

HPLC法同时测定两粤黄檀中6种成分

宋舸，韦建华，陈瑾，张妍妍，王慧敏，冯旭*

(广西中医药大学，广西南宁 530001)

摘要：目的 建立HPLC法同时测定两粤黄檀中甘草酸、土甘草A、4'-羟基-6-羟甲基-5,7-二甲氧基异黄酮、大鱼藤树素甲醚、大鱼藤树酸甲酯、甘草次酸的含有量。**方法** 两粤黄檀氯仿提取物的分析采用Waters-symmetry C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)；流动相甲醇-乙腈-0.2%磷酸，梯度洗脱；体积流量1.0 mL/min；柱温30 ℃；检测波长256 nm。**结果** 甘草酸、土甘草A、4'-羟基-6-羟甲基-5,7-二甲氧基异黄酮、大鱼藤树素甲醚、大鱼藤树酸甲酯、甘草次酸分别在0.07~2.50(*r*=0.999 2)、0.03~1.15 (*r*=0.999 2)、0.02~0.55(*r*=0.999 3)、0.01~0.26(*r*=0.999 8)、0.01~0.25 (*r*=0.999 6)、0.01~0.36 (*r*=0.999 0) mg/mL范围内线性关系良好，平均加样回收率分别为100.7%、101.5%、101.0%、97.4%、96.4%、100.5%，RSD分别为2.1%、2.1%、1.8%、2.0%、1.5%、2.1%。**结论** 该方法准确稳定，重复性好，可用于两粤黄檀的质量控制。

关键词：两粤黄檀；甘草酸；土甘草A；4'-羟基-6-羟甲基-5,7-二甲氧基异黄酮；大鱼藤树素甲醚；大鱼藤树酸甲酯；甘草次酸；HPLC

中图分类号：R284.1

文献标志码：A

文章编号：1001-1528(2019)11-2676-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.11.024

Simultaneous determination of six constituents in *Dalbergia benthamii* by HPLC

SONG Ge, WEI Jian-hua, CHEN Jin, ZHANG Yan-yan, WANG Hui-min, FENG Xu*

(Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

ABSTRACT: AIM To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of glycyrrhizic acid, 3-phenylcoumarin robustic acid, 4'-hydroxy-6-hydroxymethyl-5, 7-dimethoxy isoflavone, robustin methyl ether, methyl robustate, glycyrrhetic acid in *Dalbergia benthamii* Prain.. **METHODS** The analysis of chloroform extract of *D. benthamii* was performed on a 30 ℃ thermostatic Waters-Symmetry C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of methanol-acetonitrile-0.2% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 256 nm. **RESULTS** The glycyrrhizic acid, 3-phenylcoumarin robustic acid, 4'-hydroxy-6-hydroxymethyl-5, 7-dimethoxy isoflavone, robustin methyl ether, methyl robustate, glycyrrhetic acid showed good linear relationships within the ranges of 0.07–2.50 (*r*=0.999 2)、0.03–1.15 (*r*=0.999 2)、0.02–0.55 (*r*=0.999 3)、0.01–0.26 (*r*=0.999 8)、0.01–0.25 (*r*=0.999 6)、0.01–0.36 (*r*=0.999 0) mg/mL, whose average recoveries were 100.7%、101.5%、101.0%、97.4%、96.4%、100.5% with the RSDs of 2.1%、2.1%、1.8%、2.0%、1.5%、2.1%, respectively. **CONCLUSION** This accurate, stable and reproducible method can be used for the quality control of *D. benthamii*.

