

# HPLC法测定陕西产黄花油点草中烟花苷的含量<sup>Δ</sup>

孙 静<sup>1\*</sup>, 何晓娟<sup>2</sup>, 刘洁琼<sup>1</sup>(1. 陕西中医学院药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 天津红日药业股份有限公司, 天津 301700)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)09-1246-02  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.09.33

**摘 要** 目的: 建立陕西产黄花油点草中烟花苷含量测定的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Thermo Hypersil GOLD, 流动相为乙腈-0.4%磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1 ml/min, 柱温为 20 ℃, 检测波长为 360 nm。结果: 烟花苷的进样量在 5.9~35.3 μg 范围内与其峰面积呈良好线性关系( $r=0.9995$ ); 精密性、重复性、稳定性试验的 RSD < 2%; 平均加样回收率为 98.9%, RSD 为 1.6% ( $n=6$ )。结论: 该方法稳定、可行, 可用于陕西产黄花油点草水提取物及总黄酮部位中烟花苷的含量测定。  
**关键词** 黄花油点草; 黄酮部位; 烟花苷; 高效液相色谱法; 含量测定

## Content Determination of Nicotiflorin in *Tricyrtis maculata* from Shaanxi by HPLC

SUN Jing<sup>1</sup>, HE Xiao-juan<sup>2</sup>, LIU Jie-qiong<sup>1</sup>(1. College of Pharmacy, Shaanxi University of TCM, Shaanxi Xianyang 712046, China; 2. Tianjin Hongri Pharmaceutical Co, Ltd., Tianjin 301700, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of nicotiflorin in *Tricyrtis maculata* from Shaanxi. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Thermo Hypersil GOLD column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.4% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> water solution (gradient elution) at the flow rate of 1 ml/min. The column temperature was set at 20 ℃, and the detection wavelength was 360 nm. RESULTS: The linear range of nicotiflorin was 5.9-35.3 μg ( $r=0.9995$ ) with an average recovery of 98.9% (RSD=1.6%,  $n=6$ ). RSDs of precision, reproducibility and stability tests were less than 2%. CONCLUSIONS: The method is feasible and stable. It can be used for the content determination of nicotiflorin water extract and flavonoids site in *T. maculata* from Shaanxi.

**KEYWORDS** *Tricyrtis maculata*; Flavonoid fraction; Nicotiflorin; HPLC; Content determination

黄花油点草来源于百合科 *Liliaceae* 植物黄花油点草 *Tricyrtis maculata* 的干燥全草, 具有安神除烦、活血消肿之功效, 是陕西省民间用于跌打损伤的重要习用品种之一。该药材在陕西蕴藏量较高、用药历史悠久、疗效突出, 但目前尚缺乏相应的质量评价依据。本课题组在前期基础研究过程中, 通过提取分离纯化研究得到了该药材的总黄酮部位, 并发现该部位具有较强的活血作用, 且烟花苷为其主要活性成分之一。本试验拟通过对黄花油点草的水提取物和总黄酮部位中烟花苷的含量进行测定, 以期为该药材质量标准的建立提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

L-2400 型高效液相色谱 (HPLC) 仪 (日本日立公司); AR-1140 型电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司, 精度: 0.1 mg)。

### 1.2 试剂

黄花油点草总黄酮部位<sup>[1-2]</sup> (实验室自制); 烟花苷对照品 (BioBioPha Co., Ltd., 批号: BBP00732, 纯度: 98.8%); 乙腈、甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Thermo Hypersil GOLD (250 mm×4.6 mm, 5 μm);

<sup>Δ</sup> 基金项目: 陕西省 2013 年科学技术研究发展计划 (No. 2013KJXX-71); 陕西省教育厅 2013 年科学研究项目计划项目 (No. 2013JK0833)

\* 副教授。研究方向: 中药制剂过程的关键技术及适宜性。电话: 029-38184958。E-mail: ph.175@163.com

流动相: 乙腈 (A)-0.4% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0~30 min, 15%→25% A; 30~80 min, 25%→55% A); 流速: 1 ml/min; 柱温: 20 ℃; 检测波长: 360 nm。色谱见图 1。

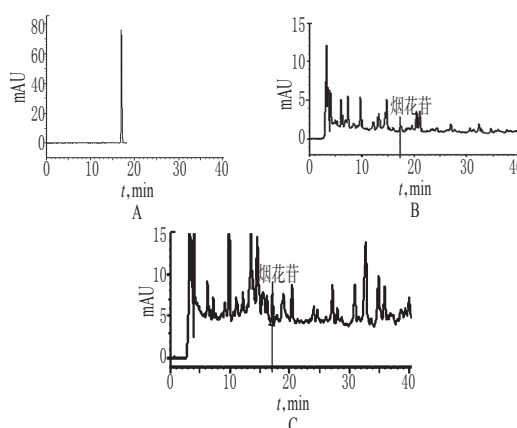


图 1 高效液相色谱图

A. 烟花苷对照品; B. 黄花油点草药材; C. 总黄酮提取物

Fig 1 HPLC chromatograms

A. nicotiflorin control; B. *T. maculata*; C. total flavonoid extract

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取烟花苷对照品 1.96 mg, 置于 10 ml 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 得质量浓度为 0.196 mg/ml 的对照品贮备液。精密移取 0.1 ml 对照品贮备液, 置于 10 ml 量瓶中, 加甲醇定容, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得质量浓度为 1.960 μg/ml 的对照品溶液。

2.2.2 总黄酮供试品溶液 精密称取黄花油点草总黄酮<sup>①</sup>部位1 g,用甲醇定容至10 ml量瓶中,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 药材供试品溶液 精密称取同一批黄花油点草药材5.200 3 g,按照提取工艺<sup>②</sup>提取;提取液浓缩干燥后,加甲醇溶液,滤过,并定容至50 ml量瓶中,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

