祥全,苏镜娉,等. 广藿香中的黄酮类化合物[J]. 中草藥,2001,32(10):534-536.  
[10] 徐建富,杜秀宝,孔景临,等. RP-HPLC 测定槲寄生中紫丁香素的含量[J]. 中国中医药信息杂志,2004,11(2):49-50.  
[11] 赵赵丽,马铭研,高晓露,等. 槲寄生中高圣草素-7-O-D-葡萄糖苷的分离及含量测定[J]. 色谱,2006,24(5):479-481.

## 肿节风中落新妇苷及柚皮苷的 HPLC 分析

李可强<sup>1</sup>,张广财<sup>2</sup>,宋宇宁<sup>1</sup>,张振秋<sup>2</sup>

(1. 辽宁省中药研究所,辽宁 沈阳 110161;2. 辽宁中医药大学药学院,辽宁 大连 116600)

**摘要:**目的 采用 HPLC 法测定中药材肿节风中黄酮类成分落新妇苷及柚皮苷的量。方法 采用 Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm);以乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)水溶液为流动相,采用梯度洗脱:0~10 min, A-B(10/90);10~25 min, A-B(10/90) A-B(15/85);25~35 min, A-B(15/85) A-B(20/80) B 保留 15 min;体积流量采用程序控制 0~10 min,0.5 mL/min;10~25 min,0.5~0.75 mL/min;25~35 min,0.7~0.8 mL/min;保留 15 min;检测波长为 290 nm;柱温:30。结果 落新妇苷及柚皮苷的平均回收率分别为 97.3%、95.6%,RSD 分别为 2.2%、2.3%;线性范围分别为 0.028~0.27 μg( $r=0.9996$ ),0.030~0.29 μg( $r=0.9995$ )。结论 该方法简便、灵敏、快速、准确、重现性好,为肿节风药材的质量控制及合理开发利用提供了科学依据。

**关键词:**肿节风;黄酮;落新妇苷;柚皮苷;反相高效液相色谱

中图分类号:R282.6 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2010)01-0137-02

肿节风为金粟兰科植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 的全株,又名草珊瑚、九节茶、接骨金粟兰等,其味苦、辛,性平,具有清热凉血、活血消斑、祛风通络之功效,用于血热紫斑、紫癜,风湿痹痛,跌打损伤<sup>[1]</sup>。现代医药研究表明,肿节风全草含黄酮、香豆素、有机酸及酚类等多种化学成分,具有抗菌、抗炎、镇痛等药理活性<sup>[2]</sup>。这些作用与肿节风的功效相符,是临床应用的药理基础之一。目前对于肿节风的定量测定报道多集中在香豆素类的异秦皮啶和有机

酸类的反丁烯二酸 2 种化学成分上<sup>[2,3]</sup>,而对其黄酮类成分的定量测定则未见报道。另一方面,目前国内已有应用肿节风总黄酮制剂进行临床研究的报道<sup>[4]</sup>。因此,对肿节风药材中黄酮类成分进行定量分析也有其必要性。为此,本实验首次建立了肿节风中黄酮类成分落新妇苷及柚皮苷的 HPLC 分析方法,并对来自全国 10 个不同收集地的肿节风药材样品进行了测定。结果表明,该方法准确、简便、可靠,适用于肿节风的定量分析,可为全面控制与评价其内在质量及药

收稿日期:2009-03-09

作者简介:李可强(1967—),男,高级工程师,博士。E-mail:sylkq@sina.com

\*通讯作者:张振秋 Tel:(0411)87586058 E-mail:zhangzhenqiu@sina.com