

高效液相法同时测定土茯苓中五种多酚成分

张清峰¹, 张汉扬², 上官新晨¹, 郑国栋¹

(1. 江西农业大学食品科学与工程学院, 江西省高等学校天然产物开发与利用重点实验室, 江西南昌 330045)

(2. 香港城市大学生物与化学系, 香港)

摘要: 本文建立了土茯苓中五种多酚成分: 5-O-咖啡酰莽草酸、落新妇苷、花旗松素、黄杞苷及白藜芦醇的高效液相色谱分析方法。色谱柱为 Agilent Zorbax SB C18 柱 (250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm), 流动相为乙腈 (A) 及 0.1% 醋酸水溶液 (B), 线性梯度洗脱程序为 0~15 min, 16~21% A; 15~40 min, 21~40% A。五种成分线性良好 ($r>0.998$), 保留时间相对标准偏差介于 0.22~0.76%, 峰面积相对标准偏差介于 2.67~4.64%, 加标回收率介于 96.5~103.7%。对 18 批土茯苓样品分析结果表明, 落新妇苷是土茯苓中最主要黄酮成分, 含量范围为 5.48~25.75 mg/g; 花旗松素、黄杞苷、异黄杞苷、落新妇苷及其三种异构体(以落新妇苷计)等七种黄酮总量介于 6.72~35.3 mg/g, 平均含量为 18±8.5 mg/g; 5-O-咖啡酰莽草酸含量也较高, 含量范围为 0.97~6.29 mg/g, 该成分在土茯苓中的含量测定为首次报道。但花旗松素和白藜芦醇含量较低, 在一些样品中未检测到。

关键词: 土茯苓; 高效液相色谱法; 测定

文章编号: 1673-9078(2013)9-2275-2278

Quantitative Analysis of Five Polyphenols in *Rhizoma smilacis Glabrae* by HPLC

ZHANG Qing-feng¹, ZHENG Han-yang², SHANG GUAN Xin-cheng¹, ZHENG Guo-dong¹

(1. Key Laboratory of Jiangxi Provincial Department of Education in Natural Product Research and Development, Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China) (2. Research Group for Bioactive Products, Department of Biology and Chemistry, City University of Hong Kong, 83 Tat Chee Avenue, Hong Kong SAR, China)

Abstract: A HPLC quantitative method for simultaneous determination of 5-O-caffeoylshikimic acid, astilbin, taxifolin, engeletin and trans-resveratrol in *Rhizoma Smilacis Glabrae* (RSG) was developed. An Agilent Zorbax SB C18 column (250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm) was used. The mobile phase consisted of acetonitrile (A) and 0.1% acetic acid aqueous solution (B) with linear gradient program of 16~21% (A) in 0~15 min, 21~40% (A) in 15~40 min. The calibration curve of each analyte was constructed under six concentrations. The correlation coefficients were all >0.998 , and the RSD values of t_R and the peak area ranged from 0.22 to 0.76% and from 2.67 to 4.64%, respectively. Among 18 RSG samples, astilbin was the most dominant constituent with content ranged from 5.48 to 25.75 mg/g. The total amount of seven flavonols including taxifolin, engeletin, isoengeletin, astilbin and its three isomers (quantified as astilbin) was in the range of 6.72~35.3 mg/g, with average of 18±8.5 mg/g. 5-O-caffeoylshikimic acid was the second dominant component with content ranged from 0.97 to 6.29 mg/g, while the contents of taxifolin and trans-resveratrol were relatively low, and in some samples was even undetected.

Key words: *Rhizoma Smilacis Glabrae*; HPLC; quantification

土茯苓是百合科菝葜属植物光叶菝葜 (*Smilax glabra* Roxb.) 的干燥根茎, 是中国药典收录的常用中药, 也是卫生部允许在保健品中使用的中草药之一。土茯苓富含淀粉, 可以充饥, 因此在一些地方也作为食品, 如广东就有用其煲汤的习惯。目前市场上以其

收稿日期: 2013-05-15

基金项目: 江西省自然科学基金资助项目(20122BAB214005); 江西农业大学青年基金资助项目(QN201108)

作者简介: 张清峰(1983-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为功能性食品成分, 天然产物开发与利用

