

· 药学 ·

HPLC 法测定不同来源槐角中槐角苷含量 *

韦华梅¹ 李 飞² 王 羽³ 王剑波^{1△}

(1 第四军医大学药理学系药物研究所 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学药理学系学员队 陕西 西安 710032;

3 中国人民解放军 66477 部队卫生队 北京 102202)

摘要 目的 建立 HPLC 法测定槐角中槐角苷含量测定方法并检测不同来源槐角中槐角苷的含量。方法 Luna 5u C18 (2) 100A 柱 (250 mm× 4.60 mm, 5 μm), 柱温为 35 ℃, 流动相为甲醇-乙腈-1%冰醋酸 (40:5:55), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 260 nm。结果 槐角苷质量浓度在 14.58 mg/L~53.46 mg/L 范围内呈良好的线性关系, 回归方程为 $y = 110353x - 274717$ ($r = 0.9999$), 平均回收率为 99.5%, RSD 为 1.27%。不同来源槐角中槐角苷含量范围 4.27%~8.78%。结论 该方法简便、快速、灵敏、可靠。不同来源的槐角中槐角苷含量有较大差异, 其中以陕北黄土高原品种含量最高, 可为槐角的质量保证提供依据。

关键词 槐角 槐角苷 含量测定 HPLC**中图分类号**: 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273 (2012) 16-3170-04

Determination of Sophoricoside Content in Fructus Sophorae from Different Sources by HPLC*

WEI Hua-mei¹, LI Fei², WANG Yu³, WANG Jian-bo^{1△}

(1 Institute of Materia Medica, School of Pharmacy, the Fourth Military Medical University, Xi'an Shaanxi 710032, China;

2 The Corps, School of Pharmacy, the Fourth Military Medical University, Xi'an Shaanxi 710032, China;

3 Sanitary Corps, Troops 66477, People's Liberation Army, Beijing 102202, China)

ABSTRACT Objective: To develop a HPLC method for the determination of sophoricoside content in Fructus Sophorae and to determine the content of sophoricoside in Fructus Sophorae from different sources. **Methods:** The extracts of Fructus sophorae were separated in a Luna 5u C18(2)100A column (250 mm x 4.60 mm, 5 μm); Methanol-acetonitrile-1 % glacial acetic acid (40 : 5 : 55) was used as mobile phase; The flow rate was 1.0 ml/min; The effluents were monitored at 260 nm. **Results:** The linear ranges of sophoricoside were 14.58 mg/L~53.46 mg/L. The average recovery rate for sophoricoside was 99.5%, while the RSD was 1.27%. The content of sophoricoside ranges from 4.27 % to 8.78 %. **Conclusions:** The method is simple, rapid, sensitive and reliable; The content of sophoricoside in Fructus Sophorae from different sources was different and the content of sophoricoside was higher in the Fructus Sophorae of Shanbei Loess Plateau than other places.

Key words: Fructus Sophorae; Sophoricoside; Assaying; HPLC**Chinese Library Classification:** Document code: A**Article ID:** 1673-6273(2012)16-3170-04

前言

中药槐角为豆科植物槐(*Sophora japonica* L.)的干燥成熟果实, 又名槐实(《本经》), 槐子(陶弘景), 槐豆(《本草原始》), 槐连灯、九连灯、天豆(《河南中药手册》), 槐连豆(《中药材手册》)^[1], 系我国重要的传统中药之一, 始载于《神农本草经》, 并将其列为上品。传统中药学认为其性寒、味苦, 归肝、大肠经, 具有清热泻火, 凉血止血的功效。临床主要用于肠热便血、痔肿出血, 肝热头痛、眩晕目赤^[2], 为《中华人民共和国药典》历版收载品种。从槐角中提取的化合物主要为黄酮类和异黄酮类, 其中有染料木素、槐属苷、槐属双苷、山奈酚糖苷-C、槐属黄酮苷和芸香

