

HPLC 波长转换法同时测定蒙药文冠木中 5 种成分的含量

刘宏, 王焕芸, 马岚, 张弘, 夏慧敏, 张玲玲, 饶宇泽, 李刚^{*}(内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110)

摘要: 目的 建立同时测定蒙药文冠木药材中儿茶素、表儿茶素、槲皮苷、槲皮素和杨梅素 5 种成分含量的方法, 为文冠木药材及制剂的质量控制提供参考和依据。方法 采用 HPLC 波长转换法, 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)为流动相进行梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长分别为 0~8 min, 280 nm(儿茶素, 表儿茶素)、8~10 min, 257 nm(槲皮苷)、10~12 min, 375 nm(杨梅素)和 12~18 min, 256 nm(槲皮素); 柱温 30 °C; 进样量为 10 μL。结果 儿茶素、表儿茶素、槲皮苷、杨梅素及槲皮素分别在 6.64~33.20 μg·mL⁻¹($r^2=0.999\ 6$)、49.04~245.20 μg·mL⁻¹($r^2=0.999\ 7$)、1.28~6.40 μg·mL⁻¹($r^2=0.999\ 8$)、14.4~72.0 μg·mL⁻¹($r^2=0.999\ 2$)、0.84~4.20 μg·mL⁻¹($r^2=0.999\ 6$) 线性关系良好; 仪器精密性、稳定性、重复性的 RSD 均 < 2.0%; 平均加样回收率分别为 98.15%(RSD=1.4%, $n=6$), 102.34%(RSD=1.4%, $n=6$), 91.90%(RSD=1.3%, $n=6$), 101.16%(RSD=1.9%, $n=6$), 94.97%(RSD=1.6%, $n=6$)。结论 该方法操作简单便捷, 仪器精确度高, 仪器精密性、稳定性、重复性好, 可用于同时测定文冠木的质量控制。

关键词: 文冠木; HPLC 波长转换法; 质量控制

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)24-2996-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.24.009

引用本文:刘宏,王焕芸,马岚,等.HPLC 波长转换法同时测定蒙药文冠木中 5 种成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(24): 2996-2999.

Simultaneous Determination of Five Components in Mongolian Medicine *Xanthoceras Sorbifolia* Bunge by HPLC Wavelength Conversion Method

LIU Hong, WANG Huanyun, MA Lan, ZHANG Hong, XIA Huimin, ZHANG Lingling, RAO Yuze, LI Gang^{*}
(School of Pharmacy, Inner Mongolian Medical University, Hohhot 010110, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for simultaneous determination of catechin, epicatechin, quercitrin, quercetin, myricetin in *Xanthoceras sorbifolia* Bunge, and to provide reference and basis for the quality control of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge and its preparation. **METHODS** HPLC wavelength conversion method was adopted. Agilent Eclipse Plus C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used; the mobile phase was acetonitrile(A)-0.1% phosphoric acid solution(B) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹; the detection wavelength was 0~8 min, 280 nm(catechin, epicatechin), 8~10 min, 257 nm(quercitrin), 10~12 min, 375 nm(myricetin) and 12~18 min, 256 nm(quercetin); the column temperature was 30 °C; the injection volume was 10 μL. **RESULTS** The linear ranges of catechin, epicatechin, quercitrin, quercetin, myricetin were 6.64~33.20 μg·mL⁻¹($r^2=0.999\ 6$), 49.04~245.20 μg·mL⁻¹($r^2=0.999\ 7$), 1.28~6.40 μg·mL⁻¹($r^2=0.999\ 8$), 14.4~72.0 μg·mL⁻¹($r^2=0.999\ 2$), 0.84~4.20 μg·mL⁻¹($r^2=0.999\ 6$) respectively, the five components showed good linear correlations; RSD of precision, stability and repeatability were all < 2.0%; the average recoveries were 98.15%(RSD=1.4%, $n=6$), 102.34%(RSD=1.4%, $n=6$), 91.90%(RSD=1.3%, $n=6$), 101.16%(RSD=1.9%, $n=6$), 94.97%(RSD=1.6%, $n=6$). **CONCLUSION** The method is simple and convenient, with high precision, stability and repeatability, and can be used for quality control of *Xanthoceras Sorbifolia* Bunge.

