

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¹,张广财²,宋宇宁¹,张振秋²

(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 C₁₈ 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^[1]。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^[2]。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^[2,3],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^[4]。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

材的合理开发利用提供科学依据。

1 仪器与试剂

日立 U-3010 紫外可见双光束扫描分光光度计; Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪; Chemstation 色谱工作站; G1314-A 紫外检测器。落新妇苷对照品(99%以上), 供定量测定用, 购自南京青泽医药科技开发有限公司; 柚皮苷(批号 722-8803), 供定量测定用, 购自中国药品生物制品检定所; 肿节风药材分别购自河北、广西等地, 均经辽宁中医药大学李峰教授鉴定。高效液相色谱用乙腈为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

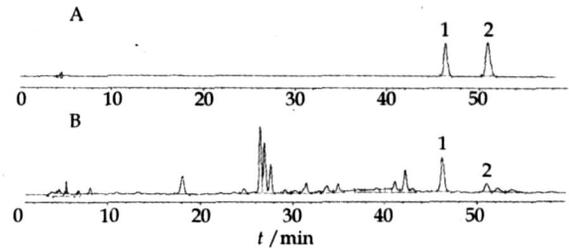
2.1 对照品溶液制备: 精密称取落新妇苷、柚皮苷对照品 6.82、7.26 mg, 分别置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成含落新妇苷 0.068 2 mg/mL, 柚皮苷 0.072 6 mg/mL 的溶液; 分别精密量取上述溶液各 2 mL, 置于同一 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.2 供试品溶液制备: 取肿节风药材粉末(过三号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加 50%乙醇 100 mL, 回流提取 2 h, 滤过, 用 50%乙醇洗涤残渣, 合并提取液和洗涤液, 水浴蒸干, 用 50%乙醇溶解置 25 mL 量瓶中, 加 50%乙醇至刻度, 用微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 色谱条件: 色谱柱为 Diamonsil C₁₈(200 mm × 4.6 mm, 5 μm)柱; 流动相: 乙腈(A)-0.1%磷酸(B)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, 0.5~0.7 mL/min; 25~35 min, 0.7~0.8 mL/min; 保留 15 min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 290 nm; 在此条件下, 理论塔板数按落新妇苷峰计算应不低于 3 000。色谱图见图 1。

2.4 线性关系: 分别精密吸取对照品溶液 2.0、6.0、10.0、14.0、16.0、20.0 μL, 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件测定色谱峰面积, 以进样量 X (μg) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 进行线性回归。其回归方程及线性范围分别为: 落新妇苷 $Y = 2 280.20 X + 22.94$ ($r = 0.999 6$), 0.028~0.27 μg; 柚皮苷 $Y = 4 072.3 X - 42.99$ ($r = 0.999 5$), 0.030~0.29 μg。各成分在各自进样量范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验: 精密吸取同一供试品溶液 10



1-落新妇苷 2-柚皮苷

1-astilbin 2-naringin

图 1 对照品(A)和肿节风药材(玉林)样品(B)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of reference substances (A)

and Herba Sarcandrae sample (B)

μL, 按上述色谱条件, 连续进样 5 次, 测定落新妇苷及柚皮苷峰面积积分值并计算 RSD 分别为 2.3%、2.7%。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 10 μL, 于制备后 0、2、4、6、8 h 分别进样, 测定落新妇苷及柚皮苷峰面积积分值, 计算 RSD 分别为 1.3%、2.2%, 说明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.7 重现性试验: 精密称取同一样品 5 份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件进样 10 μL。测定计算落新妇苷及柚皮苷分别为 1.024 0、0.692 2 mg/g ($n = 5$); RSD 分别为 1.3%、2.6%。表明方法重现性较好。

2.8 回收率试验: 取已测知量(落新妇苷 1.024 0 mg/g、柚皮苷 0.692 2 mg/g)的样品 5 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 精密加入落新妇苷对照品溶液 4 mL(质量浓度为 0.068 2 mg/mL), 柚皮苷对照品溶液 2.5 mL(质量浓度为 0.072 6 mg/mL), 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 求得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%。表明回收率良好。

2.9 样品测定: 对 10 批不同收集地的肿节风药材样品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别精密吸取上述各溶液及对照品溶液 5~20 μL, 进样, 外标一点法计算质量分数。结果见表 1。

