

HPLC 法同时测定青天葵药材中 7 种黄酮的含量

张 丽, 祝晨陈*, 赵钟祥, 林朝展

(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 建立同时测定青天葵中鼠李秦素 (1)、鼠李柠檬素 (2)、鼠李素 (3)、鼠李秦素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷 (4)、鼠李秦素-3-*O*- β -D-木糖-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-葡萄糖苷 (5)、鼠李秦素-3-*O*- β -D-葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-葡萄糖苷 (6) 和鼠李柠檬素-3-*O*- β -D-葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-葡萄糖苷 (7) 含量的高效液相色谱法。采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 以 0.4% 磷酸-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 流速为 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, 检测波长为 256 nm, 柱温为 40 $^{\circ}$ C。7 种黄酮类化合物 (1~7) 的线性范围分别为 0.55~70.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ ($r = 0.999\ 7$)、0.86~110.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ ($r = 0.999\ 7$)、0.39~50.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ ($r = 0.999\ 7$)、0.55~70.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ ($r = 0.999\ 5$)、1.33~170.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ ($r = 0.999\ 8$)、1.33~170.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ ($r = 0.999\ 8$)、0.16~20.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ ($r = 0.999\ 5$), 平均回收率在 97.19%~99.45% 之间, RSD 在 0.91%~2.69% 之间。该方法简单、准确, 具有良好的重复性和稳定性, 可为青天葵的质量控制提供科学依据。

关键词: 高效液相色谱; 青天葵; 黄酮; 含量测定

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 10-1237-04

Simultaneous determination of seven flavonoids in *Nervilia fordii* with HPLC

ZHANG Li, ZHU Chen-chen*, ZHAO Zhong-xiang, LIN Chao-zhan

(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The study is to develop an HPLC method for simultaneous determination of rhamnazin (1), rhamnocitrin (2), rhamnetin (3), rhamnazin-3-*O*- β -D-glucopyranoside (4), rhamnazin-3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranoside (5), rhamnazin-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranoside (6), and rhamnocitrin-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranoside (7) in *Nervilia fordii*. The separation was performed on a Kromasil C₁₈ column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) with 0.4% phosphoric acid – acetonitrile as the mobile phase in a gradient elution at a flow rate of 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹. The detect wavelength was set at 256 nm, and the column temperature was set at 40 $^{\circ}$ C. There were good linear relationships between the logarithm values of concentrations and those of the peak areas of seven flavonoids (1~7) in the range of 0.55–70.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ ($r = 0.999\ 7$), 0.86–110.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ ($r = 0.999\ 7$), 0.39–50.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ ($r = 0.999\ 7$), 0.55–70.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ ($r = 0.999\ 5$), 1.33–170.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ ($r = 0.999\ 8$), 1.33–170.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ ($r = 0.999\ 8$), 0.16–20.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ ($r = 0.999\ 5$), respectively. The recoveries of the seven flavonoids were between 97.19%–99.45%, the relative standard deviations (RSDs) were between 0.91%–2.69%. The established method is rapid, accurate with high repeatability, which could provide scientific evidence for the quality control of *Nervilia fordii*.

Key words: HPLC; *Nervilia fordii*; flavonoid; content determination

收稿日期: 2011-03-10.

基金项目: 广东省国际合作项目 (2008-A05-0200005).