KEYWORDS: *Xanthoceras sorbifolia* Bunge; HPLC wavelength conversion method; quality control

文冠木, 无患子科植物文冠 *Xanthoceras sorbifolia* Bunge 的干燥茎枝条, 蒙药名“森登”, 为蒙医常用药材, 很多蒙药方剂中均有使用, 具有抗炎镇痛、抗肿瘤、抗突变、抑制艾滋病病毒、抗衰老、抗凝血等生物活性, 临床用于风湿性关节炎、风湿内热、皮肤风湿病等^[1]。文冠木中含有黄酮、三萜、醌类、香豆素、甾体等类化合物,

与其主要功效相关的成分有槲皮素、槲皮苷、儿茶素、表儿茶素、杨梅素等。

以往的研究以及质控方法多以单一成分或单一波长检测为主, 均存在一定的缺陷, 不能全面、准确反映文冠木药材的整体质量, 因而难以保证药材以及入药后制剂的有效性及安全性。本研究参考相关研究文献^[2-7], 结合本课题组前期研究工

作者简介: 刘宏, 男, 硕士, 助理研究员 Tel: 18548140887
15024925163 E-mail: cnnmligang@hotmail.com

E-mail: lhsn@163.com *通信作者: 李刚, 男, 博士, 教授 Tel:

作,以波长转换法研究建立 HPLC 同时测定文冠木中槲皮素、槲皮苷、儿茶素、表儿茶素、杨梅素等 5 种成分含量的方法,以期为文冠木的质量控制与质量评价提供研究基础。

1 材料与试剂

1.1 仪器

Thermo Ultimate 3000 高效液相色谱仪(美国赛默飞世尔科技公司); LC-2030C 3D 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); AB135-5 型十万分之一天平(Mettler Toledo); KQ-250DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

儿茶素对照品(批号: E-011-180725; 纯度>98%)、表儿茶素对照品(批号: B-020-171216; 纯度>96%)、槲皮苷对照品(批号: H-011-180508; 纯度>98%)、杨梅素对照品(批号: Y-028-171216; 纯度>98%)、槲皮素对照品(批号: H-009-170516; 纯度>98%)均购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯,实验用水为超纯水。

文冠木药材(安徽亳州三义堂药业有限公司,产地:内蒙古赤峰市;批号:170701;生产日期:2017.7.18),药材经内蒙古医科大学生药教研室渠弼教授鉴定为无患子科植物文冠木 *Xanthoceras sorbifolia* Bunge 的干燥根茎。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse Plus C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),洗脱梯度(0~5 min, 15%→28%A; 5~13 min, 28%→37%A; 13~18 min, 37%→45%A); 柱温: 30 °C; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μL。

检测波长: 0~8 min, 280 nm(儿茶素、表儿茶素); 8~10 min, 257 nm(槲皮苷); 10~12 min, 375 nm(杨梅素); 12~18 min, 256 nm(槲皮素)。

2.2 混合对照品溶液制备

精密称取适量儿茶素对照品 4.15 mg、表儿茶素对照品 30.65 mg、槲皮苷对照品 0.8 mg、杨梅素对照品 3.6 mg、槲皮素对照品 0.55 mg,分别置 5 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成单一对照品储备液;分别吸取单一对照品储备液各 1 mL,制成儿茶素、表儿茶素、槲皮苷、杨梅素和槲皮素质量浓度分别为 166, 1 226, 32, 360, 22 μg·mL⁻¹

的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备

取文冠木药材,粉碎,过 40 目筛,取粉末约 5.00 g,精密称定,置 100 mL 圆底烧瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称重,70 °C 加热提取 60 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减少质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 1 mL,置 5 mL 量瓶中,用甲醇定容,摇匀,0.45 μm 的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 系统适应性及专属性试验 取“2.2”项下的混合对照品溶液和“2.3”项下的供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别进样测定,记录色谱图。儿茶素、表儿茶素、槲皮苷、杨梅素和槲皮素理论板数均>5 000;分离度均>1.5,且各成分互不干扰,其他杂峰对各待测成分无干扰,表明本法对儿茶素、表儿茶素、槲皮苷、杨梅素和槲皮素检测的专属性良好。结果见图 1。