3 讨论

3.1 溶液制备方法的考察: 本实验曾以甲醇、乙醇、水为提取溶剂对回流和超声 2 种提取方法进行了考察, 结果表明, 乙醇回流提取效果好。在此基础上, 设计正交试验 $L_9(3^4)$ 对同一供试样品以及乙醇浓度、提取时间、提取次数, 进行了 3 因素, 3 水平的提取条件的优选考察, 最终确定了本实验的供试品溶液制备方法。

(下转附 2 页)

- [58] Li J Z, Liu H Y, Lin Y J, et al. Six new C₂₁ steroidal glycosides from *Aselepias curassavica* L. [J]. *Steroids*, 2008, 73(6): 594-600.
- [59] Warashina T, Noro T. Steroidal glycosides from the roots of *Aselepias curassavica* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56(3): 315-322.
- [60] Hamed A I, Sheded M G, Abd El-Shaheen S M, et al. Polyhydroxypregnane glycosides from *Oxystelma esculentum* var. *alpine* [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(7): 975-980.
- [61] Zhang Q Y, Zhao Y Y, Wang B, et al. New pregnane glycosides from *Stelmatorcrypton khasianum* [J]. *Steroids*, 2002, 67(5): 347-351.
- [62] Vo Duy H, Kazuhiro O, Ryoji K, et al. Sweet Pregnane Glycosides from *Telosma procumbens* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2001, 49(4): 453-460.
- [63] Liu Y, Tang W, Yu S, et al. Eight new C₂₁ steroidal glycosides from *Dregea sinensis* var. *corrugata* [J]. *Steroids*, 2007, 72(6-7): 514-523.
- [64] Liu Y B, Qu J, Yu S S, et al. Nine novel C₂₁ steroidal glycosides substituted with orthoacetate from *Dregea sinensis* var. *corrugata* [J]. *Steroids*, 2008, 73: 184-192.
- [65] Kim M S, Baek J H, Park J A, et al. Wilfoside KIN isolated from *Cynanchum wilfordii* inhibits angiogenesis and tumor cell invasion [J]. *Int J Oncol*, 2005, 26(6): 1533-1539.
- [66] Wang H, Wang Q, Srivastava R K, et al. Effects of total glycosides from baishouwu of human breast and prostate cancer cell proliferation [J]. *Altern Ther Health Med*, 2003, 9(5): 62-66.
- [67] 张如松, 叶益萍, 刘雪莉. 白首乌中体外抑制肿瘤细胞活性成分研究 [J]. 中草药, 2000, 31(8): 599-601.
- [68] 王冬艳, 张洪泉, 李心. 白首乌 C₂₁甾体苷诱导肝癌细胞凋亡的作用及其机制 [J]. 药学报, 2007, 42(4): 366-370.
- [69] 尹家乐, 李心, 张士侠, 等. 白首乌 C₂₁甾体酯苷对小鼠急性四氯化碳肝损伤的保护作用 [J]. 安徽医药, 2007, 11(3): 198-199.
- [70] 陆佳静, 王晓岚, 姚文杰, 等. 白首乌 C₂₁甾体苷对小鼠脑缺血再灌注致学习记忆损伤的保护作用 [J]. 中成药, 1991, 31(3): 463-465.
- [71] 王冬艳, 李心, 张洪泉. 江苏地产白首乌 C₂₁甾体苷对荷瘤小鼠的免疫保护作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12(2): 168-172.
- [72] Lee K Y, Yoon J S, Kim E S, et al. Anti-acetylcholinesterase and anti-amnesic activities of a pregnane glycoside, cynatroside B, from *Cynanchum atratum* [J]. *Planta Med*, 2005, 71(1): 7-11.
- [73] Zhao Y B, He H P, Lu C H, et al. C₂₁ steroidal glycosides of seven sugar residues from *Cynanchum otophyllum* [J]. *Steroids*, 2006, 71(11): 935-941.
- [74] 王虎根, 叶益萍. 黑鳗藤新苷 A 的溶血性及其对卵清白蛋白免疫小鼠的免疫佐剂作用 [J]. 中国天然药物, 2005, 3(1): 382-386.
- [75] 陈峰阳, 叶益萍, 李晓誉, 等. 黑鳗藤新苷 K 的急性毒性及体内抑制细胞和体液免疫的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(3): 608-610.
- [76] 周俐斐, 陈峰阳, 李晓誉, 等. 黑鳗藤新苷 K 对大鼠佐剂性关节炎和同种异体皮肤移植排斥反应的治疗作用 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(3): 566-569.
- [77] Ye Y P, Chen F Y, Sun H X, et al. Stemucronatoside K, a novel C₂₁ steroidal glycoside from *Stephanotis mucronata*, inhibited the cellular and humoral immune response in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8: 1231-1238.
- [78] Chen F Y, Ye Y P, Sun H X, et al. Stemucronatoside L, a pregnane glycoside from the roots of *Stephanotis mucronata*, inhibits Th1/Th2 immune responses *in vitro* [J]. *Chem Biodivers*, 2009, 6(6): 916-923.
- [79] Zhu Y N, Zhao W M, Yang Y F, et al. Periplocoside E, an effective compound from *Periploca sepium* Bge, inhibited T cell activation *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 316(2): 662-669.
- [80] Zhu Y N, Zhong X G, Feng J Q, et al. Periplocoside E inhibits experimental allergic encephalomyelitis by suppressing interleukin 12-dependent CCR5 expression and interferon gamma-dependent CXCR3 expression in T lymphocytes [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318(3): 1153-1162.
- [81] Wan J, Zhu Y N, Feng J Q, et al. Periplocoside A, a pregnane glycoside from *Periploca sepium* Bge., prevents concanavalin A-induced mice hepatitis through inhibiting NKT-derived inflammatory cytokine productions [J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(9): 1248-1256.
- [82] Zhang J, Ni J, Chen Z H, et al. Periplocoside A prevents experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing IL-17 production and inhibits differentiation of Th17 cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30: 1144-1152.

