

HPLC 法同时测定中药菟丝子中五种黄酮类成分含量的研究

许晓嘉 徐丽媛 郭志勇 潘丽丽 袁少雄 郝 变 吕剑波 李向日

(北京中医药大学中药学院,北京,100102)

摘要 目的:建立中药菟丝子中金丝桃苷、紫云英苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素的含量的高效液相色谱测定方法。方法:采用 Agilent TC C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.4%磷酸,紫外检测器:检测波长 360 nm,流速为 1 mL/min,梯度洗脱:0→60 min→80 min,甲醇的比例由 25%→40%→60%,柱温 45℃,测定中药菟丝子中 5 种黄酮类成分的含量。结果:色谱峰分离情况良好,菟丝子中 5 种化学成分在各自的浓度范围内均具有良好的线性关系;加样回收率为 98.0%~102.2%,RSD 为 1.44%~2.63%。结论:所建方法简便、准确,重现性好,可用于菟丝子药材的质量评价。

关键词 HPLC;菟丝子;黄酮类成分

Study on Simultaneous Determination of Five Kinds of Flavonoids in Seed of Semen Cuscutae by HPLC

Xu Xiaojia, Xu Liyuan, Guo Zhiyong, Pan Lili, Yuan Shaoxiong, Hao Bian, LV Jianbo, Li Xiangri

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract Objective: To determine the content of five kinds of flavonoids in the seed of semen cuscutae, including hyperoside, astragaln, quercetin, kaempferol and isorhamnetin. **Methods:** The HPLC method was used to determine the content of flavonoids in the seeds of semen cuscutae. The analysis was carried out on Agilent TC C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with MeOH-0.4% H₃PO₄ as mobile phase, the flow rate of 1 mL·min⁻¹ and wave length at 360 nm. The gradient elute time was 0→60min→80min, and the proportion of methanol was 25%→40%→60%. at 45℃. **Results:** Chromatographic peak separation was in good condition, and five kinds of flavonoids had good linear relationship respectively within their own scope of concentration; the recovery was 98.0%~98.0%, RSD was 1.44%~2.63%. **Conclusion:** The established method is simple, accurate, and reproducible and can be used as the quality evaluation of semen cuscutae.

Key Words HPLC; Semen cuscutae; Flavonoids

中图分类号:R284.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.04.029

菟丝子为旋花科植物南方菟丝子 *Cuscuta australis* R. Br. 或菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. 的干燥成熟种子^[1]。中药菟丝子是临床上常用的补阳药,始载于《神农本草经》,并被列为上品,具有补肝肾、益精明目、安胎等功效,是中医补肾壮阳的要药。现代药理研究表明黄酮类成分具有增强生殖系统作用^[2-4],提高心血管系统功能,提高免疫力、抗氧化^[2-4]、抗衰老^[2-4]、抗癌^[2-4]、保肝明目等作用,黄酮类成分是菟丝子的主要有效成分。目前文献^[5-6]报道菟丝子的黄酮类成分主要有金丝桃苷、紫云英苷、山柰酚、槲皮素、异鼠李素、槲皮素-3-O-β-D-半乳糖(2-1)β-D-芹糖苷等,因此本研究选择菟丝子和南方菟丝子中共有五种单体黄酮,即金丝桃苷、紫云英苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素(化学结构式如图 1)作为指标性成分,建立其含量测定的方法。本文首次采用 HPLC 法对菟丝子中

五种黄酮成分进行同时测定。

1 仪器、试剂与试药

Waters 液相色谱仪包括 1525 色谱泵,2489 双波长紫外检测器, Breeze 工作站;金丝桃苷(111521-200303)、紫云英苷(MUST-09030603)、槲皮素(100081-200907)、山柰酚(110861-200808)、异鼠李素(110860-200608)、绿原酸(110753-200413),购于中国食品药品检定研究院;甲醇色谱纯、磷酸(分析纯)、甲醇分析纯、娃哈哈纯净水。

菟丝子(批号:090215 为样品 1,100523 为样品 2)产地为黑龙江,河北光明饮片有限公司饮片厂供应;菟丝子(批号:110301 为样品 3,090601 为样品 4)产地内蒙古,哈尔滨市盛泰中药饮片加工厂提供。样品 1 和 3 为南方菟丝子(*Cuscuta australis* R. Br.),样品 2 和 4 为菟丝子(*Cuscuta chinensis* Lam.),其中混有少量南方菟

