

HPLC 法测定半边旗中 7 个成分的含量

周星宏, 杨 宝, 朱锦萍, 李 慧, 赵钟祥(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 建立同时测定半边旗药材中 7 个组分芹菜素-7-O-β-D-龙胆二糖苷、木犀草苷、paniculose III、芹菜素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、ent-11α-hydroxy-15-oxokaur-16-en-19-oic acid、(16R)-ent-11α-hydroxy-15-oxokaurane-19-oic acid、芹菜素含量的 HPLC 方法。**方法** 采用 Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 乙腈-0.02% 三氟乙酸水梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 35 °C, 检测波长为 210 nm。**结果** 7 个化合物分离度良好, 呈现良好的线性关系($r > 0.9995$), 平均加样回收率在 99.58%~100.84%, RSD < 1.60%。**结论** 该方法简单准确, 稳定性和重复性良好, 可以为半边旗药材的质量控制提供科学参考。

关键词: 半边旗; 含量测定; 高效液相色谱法; 二萜类; 黄酮类

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783-(2018)01-0000-0

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2018.01

Simultaneous Determination of Seven Constituents in *Pteris semipinnata* by HPLC

ZHOU Xinghong, YANG Bao, ZHU Jinping, LI Hui, ZHAO Zhongxiang (Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, 510006 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for simultaneous determination of apigenin-7-O-β-D-gentobioside, luteolin, paniculose III, apigenin-7-O-β-D-glucopyranoside, ent-11α-hydroxy-15-oxokaur-16-en-19-oic acid, (16R)-ent-11α-hydroxy-15-oxokaurane-19-oic acid, and apigenin in *Pteris semipinnata* L.. **Methods** HPLC analysis was performed on a shimadzu LC-20AT apparatus with a Kromasil 100-5 C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) and gradient eluting with acetonitrile-0.02% trifluoroacetic acid water at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was set at 35 °C and detect wavelength at 210 nm. **Results** Seven compounds showed good separation and linearity ($r > 0.9995$). The average sample recovery rates were 99.58%–100.84%, RSD < 1.60%. **Conclusion** The method is rapid, accurate, with high stability and repeatability, which could provide reference for the quality control of *P. semipinnata*.

Keywords: *Pteris semipinnata*; Content determination; HPLC; Diterpenoids; Flavonoids

半边旗 *Pteris semipinnata* L.系凤尾蕨属植物, 以带根茎的全草入药, 广泛分布于我国南方各省^[1]。味苦、辛, 性凉, 具有清热解毒、凉血止血、止痛的功效, 主治跌打损伤、目赤肿痛、痢疾等^[2]。现代天然药物化学和药理学研究表明其主要含有倍半萜、二萜、黄酮等成分, 具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎等生物活性^[3-5], 其中, 二萜类成分为其抗肿瘤的主要活性成分^[6-7], 黄酮类成分为抗氧化的主要活性成

分^[8-9]。鉴于半边旗丰富的化学成分和较好的药理活性, 对其进行质量控制具有重要的意义。现有文献关于其质量控制的报道, 仅同时测定了其中的 1~2 个成分的含量, 尚不能较为全面的评价药材质量^[10-11]。因此, 开展半边旗药材的多成分含量测定研究对建立其质量控制标准、指导合理用药具有重要意义。本实验在前期化学成分研究的基础上结合活性筛选结果, 选取主要的二萜及黄酮类成分, 建立

收稿日期: 2017-08-03

作者简介: 周星宏, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药化学及中药分析。Email: zzx37@163.com。通信作者: 赵钟祥, 男, 教授。研究方向: 中药药效物质基础。Email: zzx37@163.com。

基金项目: 广东省优秀青年教师培养计划(Yq2013045)。

foxmail.com
ZXH9292@foxmail.com
周星宏 杨宝 朱锦萍 李慧 赵钟祥

了同时测定 7 个成分含量的 HPLC 方法，以期为半边旗药材的质量控制提供科学参考。

1 材料

1.1 仪器与试剂 岛津 LC-20AT 液相色谱仪，岛津 SPD-M20A 检测器，SIL-20A 自动进样器，日本岛津公司；PS-40 超声波清洗机，深圳华泰超声设备有限公司。乙腈，甲醇，均为色谱纯，德国默克公司；三氟乙酸，赛默飞世尔科技(中国)有限公司；水为市售怡宝水。

