

## 测定土茯苓中二氢黄酮醇类含量的 UPLC法和 HPLC法的建立与比较

贾 玮<sup>1</sup>, 刘 海<sup>2,3\*</sup>, 王峥涛<sup>1,2,3\*\*</sup>

(<sup>1</sup>中国药科大学生药学研究室, 南京 210009; <sup>2</sup>上海中医药大学中药研究所中药标准化教育部重点实验室, 上海 201203;  
<sup>3</sup>上海中药标准化研究中心, 上海 201203)

**摘 要** 目的: 建立与比较土茯苓中二氢黄酮醇类成分的两种含量测定方法, 为完善土茯苓的质量标准奠定基础。方法: 分别用超高效液相色谱 (UPLC) 和高效液相色谱 (HPLC) 对来自 15 个不同产地的土茯苓中 4 种二氢黄酮醇类成分进行含量测定, 并比较两种方法的分离时间、线性、灵敏度、精密度、重复性、加样回收率和样品测定结果。结果: 与 HPLC 法比较, UPLC 的分析时间短、灵敏度高, 两种方法在线性范围、精密度、准确度方面均无显著差异。结论: 所建立的 HPLC 法简便可靠, 可用于土茯苓的质量评价; UPLC 法节省了分析时间和溶剂的消耗, 是一种值得推广的、更为快速、准确的中药质量评价方法。

**关键词** 超高效液相色谱法; 高效液相色谱法; 二氢黄酮醇; 土茯苓; 含量测定

**中图分类号** R917 **文献标识码** A **文章编号** 1000 - 5048(2009)04 - 0337 - 05

### Development and comparative evaluation of the UPLC and HPLC methods for the determination of dihydroflavonoids in *Smilacis glabrae* Rhizoma

JIA Wei<sup>1</sup>, LIU Hai<sup>2,3\*</sup>, WANG Zheng-tao<sup>1,2,3\*\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; <sup>2</sup>The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203;

<sup>3</sup>Shanghai R&D Center for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201203, China

**Abstract** Aim: To develop and compare the ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and HPLC methods for the determination of dihydroflavonoids in *Smilacis glabrae* Rhizoma, and establish the quality evaluation system of the above-mentioned crude drug. Methods: Four dihydroflavonoids in the crude drugs collected from 15 localities were determined using the UPLC and HPLC methods, respectively. The resolution, sensitivity, precision, accuracy and the content determination results of the four compounds were compared between the two methods. Results: The UPLC method was more fast and sensitive than the HPLC method with no significant differences among the linearity range, precision, accuracy and the content determination results between the two methods. Conclusion: The developed HPLC method was proved practicable and reliable for the quality control of *Smilacis glabrae* Rhizoma. The UPLC method was provided to be a more sensitive, fast and solvent-saving method compared to HPLC and can be applied in the quality evaluation of Chinese medicines

**Key words** ultra-performance liquid chromatography; HPLC; dihydroflavonoids; *Smilacis glabrae* Rhizoma; determination of contents

This study was supported by the Grant from the Committee of Science and Technology of Shanghai (No. 08DZ1970103)

\* 收稿日期 2009-03-16 通讯作者 \* Tel: 021 - 50805522 - 3037 E-mail: lhb77@hotmail.com

\*\* Tel: 021 - 51322507 E-mail: wangzht@hotmail.com

基金项目 上海市科学技术委员会资助项目 (No. 08DZ1970103)