为主要原料的功能食品有龟苓膏、土茯苓凉茶等。《中国药典》描述其功能主治包括解毒, 除湿及利通关节, 用于治疗梅毒及汞中毒所致的肢体拘挛, 筋骨疼痛; 及疥癣等皮肤疾病^[1]。现代药理研究显示土茯苓提取物有抗氧化^[2]、降血糖^[3]、抑制肝癌细胞增殖和诱导凋亡作用^[4]。在三硝基氯苯引发的肝损伤模型中, 土茯苓水提物可通过诱导浸润至肝脏的 CD4+T 细胞凋亡, 从而抑制其对肝细胞的杀伤作用^[5]。在大鼠佐剂性关节炎模型研究中发现土茯苓水提物通过下调过度活化的巨噬细胞活性, 上调炎症后期低下的 T 细胞功能而

发挥抗慢性炎症的功能^[6-8]。

化学成分研究表明二氢黄酮醇类物质落新妇苷、黄杞苷、异黄杞苷、花旗松素等是土茯苓主要活性成分；另外，它也含有白藜芦醇、丁香酸、莽草酸、5-O-咖啡酰莽草酸等芪类及酚酸类物质^[9-10]。为更好的开发利用土茯苓资源及控制其质量，建立其功能成分的定量分析方法非常有必要。2010版《中国药典》仅以落新妇苷含量来评估土茯苓质量，要求含量不低于0.45%^[1]。李磊等建立了土茯苓中落新妇苷和白藜芦醇的含量的HPLC测定方法^[11]。但一或两种有效成分的定量并不能很好的反应土茯苓的质量。在前期建立土茯苓HPLC指纹图谱的研究基础上^[12]，本文建立了土茯苓中五种主要成分，5-O-咖啡酰莽草酸、落新妇苷、黄杞苷、白藜芦醇及花旗松素的HPLC分析方法。

1 材料与方法

1.1 试剂与原料

HPLC级乙腈购自RCI Labscan (Bangkok, Thailand)。HPLC级醋酸购自International Laboratory (San Bruno, USA)。使用水为Milli-Q水。白藜芦醇(>98%)，花旗松素(>85%)购自Sigma (St. Louis, MO, USA)。5-O-咖啡酰莽草酸，落新妇苷，黄杞苷由本实验室从土茯苓中纯化，经UV、IR、MS and NMR鉴定，纯度>98%。18批次土茯苓样品购自广州清平药材市场，香港九升街药材市场，由香港浸会大学赵中振教授鉴定为土茯苓。

1.2 主要仪器设备

HPLC系统为Waters 600，配备双波长检测器及在线脱气系统。色谱柱为Agilent Zorbax SB C18柱(250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm)。

1.3 HPLC分析方法

HPLC使用线性梯度洗脱，流动相为乙腈(A)及0.1%醋酸水溶液(B)。线性梯度程序为0~15min, 16~21%A; 15~40 min, 21~40%A。流速为1 mL/min。进样量为10 μL。检测波长为291 nm。

1.4 土茯苓样品液制备

精密称取土茯苓药材粉末0.5 g(过40目筛)，置具塞锥形瓶中，精密加25 mL 60%乙醇，密塞后称定重量。超声(功率为500 W，频率为40 kHz)处理20 min，再称重，用60%乙醇补足减失的重量，经0.45 μm滤膜滤过，作为供试品溶液。

1.5 数据统计

数据统计和作图软件为Origin7.0。每个样品平行测定三次，结果表示为平均值±标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 分离条件优化

比较了甲醇和乙腈作为流动相的分离效果。结果表明，甲醇作为流动相的分离时间要比乙腈偏长。比较了不同线性梯度洗脱程序下的分离效果，提高有机溶剂在流动相中比率可缩短分离时间，当初始乙腈浓度大于30%，所有成分在8分钟内被洗出，但分离度非常差。经过比较，最佳的分离条件是以乙腈(A)及0.1%醋酸水溶液(B)作为流动相，线性梯度程序为0~15 min, 16~21%A; 15~40 min, 21~40%A，流速为1 mL/min。样品分离结果见图1，可以看到整个分离可以在40分钟内完成，峰与峰之间可以完全分开。