1.2 药品 采集于广东不同产地的 11 批药材均由广州中医药大学中药学院赵钟祥教授鉴定为凤尾蕨属植物半边旗 *Pteris semipinnata* 带根茎的全草，标本存放于广州中医药大学中药化学实验室。对照品芹菜素-7-O-β-D-龙胆二糖苷 (1)、木犀草苷 (2)、paniculose III (3)、芹菜素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 (4)、ent-11α-hydroxy-15-oxokaur-16-en-19-oic acid (5)、(16R)-ent-11α-hydroxy-15-oxo-kaurane-19-oic acid (6)、芹菜素 (7) 均由本实验室自制，经 HPLC 分析纯度均在 98.0 % 以上。药材产地信息见表 1。

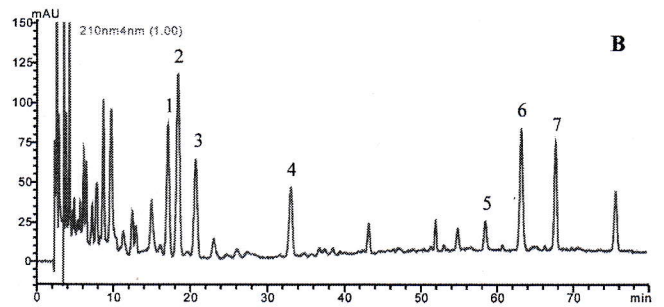
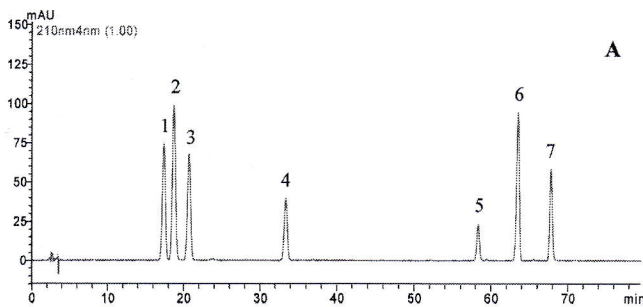
表 1 药材产地信息

Table 1 Information of origin of medicinal materials

药材批次	药材来源	采集时间
1	广东信宜	2015.01
2	华南植物园	2015.03
3	广东电白	2015.02
4	广州番禺区	2014.12
5	广东梅州	2015.02
6	广东河源	2015.02
7	广东揭阳	2015.03 2015.02
8	广东惠州	2015.03 2015.02
9	广东中山	2015.03 2015.02
10	广东从化	2015.03 2015.02
11	广东龙川	2012.08

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈(A)-0.02 %三氟乙酸水(B)；梯度洗脱程序 (0~21 min, 16 % A; 21~80 min, 16 %~34 % A)；流速：1 mL·min⁻¹；柱温：35 °C；检测波长：210 nm。按上述色谱条件得到的混合对照品及供试品的色谱图，见图 1。



1. 芹菜素-7-O-β-D-龙胆二糖苷；2. 木犀草苷；3. paniculose III；4. 芹菜素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷；5. ent-11α-hydroxy-15-oxokaur-16-en-19-oic acid；6. (16R)-ent-11α-hydroxy-15-oxo-kaurane-19-oic acid；7. 芹菜素

图 1 混合对照品(A)和供试品(B)的 HPLC 色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms for mixed reference substances(A) and P. semipinnata(B)

2.2 混合对照品溶液制备 精密称量 7 个对照品适量，加入甲醇摇匀，制成化合物 1~7 的质量浓度分别为 28.15, 31.80, 259.20, 12.60, 70.86, 526.50, 10.01 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 取半边旗药材粉末 1.0 g，精密称定后置于 50 mL 具塞锥形瓶中，加入 40 mL 甲醇，密封并称定质量，超声处理 40 min，取出放冷至室温后再次称定质量，用甲醇补足差量并摇匀。提取液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液即得供试品溶液。