*通讯作者 Tel: 86-20-39358047, Fax: 86-20-39358047, E-mail: zhuchenchen@vip.sina.com

青天葵来源于兰科芋兰属植物毛唇芋兰 *Nervilia fordii* (Hance) Schltr., 主产于广西、广东和海南, 四川、云南、泰国亦有分布, 具有清热润肺止咳, 解毒散瘀止痛的功效, 主治肺热咳嗽、肺癆咯血、咽喉肿痛、口腔炎症、瘰癧、疮疡肿毒、跌打损伤等症^[1-3]。临床上常与其他中药联合应用, 如天龙茶、天龙咳喘灵胶囊等, 在治疗哮喘、急性支气管炎、喘息型慢性支气管炎方面效果显著^[4]。已有研究^[5-7]表明青天葵中主要含有黄酮、甾体、三萜、氨基酸类等化学成分。青天葵按叶片形态与大小可分为大叶、中叶、小叶 3 种商品规格, 近年来还发现在中药材市场中以其近缘品种毛叶芋兰 *Nervilia plicata* (Andr.) Schltr. (亦称毛叶青天葵) 的干燥全草作青天葵用。目前还尚未建立有效的质量评价方法用于控制其药材质量, 仅有对于水分、水溶性浸出物、醇溶性浸出物等及鼠李素、鼠李柠檬素和鼠李素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷含量测定的报道^[8-10]。本课题组在化学成分研究的基础上建立了 HPLC 梯度洗脱法同时测定青天葵中 7 种黄酮类成分的含量, 旨在建立一种简便、灵敏的测定方法以更好控制青天葵药材质量。

材料与方法

仪器与材料 天美高效液相色谱仪 (LC2000 紫外检测器, L-2200 自动进样器, L-2130 四元泵, T2000 工作站), Dionex Tcc-100 型柱温箱 (美国戴安公司), AEG-220 电子分析天平 (日本岛津公司)。乙腈 (色谱纯, Merck 公司), 超纯水, 磷酸 (分析纯)。

实验药材购自广西和广东两省的药材市场或药房, 经广州中医药大学祝晨蓀研究员鉴定为毛唇芋兰 *Nervilia fordii* (Hance) Schltr. 及毛叶芋兰 *Nervilia plicata* (Andr.) Schltr. 的全草, 干燥、粉碎, 过 3 号筛。鼠李素 (1)、鼠李柠檬素 (2)、鼠李素 (3)、鼠李素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷 (4)、鼠李素-3-*O*- β -D-木糖-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-葡萄糖苷 (5)、鼠李素-3-*O*- β -D-葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-葡萄糖苷 (6) 和鼠李柠檬素-3-*O*- β -D-葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-葡萄糖苷 (7) 对照品均由本实验室前期分离纯化制得, 经紫外光谱 (UV)、红外光谱 (IR)、质谱 (MS)、核磁共振谱 (NMR) 等鉴定结构^[11], 经 HPLC 检测均为单一成分, 纯度均在 98.5% 以上。

标准曲线 分别精密称取上述 7 种对照品适量, 用甲醇-水溶解, 均配成质量浓度为 0.67 mg·mL⁻¹ 的储备液。分别取各化合物储备液适量, 制成每 1 mL 含化合物 1~7 分别为 0.07、0.11、0.05、0.07、0.17、0.17、0.02 mg 的混合对照品储备液。将混合对照品

储备液稀释成不同浓度, 在色谱条件下测定各对照品的色谱峰面积, 再计算各对照品浓度与色谱峰面积的线性回归方程和 *r* 值。

供试品溶液 精密称取药材粉末 0.5 g 于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 80% 乙醇 50 mL, 水浴提取 2 次, 每次提取 1 h, 过滤, 合并滤液, 减压浓缩, 用 80% 乙醇溶解定容至 40 mL, 用 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 256 nm; 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ L; 流动相: 乙腈 (A) - 0.4% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0~15 min, 26% A; 15~20 min, 26% A~34% A; 20~40 min, 34% A~60% A)。

方法学考察

精密度 精密吸取混合对照品溶液 20 μ L, 注入高效液相色谱仪, 重复测定 6 次, 记录峰面积, 计算 7 个化合物的 RSD 值。

重复性 精密称取同一批供试品药材 (大叶青天葵), 按供试品溶液制备方法平行制备 6 份供试品溶液, 测定 7 个化合物的色谱峰面积。

稳定性 精密称定青天葵药材粉末 0.5 g, 按供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 分别在室温下放置 0、2、4、8、12 和 24 h 后进样分析, 测定各组分 (1~7) 的峰面积。

回收率 精密称取同一批青天葵药材粉末 6 份, 每份 0.5 g, 加入等同于药材样品含量的 7 种黄酮对照品。按所建立的方法进行供试品制备和测定, 计算各组分的含量和加样回收率。