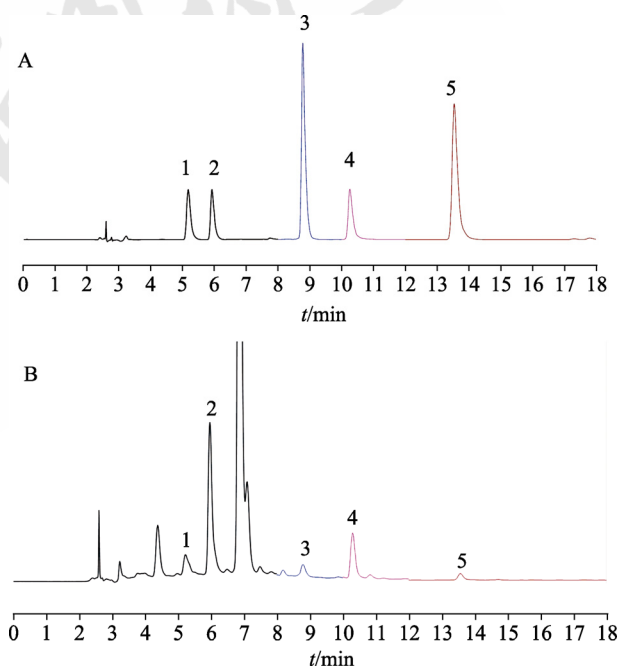


图 1 高效液相色谱图

A-对照品; B-文冠木样品; 1-儿茶素; 2-表儿茶素; 3-槲皮苷; 4-杨梅素; 5-槲皮素。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-reference substance; B-*Xanthoceras sorbifolia* Bunge sample; 1-catechin; 2-epicatechin; 3-quercitrin; 4-myricetin; 5-quercetin.

2.4.2 线性关系的考察 分别精密量取混合对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置 5 mL 量瓶中,用甲醇稀释定容,取上述对照品溶液进样,以对照品溶液浓度(μg·mL⁻¹)为横坐标(X),峰

面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线。回归方程及浓度范围见表 1, 各待测成分在浓度范围内呈良好线性关系。

表 1 5 种成分的线性范围和回归方程(n=6)

Tab. 1 Regression equation and linear range of five components(n=6)

成分	回归方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
槲皮苷	$Y=1.2907X-0.0193$	0.9998	1.28~6.40
槲皮素	$Y=1.2763X-0.0678$	0.9996	0.84~4.20
儿茶素	$Y=0.1615X-0.0801$	0.9996	6.64~33.20
表儿茶素	$Y=0.0960X-0.2175$	0.9997	49.04~245.20
杨梅素	$Y=0.1375X-0.1724$	0.9992	14.4~72.0

2.4.3 仪器精密度试验 取“2.2”项下混合对照品溶液, 重复进样 6 次, 计算槲皮素、槲皮苷、儿茶素、表儿茶素、杨梅素峰面积 RSD。经计算, 儿茶素、表儿茶素、槲皮苷、杨梅素和槲皮素峰面积的 RSD 分别为 0.66%, 0.62%, 0.34%, 0.93% 和 0.62%, 均<2%, 表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取“2.3”项下的供试品溶液分别在 0, 2, 4, 6, 8 h 进样测定, 计算槲皮素、槲皮苷、儿茶素、表儿茶素、杨梅素峰面积 RSD。经计算, 槲皮素、槲皮苷、儿茶素、表儿茶素、杨梅素色谱峰面积的 RSD 分别为 2.8%, 1.9%, 1.8%, 2.2% 和 2.2%, 表明样品中各成分在 8 h 内稳定性良好。