2.4 线性关系考察 取上述混合对照品溶液按 2.1 项

下的色谱条件进样分析，进样体积分别为 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 μL，每个体积重复进样 3 次，记录峰面积。以峰面积为纵坐标(Y)对进样体积中所含相应化合物的质量为横坐标(X, μg)进行线性回归，得回归方程和相关系数(r)，见表 2。结果表明 7 个对照品在各自的线性范围内线性关系良好。

2.5 精密度的试验 取上述混合对照品溶液按 2.1 项下的色谱条件进样分析，重复进样 6 次考察日内精密度的，连续进样 3 天考察日间精密度的，记录各峰面积并计算 RSD。化合物 1~7 的日内精密度的 RSD 分别为 0.10 %、0.23 %、0.27 %、0.43 %、0.40 %、

表 2 回归方程、线性范围及相关系数

Table 2 Regression equations, Linear ranges and correlation coefficient for the seven component

化合物	回归方程	线性范围/ μg	r
1	$Y=3.765 1 \times 10^6 X+7.202 5 \times 10^3$	0.28~4.20	0.999 9
2	$Y=4.512 0 \times 10^6 X+8.337 1 \times 10^3$	0.32~4.80	0.999 9
3	$Y=3.768 8 \times 10^5 X+9.045 6 \times 10^3$	2.60~39.00	0.999 7
4	$Y=4.339 3 \times 10^6 X+6.999 0 \times 10^3$	0.12~1.80	0.999 8
5	$Y=3.893 3 \times 10^5 X+4.268 4 \times 10^3$	0.70~10.50	0.999 9
6	$Y=2.283 4 \times 10^5 X+1.100 3 \times 10^4$	5.26~78.90	1.000 0
7	$Y=6.835 1 \times 10^6 X-1.790 4 \times 10^3$	0.10~1.50	1.000 0

0.25 %、0.88 %，日间精密度的 RSD 分别为 0.26 %、0.20 %、0.46 %、0.62 %、0.75 %、0.50 %、0.43 %，结果表明该方法的精密度良好。

2.6 稳定性试验 取半边旗供试品溶液，分别于 0, 4, 8, 12, 24, 48 h 进样分析以考察被测成分的稳定性，进样体积为 20 μL ，每个时间点重复进样 3 次，记录各峰面积并计算 RSD。化合物 1~7 的峰面积的 RSD 分别为 1.05 %、0.91 %、1.62 %、1.58 %、1.83 %、0.87 %、0.72 %，结果表明 7 个被测成分在 48 h 内的稳定性良好。

2.7 重复性试验 取半边旗药材(批次 4)按 2.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液，每份供试品溶液重复进样 3 次，记录各峰面积并计算其含量。化合物 1~7 的含量分别为 0.698, 0.769, 1.376, 0.323, 1.040, 11.149, 0.246 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，其峰面积的 RSD 分别为 1.57 %、0.85 %、1.53 %、0.96 %、0.76 %、1.56 %、0.65 %，结果表明该方法的重复性良好。

2.8 加样回收试验 取已知含量的同一批半边旗药材 6 份，每份约 0.5 g，精密称定后置于 50 mL 具塞锥形瓶中，加入化合物 1~7 的对照品溶液适量，按 2.3 项下方法制备供试品溶液，照 2.1 项下的色谱条件进样分析，进样体积为 20 μL ，每份供试品重复进样 3 次，记录各峰面积并计算 RSD。结果见表 3。

2.9 样品含量测定 取 11 批采集于广东不同产地的半边旗药材，按 2.3 项下方法分别平行制备 3 份供试品溶液，照 2.1 项下的色谱条件进样分析，结果见表 4。

3 讨论

本实验对提取条件及色谱条件进行了优化，分别考察了甲醇、乙醇和 70 %乙醇为提取溶剂时 7 个化合物的提取率，结果表明甲醇的提取率最高且被测成分色谱峰周围的干扰最少。比较了甲醇-水、

