

RP-HPLC 测定龙须藤中 4 种黄酮类成分的含量

徐伟^a, 郑海音^b, 洪振丰^{b*}, 汤须崇^a (福建中医学院, a.药理学系; b.中西医结合系, 福州 350108)

摘要: 目的 用 HPLC 梯度洗脱法测定龙须藤中 4 种黄酮类成分的含量, 考察了杨梅素、槲皮素、表儿茶素和 5, 6, 7, 3', 4', 5'-六甲氧基黄酮 4 种成分在不同产地药材中的含量。方法 采用 RP-HPLC 测定, 以 Shimadzu C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 为色谱柱; 流动相为乙腈-0.05%磷酸溶液, 梯度洗脱(0 min, 乙腈-0.05%磷酸比例为 20:80, 5 min 比例为 30:70; 10 min, 比例为 50:50; 30 min, 比例为 50:50); 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 370 nm。结果 杨梅素在 0.071 6~0.716 μg、槲皮素在 0.122 8~1.228 μg、表儿茶素在 0.102 4~1.024 μg、5, 6, 7, 3', 4', 5'-六甲氧基黄酮在 0.090 2~0.902 μg 内呈良好的线性关系; 重复性的 RSD 分别为 1.32%, 0.93%, 1.02%, 1.17%。不同产地中黄酮成分含量大小依次为福建青云山地区、广西隆安、江西安福、湖北宜昌、浙江缙云地区样品。结论 本方法精密性、重复性和分离效果好, 分析快速, 适合于该药材的含量测定, 不同产地中成分存在一定的差异。

关键词: 反相高效液相色谱法; 龙须藤; 杨梅素; 槲皮素; 表儿茶素; 5, 6, 7, 3', 4', 5'-六甲氧基黄酮

中图分类号: R284.1; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2009)09-0763-04

RP-HPLC Determination of Four Flavonols in *Bauhinia championii* Benth.

XU Wei^a, ZHENG Haiyin^b, HONG Zhenfeng^{b*}, TANG Xuchong^a (Fujian College of Traditional Chinese Medicine, a. Department of Pharmacy; b. Department of Integrative Medicine, Fuzhou 350108, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine myricetin, quercetin, (-)-epicatechin, 5, 6, 7, 3', 4', 5'-hexamethoxy flavone in *Bauhinia championii* Benth., several samples from different areas were examined, by HPLC using gradient elution. **METHODS** The determination was performed on a Shimadzu C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile-water, gradient elution (0 min, CH₃CN-water 20:80, 5 min, CH₃CN-water 30:70, 10 min, CH₃CN-water 50:50). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 370 nm. **RESULTS** The line response range from 0.0716-0.716 μg of myricetin; 0.122 8-1.228 μg of quercetin; 0.102 4-1.024 μg of (-)-epicatechin; 0.090 2-0.902 μg of 5, 6, 7, 3', 4', 5'-hexamethoxy flavone. Their contents were highest in Qungyunshan, Fujian. **CONCLUSION** The RP-HPLC method shows a good separation, reproducibility and accuracy. It will be used for determining flavones in herbs and extracts. The contents of four flavones are different in *Bauhinia championii* Benth. from different places.

KEY WORDS: RP-HPLC; *Bauhinia championii* Benth.; myricetin; quercetin; (-)-epicatechin; 5, 6, 7, 3', 4', 5'-hexamethoxy flavone

龙须藤为豆科羊蹄甲属植物龙须藤 *Bauhinia championii* Benth. 的藤, 主要分布福建、江西、广西、浙江等, 具有祛风湿、行血气的功效^[1]。现代药理

学研究证明, 龙须藤的有效成分具有祛风除湿、活血止痛、健脾理气的作用, 用于治疗风湿性关节炎、腰腿疼、跌打损伤、胃痛、小儿疳积。龙须藤药材

基金项目: 福建省科技厅重点项目(2004I005)