土茯苓为百合科植物光叶菝葜 (*Smilax glabra* Roxb.) 的干燥根茎<sup>[1]</sup>, 主要分布于华东及西南地区, 具有除湿、解毒、通利关节等作用, 临床上主要用于治疗钩端螺旋体病以及用于镇痛, 利尿, 保肝等<sup>[2-3]</sup>。土茯苓中主要含有黄酮类, 特别是二氢黄酮醇类成分<sup>[4]</sup>, 如落新妇苷 (astilbin, 2*R*, 3*S*)、对映落新妇苷 (ent-astilbin, 2*S*, 3*R*)、表落新妇苷 (epi-astilbin, 2*R*, 3*R*)、对映表落新妇苷 (ent-epiastilbin, 2*S*, 3*S*) 等。其中最主要成分落新妇苷具抗炎镇痛利尿之效果<sup>[5]</sup>, 同时对于免疫性的肝损伤具有保护作用<sup>[6]</sup>, 可作为土茯苓质量控制的指标性成分。

关于土茯苓质量控制研究已有一些报道<sup>[7-9]</sup>, 但由于落新妇苷类成分以光学异构体形式存在, 色谱分离及对对照品制备均有一定困难。迄今为止, 尚无统一、规范的质量控制方法, 中国药典 2005 年版也没有关于土茯苓含量测定的指标。近年来, 超高效液相色谱 (ultra performance liquid chromatography, UPLC) 作为一种新兴的液相色谱技术, 相对于传统 HPLC 具有快速、节省溶剂和分离度高等优势, 已经得到越来越广泛的应用<sup>[10]</sup>。本研究运用 HPLC 和 UPLC 技术建立了土茯苓中落新妇苷的含量测定方法, 比较了两种测定方法的特点。同时参照文献<sup>[11]</sup>, 采用落新妇苷一个对照品, 同时测定了其他 3 种二氢黄酮醇类 (对映落新妇苷), 表落新妇苷和对映表落新妇苷成分的含量, 所建立的方法克服了其对照品缺乏的困难。15 批土茯苓样品的含量测定结果为中国药典 2010 年版土茯苓质量标准的修订提供了依据, 所采用的 UPLC 分离技术可作为土茯苓的质量控制方法。

## 材 料

HPLC: Waters e2695 Separations Module 系统, Waters 2998 二极管阵列检测器 (PDA) 和 Empower 软件 (美国 Waters 公司); UPLC: Waters Acquity UPLC Micromass ZQ 2000 系统和 Waters Masslynx 4.1 软件 (美国 Waters 公司); Sartorius BT25S 天平和 BT124S 天平 (德国 Sartorius 公司); DK-S24 型恒温水浴锅 (上海精密实验设备有限公司)。

15 批土茯苓样品在 2007 年 7 月至 2008 年 10 月间购自全国各地不同的药材公司和药店, 经上海中药标准化研究中心吴立宏副教授鉴定为百合科植物光叶菝葜 (*Smilax glabra* Roxb.) 的干燥根

茎; 对照品落新妇苷、对映落新妇苷和对映表落新妇苷由上海中药标准化研究中心提供, 结构经 MS、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 确证。

甲醇 (色谱纯, 美国 Fisher 公司); 醋酸 (色谱纯, 美国 Tedia 公司)。水为娃哈哈纯净水, 其余试剂均为市售分析纯。

## 方 法

### 2.1 对照品与供试品溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取经五氧化二磷干燥 24 h 的落新妇苷对照品适量, 加 60% 甲醇制成 443.2 μg/mL 的对照品溶液, 即得。

2.1.2 土茯苓药材供试品溶液的制备 各批药材于 60 °C 干燥 3 h, 粉碎后过 3 号筛, 精密称定药材粉末 0.2 g, 加入 60% 甲醇 25 mL, 精密称定, 回流提取 1 h, 放冷, 用 60% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液即得。

### 2.2 色谱条件和系统适用性试验

2.2.1 UPLC 色谱条件 色谱柱: Waters Acquity UPLC BEH-C<sub>18</sub> (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 0.1% 醋酸水溶液-甲醇 (25:75); 检测波长: 291 nm; 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样体积: 2 μL。药材的 UPLC 色谱图见图 1(A)。

2.2.2 HPLC 色谱条件 色谱柱: Zorbax SB-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1% 醋酸水溶液-甲醇 (61:39); 检测波长: 291 nm; 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样体积: 2 μL。药材的 HPLC 色谱图见图 1(B)。

