

- 究进展[J]. 福建中医药, 2018, 49(1): 83-85, 88.
- [10] 张波, 李亚平. 药墨性用小考[J]. 浙江中医杂志, 2004, 39(6): 261.
- [11] 吴志瑰, 付小梅, 吴蜀瑶, 等. 墨的药用考证[J]. 江西中医药大学学报, 2017, 29(3): 1-3, 8.
- [12] 侯晓艺, 高昂, 巩江, 等. 墨的药学研究概况[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(5): 79-81.
- [13] 尚海霞, 杨弘, 靳祎祎, 等. 八宝丹抑制胃癌细胞增殖与诱导细胞凋亡的实验研究[J]. 福建中医药, 2018, 49(1): 29-31.
- [14] 吴爽, 吕怀友, 王文谦, 等. 安宫牛黄丸对脑出血后神经功能与肠粘膜屏障的影响[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(1): 6-10.

HPLC法同时测定乳白香青中3种黄酮醇苷

桂兰^{1,2}, 于瑞涛¹, 吴楠^{1,2}, 王卫东^{1,2}, 梅丽娟^{*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 中国科学院藏药研究重点实验室, 青海省藏药研究重点实验室, 青海西宁810008; 2. 中国科学院大学, 北京100049)

摘要: 目的 建立HPLC法同时测定乳白香青 *Anaphalis lactea* Maxim. 中3种黄酮醇苷的含有量。方法 乳白香青甲醇-25%盐酸(4:1)提取液的分析采用Unitary C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.4%磷酸水(45:55), 等度洗脱; 体积流量1.0 mL/min; 柱温35℃; 检测波长365 nm。结果 槲皮素、山柰素、异鼠李素在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.9988$), 平均加样回收率99.1%~100.9%, RSD 0.33%~1.26%。结论 该方法准确稳定, 重复性好, 可用于乳白香青的质量控制。

关键词: 乳白香青; 槲皮素; 山柰素; 异鼠李素; HPLC

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2019)01-0214-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.01.045

乳白香青 *Anaphalis lactea* Maxim. 为菊科香青属多年生草本植物, 主要分布在甘肃南部、青海及四川西北部, 在青海为民间草药, 又名“哇日多罗”, 可治头痛^[1], 具有祛痰、止血活血、祛风湿、消痞瘤、平肝潜阳、平喘, 以及治疗风寒感冒、胃溃疡等功效^[2-3], 主要含有黄酮类、皂苷类、萜类等成分^[4], 其中黄酮类化合物有抗肿瘤、抗氧化、抗辐射等作用^[5-6]。前期报道, 乳白香青总黄酮具有很好的抗氧化活性^[4,7]; 袁彦平等^[8]对乳白香青煎剂、蒸馏液、黄酮和全草注射液进行了动物实验研究, 发现黄酮类化合物具有一定的镇咳作用和比较明显的祛痰作用。根据质量标志物(Q-marker)新概念^[9]并参考相关研究^[10], 黄酮醇苷为乳白香青中主要活性成分, 故本实验将其作为该药材的Q-marker。

目前, 国内报道黄酮醇苷含有量的检测方法主要有紫外分光光度法^[7,11]、薄层扫描法、HPLC法、荧光分光光度法、毛细管电泳法等, 本实验采用HPLC法, 具有分离效率高、分析速度快、灵敏度高特点^[12]。另外, 对乳白香青总黄酮醇苷的研究较少, 并且尚无通过HPLC法测定其含有量的报道, 故本实验建立该方法测定该成分含有量,

以期对乳白香青质量评价与开发利用提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津LC-20A高效液相色谱仪[岛津企业管理(中国)有限公司]; XS105电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司); HH-4恒温水浴锅(常州国华电器有限公司); UPI-1-520T超纯水器(成都超纯科技有限公司)。