苷, 芸香苷的含量很高; 另含槐糖、亚油酸和亚麻酸等一些化学物质^[3]。近年来国内外医药工作者对槐角进行多方面的研究, 尤其是槐角中富含异黄酮类化合物的特点。本文对陕西不同时期不同产地槐角提取物中的指标性成分且含量较大的槐角苷进行含量测定。现参考药典测定槐角中槐角苷的流动相和相关文献^[4-13], 使得芦丁、槐角苷、染料木素的分离度好, 出峰时间适中, 杂质出峰时间早。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

600-2996 型高效液相色谱系统 (美国 Waters) Luna 5u

* 基金项目 辽宁省教育厅科研基金资助项目 (2008179) 大连市科技局科研基金资助项目 (2009J22DW023)

作者简介 韦华梅 (1986), 女, 硕士研究生, 主要研究方向 中药的物效基础研究, E-mail: weihuamei218@163.com

△通讯作者 王剑波, Tel: 029-84773290, E-mail: yyswbj@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2011-12-08 接受日期 2011-12-31)

C₁₈ (2) 100A 柱 (250 mm×4.60 mm, 5 μm), Sartorius 电子分析天平 (德国沙多利斯公司)。

1.2 试剂

槐角苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号为: 11695-200501); 芦丁 (中国药品生物制品检定所, 批号为: 0080-9705); 染料木素 (中国药品生物制品检定所, 批号为: 111704-200501); 色谱甲醇 (SK chemicals, Korea); 色谱用冰乙酸 (天津市科密欧化学试剂有限公司); 超纯水; 槐角样本 (陕西地道中药材种植有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Luna 5u C₁₈ (2) 100A 柱 (250 mm×4.60 mm, 5 μm); 柱温 35 °C; 流动相: 甲醇-乙腈-1%冰醋酸 (40:5:55); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长 260 nm; 进样量 20 μl。

2.2 槐角样本处理方法

称取槐角样本 50g, 用 8 倍量 65%乙醇回流提取 3 次, 每次 1 小时, 将提取液合并后浓缩得浸膏, 烘干得干膏备用^[14]。每个样本平行做 2 次。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品 0.00024 g 置五氧化二磷减压干燥器中干燥 12 小时以上的槐角苷对照品 0.00486 g 染料木素对照品 0.00017 g, 用流动相配置到 10 ml 容量瓶中, 摇匀后用 0.45 μm 有机相微孔滤膜滤过后作为标准品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取槐角提取物 2 mg 至 10 ml 容量瓶中, 用流动相定容, 摇匀后用 0.45 μm 有机相微孔滤膜滤过后作为供试品溶液。

2.4 流动相的优化试验

以药典流动相甲醇-乙腈-0.07%磷酸溶液 (12:20:68) 考察芦丁和槐角苷的分离情况, 当变换比例时, 未能将芦丁与槐角苷分离; 以甲醇-水为流动相并调整比例, 未能将芦丁与槐角苷分离; 最后探索出以甲醇-乙腈-1%乙酸为流动相进行测定可以达到较好的分离效果。其中文献报道甲醇-乙腈-1%乙酸 (38:5:57) 可以达到槐角提取物中多种成分较好分离的效果^[4], 但保留时间较长, 对于本试验样品量较大来说不适用, 进而继续探索发现以甲醇-乙腈-1%乙酸 (40:5:55) 为流动相分离效果好, 保留时间适中, 为最佳条件, 适用本试验。因此, 将甲醇-乙腈-1%冰醋酸 (40:5:55) 作为含量测定的流动相 (图 1)。