2.2.3 MS 条件 检测方式: ESI(-); 干燥气流速: 10 L/min; 干燥气温度: 350 °C; 毛细管电压: 3 200 eV; 扫描范围:  $m/z$  100 ~ 700。

2.2.4 UPLC-MS 分析 按照“2.2.1 项下色谱条件, 取供试品溶液进样分析, 得土茯苓样品的质谱总离子流图和一级质谱图 (数据未给出)。~ 号色谱峰相应的一级质谱图给出的准分子离子峰 ( $[M-H]^-$ ) 的  $m/z$  均为 449, 说明这 4 个化合物的相对分子质量一致, 比较各色谱峰的紫外光谱图也非常相似 (数据未给出), 证实这 4 个化合物为同一类型的化合物。通过与 3 个对照品的保留时间相比较 (见图 2), 确定, ~ 号色谱峰代表的化合物为对映落新妇苷, 落新妇苷和对映表落新妇苷。结合文

献 [10] 和 号色谱峰提供的分子离子峰信息,推断

号色谱峰代表的化合物是表落新妇苷。

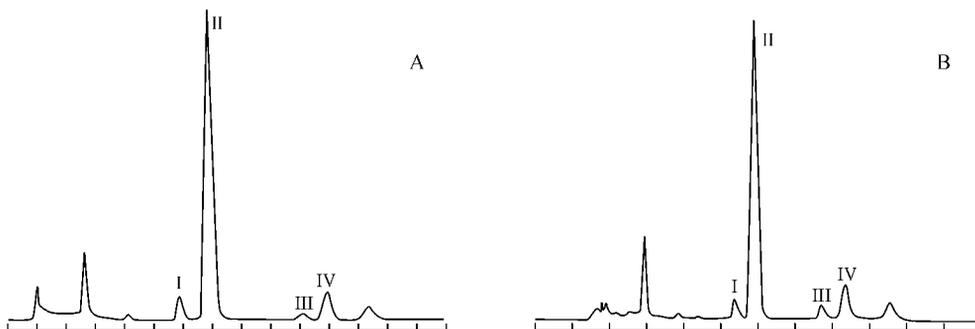


Figure 1 UPLC-UV (A) and HPLC-UV (B) chromatograms of the extract of *Smilax glabrae*  
I: ent-astilbin; II: Astilbin; III: ent-epiastilbin; IV: epi-astilbin

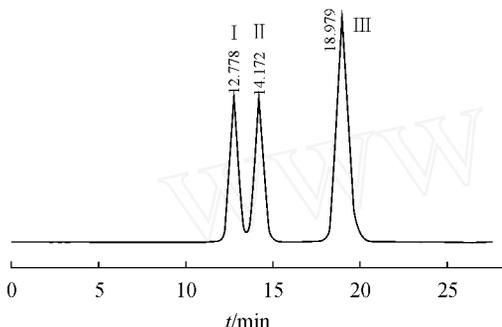


Figure 2 Chromatogram of ent-astilbin (I), astilbin (II), and ent-epiastilbin (III)

### 2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系 精密吸取落新妇苷对照品储备液 (443.2 μg/mL), 用 60% 甲醇溶液稀释分别配制成 332.4, 221.6, 110.8, 44.3, 4.4 μg/mL 的一系列对照品溶液, 精密吸取上述溶液 2 μL 进样, 按“2.2.1 和“2.2.2 项下色谱条件测定, 以峰面积 (Y) 为横坐标, 对照品进样量 (X, μg) 为纵坐标绘制标准曲线, 得 UPLC 的回归方程:  $Y = 105\,976.6X + 233.2$ ,  $r = 0.999\,9$ , 落新妇苷在 0.2 ~ 886.4 ng 范围内呈良好的线性关系; 同样的方法得到 HPLC 的回归方程:  $Y = 3\,125\,596.5X - 3\,334.4$ ,  $r = 0.999\,9$ , 落新妇苷在 0.2 ~ 886.4 ng 范围内呈良好的线性关系。