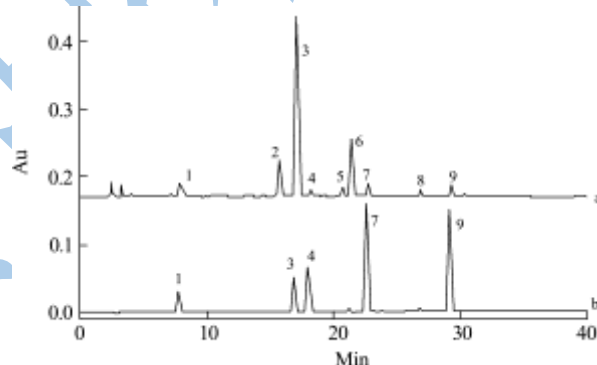


图1 土茯苓样品(a)及标准品色谱图(b)

Fig.1 The HPLC chromatography of *Rhizoma smilacis Glabrae* sample (a) and standard markers (b)

注：1:5-O-咖啡酰莽草酸；3:落新妇苷；4:花旗松素；7:黄杞苷；9:白藜芦醇。

根据与标准品保留时间对照，色谱图中峰1、3、4、7、9分别鉴定为5-O-咖啡酰莽草酸、落新妇苷、花旗松素、黄杞苷、白藜芦醇。根据我们前期HPLC-DAD-MS/MS分析结果，峰2、5、6与落新妇苷具有完全相同的分子量及碎片，因此这三个峰鉴定为落新妇苷三种异构体；峰8与黄杞苷具有完全相同的分子量及碎片，因此鉴定为异黄杞苷^[12]。根据DAD给出的各色谱峰UV光谱^[12]，土茯苓中7个黄酮物质的最大吸收波长均在291 nm左右，5-O-咖啡酰莽草酸的最大吸收波长为327 nm，而白藜芦醇的最大吸收波长为320 nm。因此，本研究选定检测波长为291 nm。

2.2 定量分析方法学考察

建立了 5-O-咖啡酰莽草酸、落新妇苷、花旗松素、黄杞苷及白藜芦醇的定量分析方法, 方法学考察结果见表一。在线性范围内, 均匀取 6 个浓度, 测定其峰面积, 以峰面积对浓度进行线性回归, 得到标准曲线。各化合物线性关系良好, 相关系数 r 均大于 0.998。方法精密度: 连续测定浓度为 10 μg/mL 的标准品 6 次, 计算各标准品保留时间及峰面积的相对标准偏差。由表 1 知, 保留时间相对标准偏差介于 0.22~0.76%, 峰

面积的相对标准偏差介于 2.67~4.64% 之间, 表明方法稳定性很好。回收率: 往已知浓度的样品溶液中加入等体积的 20 μg/mL 的标准品溶液, 根据标准曲线, 测定各物质含量。回收率=100×(测定浓度-初始浓度)/加样浓度。测试结果表明五种化合物的加标回收率介于 96.5~103.7%。检出限(LOD)和定量限(LOQ)分别定义为 3 倍和 10 倍空白样品信号所对应的待测物浓度, 由表 1 知, 五种化合物的定量限都低于 1 μg/mL。方法学考察结果表明本 HPLC 方法具有很好的准确性和重现性, 可以用于实际样品分析。

表1 检测方法线性、精密度及回收率实验结果

Table 1 Precision, linearity and recovery of HPLC method of different analytes

待测物	RSD/%		回归方程 ^a	线性范围 (μg/mL)	r	回收率/% ^b	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)
	t _R	峰面积						
5-O-咖啡酰莽草酸	0.76	3.95	Y=17365X-2176	1.0~100	0.999	103.7±2.4	0.30	0.96
落新妇苷	0.39	4.64	Y=30992X+2097	1.0~100	0.999	97.2±3.6	0.27	0.86
花旗松素	0.28	2.67	Y=48064X-3846	1.0~50	0.998	102.9±3.3	0.19	0.63
黄杞苷	0.22	3.13	Y=33744X-1287	1.0~100	0.999	101.7±2.9	0.26	0.87
白藜芦醇	0.34	3.77	Y=88577X+12637	1.0~50	0.998	96.5±4.5	0.18	0.6