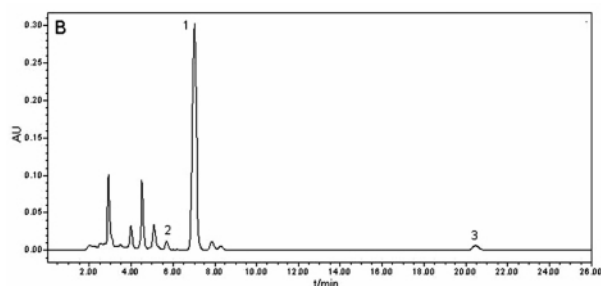


图 1 槐角苷对照品(A)及供试品(B)HPLC 色谱图: 1. 槐角苷 2. 芦丁 3. 染料木素

Fig. 1 HPLC chromatogram of sophoricoside reference substance(A) and tested products (B): 1. sophoricoside 2. rutin 3. genistein

2.5 标准曲线的制备

取混合对照品溶液, 用流动相稀释成 1 L 含槐角苷分别为 14.58 mg、24.30 mg、34.02 mg、43.74 mg、53.46 mg (分别精密量取 0.3、0.5、0.7、0.9、1.1 ml 用流动相定容至 10 ml) 的系列溶液, 进样 20 μl, 每个浓度重复 2 次, 记录色谱图。以峰面积对进样浓度进行线性回归, 回归方程为 $\hat{y} = 110353x - 274717$ ($r = 0.9999$)。结果表明 槐角苷质量浓度在 14.58 mg/L~53.46 mg/L 范围内线性良好。

2.6 精密度试验

取浓度为 53.46 mg/l 的对照品溶液按色谱条件重复进样 5 次, 每次 20 μl, 记录槐角苷色谱峰面积分别为 5622699、5611141、5616423、5625349、5621167, RSD 为 0.10 %, 表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验

精密称取同一槐角提取物粉末 5 份, 为 2.46 mg、2.20 mg、2.24 mg、2.30 mg、2.24 mg, 分别用流动相定容至 10 ml 容量瓶中, 用 0.45 μm 有机相微孔滤膜滤过后按 "2.1" 项下色谱条件, 分别进样 20 μl, 记录槐角苷色谱峰面积。RSD 为 0.09 %, 表明重复性良好。

2.8 稳定性试验

取样品 C2-1 提取物粉末 2.62 mg 用流动相定容至 10 ml 容量瓶中, 分别于 0、4、8、12、24 h, 用 0.45 μm 有机相微孔滤膜滤过后按 "2.1" 项下色谱条件分别进样 20 μl, 记录槐角苷色谱峰面积, RSD 为 0.67 %, 表明稳定性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取 A1 提取物粉末 (槐角苷含量为总提取量的 15.49 %) 1.45 mg、1.50 mg、1.54 mg、1.60 mg、1.63 mg 分别置 10 ml 容量瓶中, 分别加入槐角苷对照品 0.22 mg、0.23 mg、0.25 mg、0.25 mg、0.25 mg, 分别用流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。按 "2.1" 项下色谱条件分别进样 20 μl, 测定峰面积。根据峰面积及加入的对照品的量计算加样回收率。回收率 (%) = (实测值 - 供试品所含被测成分量) / 加入对照品量 × 100 % (表 1)。

槐角苷浓度在 14.58 mg/L~53.46 mg/L 范围内线性关系良好, 该方法加样回收率达 95 % 以上, 精密度、重现性、稳定性良好, 可作为含量测定的有效方法。

2.10 样品测定结果

2.10.1 样品来源及编号 将延安宜川、榆林清涧、渭南蒲城、咸阳旬邑、宝鸡陇县 5 个地区作为采集供试样点。供试样的要求为不同产地同一时间采集, 并且 8 月一个产地 1 个样 (开花期, 样本多缺失), 9、10、11 月为一个产地不同时期 (上、下旬) 2 个样。将产地按 A 榆林、B 延安、C 渭南、D 咸阳、E 宝鸡进行编号, 每个产地的 7 个样编为 0~6 号 (表 2)。

2.10.2 槐角苷的含量测定 将各槐角提取物按 "2.3.2" 项下方法制备样品溶液, 并按 "2.1" 项下色谱条件分别进样 20 μl, 记录槐角苷色谱峰面积。将测得的峰面积代入回归方程, 计算各槐角样本中槐角苷含量, 结果见表 3。