2.3.2 检测限和定量限 取标准曲线的最低点为对照品溶液, 用 60% 甲醇溶剂逐级稀释, 按“2.2.1 和“2.2.2 项下色谱条件测定。信噪比为 3 的量确定为最低检测限, 信噪比为 10 的量确定

为最低定量限。UPLC 法测得的检测限为 0.014 ng, 定量限为 0.222 ng; 而 HPLC 的检测限为 1.051 ng, 定量限为 4.203 ng, UPLC 的灵敏度明显高于 HPLC。

2.3.3 精密度 精密吸取质量浓度为 110.8 μg/mL 的落新妇苷对照品溶液, 按“2.2.1”和“2.2.2 项下色谱条件测定, 在 1 d 内连续测定 5 次, 以及在连续 3 d 每天进样 5 次, 测定峰面积的 RSD 值来评价日内和日间精密度。结果显示, UPLC 日内精密度为 0.26%, 日间精密度为 0.55%; HPLC 的日内精密度为 0.10%, 日间精密度为 0.11%, 表明两种仪器精密度均良好。

2.3.4 重复性 取同一样品, 按“2.1.2 项下的方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.2.1”和“2.2.2 项下色谱条件测定, 测定落新妇苷峰面积值, 结果两种方法的 RSD 分别为 0.72% 和 0.87%, 表明两种测定方法重复性均良好。

2.3.5 加样回收率 平行取 5 份已知落新妇苷含量的土茯苓粉末, 每份 0.1 g, 每 3 份为 1 组, 分别准确加入落新妇苷对照品 0.44, 0.35, 0.53 mg, 按“2.1.2 项下条件制备供试品溶液, 按“2.2.1 和“2.2.2 项下色谱条件测定。结果 UPLC 的平均加样回收率为 100.1%, RSD 为 1.93%; HPLC 的平均加样回收率为 99.4%, RSD 为 2.21%。两者无显著性差异, 说明两方法均具有良好的加样回收率 (见表 1)。

**Table 1** Recovery of astilbin (4.26 mg/g) ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

| Added/mg | UPLC             |                   |       | HPLC             |                   |       |
|----------|------------------|-------------------|-------|------------------|-------------------|-------|
|          | Found/mg         | Recovery/%        | RSD/% | Found/mg         | Recovery/%        | RSD/% |
| 0.443 2  | 0.88 $\pm$ 0.007 | 97.81 $\pm$ 1.09  | 1.11  | 0.88 $\pm$ 0.006 | 97.55 $\pm$ 0.75  | 0.77  |
| 0.354 6  | 0.81 $\pm$ 0.002 | 101.78 $\pm$ 0.89 | 0.87  | 0.80 $\pm$ 0.002 | 101.27 $\pm$ 1.25 | 1.23  |
| 0.531 8  | 0.98 $\pm$ 0.006 | 100.67 $\pm$ 0.60 | 0.60  | 0.98 $\pm$ 0.002 | 100.97 $\pm$ 1.03 | 1.02  |

