

超高效液相色谱法同时测定川射干中 7 个异黄酮成分的含量

陈 帅*,袁崇均,罗 森,王 笕

四川省中医药科学院,成都 610041

摘要:分析测定不同产地的川射干中射干苷、鸢尾甲苷 A、鸢尾甲苷 B、野鸢尾苷、鸢尾苷元、鸢尾甲黄素 A、鸢尾甲黄素 B 7 个异黄酮成分,建立快速测定其异黄酮成分含量的方法。采用 Waters Acquity UPLC 系统;色谱柱为 Waters BEH C₁₈ 柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm);流动相为乙腈-0.5% 冰醋酸,梯度洗脱;流速 0.5 mL/min;柱温,35 °C;检测波长 266 nm。所得结果表明川射干中异黄酮成分分离良好,各成分进样量与峰面积在测定范围内呈现良好的线性关系($r \geq 0.9990$),加样回收率分别为 99.68%、100.57%、98.43%、98.03%、99.14%、97.53%、101.86%,RSD 分别为 0.84%、1.82%、1.67%、1.54%、0.89%、1.95%、1.77%。本实验所建立的川射干 UPLC 含量测定方法快速、简便、准确,为川射干的质量控制提供了科学依据。

关键词:异黄酮;川射干;质量控制;超高效液相色谱

中图分类号:R917

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.2.014

Simultaneous Determination of 7 Isoflavone Components in *Iris tectorum* Using UPLC

CHEN Shuai*, YUAN Chong-jun, LUO Sen, WANG Jia

Sichuan Institute of Chinese Materia Medica, Chengdu 610041, China

Abstract: To establish a UPLC method for the simultaneous determination of tectoridin, iristectorin A, iristectorin B, iridin, tectorigenin, iristectorigenin A, iristectorigenin B in *Iris tectorum* Maxim. Waters BEH C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) column was used, with acetonitrile-0.5% glacial acetic acid as the mobile phases in gradient elution mode. The column temperature was 35 °C, with flow rate 0.5 mL/min. The UV detection wavelength was set at the maximum absorption wavelength, 266 nm for all components. The seven kinds of isoflavone components in *I. tectorum* were separated well, and the linear relationship was obtained ($r \geq 0.9990$). The average recoveries were 99.68%, 100.57%, 98.43%, 98.03%, 99.14%, 97.53% and 101.86%, with RSDs were 0.84%, 1.82%, 1.67%, 1.54%, 0.89%, 1.95% and 1.77%, respectively. The established method was rapid, simple and accurate, it can provide the basis for the quality control of *I. tectorum*.

Key words: isoflavone; *Iris tectorum* Maxim.; quality control; UPLC

川射干为鸢尾科植物鸢尾 *Iris tectorum* Maxim. 的干燥根茎,具有清热解毒、祛痰、利咽的功效,用于热毒痰火郁结、咽喉肿痛、痰涎壅盛、咳嗽气喘^[1]。川射干在中成药中被广泛应用,如川射干黄酮胶囊(本院研制,国药证字 Z20140006)、抗病毒颗粒、咽喉舒颗粒、美声喉泰含片等均以川射干或其提取物为主要原料。川射干的原生药材长期以来主要依靠采集野生资源,来源广泛,主产于四川、重庆、贵州、云南、广西等省份,不同生长环境下的川射干质量参

差不齐,相近品种有射干、白射干、黄射干等植物,容易混淆,导致用药质量难以保证,故对川射干进行质量控制尤为重要。

川射干所含化学成分十分复杂,主要包括黄酮类化合物及其糖苷、异黄酮类化合物及其糖苷、苯醌类化合物、三萜类化合物及其皂甙,其中异黄酮类化合物是鸢尾属植物的特征化学成分,现已从川射干中分离出射干苷、鸢尾苷元、鸢尾甲苷 A、鸢尾甲苷 B、鸢尾甲黄素 A、鸢尾甲黄素 B、野鸢尾苷、野鸢尾黄素、染料木素等异黄酮化合物^[2-4],药理研究表明川射干乙醇提取物有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、降血脂,清除自由基和雌激素样作用^[5-7];鸢尾苷和鸢尾苷元均能有效地抑制血管增生^[8],对人胃癌细胞株 SGC-