1.2 试剂 槲皮素(批号1100812200205, 含有量>98%)、山柰素(批号1108612200606, 含有量>98%)、异鼠李素(批号1108612200407, 含有量>98%)对照品(中国食品药品检定研究院)。9批乳白香青于2011年7~8月采自青海省, 经中国科学院西北高原生物研究所梅丽娟研究员鉴定为正品(具体信息见表1)。甲醇为色谱纯(江苏汉邦科技有限公司); 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Unitary C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.4%磷酸水(45:55), 等度洗脱(50 min); 柱温35℃; 体积流量1.0 mL/min; 检测波长365 nm; 进样量10 μL。色谱图见图1。

收稿日期: 2017-11-17

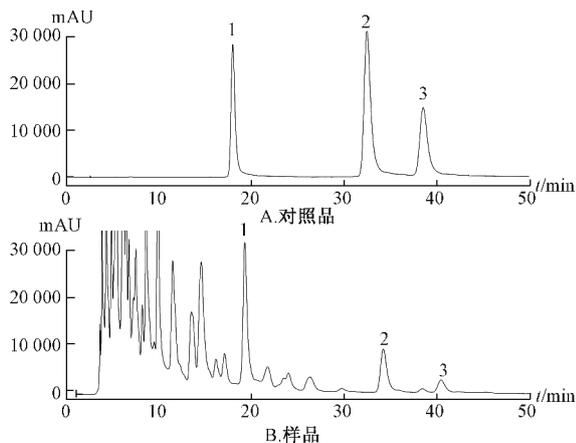
基金项目: 青海省藏药研究重点实验室创新平台发展建设专项(2017-ZJ-Y11); 青海省重大科技专项(2014-GX-A3A-01)

作者简介: 桂兰(1993—), 女, 硕士生, 研究方向为天然药物化学。E-mail: guilan16@mails.ucas.ac.cn

* 通信作者: 梅丽娟(1964—), 女, 研究员, 从事植物资源研究。E-mail: meilijuan111@163.com

表1 样品信息

编号	产地	经纬度	海拔/m
1	天峻县舟群乡	N 37°36'19.21" E 99°23'17.41"	3 470
2	玛沁县果洛军牧场	N 38°21'29.30" E 100°29'19.50"	3 950
3	共和县	N 36°26'44.86" E 101°6'7.82"	3 308
4	互助县南门峡	N 36°58'42.12" E 101°52'55.88"	2 768
5	互助县北山	N 37°1'57.50" E 102°15'31.50"	2 882
6	祁连县卓尔山	N 38°12'7.68" E 100°16'23.40"	2 960
7	祁连县阿柔乡	N 38°4'24.02" E 100°22'48.66"	2 930
8	祁连县冰大坂	N 38°1'25.50" E 100°14'7.74"	4 000
9	祁连县油葫芦沟	N 38°6'31.62" E 99°48'21.12"	3 090



1. 槲皮素 2. 山柰素 3. 异鼠李素

图1 各成分HPLC色谱图

2.2 供试品溶液制备 精密称取干燥过筛的药材粉末约0.21 g, 置于250 mL圆底烧瓶中, 加甲醇-25%盐酸(4:1)混合溶液10 mL, 称定质量, 加热回流60 min, 甲醇-25%盐酸(4:1)补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 对照品溶液制备 分别精密称取槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品3.02、4.84、3.20 mg, 置于50 mL量瓶中, 加甲醇40 mL, 超声处理5 min, 甲醇稀释至刻度, 0.45 μm微孔滤膜过滤, 即得, 4℃保存, 备用。

2.4 线性关系考察 精密量取对照品溶液0.05、0.5、1.0、2.5、5.0、10 mL, 置于10 mL量瓶中, 甲醇定容至刻度, 摇匀, 在“2.1”项色谱条件下测定3次。以峰面积为纵坐标(Y), 溶液质量浓度为横坐标(X)进行线性回归, 结果见表2, 可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表2 各成分线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/ (μg·mL ⁻¹)
槲皮素	$Y=3\ 077\ 858.03X-11\ 760.95$	0.999 7	0.030 2~0.604 0
山柰素	$Y=3\ 332\ 227.38X+2\ 582.68$	0.998 8	0.048 4~0.968 0
异鼠李素	$Y=2\ 696\ 249.50X-7\ 563.79$	0.999 9	0.032 0~0.640 0