## 结 果

精密吸取样品溶液,分别用 UPLC 和 HPLC 按“2.2.1 和“2.2.2 项下色谱条件测定,测定 4 种

二氢黄酮醇类成分峰面积积分值,利用落新妇苷对照品的标准曲线,按外标法计算样品溶液中落新妇苷的准确含量和另外 3 种黄酮醇类成分的相对含量,结果见表 2。

**Table 2** Sources of the samples and results of four dihydroflavonoids in *Smilacis glabrae* Rhizoma

| No.              | Source       | UPLC |       |      |      | HPLC |       |      |      |
|------------------|--------------|------|-------|------|------|------|-------|------|------|
|                  |              | I    | II    | III  | IV   | I    | II    | III  | IV   |
| Decoction pieces |              |      |       |      |      |      |       |      |      |
| 1                | Hunan        | 0.12 | 1.53  | 0.27 | 0.09 | 0.13 | 14.90 | 0.28 | 0.08 |
| 2                | Shanghai-1   | 1.39 | 20.18 | 0.70 | 2.83 | 1.22 | 19.59 | 0.69 | 2.80 |
| 3                | Jiangxi      | 0.23 | 3.64  | 0.25 | 0.43 | 0.22 | 3.56  | 0.24 | 0.43 |
| 4                | Shanghai-2   | 0.81 | 7.81  | 0.28 | 1.20 | 0.75 | 7.32  | 0.27 | 1.11 |
| 5                | Zhengjiang   | 0.71 | 12.79 | 0.37 | 1.85 | 0.56 | 12.29 | 0.39 | 1.82 |
| 6                | Shanghai-3   | 1.56 | 11.65 | 0.43 | 2.31 | 1.39 | 11.59 | 0.42 | 2.30 |
| 7                | Suqian       | 0.03 | 1.42  | -    | 1.40 | 0.03 | 1.42  | -    | 1.39 |
| 8                | Guangxi      | 0.78 | 5.21  | 0.20 | 1.10 | 0.03 | 4.55  | 0.19 | 1.12 |
| Crude drugs      |              |      |       |      |      |      |       |      |      |
| 9                | Henan-1      | 0.81 | 11.09 | 0.34 | 1.68 | 0.75 | 11.32 | 0.33 | 1.65 |
| 10               | Anhui        | 1.25 | 15.51 | 0.43 | 2.14 | 1.1  | 14.52 | 0.42 | 2.10 |
| 11               | Henan-2      | 0.92 | 10.20 | 0.28 | 1.54 | 0.88 | 9.83  | 0.28 | 1.53 |
| 12               | Shanghai-4   | 0.76 | 16.19 | 0.34 | 1.85 | 0.76 | 15.29 | 0.31 | 1.83 |
| 13               | Heilongjiang | 0.21 | 2.08  | 0.28 | -    | 0.20 | 2.10  | 0.28 | -    |
| 14               | Henan-2      | 1.63 | 16.77 | 0.48 | 2.73 | 1.59 | 16.59 | 0.34 | 2.70 |

I ent-astilbin; II A stilbin; III ent-epiastilbin; IV: epi-astilbin (All the contents were calculated by mg/g)

## 讨 论

从所测得的含量结果可以看出,落新妇苷为土茯苓中的主要成分,相较于其他 3 种二氢黄酮醇类成分其含量最高。但是不同产地、不同商品之间的落新妇苷含量差异很大。HPLC 法测定时,其含量差异为 1.42 ~ 19.59 mg/g,这说明了制定土茯苓质量标准的迫切性。本研究建立的 HPLC 含量测定方法,通过精密度试验、重复性试验以及加样回收率试验证实该方法简便易行,准确可靠,可作为土茯苓药材质量控制和评价方法。这些为中国药典 2010 年版土茯苓药材质量标准的完善提供了重要依据。

中药对照品的获得一直是一个重点和难点。土茯苓中落新妇苷、对映落新妇苷、对映表落新妇苷和表落新妇苷为光学异构体,分离和制备的过程

尤其困难。此外它们的相对分子质量相同并且紫外吸收光谱几乎一致,非常适合用一品多测的方法。Li 等<sup>[11]</sup>证实了采用一种对照品测定多种紫外吸收情况类似并且化学结构相似成分方法的合理性。本研究 HPLC 法测定的对映落新妇苷相对含量为 0.03 ~ 1.59 mg/g,对映表落新妇苷的相对含量为 0.19 ~ 0.69 mg/g,表落新妇苷的相对含量为 0.09 ~ 2.80 mg/g。这些结果与文献 [9] 报道的相一致,说明这种方法对含较多紫外吸收光谱相似的中药复杂体系的含量测定和质量控制具有一定的借鉴作用。