KEY WORDS: *Dalbergia benthamii* Prain.; glycyrrhizic acid; 3-phenylcoumarin robustic acid; 4'-hydroxy-6-hydroxymethyl-5, 7-dimethoxy isoflavone; robustin methyl ether; methyl robustate; glycyrrhetic acid; HPLC

收稿日期：2019-01-31

基金项目：广西自然科学基金项目（2017GXNFAA1981171）；广西高校中药提取纯化与质量分析重点实验室（桂教科研〔2014〕6）；广西高校中药提取纯化与质量分析重点实验室子课题（J1700205）

作者简介：宋舸（1993—），男，硕士生，研究方向为中药质量控制。Tel: 13396951806, E-mail: 1052914219@qq.com

*通信作者：冯旭（1975—），男，硕士，教授，研究方向为中药、民族药成分分析及质量控制。E-mail: 301678@qq.com

两粤黄檀 *Dalbergia benthamii* Prain. 为蝶形花亚科黄檀属植物，藤本，有时为灌木。枝长，干时黑色，具有通经活血的作用，常用于治疗跌打损伤、筋骨疼痛等^[1]。张礼行等^[2]通过GC-MS技术发现其中含有丁香酚甲醚、异丁香酚甲醚、榄香素等10种成分。韦建华等^[3]通过柱色谱、重结晶等方法分离获得14个化合物。霍丽妮等^[4]对比95%乙醇、丙酮、乙酸乙酯提取物发现，乙酸乙酯部位有相对优异的抗氧化能力，并通过与阿卡波糖的对比，发现乙酸乙酯部位对α-葡萄糖苷酶有一定的抑制作用。陈思思等^[5]用二倍稀释法考察发现两粤黄檀粗提物具有一定的抗菌作用，通过二甲苯、鸡蛋清致模型肿胀发现其具有一定的抗炎作用。鉴于两粤黄檀中相关活性成分复杂，单一含有量测定难以达到质量控制的要求。因此，本研究建立了两粤黄檀中6种成分含有量同时测定的方法，以期为其质量控制提供更加全面、科学的依据。

1 材料

TGL-16B 高速台式离心机（上海安亭科学仪器厂）；TM-D 24UV 超纯水仪（德国 Millipore 公司）；SHB-Ⅲ循环水式多用真空泵（郑州长城科工贸有限公司）；KQ5200B 型超声波清洗仪（昆山市超声仪器有限公司）；安捷伦 1260 高效液相色谱仪（VWD 检测器，四元高压梯度泵，美国安捷伦公司）；SQP 电子天平 [德国赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]。

甘草酸对照品（批号 G-003-191220）、甘草次酸对照品（批号 G202002）购自合肥博美生物科技有限公司；土甘草 A 对照品、4'-羟基-6-羟甲基-5,7-二甲氧基异黄酮对照品、大鱼藤树素甲醚对照品^[3,6]、大鱼藤树酸甲酯对照品^[3,7]（自制，归一化法含有量在98%以上）。氯仿（分析纯，西陇化工股份有限公司）；水为超纯水；乙腈（德国默克公司）、甲醇（Fisher）、磷酸（西陇化工股份有限公司）均为色谱纯。两粤黄檀，信息见表1，经广西中医药大学壮医药学院韦松基教授鉴定为豆科植物黄檀属两粤黄檀 *Dalbergia benthamii* Prain. 植物的茎。打粉过40目筛。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters-symmetry C₁₈ 色谱柱（4.6 mm×250 mm, 5 μm）；流动相乙腈（A）-甲醇（B）-0.2% 磷酸（C），梯度洗脱，程序见表2；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 °C；检测波长 256 nm；进样量 10 μL。色谱图见图1。