注: ^aY为峰面积, X为浓度; ^b回收率=100×(测定浓度-初始浓度)/加样浓度

2.3 样品分析

将建立的定量分析方法用于 18 批次土茯苓样品各成分的定量分析, 测定结果见表 2。由表二可知, 五种成分在不同样品中含量差异较大, 反映土茯苓质量参差不齐, 这可能是由于土茯苓不同生长环境或采收时间引起的。但是, 在 18 批次土茯苓样品中, 落新妇苷都是含量最高的成分, 含量介于 5.48~25.75 mg/g, 均符合 2010 版《中国药典》要求土茯苓中落新妇苷含量不低于 4.5 mg/g 的标准。5-O-咖啡酰莽草酸的含量也较高, 含量范围为 0.97~6.29 mg/g, 该成分在土茯苓中的含量测定为首次报道。而土茯苓中花旗松素和

白藜芦醇含量较低, 在有些样品中甚至低于检出线。

图 1 中峰 2、5、6 为落新妇苷的三种异构体, 峰 8 为黄杞苷异构体, 本文建立的分离条件可以很好的分离这些异构体。但由于这几种成分的标准品难以获得, 本研究为更好的反映土茯苓质量, 使用落新妇苷及黄杞苷的标准线同时测定了这些化合物的含量(表 2)。花旗松素、黄杞苷、异黄杞苷、落新妇苷及其三种异构体都为二氢黄酮醇类物质, 测定结果表明 18 批土茯苓样品中这七种黄酮含量之和介于 6.72~35.3 mg/g, 平均含量为 18.0±8.5 mg/g。研究表明土茯苓中黄酮含量较高, 是其最主要的活性成分。

表2 18批次土茯苓样品中9种成分含量 (mg/g, n=3)

Table 2 Contents of the nine constituents in different RSG sample

	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4 ^a	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8 ^a	峰 9
	5-O-咖啡酰莽草酸	*	落新妇苷	花旗松素	*	*	黄杞苷	异黄杞苷	白藜芦醇 ^a
S01	1.29±0.02	0.38±0.04	7.75±0.16	76.2±2.9	0.15±0.01	1.03±0.06	0.52±0.03	92.6±2.4	ND ^b
S02	1.18±0.03	1.30±0.02	6.85±0.18	164.1±1.8	0.35±0.02	2.05±0.09	0.39±0.02	162.3±3.2	123.1±5.9
S03	2.76±0.14	0.81±0.02	12.91±0.31	279.8±6.3	0.37±0.01	2.36±0.07	0.92±0.08	265.0±7.9	44.1±6.7
S04	4.61±0.19	0.43±0.05	13.18±0.09	39.2±1.1	0.25±0.01	1.75±0.05	1.05±0.09	272.1±5.7	305.815.9
S05	1.53±0.09	0.18±0.01	5.48±0.31	ND ^b	0.10±0.01	0.71±0.08	0.20±0.04	52.1±1.1	204.2±11.1
S06	3.05±0.12	0.15±0.01	18.87±0.26	124.4±1.0	0.79±0.02	3.37±0.03	1.23±0.04	302.3±9.9	211.7±12.0
S07	1.46±0.15	0.86±0.02	7.88±0.16	181.7±8.4	0.26±0.01	1.52±0.08	0.43±0.02	128.3±2.4	33.5±7.6
S08	3.64±0.21	0.79±0.02	25.75±0.61	131.7±1.1	0.39±0.01	2.89±0.19	2.63±0.09	437.7±25.9	60.6±5.3

转下页

接上页

S09	2.09±0.01	1.16±0.01	10.84±0.71	391±13.7	0.43±0.03	2.65±0.02	0.49±0.04	299.1±4.3	ND ^b
S10	2.43±0.51	0.61±0.06	13.73±0.56	109.0±6.6	0.50±0.03	2.57±0.17	0.70±0.04	158.8±1.3	103.8±.39
S11	2.35±0.39	0.97±0.02	12.17±0.06	87.9±0.9	0.38±0.01	1.99±0.13	0.95±0.03	225.8±2.7	150.8±5.9
S12	2.42±0.04	0.26±0.01	7.41±0.05	26.7±1.3	0.15±0.02	1.01±0.05	0.27±0.02	80.5±1.0	279.2±11.9
S13	5.25±0.44	0.58±0.03	23.84±0.17	38.7±2.1	0.27±0.02	1.45±0.04	0.85±0.09	110.6±3.2	264.8±12.3
S14	0.97±0.07	1.86±0.01	8.70±0.18	ND ^b	0.39±0.04	2.77±0.01	0.95±0.05	405.1±14.5	30.7±1.2
S15	6.29±0.25	1.91±0.02	25.21±0.09	204.7±8.1	0.68±0.04	4.08±0.07	2.61±0.05	598.4±17.9	42.2±2.1
S16	2.51±0.15	0.09±0	18.39±0.17	36.5±2.5	0.14±0.01	0.83±0.04	1.88±0.08	173.6±2.9	49.7±1.7
S17	2.90±0.09	0.081±0	8.28±0.06	92.5±1.8	0.11±0.01	0.68±0.03	0.12±0.01	ND ^b	ND ^b
S18	1.46±0.03	1.004±0.01	13.52±0.14	32.4±3.8	0.29±0.02	1.51±0.08	1.14±0.08	226.8±12.1	58.6±6.1

