

HPLC法同时测定高良姜中 3种黄酮类成分的含量

赵晓頔, 陈晓辉, 耿璐璐, 毕开顺*

(沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

摘要 目的: 建立同时测定高良姜药材中高良姜素、山奈素-4'-甲醚、高良姜素-3-甲醚含量的高效液相色谱法。方法: 采用 Promosil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈(A-0.05% 磷酸水溶液(B为流动相, 梯度洗脱(0~30 min, 34% A → 38% A; 30~55 min, 38% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 264 nm, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL。结果: 高良姜素、山奈素-4'-甲醚、高良姜素-3-甲醚的线性范围分别为 12.18~121.8 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$), 4.44~44.4 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$), 2.53~25.32 μg·mL⁻¹ ($r=0.9998$); 平均加样回收率 ($n=9$) 分别为 99.2%, 100.5%, 100.4%。结论: 本法准确、简便, 具有良好的重复性, 可为高良姜药材质量控制提供依据。

关键词: 高效液相色谱; 高良姜; 高良姜素; 山奈素-4'-甲醚; 高良姜素-3-甲醚

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009 12-2036-04)

HPLC simultaneous determination of 3 flavonoids in *Alpinia officinarum* Hance

ZHAO Xiao-di CHEN Xiao-hui GENG Lu-lu BIKai-shun*

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract Objective To develop an HPLC method for simultaneous determination of galangin, kaempferide-4'-methylether and galangin-3-methylether in the herbal of *Alpinia officinarum* Hance from different places. **Methods** The separation was performed on a Promosil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column by gradient elution with acetonitrile(A-0.05% phosphoric acid(B (0-30 min, 34% A → 38% A; 30-55 min, 38% A) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 264 nm, and the column temperature was 30 ℃. **Results** The calibration curves of galangin, kaempferide-4'-methylether and galangin-3-methylether were linear in the ranges of 12.18-121.8 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$), 4.44-44.4 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$) and 2.53-25.32 μg·mL⁻¹ ($r=0.9998$) respectively; The mean recoveries ($n=9$) of them were 99.2%, 100.5% and 100.4% respectively. **Conclusion** The developed method is simple, accurate, reliable, and is helpful to control the quality of *Alpinia officinarum* Hance.

Key words HPLC; *Alpinia officinarum* Hance; galangin; kaempferide-4'-methylether; galangin-3-methylether

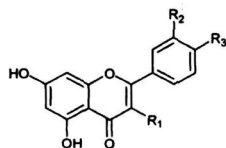
高良姜为姜科山姜属植物高良姜 (*Alpinia officinarum* Hance) 的干燥根茎^[1], 载于历版中国药典, 主产于福建、台湾、广东、广西、海南、云南等地。具有温胃、祛风、散寒、行气、止痛的功效, 临床常用于治疗脘腹冷痛、胃寒呕吐、消化不良、嗝气吞酸等病症。高良姜主要含有挥发油、黄酮类和二苯基庚烷类等化学成分。现代药理研究表明高良姜具有抗溃疡、抗氧化、抗病毒、抗菌、抗炎、抗肿瘤等多种活性^[2]。黄酮类成分是高良姜药材中主要的化学成分

分, 有文献报道只对其中的高良姜素单一成分的含量进行测定^[3], 未见多成分的同时测定。本研究从高良姜中分离得到了高良姜素、山奈素-4'-甲醚、高良姜素-3-甲醚(结构式见图1, 首次建立了同时测定高良姜中高良姜素、山奈素-4'-甲醚、高良姜素-3-甲醚含量的 HPLC 方法, 以期高良姜药材的质量控制提供依据。

1 仪器与材料

日本岛津公司 LC-2010 高效液相色谱仪、SPD

* 通讯作者 Tel: (024) 23986016 E-mail: bikaishun@yahoo.com



高良姜素 (galingin $R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = H$)

山奈素 - 4'-甲醚 (kaempferide-4'-methylether $R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = OCH_3$)