表 1 样品信息

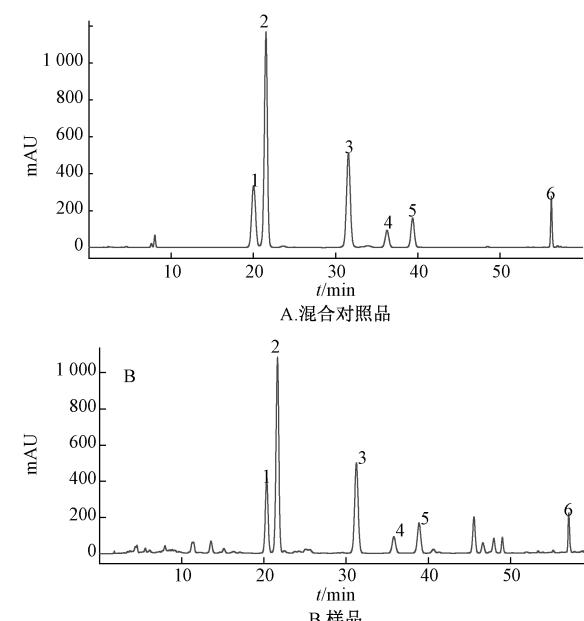
Tab. 1 Information of samples

编号	来源
S1	广西桂林
S2	广西阳朔
S3	广西靖西
S4	广西南宁
S5	广东肇庆
S6	广东湛江
S7	海南东方
S8	广西桂平
S9	广西贵港
S10	广西百色
S11	广西防城港
S12	越南高平

表 2 梯度洗脱程序

Tab. 2 Gradient elution programs

时间/min	A 乙腈/%	B 甲醇/%	C 0.2% 磷酸/%
0	4	60	36
32	6	63	31
40	8	65	27
50	9	75	16
60	9	85	6



1. 甘草酸 2. 土甘草 A 3. 4'-羟基-6-羟甲基-5,7-二甲氧基异黄酮 4. 大鱼藤树素甲醚 5. 大鱼藤树酸甲酯 6. 甘草次酸
1. glycyrrhizic acid 2. 3-phenylcoumarin robustic acid 3. 4'-hydroxy-6-hydroxymethyl-5,7-dimethoxy isoflavone 4. robustin methyl ether 5. methyl robustate 6. glycyrrhetic acid

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品溶液 精密称取各对照品适量，加甲醇定容。配制各对照品质量浓度分别为甘草酸 1.25 mg/mL、土甘草 A 0.573 mg/mL、4'-羟基-6-

羟甲基-5,7-二甲氧基异黄酮 0.276 mg/mL、大鱼藤树素甲醚 0.124 mg/mL、大鱼藤树酸甲酯 0.120 mg/mL、甘草次酸 0.180 mg/mL。

2.2.2 供试品溶液 精密称取药材粉末 1.0 g, 精密加 20 mL 氯仿, 超声 (200 W, 40 kHz) 60 min, 冷却后用氯仿补足减失质量, 滤过, 精密量取

2 mL 滤液挥干后用甲醇定容至 2 mL, 微孔滤膜

过滤。

2.3 线性关系考察 配制不同质量浓度的对照品溶液, 在“2.1”项条件下连续进样, 以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归。结果见表 3。表明各成分在各自范围内线性关系良好^[8]。

表 3 各成分线性关系

Tab. 3 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	范围/(mg·mL ⁻¹)	r
甘草酸	$Y = 7574.86X + 109$	0.07~2.50	0.999 2
土甘草 A	$Y = 43943X + 749$	0.03~1.15	0.999 2
4'-羟基-6-羟甲基-5,7-二甲氧基异黄酮	$Y = 49638X + 258$	0.02~0.55	0.999 3
大鱼藤树素甲醚	$Y = 19126X + 23.2$	0.01~0.26	0.999 8
大鱼藤树酸甲酯	$Y = 31226X + 59.5$	0.01~0.25	0.999 6
甘草次酸	$Y = 15369X + 81.4$	0.01~0.36	0.999 0