作者简介: 徐伟, 男, 讲师 *通信作者: 洪振丰, 男, 教授

Tel: (0591)22861661

E-mail: zfhong1953@163.com

的化学成分主要为黄酮类、甾萜、没食子酸等^[2]。龙须藤中黄酮类成分具有镇痛抗炎^[3-4]等作用,是其重要活性成分,而其含量情况还尚未见报道。本实验采用反相高效液相色谱梯度洗脱法对龙须藤的 4 种水解黄酮苷元杨梅素(myricetin)、槲皮素(querctetin)、表儿茶素[(-)-epicatechin]、5,6,7,3',4',5'-六甲氧基黄酮(5,6,7,3',4',5'-hexamethoxy flavone; 以下简称六甲氧基黄酮)的含量进行考察,并对不同产地的龙须藤所含黄酮成分进行了基础研究,以控制和评价其质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

美国 Waters 600E 高效液相色谱仪,包括二极管阵列检测器、四元泵、在线真空脱气机、Millennium32 色谱工作站; Sartorius BT 25S 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司)。

1.2 试剂

槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所,批号: 110861-200304,纯度: $\geq 98\%$); 表儿茶素对照品(中国药品生物制品检定所,批号: 878-200102,纯度: $\geq 98\%$); 杨梅素对照品 (Fluka 公司,批号: 70050,纯度: $\geq 96\%$); 5, 6, 7, 3', 4', 5'-六甲氧基黄酮(江苏药物研究所提供,经 HPLC 检测,面积归一化法计算纯度大于 98%); 药材由江苏药物研究所提供,经福建中医学院药理学系中药鉴定教研室杨成梓副教授鉴定为豆科羊蹄甲属植物龙须藤 *Bauhinia championii* Benth. 的藤; 乙腈为色谱纯; 屈臣氏纯净水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适应性试验

色谱柱: Shimadzu C₁₈ 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.05%磷酸溶液,梯度洗脱(0 min, 乙腈-0.05%磷酸比例为 20:80, 5 min 比例为 30:70; 10 min, 比例为 50:50; 30 min, 比例为 50:50); 灵敏度 0.02 AUFS; 柱温: 室温; 流速: 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹; 检测波长: 370 nm; 进样量: 10 μ L。在此色谱条件下,各对照品及样品的色谱图如图 1。在上述色谱条件下,杨梅素、槲皮素、表儿茶素和六甲氧基黄酮 4 种成分色谱峰理论板数不低于 18 000,峰间分离度良好。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精确称取杨梅素 3.58 mg、槲皮素 6.14 mg、表儿茶素 5.12 mg、六甲氧基

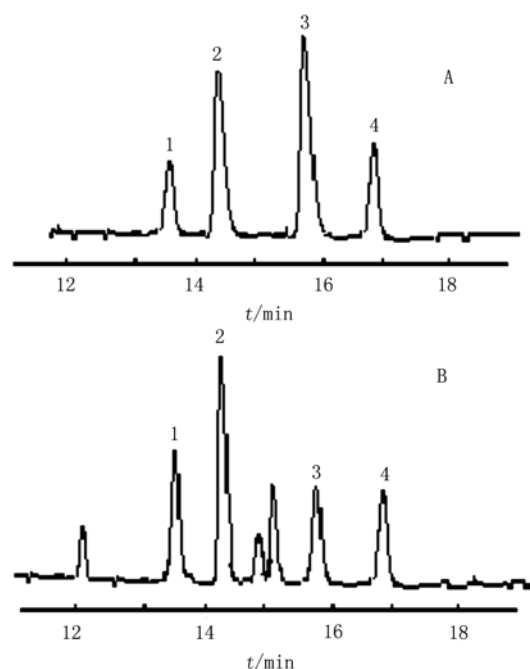


图 1 对照品及样品的高效液相色谱图谱

A-对照品; B-福建青云山产龙须藤; 1-杨梅素; 2-槲皮素; 3-表儿茶素; 4- 5,6,7,3',4',5'-六甲氧基黄酮

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances and samples

A-reference substances; B-*Bauhinia championii* Benth.in Qingyunshan, Fujian; 1-myricetin; 2-querctetin; 3-(-)-epicatechin; 4-5,6,7,3',4',5'-hexamethoxy flavone