2.4.5 检测限及定量限 以信噪比 S/N 为 3:1, 测定槲皮素、槲皮苷、儿茶素、表儿茶素、杨梅素的检测限; 以信噪比 S/N 为 10:1, 测定槲皮素、槲皮苷、儿茶素、表儿茶素、杨梅素的定量限。经测定, 儿茶素、表儿茶素、槲皮苷、杨梅素、槲皮素的检测限分别为 0.708, 0.708, 0.181, 0.706, 0.261 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 定量限为 2.363, 2.361, 0.604, 2.356, 0.867 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。

2.4.6 重复性试验 称取文冠木样品 6 份, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算槲皮素、槲皮苷、儿茶素、表儿茶素、杨梅素含量。以外标法计算得出样品中儿茶素、表儿茶素、槲皮苷、杨梅素和槲皮素的平均含量分别为 1.15, 9.03, 0.06, 2.13, 0.04 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$; RSD 分别为 1.3%, 1.4%, 0.61%, 0.91%, 和 1.2%, 表明方法重复性良好。

2.4.7 加样回收率 称取已知含量的文冠木粉末 6 份, 每份约 2.5 g, 精密称定, 置 100 mL 圆底

烧瓶中, 分别加入新配置的儿茶素(2.884 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、表儿茶素(22.54 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、槲皮苷(0.141 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、杨梅素(5.322 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)和槲皮素(0.102 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)的对照品溶液各 1 mL, 精密加入甲醇 45 mL, 称重, 70 °C 提取 60 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失质量, 摇匀, 过滤, 精密量取续滤液 1 mL 置 5 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 经 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液, 进样分析, 计算 5 个成分的平均加样回收率及 RSD, 结果见表 2, 儿茶素回收率分别为各成分测得的回收率 RSD 均<2%, 表明方法的回收率良好。

表 2 5 种成分的加样回收率(n=6)

Tab. 2 Sample recovery rate of five components(n=6)

成分	称样量/ g	样品中 的量/mg	加入量/ mg	测得量/ mg	加样回 收率/%	平均加样 回收率/%	RSD/ %
儿茶素	2.48	2.84	2.88	5.71	99.31	98.16	1.30
	2.53	2.90	2.88	5.67	96.08		
	2.51	2.88	2.88	5.73	99.07		
	2.49	2.85	2.88	5.70	99.05		
	2.51	2.88	2.88	5.71	98.03		
	2.52	2.88	2.88	5.75	99.43		
表儿茶素	2.48	22.39	22.54	45.09	100.67	102.35	1.39
	2.53	22.81	22.54	45.53	100.77		
	2.51	22.67	22.54	45.88	102.99		
	2.49	22.45	22.54	45.84	103.76		
	2.51	22.70	22.54	46.11	103.87		
	2.52	22.73	22.54	45.73	102.06		
槲皮苷	2.48	0.14	0.14	0.28	97.42	97.22	1.19
	2.53	0.14	0.14	0.28	95.72		
	2.51	0.14	0.14	0.28	96.93		
	2.49	0.14	0.14	0.28	96.34		
	2.51	0.14	0.14	0.28	98.97		
	2.52	0.14	0.14	0.28	97.96		
杨梅素	2.48	5.28	5.32	10.62	100.37	101.12	1.69
	2.53	5.38	5.32	10.75	100.94		
	2.51	5.34	5.32	10.62	99.11		
	2.49	5.29	5.32	10.61	100.00		
	2.51	5.35	5.32	10.87	103.63		
	2.52	5.36	5.32	10.82	102.65		
槲皮素	2.48	0.10	0.10	0.19	97.03	97.45	1.52
	2.53	0.10	0.10	0.19	95.14		
	2.51	0.10	0.10	0.19	99.55		
	2.49	0.10	0.10	0.19	98.38		
	2.51	0.10	0.10	0.19	97.15		
	2.52	0.10	0.10	0.19	97.25		

2.5 样品含量测定

取 6 批文冠木, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 以外标法计算各成分含量, 6 批文冠木样品含量测定结果见表 3。

表3 文冠木中5种成分的含量

Tab. 3 Results of determination of five components in *Xanthoceras sorbifolia* Bunge