统计学分析 黄酮化合物的含量统计分析采用 *t* 检验。

结果

1 方法学考察

1.1 HPLC 色谱图 混合对照品与样品色谱图见图 1。

1.2 标准曲线、精密度、重复性和稳定性 7 个对照品浓度 (*X*, μ g·mL⁻¹) 与对应的色谱峰面积 (*Y*) 线性回归方程、精密度、重复性和稳定性测定结果见表 1。

1.3 回收率 7 个对照品的平均加样回收率在 97.19%~99.45 之间, RSD 值均小于 2.69% (*n* = 6)。

2 样品含量测定

取 15 批青天葵和 5 批毛叶青天葵药材粉末各

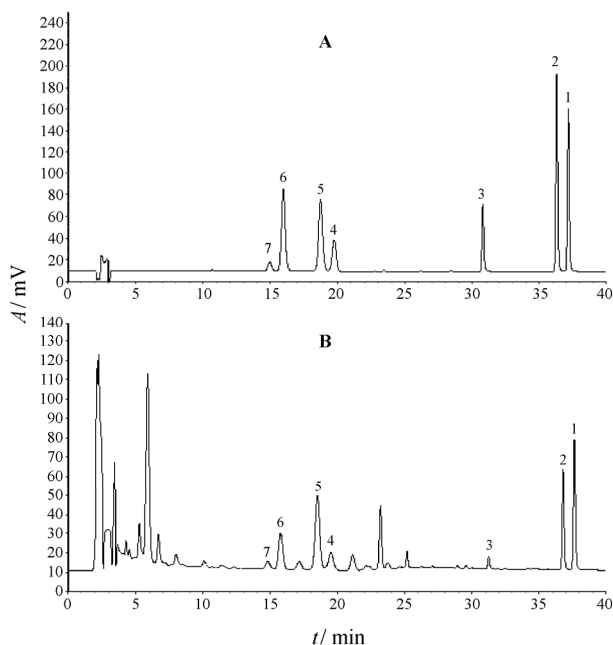


Figure 1 HPLC chromatograms of a mixture of standards (A) and a sample of *N. fordii* (B). 1: Rhamnazin; 2: Rhamnocitrin; 3: Rhamnetin; 4: Rhamnazin-3-*O*- β -D-glucopyranoside; 5: Rhamnazin-3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranoside; 6: Rhamnazin-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranoside; 7: Rhamnocitrin-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranoside

0.5 g, 制备供试品溶液, 按上述色谱条件进行分析, 并计算青天葵中 7 种黄酮化合物的含量, 结果见表 2。15 批次青天葵中黄酮 1~7 含量的 RSD 值分别为 119.54%、81.92%、87.94%、121.61%、100.95%、125.80%、95.35%; 对各批次毛叶青天葵和青天葵中 1、2、3 的总含量进行统计分析, 经 t 检验, $t = 3.271\ 2 > t_{0.05, 18}$ ($t_{0.05, 18} = 2.101$), 表明有显著性差异; 对 9 批大叶青天葵和 6 批中叶青天葵中 7 种黄酮的总含量进行统计分析, 经 t' 检验, $t' = 2.362\ 2 > t_{0.05, 11}$ ($t_{0.05, 11} = 2.201$), 有显著性差异; 对 9 批广西产青天葵和 5 批广东产青天葵中 7 种黄酮总含量进行统计分析, 经 t 检验, $t = 1.040\ 3 < t_{0.05, 12}$ ($t_{0.05, 12} = 2.179$), 无显著性差异。

讨论

在选择检测波长方面, 对上述 7 种黄酮类成分对照品溶液进行紫外图谱扫描, 化合物 4~7 的最大吸收波长在 255~267 nm 区间, 而化合物 1~3 的最大吸收波长虽不在此区间, 但吸收强度与最大吸收波长相比并无明显减弱, 故选取了 256 nm 作为检测波长。