(上接第 138 页)

表 1 肿节风药材中落新妇苷及柚皮苷的分析结果(n=3)

Table 1 Analysis of astilbin and naringin in *S. glabra* (n=3)

编号	收集地	落新妇苷/%	柚皮苷/%
01	玉林	0.111 3	0.058 2
02	广州	0.019 2	0.112 3
03	樟树	0.102 4	0.069 2
04	北京	0.013 1	0.049 6
05	安国	0.010 9	0.065 1
06	常州	0.015 5	0.066 4
07	苏州	0.014 0	0.110 6
08	南京	0.003 2	0.077 9
09	成都	0.036 1	0.033 9
10	福州	0.028 3	0.003 9

3.2 流动相的选择:考察了乙腈-水溶液、甲醇-水溶液、甲醇-磷酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液、乙腈-甲醇-磷酸水溶液等溶剂系统,结果显示不同的流动相系统分离效果相差较大,其中,甲醇-水溶液分离效果较差,乙腈-甲醇-磷酸水溶液与乙腈-磷酸水溶液分离效果较好,故最终选择乙腈-磷酸水溶液系统作为流动相。

3.3 检测波长的选择:经紫外扫描,落新妇苷和柚皮苷的最大紫外吸收分别为 290、284 nm,二者相近,故选择 290 nm 为测定波长,此时基线平稳,可获得满意的分离和测定结果。

本实验所建立的肿节风药材中黄酮类成分落新妇苷及柚皮苷定量测定方法,准确可靠,重现性好,回收率满意,可以用于其药材的质量分析。结果表明,不同收集地肿节风药材中落新妇苷及柚皮苷的差别均很大,在所测定的 10 批供试样品中落新妇苷及柚皮苷量最高分别相差 34.7、8.1 倍,进一步提示对黄酮类成分进行质控的必要性。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 郁建生,李英伦. 草珊瑚研究进展[J]. 安徽农业科学, 2005; 33(12): 2390-2392.
- [3] 王钢力,陈道峰,林瑞超. 肿节风的化学成分及其制剂质量控制研究进展[J]. 中草药, 2003, 34(8): 附 12-13.
- [4] 王砚,王钢力,姚令文,等. 肿节风药材中反丁烯二酸和异秦皮啶的含量测定[J]. 华西药理学杂志, 2005, 20(1): 60-62.