序号	批号	产地	含量/mg·g ⁻¹				
			槲皮苷	槲皮素	儿茶素	表儿茶素	杨梅素
1	052950101	湖北	0.052 3	0.036 3	1.031 8	8.355 2	1.972 5
2	170807	甘肃	0.054 0	0.037 2	1.028 0	8.357 0	1.968 3
3	151002415	安宏	0.051 9	0.036 1	1.057 6	8.311 2	1.878 7
4	180503	陕西	0.052 9	0.036 3	1.055 5	8.329 6	1.947 2
5	170504	山西	0.054 1	0.037 4	1.054 0	8.364 2	1.957 4
6	180513	内蒙古	0.053 1	0.037 3	1.049 2	8.168 3	1.933 0
\bar{x}	-	-	0.053 1	0.036 8	1.046 0	8.297 6	1.942 8
<i>r</i> %	-	-	1.668 0	1.610 6	1.227 8	0.976 2	1.778 5

3 讨论

本实验考察了多种流动相系统,包括甲醇-磷酸水溶液系统、甲醇-冰醋酸水溶液系统、乙腈-磷酸水溶液系统和乙腈-冰醋酸水溶液系统,结果表明,乙腈-磷酸水溶液系统可使样品中待测成分得到完全分离,且样品中的其他成分对检测无干扰,故确定乙腈-磷酸水溶液系统作为本方法流动相。

本实验比较了超声提取与加热提取2种样品处理方式,结果发现,超声提取由于温度控制难以恒定,出现同批次药材不同时间提取得到的含量差异较大,不能满足定量检测的要求,而加热提取法温度易于控制,且本研究涉及的几个成分的热稳定性较好,加热提取不会造成待测成分含量波动,故确定以加热提取法作为样品处理方法。

采用DAD检测器检测发现,儿茶素、表儿茶素在280 nm处有最大吸收,槲皮苷在257 nm处有最大吸收,杨梅素在375 nm处有最大吸收,槲皮素在256 nm处有最大吸收,各成分DAD图如下图所示。

为提高对5个成分检测的灵敏度和准确度,分别选择各自的最大吸收波长作为检测波长,同时,根据梯度洗脱研究结果,280 nm色谱峰的保留时间在5~8 min,257 nm色谱峰的保留时间在8~10 min,375 nm色谱峰的保留时间在10~12 min,256 nm色谱峰的保留时间在12~18 min。因此,选择8,10,12 min为检测波长转换时间点。

REFERENCES

- [1] 孟河吉日嘎拉, 萨其儿. 蒙药文冠木的研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2014, 20(11): 40-42.
- [2] YANG Q H, LI S M, DONG Y. Content determination of myricetin from *Xanthoceras sorbifolia* Bunge [J]. China Pharm(中国药业), 2014, 23(3): 8-9.
- [3] QU B, JU A H, CAI L J, et al. Identification of ultramicro *Xanthoceras sorbifolia* and the determination of epicatechin [J]. West China J Pharm Sci(华西药学杂志), 2016, 31(6): 647-649.
- [4] QING M, JU A H, BAI W F. Comparison of contents of quercetin and total flavonoids of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge from different origins [J]. Acta Sci Nat Univ Neimongol(内蒙古大学学报: 自然科学版), 2010, 41(5): 540-544.
- [5] XU X L, ZHANG Z R, KE Z H, et al. Quantitative analysis of quercetin in bud of *Sophora japonica* by RP-HPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2003, 34(6): 565-567.
- [6] ZHANG D F. Simultaneous determination of ginseng, *Panax notoginseng*, and Radix *Polygoni Multiflori* Preparata in Yinxinkang tablets by HPLC wavelength switching methods [J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2018, 30(9): 53-56.
- [7] YELXAT D, SHUHELA Z, DUMAN N B, et al. Simultaneous determination of the content of quercitrin and quercetin in *Limonium myrianthum* (Schrenk) O. Kuntze by HPLC [J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2017, 32(5): 551-554.

收稿日期: 2019-10-16

(本文责编: 李艳芳)