### 2.3 线性关系考察

分别精密吸取对照品溶液3、6、9、12、15、18 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以对照品的进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=4.7 \times 10^3 x + 9197.3$  ( $r=0.9995$ )。结果表明,烟花苷的进样量在5.9~35.3 μg范围内与峰面积呈良好线性关系。

### 2.4 精密度试验

精密吸取质量浓度为1.9 μg/ml的烟花苷对照品溶液10 μl,按“2.1”项下色谱条件连续进样5次,记录峰面积。结果, RSD=0.49% ( $n=5$ ),表明仪器精密度良好。

### 2.5 稳定性试验

取总黄酮部位及药材供试品溶液各适量,在室温下放置0、2、4、6、9、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,药材和有效部位中烟花苷峰面积的RSD分别为1.79%、1.98% ( $n=5$ ),表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

### 2.6 重复性试验

分别取总黄酮部位及黄花油点草药材各适量,按“2.2.2”及“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,各6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量。结果,药材中烟花苷的质量分数分别为0.727%、0.733%、0.728%、0.739%、0.715%、0.720%,总黄酮部位中烟花苷的质量分数分别为1.042%、1.036%、1.048%、1.015%、1.057%、1.023%,其RSD分别为1.19%、1.51% ( $n=5$ ),表明该方法重复性良好。

### 2.7 加样回收率试验

精密称取同一批药材约5 g,共6份,分别精密加入质量浓度为15 μg/ml的烟花苷对照品溶液1 ml,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果 ( $n=6$ )

Tab 1 Results of recovery tests ( $n=6$ )

称样量, g	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
10.4	14.953	15	29.983	100.2		
10.0	14.378	15	28.898	96.8		
10.3	14.517	15	29.352	98.9	98.9	1.6
10.4	14.953	15	30.103	101.0		
10.2	14.660	15	29.270	97.4		
10.2	14.660	15	29.540	99.2		

### 2.8 样品含量测定

精密称取总黄酮部位和药材各适量,按“2.2.2”及“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量,结果见表2。

## 3 讨论

### 3.1 检测波长的选择

取对照品溶液适量,在200~400 nm范围进行三维扫描,

结果对照品溶液在360 nm下有最大吸收,且基线平稳,故最终选择360 nm波长作为检测波长。

表2 样品含量测定结果 ( $n=3$ )

Tab 2 Results of content determination of samples ( $n=3$ )

样品	样品含量, μg	质量分数, %	平均质量分数, %
药材1	14.953	0.747	
药材2	14.853	0.743	0.751
药材3	15.243	0.762	
有效部位1	21.507	1.075	
有效部位2	23.376	1.169	1.140
有效部位3	23.493	1.175	

### 3.2 液相仪器与色谱柱的选择

选用Thermo Hypersil GOLD色谱柱分别在Waters2695-2966型和日立L-2400型HPLC仪上以甲醇-0.4%磷酸水(30:70, V/V)为流动相,对药材供试品溶液进样测定。根据出峰数与峰分离度情况选用仪器<sup>[3-5]</sup>,并对该仪器下的Thermo Hypersil GOLD、Thermo Hypersil GOLD aQ、Thermo BDS HYPERSIL C<sub>18</sub>等3种型号的色谱柱在同一条件下进行筛选。结果显示,日立双泵及Thermo Hypersil GOLD分离效果优于其他仪器及色谱柱,故选用此液相仪器及色谱柱进行烟花苷含量测定的研究。

### 3.3 流动相的选择

分别以甲醇-磷酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液系统在等度条件下测定烟花苷,根据出峰数目与峰分离度情况,初步确定选择乙腈-磷酸水溶液系统为流动相系统<sup>[6-9]</sup>;并在此基础上对该系统的梯度洗脱条件进行了进一步研究,根据出峰个数、峰形及峰分离度进行判断,最终确定了“2.1”项下的流动相系统,其色谱峰分离效果最好、出峰信息较多。

综上所述,本方法稳定、可行,可用于陕西产黄花油点草水提取物、总黄酮部位中烟花苷的含量测定。

## 参考文献

- [1] 孙静,刘洁琼,黎伟华,等.陕产黄花油点草总黄酮部位纯化工艺研究[J].中草药,2013,44(10):1275.
- [2] 孙静,刘洁琼,夏新华,等.陕西产黄花油点草总黄酮部位提取工艺研究[J].中药材,2012,35(4):641.
- [3] 乔善磊,朱臻宇,王建军,等.中药指纹图谱相似度计算的规范化研究[J].第二军医大学学报,2004,25(10):1114.
- [4] 陶金华,狄留庆,文红梅,等.中药指纹图谱谱效相关性研究思路探讨[J].中国中药杂志,2009,34(17):31.
- [5] 顾英,冯怡,徐德生.芍药甘草效应成分血清指纹图谱与药效的相关性研究[J].中成药,2008,30(1):6.
- [6] 李利锋,孙国祥.银杏叶片HPLC定量指纹图谱和4个成分含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(12):52.
- [7] 梁丽娟,赵奎君,屠鹏飞,等.HPLC法同时测定黄芪中4种黄酮类成分的含量[J].中国药房,2010,21(15):1385.
- [8] 杨东风,梁宗锁.中药指纹图谱研究进展[J].中国药房,2007,18(6):467.
- [9] 袁琦,徐玫,赵辉,等.HPLC法快速定量测定硫酸长春新碱[J].中成药,2013,35(6):1345.

(收稿日期:2014-05-19 修回日期:2014-11-17)

(编辑:孙冰)