本实验建立了高效液相色谱法同时测定青天葵药材中 7 种黄酮含量的方法, 并测定了以上 7 种黄酮在不同产地青天葵和毛叶青天葵中的含量, 结果表明青天葵与毛叶青天葵的化学成分含量差异很大: 黄酮化合物 1、2、3 虽然均存在于青天葵与毛叶青天葵中, 但总含量有显著性差异; 而黄酮 4、5、6、7 仅存在于青天葵中, 毛叶青天葵均未检出。鉴于两者在化学成分多样性上的差异及由这种差异导致的两者在药理作用、药效学上的差异, 毛叶青天葵是否可以代替青天葵, 两者对于人体机能的影响是否不同有待进一步研究。

含量测定结果显示, 黄酮化合物 1~7 在所测定的 15 批次青天葵样品中的含量波动幅度较大, 因此单一考察其中某种成分并不能将不同商品规格、不同产地青天葵准确的区分开来。但是, 在现有的样本基础上, 以所测黄酮总含量为标准, 可以发现大叶青天葵中 7 种黄酮总含量高于中叶青天葵, 且有显著性差异, 而广西产青天葵和广东产青天葵则无显著性差异。由于实验所收集样品无法确定药材的生长年限、采收时间以及储存时间, 生长环境、储存条件也不尽相同, 以上因素均可能影响到植物的次生代谢途径, 或许是造成单个黄酮类成分含量有较大差异的原因。虽然 7 种黄酮在所有样本中均存在着此高彼低的情况, 但由于 15 批青天葵同属同种, 携带着同样的遗传基因, 实验所测定化合物结构的相似程度即可反映出不同样本的化学成分信息有着整体相似性, 所以采用 7 个黄酮的总含量评价青天葵药材质量优劣

Table 1 Regression equations and linear ranges of references and verifying the HPLC method (RSD of peak area/%)

Compd.	Regression equation	r	Linear range/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Precision	Repeatability	Stability
1	$Y = 85\ 392\ X - 36\ 182$	0.999 7	0.55 – 70.00	1.85	1.30	1.04
2	$Y = 66\ 921\ X - 55\ 284$	0.999 7	0.86 – 110.00	1.57	1.30	0.89
3	$Y = 56\ 061\ X - 20\ 571$	0.999 7	0.39 – 50.00	1.45	2.86	2.61
4	$Y = 39\ 909\ X - 23\ 505$	0.999 5	0.55 – 70.00	2.57	2.21	1.08
5	$Y = 33\ 013\ X - 26\ 511$	0.999 8	1.33 – 170.00	2.65	1.00	0.65
6	$Y = 35\ 135\ X - 24\ 898$	0.999 8	1.33 – 170.00	1.83	1.57	1.68
7	$Y = 26\ 691\ X - 3\ 312$	0.999 5	0.16 – 20.00	2.36	2.79	2.56

Table 2 Contents of the seven flavonoids in *N. fordii* and *N. placata* from different sources (*n* = 3). *: Out of the linear range; –: Not detected