高良姜素 - 3-甲醚 (galingin-3-methylether $R_1 = OCH_3, R_2 = H, R_3 = H$)

图 1 高良姜素、山奈素 - 4'-甲醚、高良姜素 - 3-甲醚的化学结构式

Fig 1 Chemical structures of galingin, kaempferide-4'-methylether and galingin-3-methylether

- 10AVP 紫外检测器, CIASS-LC 10A 色谱工作站; KQ-100DB 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), AGBP210S 电子天平 (Sartorius 公司), AB135-S 电子天平 (Mettler Toledo 公司)。

对照品高良姜素、山奈素 - 4'-甲醚、高良姜素 - 3-甲醚是本研究室自制, 采用 NMR 鉴定并与文献对照一致, 经 HPLC 峰面积归一化法测定, 纯度均大于 98.5%。不同来源高良姜药材共 16 批, 经沈阳药科大学孙启时教授鉴定为姜科山姜属植物高良姜 (*Alpinia officinarum* Hance) 的干燥根茎, 粉碎过 20 目筛。乙腈 (色谱纯, 山东禹王化学试剂公司), 甲醇 (分析纯, 天津大茂化学试剂厂), 磷酸 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司), 重蒸水 (自制)。

2 方法与结果

2.1 混合对照品储备液制备 精密称取经减压干燥至恒重的对照品高良姜素、山奈素 - 4'-甲醚、高良姜素 - 3-甲醚适量, 置 25 mL 量瓶中, 用甲醇分别配制成浓度为 0.6092, 0.2220, 0.1266 $mg \cdot mL^{-1}$ 的单一对照品储备液。精密量取上述单一对照品储备液各 10 mL 置同一 50 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得混合对照品储备液。

2.2 供试品溶液制备 取高良姜药材粉末 (过 20 目筛) 约 0.2 g 精密称定, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 超声提取 (100 W, 40 kHz, 30 min), 放冷后用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 色谱条件及系统适用性试验 色谱柱: Promosil C₁₈ (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相: 乙腈 (A - 0.05% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0~30 min 34% A $\rightarrow$ 38% A; 30~55 min 38% A), 流速

1.0 $mL \cdot min^{-1}$; 检测波长 264 nm; 柱温 30 $^{\circ}C$; 进样量 10 μL 。在上述色谱条件下, 高良姜素、山奈素 - 4'-甲醚、高良姜素 - 3-甲醚与相邻色谱峰的分离度均大于 1.5, 理论板数均大于 7000, 对称因子在 0.95~1.05 之间。色谱图见图 2。

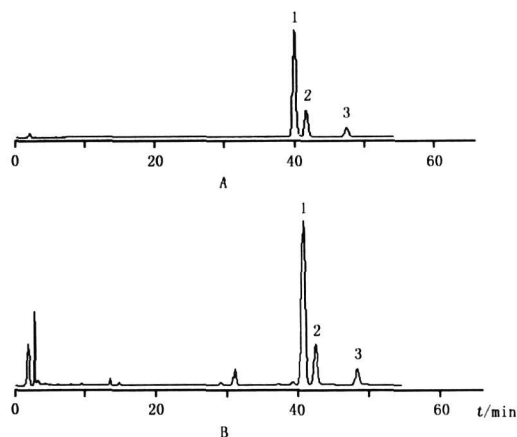


图 2 对照品 (A) 及 3 号样品 (B) 色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of reference substances (A) and sample Na 3 (B)

1. 高良姜素 (galingin) 2. 山奈素 - 4'-甲醚 (kaempferide-4'-methylether) 3. 高良姜素 - 3-甲醚 (galingin-3-methylether)

2.4 线性关系考察 分别精密量取混合对照品储备液 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL 至 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得系列浓度混合对照品溶液。取各系列浓度混合对照品溶液在上述色谱条件下进行 HPLC 分析, 以峰面积 Y 为纵坐标, 溶液的质量浓度 $X (\mu g \cdot mL^{-1})$ 为横坐标绘制标准曲线, 得到高良姜素、山奈素 - 4'-甲醚、高良姜素 - 3-甲醚的回归方程分别为:

$$Y = 4.343 \times 10^4 X - 4.409 \times 10^4 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 3.097 \times 10^4 X - 1.500 \times 10^4 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 2.346 \times 10^4 X - 5.655 \times 10^3 \quad r = 0.9998$$