表 1 加样回收率试验

Table 1 Recovery test

Weighing weight of extract(mg)	Content of sophoricoside in the tested products(mg)	Adding content of control products(mg)	The measured content(mg)	Recovery rate(%)	Average recovery rate (%)	RSD (%)
1.45	0.224605	0.22	0.44	97.9	99.5	1.27
1.50	0.232350	0.23	0.45	98.9		
1.54	0.238546	0.25	0.47	100.6		
1.60	0.247840	0.25	0.50	100.9		
1.63	0.252487	0.25	0.50	99.0		

表 2 槐角样品编号

Table 2 Sample number

	Qingjian of Yulin	Yichuan of Yan' an	Pucheng of Weinan	Xunyi of Xianyang	Longxian of Baoji
August	-	-	-	D0	-
Early September	A1	B1	C1	D1	E1
Late September	A2	B2	C2	D2	E2
Early October	A3	B3	C3	D3	E3
Late October	A4	B4	C4	D4	E4
Early November	A5	B5	C5	D5	E5
Late November	A6	B6	C6	D6	E6

表 3 槐角苷含量测定结果

Table 3 The results of sophoricoside content determination

Sample name	Content of sophoricoside(%)	Sample name	Content of sophoricoside(%)
A1	7.18	C5	5.82
A2	7.28	C6	5.97
A3	6.95	D0	6.96
A4	6.53	D1	7.61
A5	4.63	D2	6.86
A6	4.89	D3	6.36
B1	6.52	D4	7.90
B2	7.22	D5	6.98
B3	6.40	D6	4.95
B4	4.56	E1	7.35
B5	5.41	E2	6.07
B6	4.27	E3	5.53
C1	7.76	E4	8.42
C2	6.20	E5	6.91
C3	5.15	E6	6.14
C4	8.78		

3 讨论

槐角是常用中药,槐角中槐角苷含量较高,可以作为生产槐角苷的主要药源。目前,对槐角中槐角苷的含量测定的报道

比较多^[4,6,9],也有比较全国不同省份的槐角中槐角苷含量差异的报道。槐角作为陕西的道地药材之一,但现在对陕西槐角的槐角苷含量的差异比较未见报道。

本实验建立了 HPLC 法测定槐角中槐角苷含量的测定方

法。通过上述实验结果分析,不同来源槐角中槐角苷含量范围4.27%~8.78%。我们发现陕北黄土高原沟壑区9月下旬的槐角中槐角苷含量较高;渭北黄土高原干旱区10月下旬槐角中槐角苷含量较高,这可能与日照时间、温度、海拔和干旱等因素有关。说明槐角苷含量与地域分布、环境条件等有很重要的关系。

本实验为寻找其他槐角苷药源提供了依据,为寻找陕西槐角苷含量高槐角的采摘地区和采摘时间提供了依据,也为陕西槐角的资源利用和开发提供实验依据。

参考文献(References)