收稿日期:2017-07-27 接受日期:2017-09-01

基金项目:四川省应用基础研究计划(2016JY0009);四川省公益性科研基金项目(A-2017N-39)

* 通信作者 Tel:86-28-85237395; E-mail:csdctcm@126.com

7901 的生长有抑制作用^[9]; 鸢尾苷元具有清除自由基, 抗脂质过氧化损伤、保护心肌缺血、降低血脂、血糖等作用^[10]; 鸢尾甲苷 A、鸢尾甲苷 B 具有显著的神经保护作用^[11]。药典对川射干含量规定仅为 HPLC 法测定射干苷, 难以全面反映其的真实质量。本文采用 UPLC 法, 在同一条件下同时测定药材中射干苷、鸢尾甲苷 A、鸢尾甲苷 B、野鸢尾苷、鸢尾苷元、鸢尾甲黄素 A、鸢尾甲黄素 B 的含量^[12,13], 全面地检测了其异黄酮主要成分。该方法简单方便、分析快速, 为控制川射干质量提供科学依据。

1 仪器与试剂

Acquity UPLC (Waters, 包括二元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Empower II 色谱工作站); Waters BEH C₁₈ 柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm); Sartorius 电子分析天平 BP 211D 型 (十万分之一); Milli-Q Integral 3 超纯水机 (Millipore 公司); KQ-500E 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

对照品: 射干苷 (HPLC ≥ 98%, 中国药品生物制品检定所, 批号 111632-200501)、野鸢尾苷 (HPLC ≥ 98%, 江苏永健医药科技有限公司, 批号 151228)、射干苷元 (HPLC ≥ 98%, 成都曼思特生物制品有限公司批号, MUST-14091601)、鸢尾甲黄素 A、

鸢尾甲黄素 B、鸢尾甲苷 A、鸢尾甲苷 B (自制, HPLC ≥ 98%)。乙腈为色谱纯, 乙醇、甲醇为分析纯, 水为超纯水。

川射干购于四川、重庆、贵州、云南、广西等地, 由四川省中医药科学院舒光明研究员鉴定为鸢尾科植物鸢尾 *Iris tectorum* Maxim. 的干燥根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Waters Acquity UPLC 系统; 色谱柱为 Waters BEH C₁₈ 柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm); 流动相 0.5% 冰醋酸 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱如下: 0 ~ 3.0 min, 10% ~ 20% B; 3.0 ~ 4.5 min, 20% ~ 30% B; 4.5 ~ 5.5 min, 30% ~ 55% B; 5.5 ~ 6.5 min, 55% B; 6.5 ~ 7.0 min, 55% ~ 90% B; 流速 0.5 mL/min; 柱温: 35 °C; 检测波长为 266 nm; 进样量 2 μL, 色谱图见图 1。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取射干苷、鸢尾甲苷 A、鸢尾甲苷 B、野鸢尾苷、鸢尾苷元、鸢尾甲黄素 A、鸢尾甲黄素 B 对照品适量, 加 70% 甲醇溶液配制成混合对照品溶液。浓度分别为射干苷 0.0487 mg/mL、鸢尾甲苷 A 0.0096 mg/mL、鸢尾甲苷 B 0.0108 mg/mL、野鸢尾苷 0.0082 mg/mL、鸢尾苷元 0.0295 mg/mL、鸢尾