黄酮 4.51 mg,精密称定,置于 5 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度,溶液浓度分别为杨梅素 0.716 mg $\cdot$ mL⁻¹、槲皮素 1.228 mg $\cdot$ mL⁻¹、表儿茶素 1.024 mg $\cdot$ mL⁻¹、六甲氧基黄酮 0.902 mg $\cdot$ mL⁻¹。

2.2.2 供试品溶液的配制 样品于 60 $^{\circ}$ C 下烘 2 h,粉碎过 40 目筛,精确称取约 2 g,加入甲醇 20 mL 及 25%盐酸 10 mL,沸水浴中加热回流 1.5 h,冷却,用甲醇定量转入 50 mL 的量瓶中,稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤。精密量取续滤液 1 mL,用甲醇定容于 100 mL 量瓶中。取上述溶液注入高效液相色谱仪,测定,即得。

2.3 线性关系的考察

精确吸取对照品储备液 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.0 mL 置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取各对照品液 10 μ L 进样,按“2.1”项下的色谱条件测定峰面积,以对照品的进样量(μ g)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归分析,得杨梅素回归方程为 $Y=578\ 952 X+6\ 874$ ($r=0.999\ 8$); 槲皮素回归方程为 $Y=798\ 592 X-7\ 548$ ($r=0.999\ 9$), 表儿茶素回归方程为 $Y=473\ 217 X+9\ 122$ ($r=0.999\ 9$), 六甲氧基黄酮回归方程为 $Y=489\ 219 X+4\ 548$ ($r=$

0.999 8)。线性范围分别为 0.071 6~0.716 μg , 0.122 8~1.228 μg , 0.102 4~1.024 μg , 0.090 2~0.902 μg 。

2.4 核实精密度试验

分别精密吸取同一对照品溶液,在“2.1”项下色谱条件,连续进样 6 次,测定峰面积,结果杨梅素、槲皮素、表儿茶素、六甲氧基黄酮的 4 种成分 RSD 分别为 1.16%, 1.33%, 0.98%, 1.07%, 符合要求。

2.5 重复性试验

称取福建永泰产龙须藤样品 6 份,按“2.2.2”项下方法操作,在“2.1”项下色谱条件,各取 10 μL 进样,测定峰面积,计算得杨梅素、槲皮素、表儿茶素、六甲氧基黄酮的 4 种成分的平均含量分别为 1.732, 2.469, 1.217, 0.759 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$; RSD 分别为 1.32%, 0.93%, 1.02%, 1.17%, 符合要求。

表 1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Average recovery of samples($n=6$)

成分	药材取样量/g	药材原有量/mg	加入量/mg	测得总量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
杨梅素	1.003 4	1.737 9	1.700 0	3.435 0	99.83	98.50	0.89
	1.008 5	1.746 7	1.700 0	3.433 1	99.20		
	1.002 6	1.736 5	1.700 0	3.406 6	98.24		
	1.004 9	1.740 5	1.700 0	3.412 3	98.34		
	1.004 8	1.740 3	1.700 0	3.406 0	97.98		
槲皮素	1.003 7	1.738 4	1.700 0	3.393 9	97.38	97.74	0.58
	1.002 1	2.474 2	2.500 0	4.939 9	98.63		
	1.003 5	2.477 6	2.500 0	4.918 9	97.65		
	1.006 5	2.485 0	2.500 0	4.914 3	97.17		
	1.008 9	2.491 0	2.500 0	4.932 7	97.67		
表儿茶素	1.004 8	2.480 9	2.500 0	4.934 6	98.15	98.73	0.62
	1.002 1	2.474 2	2.500 0	4.903 7	97.18		
	1.003 5	1.221 3	1.200 0	2.407 9	98.89		
	1.006 9	1.225 4	1.200 0	2.415 1	99.14		
	1.004 9	1.223 0	1.200 0	2.405 9	98.58		
六甲氧基 黄酮	1.005 7	1.223 9	1.200 0	2.414 9	99.25	98.75	0.86
	1.003 5	1.221 3	1.200 0	2.392 2	97.58		
	1.004 1	1.222 0	1.200 0	2.409 5	98.96		
	1.005 9	0.763 5	0.750 0	1.505 8	98.97		
	1.006 7	0.764 1	0.750 0	1.498 8	97.96		
	1.006 7	0.764 1	0.750 0	1.496 7	97.68		
	1.005 8	0.763 4	0.750 0	1.502 3	98.52		
	1.003 4	0.761 6	0.750 0	1.508 4	99.57		
	1.006 8	0.764 2	0.750 0	1.512 5	99.78		