注: *表示为落新妇苷异构体; ^a单位为 $\mu\text{g/g}$; ^b未检测到。

3 结论

建立了土茯苓中五种成分的 HPLC 分析方法, 方法具有很好精密度和回收率。对 18 批次土茯苓样品分析结果表明, 土茯苓中有花旗松素、黄杞苷、异黄杞苷、落新妇苷及其三种异构体等七种二氢黄酮醇类化合物, 总黄酮平均含量(以落新妇苷计)为 $18\pm 8.5 \text{ mg/g}$ 。落新妇苷含量范围为 $5.48\sim 25.75 \text{ mg/g}$, 是土茯苓中含量最高的成分。除黄酮成分外, 土茯苓中 5-O-咖啡酰莽草酸含量也较高, 含量范围为 $0.97\sim 6.29 \text{ mg/g}$; 但花旗松素和白藜芦醇含量较低, 在有些样品中甚至低于检出线而未检测到。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 版第一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010
National Commission of Chinese Pharmacopoeia. Pharmacopoeia of Peoples Republic of China: 2010 edition Vol I [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010
- [2] Zhang Q F, Zhang Z R, Cheung H Y. Antioxidant activity of Rhizoma Smilacis Glabrae extracts and its key constituent-astilbin [J]. Food Chemistry, 2009, 115: 297-303
- [3] Fukunaga T, Miura T, Furuta K, et al. A Hypoglycemic effect of the rhizomes of Smilax glabra in normal and diabetic mice [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 1997, 20: 44-46
- [4] Sa F, Gao J L, Fung K P, et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of Smilax glabra Roxb extract on hepatoma cell lines [J]. Chemico-biological interaction, 2008, 171: 1-14
- [5] Xu Q, Cao J S, Wu F G, et al. Aqueous Extract from Rhizoma Smilacis Glabrae Alleviates Immunological Liver Damage by Selectively Facilitating the Dysfunction of Liver-infiltrating Lymphocytes [J]. Pharmacy and Pharmacology Communications, 2000, 6(1): 41-47
- [6] Jiang J Y, Wu F H, Lu J F, et al. Anti-inflammatory activity of the aqueous extract from Rhizoma Smilacis Glabrae [J]. Pharmacological Research, 1997, 36: 309-314
- [7] Jiang J Y, Xu Q. Immunomodulatory activity of the aqueous extract from rhizome of Smilax glabra in the later phase of adjuvant-induced arthritis in rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2003, 85: 53-59
- [8] Jiang J Y, Wu F H, Lu J F, et al. Anti-inflammatory activity of the aqueous extract from Rhizoma Smilacis Glabrae [J]. Pharmacological Research, 1997, 36: 309-314
- [9] Zhang Q F, Li S C, Lai W P, et al. β -Cyclodextrin facilitates simultaneous analysis of six bioactive components in Rhizoma Smilacis Glabrae by capillary zone electrophoresis [J]. Food Chemistry, 2009, 113: 684-691
- [10] Chen L, Yin Y, Yi H W, et al. Simultaneous quantification of five major bioactive flavonoids in Rhizoma Smilacis Glabrae by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, 43: 1715-1720
- [11] 李磊, 张宏桂, 乔延江. 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, 2007, 27(5): 654-656
Li L, Zhang H G, Qiao Y J. HPLC determination of astilbin and resveratrol in Smilax glabra Roxb [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2007, 27(5): 654-656
- [12] Zhang Q F, Cheung H Y, Zeng L B. Development of HPLC fingerprint for species differentiation and quality assessment of Rhizoma Smilacis Glabrae [J]. Journal of Natural Medicines, 2013, 67: 207-211