通过比较 UPLC 和 HPLC 的数据和图谱结果,表明 4 种二氢黄酮醇类化合物含量测定的结果相似,无显著性差异,说明这两种分析方法均可用于土茯苓药材的质量控制。与 HPLC 相比,UPLC 缩短了分析时间,流速低且减少了有机试剂的使用,

大大节约了成本。此外 UPLC 的检测灵敏性较高,这对于中药中微量成分的检测非常有效。因此,UPLC 将有可能在中药分析中得到更广泛的应用。

### 参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部 [M]. 北京:化学工业出版社. 2005: 14.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典:上册 [M]. 上海:上海科学技术出版社. 1986: 91 - 93.
- [3] 袁曙光 (Yuan SG). 高耀风重用土茯苓治疗顽固性头痛 45 例观察 [J]. 河北中医 (*Hebei J Trad Chin Med*), 1988, **10** (6): 4 - 5.
- [4] 袁久志 (Yuan JZ), 窦德强 (Dou DQ), 陈英杰 (Chen YJ), 等. 土茯苓二氢黄酮醇类成分研究 [J]. 中国中药杂志 (*Chin J Chin Mater Med*), 2004, **29** (9): 867 - 870.
- [5] 张白嘉 (Zhang BJ), 刘亚欧 (Liu YO), 刘 榴 (Liu L), 等. 土茯苓及落新妇苷抗炎、镇痛、利尿作用研究 [J]. 中药药理与临床 (*Pharmacol Clin Chin Mater Med*), 2004, **20** (1): 11 - 12.
- [6] Xu Q, Wu FH, Cao JS, *et al*. Astilbin selectively induces dysfunction of liver-infiltrating cells—novel protection from liver damage [J]. *Eur J Pharmacol*, 1999, **377** (1): 93 - 100.
- [7] 陈 幸 (Chen X), 李 彬 (Li B), 黎万寿 (Li WS), 等. HPLC 法测定土茯苓中落新妇苷的含量 [J]. 药物分析杂志 (*Chin J Pharm Anal*), 2004, **24** (4): 437 - 439.
- [8] 李 磊 (Li L), 张宏桂 (Zhang HG), 乔延江 (Qiao YJ), 等. HPLC 法测定土茯苓药材中落新妇苷和白藜芦醇的含量 [J]. 药物分析杂志 (*Chin J Pharm Anal*), 2007, **27** (5): 654 - 656.
- [9] Chen L, Yin Y, Yi HW, *et al*. Simultaneous quantification of five major bioactive flavonoids in *Rhizoma Smilacis glabrae* by high-performance liquid chromatography [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, **43** (5): 1 715 - 1 720.
- [10] Liu M, Li YG, Chou GX, *et al*. Extraction and ultra-performance liquid chromatography of hydrophilic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb *Radix Salviae miltiorrhizae* [J]. *J Chromatogr A*, 2007, **1 157** (1-2): 51 - 55.
- [11] Li YG, Zhang F, Wang ZT, *et al*. Identification and chemical profiling of monacolins in red yeast rice using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, **35** (5): 1 101 - 1 112.

## · 会 讯 ·

### 2009年上海中药与天然药物国际大会

大会主题: 中药与天然药物合作与创新

时 间: 2009-10-16 ~ 2009-10-18

地 点: 上海

主办单位: 上海市现代生物与医药产业办公室、中国药学会

承办单位: 上海市中医药科技产业促进中心、上海中药现代化中心

大会组织委员会

主 席: 徐祖信

秘书长: 黄 瑛

学术委员会

主 席: 姚新生 / Brigitte Kopp

秘书长: 果德安 张卫东 陈万生

会议秘书处

上海市中医药科技产业促进中心

地 址: 上海市浦东张江郭守敬路 199号

联系人: 杜璇; E-mail: jsduxuan@yahoo.com.cn

电 话: 021-50272737; Fax: 021-50805932