表 3 半边旗中 7 个化学成分的加样回收结果($n=6$)

Table 3 Results of sample recovery of seven compounds in Pteris semipinnata

化合物	取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.500 8	0.282	0.280	0.558	98.57	99.64	1.18
	0.501 6	0.283	0.280	0.561	99.29		
	0.499 1	0.281	0.280	0.559	99.29		
	0.499 5	0.282	0.280	0.568	102.14		
	0.501 3	0.283	0.280	0.560	98.93		
	0.501 0	0.283	0.280	0.562	99.64		
	0.501 0	0.283	0.280	0.562	99.64		
2	0.500 8	0.341	0.320	0.657	98.75	100.84	1.32
	0.501 6	0.341	0.320	0.667	101.88		
	0.499 1	0.339	0.320	0.666	102.19		
	0.499 5	0.340	0.320	0.666	101.88		
	0.501 3	0.341	0.320	0.659	99.38		
	0.501 0	0.341	0.320	0.664	100.94		
	0.501 0	0.341	0.320	0.664	100.94		
3	0.500 8	2.316	2.590	4.871	98.65	100.81	1.03
	0.501 6	2.319	2.590	4.941	101.24		
	0.499 1	2.308	2.590	4.934	101.39		
	0.499 5	2.310	2.590	4.942	101.62		
	0.501 3	2.318	2.590	4.947	101.51		
	0.501 0	2.317	2.590	4.919	100.46		
	0.501 0	2.317	2.590	4.919	100.46		
4	0.500 8	0.134	0.130	0.262	98.46	100.26	1.38
	0.501 6	0.134	0.130	0.266	101.54		
	0.499 1	0.134	0.130	0.266	101.54		
	0.499 5	0.134	0.130	0.266	101.54		
	0.501 3	0.134	0.130	0.262	98.46		
	0.501 0	0.134	0.130	0.264	100.00		
	0.501 0	0.134	0.130	0.264	100.00		
5	0.500 8	0.584	0.710	1.285	98.73	99.58	1.03
	0.501 6	0.585	0.710	1.303	101.13		
	0.499 1	0.582	0.710	1.297	100.70		
	0.499 5	0.583	0.710	1.291	99.72		
	0.501 3	0.585	0.710	1.285	98.59		
	0.501 0	0.584	0.710	1.284	98.59		
	0.501 0	0.584	0.710	1.284	98.59		
6	0.500 8	4.673	5.270	9.880	98.80	99.65	1.03
	0.501 6	4.681	5.270	9.998	100.89		
	0.499 1	4.658	5.270	9.849	98.50		
	0.499 5	4.661	5.270	9.848	98.43		
	0.501 3	4.678	5.270	9.988	100.76		
	0.501 0	4.675	5.270	9.971	100.49		
	0.501 0	4.675	5.270	9.971	100.49		
7	0.500 8	0.100	0.100	0.198	98.00	99.67	1.51
	0.501 6	0.100	0.100	0.201	101.00		
	0.499 1	0.100	0.100	0.201	101.00		
	0.499 5	0.100	0.100	0.199	99.00		
	0.501 3	0.100	0.100	0.201	101.00		
	0.501 0	0.100	0.100	0.198	98.00		
	0.501 0	0.100	0.100	0.198	98.00		

乙腈-水、甲醇-0.02 %三氟乙酸水、乙腈-0.02 %三氟乙酸水分别作为流动相的色谱图，结果表明乙腈-0.02 %三氟乙酸水对 7 个化合物的分离效果最

表 4 半边旗药材中 7 种成分的含量($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $n=3$)Table 4 Contents of seven compounds in *Pteris semipinnata*