No.	Collection location	Content/ mg·g ⁻¹							SUM
		1	2	3	4	5	6	7	
1	<i>N. fordii</i> of big leaf (Guangxi 1)	0.688	0.217	0.044	0.520	2.721	0.957	0.339	5.486
2	<i>N. fordii</i> of big leaf (Guangxi 2)	0.720	0.752	0.122	0.510	2.459	1.053	0.284	5.900
3	<i>N. fordii</i> of big leaf (Guangxi 3)	0.191	0.623	0.079	0.257	1.684	0.614	0.733	4.181
4	<i>N. fordii</i> of big leaf (Guangxi 4)	0.098	1.176	0.147	0.050	0.408	0.146	0.396	2.421
5	<i>N. fordii</i> of big leaf (Guangxi 5)	0.092	2.241	0.201	0.030*	0.359	0.033*	0.115	3.071
6	<i>N. fordii</i> of big leaf (Guangxi 6)	0.137	3.698	0.270	–	0.513	–	–	4.618
7	<i>N. fordii</i> of big leaf (Guangdong 1)	0.543	0.262	0.169	0.417	1.747	1.165	0.298	4.601
8	<i>N. fordii</i> of big leaf (Guangdong 2)	0.304	0.996	0.119	0.097	0.545	0.274	0.220	2.269
9	<i>N. fordii</i> of big leaf (Guangdong 3)	0.047	1.761	0.072	0.057	0.275	0.057*	–	2.269
10	<i>N. fordii</i> of middle leaf (Guangxi 7)	0.145	0.617	0.584	1.390	0.237	0.065*	0.064	3.102
11	<i>N. fordii</i> of middle leaf (Guangxi 8)	0.433	1.276	0.100	0.108	0.080*	0.034*	0.092	2.123
12	<i>N. fordii</i> of middle leaf (Guangxi 9)	1.870	0.098	0.088	0.615	–	–	–	2.671
13	<i>N. fordii</i> of middle leaf (Guangdong 4)	0.474	0.749	0.121	0.248	1.167	0.300	0.384	3.443
14	<i>N. fordii</i> of middle leaf (Guangdong 5)	0.154	0.867	0.096	0.198	0.496	0.228	0.359	2.398
15	<i>N. fordii</i> of middle leaf (Xizang)	–	1.726	0.059	–	0.371	–	–	2.156
16	<i>N. placata</i> (Guangxi 1)	–	0.805	0.045	–	–	–	–	0.850
17	<i>N. placata</i> (Guangxi 2)	0.055	0.428	–	–	–	–	–	0.483
18	<i>N. placata</i> (Guangxi 3)	0.057	0.603	0.038	–	–	–	–	0.698
19	<i>N. placata</i> (Hainan 1)	–	0.130	–	–	–	–	–	0.130
20	<i>N. placata</i> (Hainan 2)	–	0.072	–	–	–	–	–	0.072

有其合理性。

根据本实验样品测定结果，青天葵药材中黄酮含量限度宜暂定为：以干燥品计，每克药材中化合物1~7的总含量不得低于2.0 mg。

References

[1] Guangdong Food and Drug Administration. Guangdong Chinese Materia Medica Standards: Vol. 1 (广东省中药材标准:第一册) [S]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 2004: 122.

[2] Zhang JR. Lingnan Summary of Chinese Herbs (岭南中草药撮要) [M]. Guangzhou: Guangdong Higher Education Press, 1994: 87.

[3] Chen WW, Xu HH. Study of Lingnan Genuine Medicine Materials (岭南道地药材研究) [M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 2007: 326–351.

[4] Men QX. Advance in the research of chemical constituents pharmacologic action and clinical application of herba *Nervilia Plicatae* [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2008, 26: 2239–2241.

[5] Tian LW, Pei Y, Zhang YJ, et al. 7-*O*-methylkaempferol and -quercetin glycosides from the whole plant of *Nervilia fordii* [J]. J Nat Prod, 2009, 72: 1057–1060.

[6] Zhen HS, Zhou YY, Yuan YF, et al. Studies on the chemical constituents of the ethyl acetate portion of *Nervilia fordii* [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2007, 30: 942–945.

[7] Lu CL, Wang H, Zhou GX, et al. Studies on the chemical constituents of petroleum ether extract with anti-tumor activity from *Nervilia fordii* [J]. J Jinan Univ (Nat Sci) (暨南大学学报 自然科学版), 2009, 30: 556–559.

[8] Wang ZH, Du Q, Xu HH. Comparative study on quality standard of *Nervilia fordii* (Hance) Schltr. of different species [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med (广州中医药大学学报), 2007, 24: 59–61.

[9] Zhou YY, Zhen HS, Yuan YF, et al. HPLC determination of rhamnocitrin and rhamnazin in *Nervilia fordii* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2009, 40: 1152–1154.

[10] Xie YL. The Mechanism of Anti-inflammation and Study of Quality Control of Southern Chinese Material Medica of Herba *Nervilia fordii* (南药青天葵的抗急性肺损伤作用机理及其质量标准研究) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2007.

[11] Pei YH, Hua HM, Li ZL, et al. Application of nuclear magnetic resonance to the determination of the configuration of glycoside bond [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2011, 46: 127–131.