2.4 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液, 在“2.1”项条件下连续进样 6 次, 甘草酸、土甘草 A、4'-羟基-6-羟甲基-5,7-二甲氧基异黄酮、大鱼藤树素甲醚、大鱼藤树酸甲酯、甘草次酸峰面积 RSD 分别为 0.54%、0.34%、0.45%、1.3%、0.45%、0.53%。表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 取同一份供试品溶液 (批号 S7), 在“2.1”项条件下, 分别于 2、4、6、8、10、12 h 进样, 甘草酸、土甘草 A、4'-羟基-6-羟甲基-5,7-二甲氧基异黄酮、大鱼藤树素甲醚、大鱼藤树酸甲酯、甘草次酸 RSD 分别为 0.82%、0.51%、0.68%、0.60%、0.52%、1.4%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.6 重复性试验 取 6 份两粤黄檀药材 (批号 S7) 平行 3 次, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项条件下进样, 甘草酸、土甘草 A、4'-羟基-6-羟甲基-5,7-二甲氧基异黄酮、大鱼藤树素甲醚、大鱼藤树酸甲酯、甘草次酸含有量 RSD 分别为 0.78%、0.81%、0.85%、1.7%、0.84%、0.80%, 表明该方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验 精密称取 9 份 (批号 S7, 每份约 0.50 g), 分别按照药材含有量的 50%、100%、150% 加入混合对照品溶液 (质量浓度分别为 0.591 6、0.263 4、0.130 8、0.058 6、0.056 8、0.085 3 mg/mL) 5.00、10.00、15.00 mL^[6]。精密加入甲醇至 20 mL, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项条件下进样。结果见表 4。

2.8 样品含有量测定 取不同产地的两粤黄檀药

材样品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项条件下进样, 计算各产地 6 种成分的含有量, 结果见表 5。

3 讨论

3.1 指标成分选择 前期本实验对两粤黄檀氯仿部位进行液相分离制备获得 7 种成分, 对 4 种未知成分分别鉴定为甘草酸、大鱼藤树素甲醚、大鱼藤树酸甲酯、甘草次酸。3 种已知成分为土甘草 A、4'-羟基-6-羟甲基-5,7-二甲氧基异黄酮、异甘草素^[3], 其中异甘草素于 6 min 出峰不能与其他杂质峰完全分离且含有量较少, 无法达到分析要求。而甘草酸、土甘草 A、4'-羟基-6-羟甲基-5,7-二甲氧基异黄酮、大鱼藤树素甲醚、大鱼藤树酸甲酯、甘草次酸, 各成分在各产地含有量均符合分析要求, 故将该种成分作为分析指标。

3.2 供试品制备方法

3.2.1 提取溶剂 分别采用水、甲醇、丙酮、乙醇、乙酸乙酯、正丁醇、氯仿, 7 种溶剂进行考察。分别计算 6 种成分的含有量。其中, 氯仿提取效果较好。

3.2.2 提取条件 分别采用超声、回流、冷浸 3 种方法, 相同体积氯仿提取进行考察。计算 6 种成分的含有量。其中超声提取和回流提取效果较好, 但超声提取效果略好于回流提取。

3.2.3 提取时间 分别用氯仿进行 30、60、90、120 min 超声提取, 计算 6 种成分的含有量。其中超声 60 min 和 120 min 提取效果较好且接近, 综合其他因素考虑选用 60 min 提取较为合理。

表4 各成分加样回收率试验结果 (n=9)

Tab. 4 Results of recovery tests for various constituents (n=9)