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 2006:2437
Nanjing University of Chinese Medicine. Great Dictionary of Chinese Medicine [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2006:2437
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2010版一部) [M]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:334
National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China(subdivision of Edition 2010) [M]. Beijing: Chinese medicine science and Technology Press, 2010:334
- [3] 王景华,唐于平,楼凤昌,等. 槐角化学成分与药理作用[J]. 国外医药 植物药分册, 2002, 17(2):58-60
Wang Jing-hua, Tang Yu-ping, Lou Feng-chang, et al. Chemical constituent and pharmacological action of Fructus Sophorae [J]. Foreign medicine: Botany Fascicule, 2002, 17(2):58-60
- [4] 王志玲,刘景东,勾凌燕,等. HPLC同时测定槐角中的芦丁和槐角苷[J]. 华西药杂志, 2010, 25(1):072-074
Wang Zhi-ling, Liu Jing-dong, Gou Ling-yan, et al. Simultaneous determination of rutin and sophoricoside in Fructus sophorae by RP-HPLC [J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010, 25(1):072-074
- [5] 刘晓华,李涛,朱亮,等. HPLC测定槐角丸中槐角苷含量[J]. 中成药, 2005, 27(4):476-478
Liu Xiao-hua, Li Tao, Zhu Liang, et al. Determination of sophoricoside component in Huaijiao pills by HPLC [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2005, 27(4):476-478
- [6] 郑芳,李志浩,李鹏,等. 高效液相色谱法同时测定槐角中槐角苷和芦丁的含量[J]. 新乡医学院学报, 2010, 27(6):569-671
Zheng Fang, Li Zhi-hao, Li Peng, et al. Simultaneous determination of sophoricoside and rutin content in Fructus Sophorae by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Xinxiang Medical College, 2010, 27(6):569-671
- [7] 魏晓亮,王冬梅,赵怀清,等. RP-HPLC同时测定槐角丸中4种有效成分的含量[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(7):549-552
Wei Xiao-liang, Wang Dong-mei, Zhao Huai-qing, et al. Simultaneous determination of four effective components in Huaijiao Pills by RP-HPLC [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2011, 46(7):549-552
- [8] 孟珺,王立军. HPLC同时测定槐角丸中槐角苷、黄芩苷和柚皮苷含量[J]. 中药材, 2011, 34(4):638-639
Meng Jun, Wang Li-jun. Simultaneous determination of sophoricoside, baicalin and naringin component in Huaijiao Pills by HPLC [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2011, 34(4):638-639
- [9] 肖怀,陈泽乃,陆阳,等. HPLC测定槐角中槐角苷含量[J]. 大理学院学报, 2003, 2(3):11-13
Xiao Huai, Chen Ze-nai, Lu Yang, et al. Determination of sophoricoside component in Fructus Sophorae by HPLC [J]. Journal of Dali College, 2003, 2(3):11-13
- [10] 房敏峰,曲欢欢. 槐角不同炮制品中槐角苷的含量测定[J]. 中药材, 2007, 30(1):24-25
Fang Min-feng, Qu Huan-huan. Determination of sophoricoside component in different processed products of Fructus Sophorae [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2007, 30(1):24-25
- [11] 边清泉,杨振萍. HPLC同时测定槐角丸中生药槐角的4种有效成分[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(19):1513-1515
Bian Qing-quan, Yang Zhen-ping. Simultaneous determination of four effective components in Huaijiao Pills by HPLC [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2005, 30(19):1513-1515
- [12] 卜红闯,刘永茂. 高效液相色谱法测定槐黄丸中槐角苷的含量[J]. 中国临床医药研究杂志, 2008, 185:1-2
Bo Hong-min, Liu Yong-mao. Determination of sophoricoside component in Huaihuang Pills by HPLC [J]. Chinese Journal of clinical medicine research, 2008, 185:1-2
- [13] 丛维涛,崔健,陈新,等. 不同产地槐角的质量分析[J]. 吉林中医药, 2005, 25(6):51
Cong Wei-tao, Cui Jian, Chen Xin, et al. Quality analysis of Fructus Sophorae in different places of production [J]. Jilin traditional Chinese Medicine, 2005, 25(6):51
- [14] 韦华梅,王剑波,闫腾蛟,等. 正交试验优选槐角总黄酮的提取工艺及不同来源槐角中总黄酮的含量测定 [J]. 陕西中医, 2011, 32(9):1231-1233
Wei Hua-mei, Wang Jian-bo, Yan Teng-jiao, et al. Optimum extracting technology for total flavonoids from Fructus Sophorae by orthogonal test and the content determination of total flavonoids in Fructus Sophorae from different Sources [J]. Shaanxi journal of traditional Chinese Medicine, 2011, 32(9):1231-1233