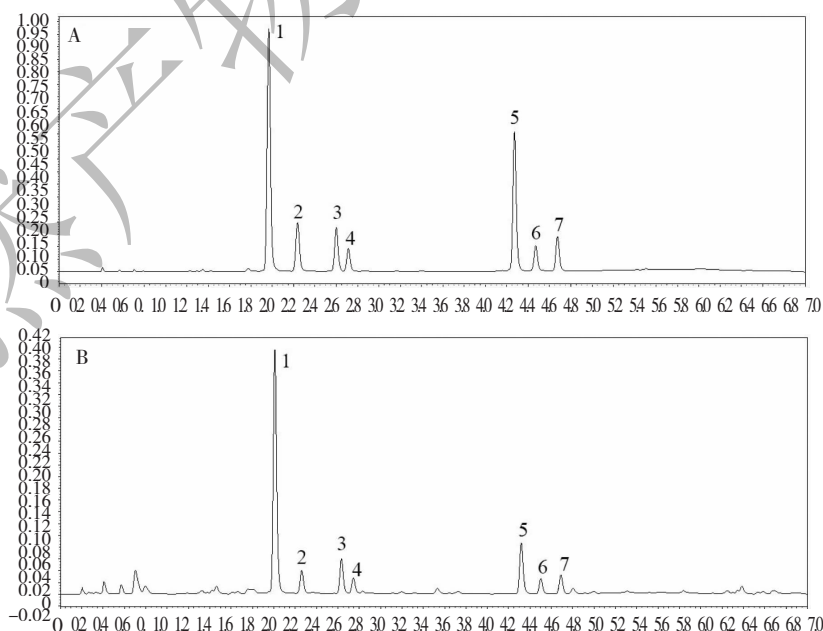


图 1 对照品 (A) 及 3 号样品 (B) 的 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of mixed standards (A) and No. 3 sample (B)

注: 1. 射干苷; 2. 鸢尾甲苷 A; 3. 鸢尾甲苷 B; 4. 野鸢尾苷; 5. 鸢尾苷元; 6. 鸢尾甲黄素 A; 7. 鸢尾甲黄素 B

Note: 1. Tectoridin; 2. iristectorin A; 3. iristectorin B; 4. Iridin; 5. Tectorigenin; 6. iristectorigenin A; 7. iristectorigenin B

甲黄素 A 0.0086 mg/mL、鸢尾甲黄素 B 0.0094 mg/mL。

2.3 供试品溶液的制备

取川射干粉末(过三号筛)约 0.25 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇 25 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 50 kHz) 1 h,放冷,再称定重量,用 70% 乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 1 mL,置 10 mL 量

瓶中,加 70% 乙醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、5.0 μL ,注入液相色谱仪中,按照上述色谱条件测定。分别以峰面积积分值为纵坐标(y),对照品进样量(μg)为横坐标(x),绘制标准曲线,结果7个成分均达到良好的线性关系,见表1。

表1 各组分的回归方程、相关系数和线性范围

Table 1 The regression equation, correlation coefficient and linear range of each component

成分 Analyte	线性方程 Calibration curve	相关系数 <i>r</i>	线性范围 Linear range (μg)
射干苷 Tectoridin	$y = 5.12 \times 10^6 x - 8.37 \times 10^3$	0.9999	0.00487 ~ 0.24350
鸢尾甲苷 A Iristectorin A	$y = 4.91 \times 10^6 x - 1.23 \times 10^4$	0.9995	0.00096 ~ 0.04800
鸢尾甲苷 B Iristectorin B	$y = 4.96 \times 10^6 x - 8.57 \times 10^3$	0.9995	0.00108 ~ 0.05400
野鸢尾苷 Iridin	$y = 4.87 \times 10^6 x - 2.24 \times 10^4$	0.9993	0.00082 ~ 0.04100
鸢尾苷元 Tectorigenin	$y = 5.67 \times 10^6 x + 8.94 \times 10^3$	0.9996	0.00295 ~ 0.14750
鸢尾甲黄素 A Iristectorigenin A	$y = 5.42 \times 10^6 x - 1.71 \times 10^4$	0.9992	0.00086 ~ 0.04300
鸢尾甲黄素 B Iristectorigenin B	$y = 5.48 \times 10^6 x + 1.54 \times 10^4$	0.9993	0.00094 ~ 0.04700