药材 批次	化合物含量							4个黄 酮总量	3个二 萜总量
	1	2	3	4	5	6	7		
1	0.775	0.624	3.097	0.085	1.641	7.920	0.131	1.615	12.658
2	0.598	0.394	5.445	0.061	1.218	8.293	0.211	1.264	14.956
3	0.565	0.676	4.742	0.271	1.191	9.490	0.200	1.712	15.423
4	0.698	0.769	1.376	0.323	1.040	11.149	0.246	2.036	13.565
5	0.839	0.794	3.393	0.372	0.356	2.481	0.281	2.286	6.230
6	0.523	0.753	4.041	0.343	1.073	7.341	0.222	1.841	12.455
7	0.413	0.400	6.432	0.109	1.418	3.811	0.081	1.003	11.661
8	0.716	0.302	2.470	0.148	1.189	12.335	0.177	1.343	15.994
9	0.801	0.432	2.197	0.295	0.826	5.019	0.128	1.656	8.042
10	0.400	0.301	1.861	0.104	1.711	5.723	0.089	0.894	9.295
11	0.275	0.179	2.762	0.070	1.718	4.898	0.125	0.649	9.378

好。对上述 7 个被测化合物的混合对照品溶液进行 190~400 nm 范围内的全波长扫描, 考虑到化合物 6 仅在 210 nm 处有较强的末端吸收, 235~400 nm 范围内无紫外吸收, 且其它化合物在 210 nm 处均有较强的紫外吸收, 故选取 210 nm 作为检测波长。

本研究建立了同时测定半边旗药材中 7 个主要化学成分含量的 HPLC 方法, 并对 11 个产地的样品进行了相应成分的含量测定, 结果显示 7 个被测成分在不同产地之间含量差异较大。其中, 4 个黄酮类成分(1, 2, 4, 7)的总含量在 0.65~2.29 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 平均含量为 1.48 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$; 3 个二萜类成分(3, 5, 6)的总含量在 6.23~16.00 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 平均含量为 11.79 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。根据实验结果, 建议将上述 7 个成分纳入半边旗的质量控制标准, 分别以 4 个黄酮类成分和 3 个二萜类成分平均含量的 80% 设限, 即上述 4 个黄

酮类成分的总量不得低于 1.19 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 3 个二萜类成分总量不得低于 9.43 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

参考文献:

- [1] 江苏医学院. 中药大辞典(第 2 版)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 782-783.
- [2] 张超, 吴繁花, 唐改娟, 等. 半边旗的研究进展及其保护利用[J]. 中国农学通报, 2008, 24(12): 485-489.
- [3] 张付玉. 半边旗和千金子化学成分研究[D]. 浙江: 浙江工业大学, 2009.
- [4] 张晓, 崔燎, 田中信寿, 等. 半边旗有效成分及抗肿瘤活性研究[J]. 中国药理学杂志, 1997, 32(1): 37-38.
- [5] WANG F, LI Y J, REN F C, et al. Pterisolic acids A-F, new ent-kaurane diterpenoids from the fern *Pteris semipinnata*[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2011, 59(4): 484-487.
- [6] LI J H, HE C W, LIANG N C, et al. Effects of antitumor compounds isolated from *Pteris semipinnata* L on DNA topoisomerases and cell cycle of HL-60 cells[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 1999, 20(6): 541-545.
- [7] SHI X B, LI Y J, JIANG J H, et al. Chemical constituents of *Pteris fauriei*[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2014, 50(6): 1108-1109.
- [8] 赵莉, 杨文钰. 蕨类植物的活性成分研究进展[J]. 中药材, 2004, 27(6): 452-456.
- [9] 吕应年, 蒋桂香, 吴科锋, 等. 半边旗中黄酮成分的分离鉴定与抗氧化活性研究[J]. 化学世界, 2007, 48(4): 205-208.
- [10] 龚先玲, 陈志红, 梁念慈. 不同产地半边旗中 11 β -羟基-15-氧-对映贝壳杉-16-烯-19-酸 19- β -D-葡萄糖的含量测定[J]. 中医学报, 2009, 24(3): 24-26.
- [11] 吕应年, 吴科锋, 梁念慈. 高效液相色谱法测定半边旗中芹菜素含量[J]. 中国药业, 2007, 16(5): 16-17.

(编辑:)