丝子(*Cuscuta australis* R. Br.)。所有样品均经北京中医药大学杨瑶珺教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent TC C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 - 0.4% 磷酸; 紫外检测器: 检测波长 360 nm; 流速为 1 mL/min; 进样量 15 μL, 柱温 45 °C。梯度洗脱: 0 → 60 min → 80 min, 甲醇的比例由 25% → 40% → 60%。

2.2 标准品溶液的制备 精确称取金丝桃苷、紫云英苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素各 1.00 mg, 甲醇定容于 10 mL, 作为标准品溶液, 色谱图见图 2。

2.3 供试液的制备 精密称取菟丝子过 60 目粉末 1.00 g, 精密加入 50 mL 80% 甲醇溶液, 密塞称重, 回流提取 2 h, 冷却后补重, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.4 标准曲线的绘制

2.4.1 金丝桃苷标准曲线的绘制 精确称取金丝桃苷 10.20 mg, 定容于 20 mL, 分别精密吸取 0.1 mL、0.4 mL、4 mL、6 mL、8 mL 的原液定容于 10 mL。原液和各稀释液分别进样 25 μL, 以峰面积对质量作回归曲线方程, 经计算得 $y = 2\,323\,873x + 173\,893$, $r = 0.999\,9$ 。

2.4.2 紫云英苷标准曲线的绘制 精密称取紫云英苷对照品 9.96 mg, 定容于 20 mL, 分别精密吸取 0.125 mL、0.5 mL、1.25 mL、2.5 mL、3.75 mL、5 mL 的原液定容于 10 mL。各稀释液分别进样 20 μL, 以峰面积对质量作回归方程, 经计算得 $y = 2\,802\,318x - 83\,742$, $r = 0.999\,9$ 。

2.4.3 槲皮素标准曲线的绘制 精密称取槲皮素对照品 5.20 mg, 定容于 50 mL, 分别精密吸取 0.1 mL、0.6 mL、5 mL、10 mL、15 mL 的原液定容于 20 mL, 原液和各稀释液进样 20 μL, 以峰面积对质量作回归方程, 经计算得 $y = 4\,178\,732x + 12\,709$, $r = 0.999\,9$ 。

2.4.4 山柰酚标准曲线的绘制 精密称取山柰酚对照品 5.10 mg, 定容于 50 mL, 分别精密吸取 0.1 mL、0.4 mL、5 mL、10 mL、15 mL 的原液定容于 20 mL, 原液和各稀释液进样 20 μL, 以峰面积对质量作回归方程, 经计算得 $y = 4\,477\,936x - 29\,527$, $r = 0.999\,9$ 。

2.4.5 异鼠李素标准曲线的绘制 精密称取异鼠李素对照品 5.01 mg, 定容于 100 mL, 分别精密吸取 0.05 mL、0.2 mL、5 mL、10 mL、15 mL 的原液定容于 20 mL, 原液和各稀释液进样 20 μL, 以峰面积对质量作回归方程, 经计算得 $y = 4\,681\,860x - 28\,099$, $r = 0.999\,9$ 。

2.5 精密度考察 按“2.1”项下方法, 各对照品溶液分别进样 10 μL, 测得金丝桃苷、紫云英苷、槲皮素、山

柰酚和异鼠李素的峰面积值, 平行测定 6 份, 其 RSD 分别为 2.27%、2.22%、1.42%、1.72% 和 1.77%。

2.6 稳定性考察 按“2.3”项下方法制备供试品溶液 1 份。按照“2.1”项下液相条件, 测定 2、4、6、8、10、12、16、24 h 内测得金丝桃苷、紫云英苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素的峰面积值的峰面积。其 RSD 分别为 3.05%、1.29%、2.57%、2.10% 和 1.03%。说明: 供试品溶液在放置 24 h 内是稳定的。

2.7 重复性考察 按照“2.3”项下方法同时制备 6 份供试品溶液。照“2.1”项下方法分别进样 15 μL, 测得金丝桃苷、紫云英苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素的峰面积值的峰面积。其 RSD 分别为 2.21%、2.21%、2.22%、2.21% 和 1.55%。

2.8 加样回收率实验 精密称取菟丝子过 60 目粉末 0.5 g, 加入各对照品适量, 按照“2.3”项下方法同时制备 6 份供试品溶液, 照“2.1”项下液相条件进样 15 μL, 记录峰面积, 计算含量和回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率结果