2.5 精密度实验

精密吸取同一供试品溶液,按确定的色谱条件连续进样6次,测定并计算射干苷、鸢尾甲苷 A、鸢尾甲苷 B、野鸢尾苷、鸢尾苷元、鸢尾甲黄素 A、鸢尾甲黄素 B 峰面积的 RSD 值,结果分别为 0.53%、0.86%、0.97%、0.87%、0.48%、0.94%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性考察

精密吸取同一供试品溶液,按确定的色谱条件,分别于配置后 0、2、4、6、12、24 h 进样,测定并计算射干苷、鸢尾甲苷 A、鸢尾甲苷 B、野鸢尾苷、鸢尾苷元、鸢尾甲黄素 A、鸢尾甲黄素 B 峰面积的 RSD 值,结果分别为 0.75%、1.24%、0.88%、0.92%、0.68%、0.96%、1.07%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性实验

取同一批川射干(3号样品)粉末6份,每份 0.25 g,平行制备6份供试品溶液,按确定的色谱条件测定并计算射干苷、鸢尾甲苷 A、鸢尾甲苷 B、野鸢尾苷、鸢尾苷元、鸢尾甲黄素 A、鸢尾甲黄素 B 平均含量及 RSD。结果分别为 46.24、6.15、9.37、6.24、12.84、3.41、7.05 mg/g, RSD 值分别为

0.85%、1.46%、1.25%、1.57%、0.82%、1.48%、1.69%。

2.8 加样回收率实验

取已知含量的川射干(3号样品)约 0.125 g,共6份,精密称定,分别精密加入含射干苷 0.2345 mg/g、鸢尾甲苷 A 0.0321 mg/g、鸢尾甲 B 0.0487 mg/g、野鸢尾苷 0.0321 mg/g、鸢尾苷元 0.0637 mg/g、鸢尾甲黄素 A 0.0185 mg/g、鸢尾甲黄素 B 0.0349 mg/g 的混合对照品的 70% 乙醇溶液 25 mL,按照“2.3”项下制备供试溶液,按确定色谱条件测定。结果射干苷、鸢尾甲苷 A、鸢尾甲苷 B、野鸢尾苷、鸢尾苷元、鸢尾甲黄素 A、鸢尾甲黄素 B 平均回收率($n=6$)依次为 99.68%、100.57%、98.43%、98.03%、99.14%、97.53%、101.86%, RSD 值分别为 0.84%、1.82%、1.67%、1.54%、0.89%、1.95%、1.77%。

2.9 样品含量测定

取川射干粉末约 0.25 g,按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,按确定色谱条件测定 10 批不同产地的川射干中射干苷、鸢尾甲苷 A、鸢尾甲苷 B、野鸢尾苷、鸢尾苷元、鸢尾甲黄素 A、鸢尾甲黄素 B 的峰面积,根据外标法计算各样品中各成分的含量平均值,结果见表2。

表2 样品含量测定结果 (mg/g, n = 2)
Table 2 Content determination results of samples (mg/g, n = 2)