成分	测得量/mg	原有量/mg	加入量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
甘草酸	9.421	6.553	2.958	96.96	100.7	2.1
	9.409	6.491	2.958	98.67		
	9.426	6.496	2.958	99.05		
	12.54	6.493	5.916	102.22		
	12.41	6.499	5.916	99.91		
	12.53	6.460	5.916	102.53		
	15.53	6.349	8.874	103.66		
	15.41	6.400	8.874	101.69		
	15.52	6.493	8.874	101.87		
土甘草 A	4.249	2.927	1.317	100.38	101.5	2.1
	4.185	2.899	1.317	97.66		
	4.210	2.901	1.317	99.39		
	5.578	2.900	2.634	101.67		
	5.609	2.903	2.634	102.75		
	5.555	2.885	2.634	101.38		
	6.969	2.836	3.951	104.62		
	6.933	2.859	3.951	103.12		
	6.956	2.900	3.951	102.65		
4'-羟基-6-羟甲基-5,7-二甲氧基异黄酮	2.136	1.472	0.654	101.56	101.0	1.8
	2.122	1.458	0.654	101.42		
	2.135	1.459	0.654	103.25		
	2.763	1.459	1.308	99.69		
	2.776	1.460	1.308	100.60		
	2.765	1.451	1.308	100.46		
	3.454	1.426	1.962	103.34		
	3.433	1.438	1.962	101.69		
	3.368	1.459	1.962	97.29		
大鱼藤树素甲醚	0.949 1	0.659 0	0.293 2	99.02	97.4	2.0
	0.927 5	0.653 0	0.293 2	93.77		
	0.942 8	0.653 0	0.293 2	98.79		
	1.238	0.653 0	0.586 3	99.87		
	1.233	0.653 0	0.586 3	98.90		
	1.220	0.649 0	0.586 3	97.34		
	1.491	0.638 0	0.879 6	96.94		
	1.486	0.644 0	0.879 6	95.82		
	1.496	0.653 0	0.879 6	95.81		
大鱼藤树酸甲酯	0.913 3	0.633 5	0.283 9	98.55	96.4	1.5
	0.901 1	0.627 5	0.283 9	96.36		
	0.901 5	0.628 0	0.283 9	96.32		
	1.177	0.627 8	0.567 8	96.72		
	1.172	0.628 3	0.567 8	95.78		
	1.185	0.624 5	0.567 8	98.75		
	1.421	0.613 8	0.851 7	94.77		
	1.435	0.618 8	0.851 7	95.88		
	1.434	0.627 8	0.851 7	94.61		
甘草次酸	1.610	1.168	0.426 6	103.49	100.5	2.1
	1.595	1.157	0.426 6	102.59		
	1.596	1.158	0.426 6	102.68		
	2.017	1.158	0.853 2	100.69		
	2.007	1.158	0.853 2	99.41		
	2.011	1.152	0.853 2	100.78		
	2.401	1.132	1.280	99.15		
	2.403	1.141	1.280	98.63		
	2.403	1.158	1.280	97.27		

表5 各成分含有量测定结果 (mg/g, n=3)

Tab. 5 Results of content determination of various constituents (mg/g, n=3)

批号	甘草酸	土甘草 A	4'-羟基-6-羟甲基-5,7-二甲氧基异黄酮	大鱼藤树素甲醚	大鱼藤树酸甲酯	甘草次酸
S1	12.65	5.489	2.745	1.410	1.346	2.151
S2	12.97	5.635	2.764	1.441	1.381	2.169
S3	28.15	12.82	0.344 3	3.225	3.219	2.401
S4	29.08	14.38	0.371 3	3.661	3.634	2.448
S5	21.45	9.316	4.588	2.202	2.073	3.784
S6	20.54	8.915	4.569	2.115	1.999	3.684
S7	26.43	11.51	5.937	2.686	2.572	4.611
S8	27.57	13.17	1.177	3.635	3.942	4.362
S9	13.82	9.209	2.032	1.775	2.363	0.948 1
S10	10.24	4.549	0.468 9	1.266	1.246	1.387
S11	12.49	8.493	1.828	1.602	2.193	0.874 2
S12	33.65	14.73	1.450	4.718	4.856	5.717

3.2.4 料液比 分别考察了 1 : 10、1 : 20、1 : 30、1 : 40、1 : 50 不同料液比。计算 6 种成分的含有量。其中 1 : 20 的含有量均明显高于其他比例。