组分	含量/mg	加入量/mg	检测量/mg	回收率/%	RSD/%
金丝桃苷	0.029 5	0.029 6	0.059 5	100.7	1.44
紫云英苷	0.276 5	0.278 0	0.553 0	99.7	1.86
槲皮素	0.004 5	0.005 2	0.009 5	98.0	1.57
山柰酚	0.059 5	0.060 1	0.120 1	100.4	2.28
异鼠李素	0.004 3	0.004 8	0.009 3	102.2	2.63

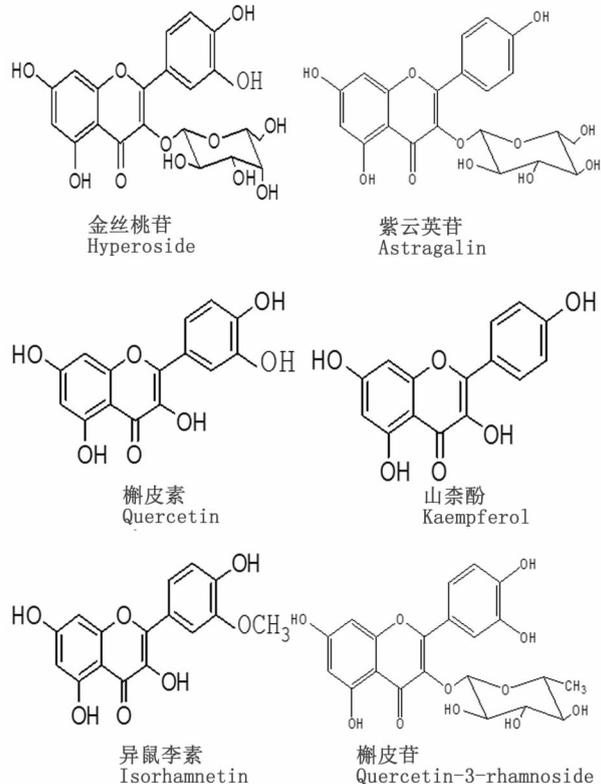


图 1 化合物的结构式

2.9 样品的含量测定 取不同产地不同批次的菟丝子药材,按照供试品溶液的制备方法得到样品溶液,按照液相条件测定,色谱图见图 2,结果见表 2。

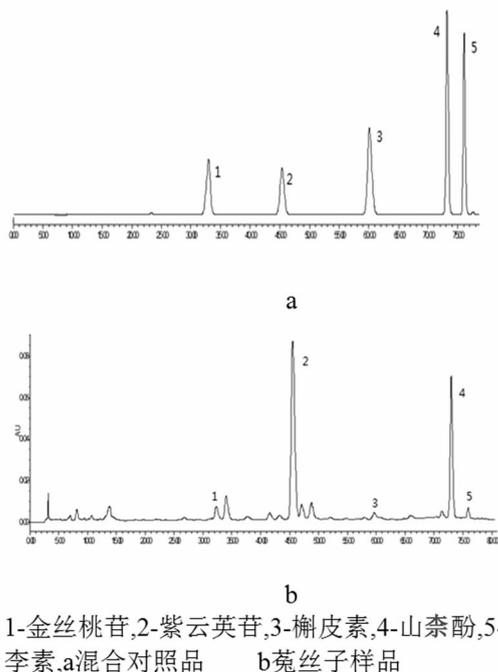


图 2 混合对照品和样品的 HPLC 图

表 2 样品含量测定结果(n=3)

样品	金丝桃苷/%	紫云英苷/%	槲皮素/%	山柰酚/%	异鼠李素/%
样品 1	0.06	0.54	0.01	0.12	0.01
样品 2	3.32	2.18	0.04	0.47	0.05
样品 3	0.21	1.93	0.08	1.15	0.10
样品 4	2.88	1.21	0.05	0.67	0.06

3 讨论

3.1 指标性成分的选择 本课题组在前期实验中,采用 LC-ESI-MSn 方法,结合对照品,比较相对保留时间和特征碎片,对菟丝子中的成分进行了结构定性^[12],在定性过程中发现,紫云英苷和槲皮苷结构式相近(见图 1),紫云英苷的分子量和槲皮苷的分子量一样,均为 448,且二者的出峰时间一样,但是在碎片离子中并未发现 m/z303,而是 m/z287,因此确定菟丝子中含有紫云英苷,不含槲皮苷。而以往有文献把紫云英苷误认为槲皮苷进行测定是不正确的。因此本实验选择金丝桃苷、紫云英苷、槲皮素、山柰酚、异鼠李素为指标性成分,同时使用金丝桃苷和紫云英苷同时作为指标性成分。