样品号 Sample No.	来源 Source	射干苷 Tectoridin	鸢尾甲苷 A Iristectorin A	鸢尾甲苷 B Iristectorin B	野鸢尾苷 Iridin	鸢尾苷元 Tectorigenin	鸢尾甲黄素 A Iristectorigenin A	鸢尾甲黄素 B Iristectorigenin B
1#	贵州织金 Zhijin, Guizhou	44.32	6.75	9.43	7.01	18.96	4.07	7.13
2#	贵州黔西 Qianxi, Guizhou	47.88	6.09	9.04	5.14	18.97	4.83	8.54
3#	云南彝良 Yiliang, Yunnan	46.24	6.15	9.37	6.24	12.84	3.41	7.05
4#	云南大关 Daguan, Yunnan	47.96	7.04	9.63	6.87	14.45	3.45	7.21
5#	四川合江 Hejiang, Sichuan	35.35	0.61	0.87	0.57	24.68	2.52	3.46
6#	四川筠连 Junlian, Sichuan	38.14	0.74	0.96	0.72	19.66	1.08	4.31
7#	四川泸县 Luxian, Sichuan	40.21	0.59	1.03	0.67	18.96	3.14	1.49
8#	重庆大足 Dazu, Chongqing	52.47	3.25	4.57	2.04	5.97	0.62	0.69
9#	重庆永川 Yongchuan, Chongqing	53.45	4.03	6.54	2.12	5.87	0.57	0.83
10#	广西南丹 Nandan, Guangxi	50.87	6.42	7.88	5.45	12.11	3.96	6.17

3 讨论

3.1 供试品制备方法的确定

药材提取考察了不同提取溶剂如甲醇、乙醇、50%乙醇、70%乙醇,考察了不同的提取方法如水浴回流、渗滤、超声,同时还考察了不同提取时间。结果表明,采用药典方法^[1]为佳,即采用70%乙醇为提取溶剂,超声提取1 h,异黄酮成分基本提取完全,色谱峰数量及响应值均不再增加,工艺简单易操作。

3.2 流动相的选择

流动相系统考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-水(含冰醋酸)、乙腈-水(含冰醋酸),结果不加冰醋酸的系统,苷元部分拖尾严重,影响分离效果,加冰醋酸的系统分离效果良好,甲醇-水(含冰醋酸)系统压力较大,所以选择乙腈-水(含冰醋酸)为流动相溶剂。

3.3 检测波长的选择

由于所有成分均为异黄酮化合物,紫外吸收基本一致,最大吸收均为266 nm,所以采用266 nm作为检测波长。

3.4 液相系统的对比

采用HPLC液相系统做本样品的检测,样品要实现基本分离需要60 min左右的分析时间,而采用UPLC超高效液相系统,大大的缩短了检测时间,仅仅7 min左右就可完成分析,节约了时间成本和溶剂成本;并且由于固定相粒度小,载样量少,各成分对应的色谱峰柱效、分离度和灵敏度均得到明显提高。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Committee (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典中国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015, Vol I: 38.
- 2 Yang YX(杨勇勋), Dong XP(董小萍). Studies on chemical constituents of Rhizoma Iridis Tectori [J]. *Pharm Clin Chin Mater Med* (中药与临床), 2010, 1(1): 20-22.
- 3 Qiu QH(邱庆浩), Zhang ZG(张志国), Wang JH(王建华), et al. Studies on the isoflavonoids of *Iris tectorum* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2009, 32: 1392-1394.
- 4 Yuan CJ(袁崇均), Wang J(王箭), Chen S(陈帅), et al. Study on the chemical constituents of *Iris tectorum* Maxim. [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008, 20: 444-446.
- 5 Zhang L(张琳), Zhang N(张妮). Progress in chemical and pharmacological studies on *Iris tectorum* Maxim. [J]. *J Shaanxi Coll Tradit Chin Med* (陕西中医学院学报), 2014, 37(5): 91-93.
- 6 Liu JY(刘建英), Jin L(金丽). Advances in research on phytochemical constituents and pharmacology of *Belamcanda chinensis* [J]. *Pharm Care Res* (药学服务与研究), 2008, 8: 358-361.
- 7 Han XJ(韩晓静). The research of pharmacodynamics on the isoflavone components in *Iris tectorum* Maxim [D]. Wuhan: Hubei University(湖北大学), 2006.
- 8 Jung SH, Lee YS, Lee S, et al. Anti-angiogenic and anti-tumor activities of isoflavonoids from the rhizomes of *Belamcanda chinensis* [J]. *Planta Med*, 2003, 69: 617-622.

(下转第217页)