三者的线性范围分别为 12.18~121.8, 4.44~44.4, 2.53~25.32 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 。

2.5 精密度试验 在上述色谱条件下, 取同一混合对照品溶液连续进样 6 次, 测得高良姜素、山奈素 - 4'-甲醚、高良姜素 - 3-甲醚的峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 0.9%, 1.0%, 1.3%。

2.6 重复性试验 取同一批高良姜药材粉末 (广东 080904, 按“2.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 在上述色谱条件下测定。结果高良姜素、山奈素 - 4'-甲醚、高良姜素 - 3-甲醚平均含量分别为 8.663, 3.125, 1.939 $mg \cdot g^{-1}$; RSD 分别为 1.6%, 1.5%, 1.0%。

2.7 稳定性试验 在上述色谱条件下,取同一份供试品溶液(广东 080904 分别于 0 2 4 6 8 10 12 24 h重复进样,测得高良姜素、山奈素-4'-甲醚、高良姜素-3-甲醚的峰面积的 RSD ($n=8$ 分别为 0.9%, 1.4%, 1.6%,表明供试品溶液在 24 h内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取已测知含量的高良姜药材粉末(广东 080904 9份,每份约 0.1 g 按低、中、高浓度分别精密加入各单一对照品储备液适量(高良姜素 0.7, 1.4 2.2 mL; 山奈素-4'-甲醚 0.7, 1.4 2.1 mL; 高良姜素-3-甲醚 0.9 1.5 2.3 mL,每一浓度 3份。按“2.2”项下方法制备所需溶液,在上述色谱条件下进样测定,计算回收率及其 RSD。见表 1。高良姜素、山奈素-4'-甲醚、高良姜素-3-甲醚低、中、高浓度回收率的平均值 ($n=9$ 分别为 99.2%, 100.5%, 100.4%。

2.9 样品的测定 取收集到的不同产地的 16批高

表 1 回收率测定结果 ($n=3$)
Tab 1 The results of recovery test

成分 (component)	加入量 (added)	回收率 (recovery %)	RSD %
高良姜素 (galangin)	0.4264	98.0	0.3
	0.8529	100.7	1.9
	1.340	98.7	0.4
山奈素-4'-甲醚 (kaempferide-4'-methylether)	0.1554	100.2	2.3
	0.3108	100.9	2.3
	0.4662	100.4	1.1
高良姜素-3-甲醚 (galangin-3-methylether)	0.1139	100.6	2.1
	0.1899	100.5	1.9
	0.2912	100.2	1.1

良姜干燥药材粉末按“2.2”项下方法操作,在上述色谱条件下进行分析,用外标法计算高良姜素、山奈素-4'-甲醚、高良姜素-3-甲醚的含量,结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3$)
Tab 2 The results of sample determination

样品号 (sample No)	来源 (source)	高良姜素 (galangin)	山奈素-4'-甲醚 (kaempferide-4'-methylether)	高良姜素-3-甲醚 (galangin-3-methylether)
1	广东 (Guangdong 080904)	8.624	3.111	1.934
2	广东 (Guangdong 080906)	7.890	2.428	1.527
3	广东 (Guangdong 070925)	8.139	2.845	2.776
4	广东 (Guangdong 080302)	9.749	2.715	1.450
5	广东 (Guangdong 080901)	10.16	3.485	2.058
6	广西 (Guangxi 080303)	7.653	2.307	1.349
7	广西 (Guangxi 080304)	8.956	2.511	1.364
8	云南 (Yunnan)	8.309	2.349	1.401
9	上海 (Shanghai)	8.782	2.492	2.166
10	南京 (Nanjing)	7.985	2.478	1.847
11	河南 (Henan)	9.529	3.120	1.531
12	浙江 (Zhejiang)	9.419	2.276	1.025
13	宁夏 (Ningxia)	8.082	2.489	1.998
14	青海 (Qinghai)	8.021	2.416	1.561
15	陕西 (Shaanxi)	8.860	2.859	1.760
16	四川 (Sichuan)	11.52	3.317	2.093