3.2 提取方法的优化 实验中考察了超声提取和加热回流两种方法对菟丝子中 5 种黄酮类成分含量的影响,发现加热回流对异鼠李素的提取效率明显优于超声提取;同时对溶剂浓度(100%、80%)和加热回流时间(1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h、3.0 h)进行了考察。最

终确定 80% 甲醇 50 mL,加热回流 2 h 提取效果最好。

3.3 样品含量测定结果比较 从样品的含量测定结果可以看出中药菟丝子中黄酮苷的含量要大于苷元的含量,而菟丝子中以金丝桃苷含量最高,南方菟丝子中以紫云英苷的含量最高;目前的文献报道^[13-16],紫云英苷具有良好的药理活性,同时菟丝子中紫云英苷含量也比较高,而现行的药典中对菟丝子含量测定中仅规定了金丝桃苷的含量不得少于 0.10%,有待继续完善和提高。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京:化学工业出版社, 2010;290-291.
- [2] 王晟,秦达念. 菟丝子总黄酮对大鼠睾丸曲细精管无血清培养所致细胞凋亡的保护作用[J]. 中国药理学通报,2006,22(8):984-987.
- [3] 柯江维,王建红,赵宏. 菟丝子黄酮对心理应激雌性大鼠海马一下丘脑-垂体-卵巢轴性激素受体的影响[J]. 中草药,2006,37(1):90-92.
- [4] Jianxiang Yang, Yali Wang, YuBao, et al. The total flavones from Semen cuscutea reverse the reduction of testosterone level and the expression of androgen receptor gene in kidney - yang deficient mice [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 119:166-171.
- [5] 陈素红,范景,吕圭源,等. 菟丝子不同提取部位对雌二醇致肾阳虚小鼠的影响[J]. 上海中医药大学学报,2008,6(22):60-63.
- [6] 真国辉,姜波,包永明,等. 菟丝子黄酮类组分对 H₂O₂ 损伤 PC₁₂ 细胞的保护作用[J]. 中药材,2006,29(10):1051-1055.
- [7] 陈林林,吴春,李伟. 菟丝子黄酮的抗氧化性能研究[J]. 食品工业科技,2008,11(29):116-121.
- [8] Feng - Lin Yen, Tzu - Hui Wu, Liang - Tzung Lin, et al. Concordance between antioxidant activities and flavonol contents in different extracts and fractions of Cuscuta chinensis[J]. Food Chemistry, 2008, 108:455-462.
- [9] 田春雨,薄海美,陈新新,等. 不同产地菟丝子抗衰老作用的比较[J]. 辽宁中医药大学报,2009,4(11):206.
- [10] 郭洪祝,李家实. 南方菟丝子化学成分研究[J]. 北京中医药大学报,2000,23(3):20-23.
- [11] 李更生,陈雅妍. 南方菟丝子化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1997,22(9):548-550.
- [12] Xian - Long Cheng, Li - Yuan Xu, Feng Wei, et al. Identification of raw Cuscutae Semen and its processed products by high performance liquid chromatography/diode - array detection/mass spectrometry (HPLC - DAD - MS) combined with principle component analysis[J]. Journal of liquid chromatography & Related Technologies, 2013. online.
- [13] Mayumi Kotani, Motonobu Matsumoto, Akihito Fujita, et al. Persimmon leaf extract and astragaloside inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice [J]. Journal of Allergy Clinical Immunology, 2000, 106:159-166.
- [14] S. N. Park, S. Y. Kim, G. N. Lim, et al. In vitro Skin Permeation and Cellular Protective Effects of Flavonoids isolated from Suaeda asparagoides Extracts [J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2012, 18: 680-683.
- [15] Lijuan Yang, Qianfeng Chen, Fei Wang, et al. Antiosteoporotic compounds from seeds of Cuscuta chinensis [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011:553-560.
- [16] Olga Burmistrova, José Quintana, Jesús G. Díaz, et al. Astragaloside heptacetate - induced cell death in human leukemia cells is dependent on caspases and activates the MAPK pathway [J]. Cancer Letters, 2011, 309:71-77.