3.3 测定条件选择

3.3.1 色谱柱 本实验分别采用依利特、Waters、热电、Inerstil 等不同厂家色谱柱，其中 Waters 分离效果最好，重复性好，故采用该色谱柱。

3.3.2 流动相 由于各成分极性差异较大，等度洗脱难以达到分离要求，所以采用梯度洗脱，其中甲醇和 0.2% 磷酸梯度洗脱虽然达到分析要求，但保留时间过长，所以采用乙腈、甲醇、0.2% 磷酸 3 相梯度洗脱。

3.3.3 测定波长 将供试品溶液进行全波长扫描，根据 6 种成分各最大吸收波长（甘草酸 251 nm；土甘草 A 260 nm；4'-羟基-6-羟甲基-5,7-二甲氧基异黄酮 256 nm；大鱼藤树素甲醚 270 nm；大鱼藤树酸甲酯 270 nm；甘草次酸 264 nm）及各产地 6 种成分含有量差异、各峰峰形等，确定检测波长为 256 nm^[9]。

4 结论

中药成分复杂多样，研究单一成分难以对其定性定量分析，不能全面的对中药材进行系统的质量控制，所以本实验采用多成分定量分析^[10]。其中采用 HPLC 定量测定干扰较少、灵敏度高、结果准确、重复性好。本实验首次对两粤黄檀药材当中的 6 种成分进行同时测定。结果表明，各产地成分差异较为明显，其中 4'-羟基-6-羟甲基-5,7-二甲氧基异黄酮含有量差异非常明显；药材中所含的新黄酮类化合物为大鱼藤树素甲醚、大鱼藤树酸甲酯等，目前研究发现具有新黄酮类母核的化合物具有

较强的药理活性^[11-12]。后续将结合药效学进行研究，以期为两粤黄檀质量控制方法的建立，提供一定的科学依据。

参考文献:

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志(第 40 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1994; 109.
- [2] 张礼行, 周丹水, 郭聪颖, 等. 基于 GC-MS 技术对降香黄檀与其他黄檀属植物挥发油成分的鉴别分析[J]. 广东药科大学学报, 2018, 34(5): 579-585.
- [3] 韦建华, 谭红声, 卢澄生, 等. 壮药两粤黄檀化学成分研究(I)[J]. 中草药, 2017, 48(11): 2159-2163.
- [4] 霍丽妮, 刘华钢, 廖艳芳, 等. 两粤黄檀体外抗氧化及 α-葡萄糖苷酶抑制活性研究[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(5): 242-244.
- [5] 陈思恩, 石心红. 2 种黄檀属植物粗提物的抑菌抗炎作用分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(12): 157-162.
- [6] East A J, Ollis W D, Wheeler R E. Natural occurrence of 3-aryl-4-hydroxycoumarins Part 1. phytochemical examination of *Derris robusta* (Roxb.) Benth [J]. J Chem Soc, 1969 (8): 365-374.
- [7] Magalhães A F, Tozzi A M G A, Magalhães E G, et al. New spectral data of some flavonoids from *Deguelia hatschbachii* A. M. G. Azevedo [J]. J Braz Chem Soc, 2003, 14(1): 133-137.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015; 375-376.
- [9] 吴琳琳, 姚文丽, 罗奕, 等. 10 个采收期青钱柳 HPLC 指纹图谱建立及 4 种成分测定[J]. 中成药, 2017, 39(2): 347-352.
- [10] 吴佳丽, 王永丽, 刘伟, 等. HPLC 法同时测定艾叶中 7 种成分[J]. 中成药, 2017, 39(9): 1876-1879.
- [11] 李娜, 王晓静, 孙捷, 等. 新黄酮类化合物的脱甲基反应及其抗氧化活性[J]. 化学研究, 2017, 28(1): 51-55.
- [12] 孟晓伟, 王定清, 陈兰英, 等. 阔叶黄檀心材新黄酮类化学成分研究 [J/OL]. 中国中药杂志, 2019, 44(6): 1186-1192.