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的选择

比较了超声提取和加热回流提取,结果表明二者提取效率接近,但超声提取方法简单,容易操作,因此选择了超声提取。在提取溶剂方面,考察了甲醇、乙醇、80% 甲醇、60% 甲醇、80% 乙醇和 60% 乙醇,结果以甲醇提取效率最高,因此选择甲醇为提取溶剂。

对提取时间 (20 30 40 min 和提取溶剂用量 (30 40 50 60 mL 进行考察,通过比较确定用 50 mL甲醇超声提取 30 min能提取完全。

3.2 色谱条件的选择 高良姜素、山奈素-4'-甲醚、高良姜素-3-甲醚 3个待测成分的结构相近,不易分离。本文经过选用不同厂家的色谱柱,如 KromasilC₁₈色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm 及 PromosilC₁₈色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm 进行

试验, 结果表明 Promosil C₁₈ 色谱柱 (4. 6 mm × 250 mm, 5 μm) 对样品的分离效果较好; 分别选用甲醇 - 0. 05% 磷酸水溶液、乙腈 - 0. 05% 磷酸水溶液、乙腈 - 0. 1% 醋酸水溶液进行流动相选择试验, 结果表明以乙腈 - 0. 05% 磷酸水溶液为流动相梯度洗脱对 3 个成分分离最好, 使 3 个成分均达到基线分离。将混合对照品溶液进样分离后, 利用 DAD 检测器在 200~ 400 nm 范围内扫描其吸收光谱, 根据图谱可知这 3 种成分分别在 264, 262, 264 nm 处有最大吸收, 故选择 264 nm 作为检测波长。

3. 3 测定结果分析 样品测定的结果表明, 高良姜药材中这 3 个黄酮类化合物含量均较高, 尤以高良姜素最高, 因此这 3 个化合物可以作为高良姜药材的药效物质基础进一步研究。本研究收集到的这

16 批高良姜药材中高良姜素、山奈素 - 4' - 甲醚、高良姜素 - 3 - 甲醚的含量分别在 7. 65~ 11. 52, 2. 31~ 3. 49, 1. 03~ 2. 78 mg • g⁻¹ 之间, 差异较大。

参考文献

- 1 ChP(中国药典 . 2005. Vol II (一部 : 202
- 2 LÜ W ei 吕玮 , JIANG Ling- huo(蒋伶活 . Chemical Constituents and Pharmacological Activities of *Alpinia officinarum* Hance (高良姜的化学成分及药理作用 . *China Pharm* (中国药业 , 2006 15 (3 : 1
- 3 LI Cai- jun(李彩君 , HUANG Jin- mei 黄劲梅 , XIE Pei- shan (谢培山 , *et al* HPLC determination of galingen in *Alpinia officinarum* (HPLC 法测定高良姜中高良姜素的含量 . *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*(中药新药与临床药理 , 2002 13(1 : 41

(本文于 2009 年 4 月 22 日修改回

李克强副总理考察中国药品生物制品检定所

中共中央政治局常委、国务院副总理李克强 9 日下午在中共中央政治局委员、北京市委书记刘淇的陪同下, 来到中国药品生物制品检定所, 考察甲型 H1N1 流感疫苗研发与检验工作, 并在现场召开了应对甲型 H1N1 流感联防联控工作机制会议。他强调, 要按照党中央、国务院的部署, 继续坚持依法、科学、有序防治的原则, 坚持联防联控的工作机制, 坚持强化预防、突出重点、加强救治、减少危害的防控策略, 进一步做好甲型 H1N1 流感防控工作, 切实保障人民群众健康和社会生产生活秩序正常稳定。

详见《中国政府网》