2.8 不同产地龙须藤样品测定

取各产地样品,按“2.2.2”项下方法操作,在“2.1”项下色谱条件,注入高效液相色谱仪测定,计算含量,结果见表 2。

3 讨论

供试样品溶液的配制为对龙须藤中 4 种黄酮醇苷元的提取,实验曾采用超声提取、热回流提取、浸渍法 3 种方法,结果超声提取、浸渍法提取效果

2.6 稳定性试验

精确称取样品,按“2.2.2”项下方法操作,在“2.1”项下色谱条件,分别在 0, 4, 8, 16, 24 h 内注入高效液相色谱仪,测定峰面积,计算得杨梅素、槲皮素、表儿茶素、六甲氧基黄酮 4 种成分的 RSD 分别为 1.22%, 1.38%, 1.42%, 1.14%。结果表明,溶液在 24 h 内稳定。其中表儿茶素对照品溶液放置时间超过 24 h,溶液由无色变为黄色,且含量降低,所以最好临用前配制。

2.7 加样回收率试验

取福建永泰产龙须藤样品粉末约 1 g,精确称定,按表 1 所示,分别精确加入与药材中含量等量的对照品,按“2.2.2”项下方法操作,在“2.1”项下色谱条件,注入高效液相色谱仪测定,计算 4 种成分的平均回收率,结果见表 1。

表 2 不同产地龙须藤中黄酮类成分的平均含量($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $n=3$)

Tab 2 The content of flavones in *Bauhinia championii* Benth. ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $n=3$)

产 地	杨梅素	槲皮素	表儿茶素	5,6,7,3',4',5'- 六甲氧基黄酮
福建青云山	1.731	2.467	1.214	0.757
湖北宜昌	1.024	2.181	0.828	0.524
浙江缙云	0.957	1.753	1.241	0.214
广西隆安	1.592	2.654	1.157	0.536
江西安福	1.175	1.946	1.321	0.414

较差,热回流提取效果较好。本实验采用酸水解法,考虑到黄酮苷水解时不同加热回流水解时间对提取效率影响较大,盐酸浓度参考中国药典方法^[5]采用 25%盐酸,将药材分别水解 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 h,表明随着水解时间的增长,4 种黄酮醇苷元的含量逐渐增加,而水解 1.5, 2.0 h 含量相当,故最终选择水解时间为 1.5 h。

本实验采用梯度洗脱法对不同产地的龙须藤中杨梅素、槲皮素、表儿茶素、六甲氧基黄酮的 4 种成分进行测定。由表 2 可知,采自福建青云山的样品杨梅素、槲皮素、表儿茶素、六甲氧基黄酮的 4 种成分的平均含量较高;其次依次为广西隆安、江西安福、湖北宜昌、浙江缙云地区样品;不同产地龙须藤中 4 种黄酮的含量存在一定的差异,其含量与生长环境、采集时间等因素有关,这为龙须藤

药材的选择以及质量标准的建立和进一步开发利用提供了科学依据。

REFERENCES

- [1] KONG X X. Flora of China(中国植物志)[M]. Beijing: Science Press, 2001: 289.
- [2] BAI H Y, ZHAN Q F, XIA Z H, et al. Studies on the chemical constituents of *Baobinia championii* Benth[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2004, 16(4): 312- 313.
- [3] HONG Z F, ZHENG H Y, XU W, et al. Study on resist inflammation and analgesic effect of Kangmeifu Burns Ointment(KBO) [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol(中国中医药科技), 2007, 14(4): 261- 262.
- [4] HONG Z F, ZHENG H Y, WANG R G, et al. Study on antibacterial activity of Kangmeifu Burns Ointment(KBO)[J]. Chin J Microecol(中国微生态学杂志), 2007, 19(2): 177-178.
- [5] Ch.P(2005)Vol II(中国药典 2005 年版. 二部)[S]. 2005: 221.

收稿日期: 2008-10-21