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液10 μL, 在“2.1”项色谱条件下测定, 测得槲皮素、山柰素、异鼠李素峰面积RSD分别为0.61%、0.96%、0.53%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液, 于0、2、4、8、12、24 h在“2.1”项色谱条件下测定, 测得槲皮素、山柰素、异鼠李素峰面积RSD分别为1.37%、2.38%、2.63%, 表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一批药材5份, 每份约0.21 g, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 过滤, 精密吸取10 μL, 在“2.1”项色谱条件下测定, 测得槲皮素、山柰素、异鼠李素含有量RSD分别为2.71%、1.53%、2.42%, 表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密量取各成分含有量已知的供试品溶液9份, 精密加入一定量对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下测定, 计算回收率, 结果见表3。

表3 各成分加样回收率试验结果(n=9)

成分	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
槲皮素	0.007 7	0.015 1	0.022 5	98.0	99.1	0.33
	0.004 6	0.015 1	0.019 6	99.3		
	0.011 6	0.015 1	0.026 4	98.0		
	0.004 9	0.015 1	0.019 8	98.7		
	0.003 8	0.015 1	0.018 8	99.3		
	0.003 3	0.015 1	0.018 1	98.0		
	0.001 8	0.015 1	0.016 7	98.7		
	0.005 8	0.015 1	0.020 9	100.0		
	0.002 8	0.015 1	0.017 8	99.3		
山柰素	0.022 8	0.024 2	0.046 9	99.6	100.9	1.26
	0.028 3	0.024 2	0.052 8	101.2		
	0.004 6	0.024 2	0.028 9	100.4		
	0.001 9	0.024 2	0.026 5	101.7		
	0.007 5	0.024 2	0.032 1	101.7		
	0.006 6	0.024 2	0.031 3	102.1		
	0.006 6	0.024 2	0.031 3	102.1		
	0.004 7	0.024 2	0.028 5	98.3		
	0.004 3	0.024 2	0.028 8	101.2		
异鼠李素	0.000 6	0.016 0	0.016 5	99.4	99.2	1.72
	0.000 4	0.016 0	0.015 9	96.9		
	0.001 9	0.016 0	0.017 5	97.5		
	0.000 5	0.016 0	0.016 7	101.3		
	—	0.016 0	0.015 8	98.8		
	—	0.016 0	0.016 2	101.3		
	—	0.016 0	0.016 1	100.6		
	—	0.016 0	0.015 7	98.1		
	—	0.016 0	0.016 0	100.0		

注: —表示未检测出该成分

2.9 样品含有量测定 取不同产地药材各5份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,过滤,精密吸取10 μL,在“2.1”项色谱条件下测定,计算含有量,同时计算总黄酮醇苷含有量 [(槲皮素含有量+山柰素含有量+异鼠李素含有量) × 2.51]^[13],结果见表4。

表4 各成分含有量测定结果 (mg/g, n=5)

编号	槲皮素	山柰酚	异鼠李素	总黄酮醇苷
1	0.73	2.18	0.06	7.43
2	0.44	2.70	0.03	7.97
3	1.11	0.44	0.19	4.34
4	0.47	0.19	0.05	1.77
5	0.36	0.71	—	2.69
6	0.31	0.63	—	2.36
7	0.17	0.38	—	1.38
8	0.55	0.45	—	2.50
9	0.27	0.40	—	1.70

注:—表示未检测出该成分

3 讨论

本实验考察了不同比例甲醇-0.4%磷酸(50:50、48:52、45:55),发现两者比例在45:55时,各色谱峰的分度、对称性和理论塔板数良好,结果可靠。在2015年版《中国药典》中,槲皮素、山柰素、异鼠李素的最高吸收波长均在365 nm左右,此波长下色谱峰响应较高,与其他杂质峰分度符合要求,故本实验确定其作为检测波长。

实验结果显示,不同产地乳白香青中3种黄酮醇苷的含有量明显存在差异,其中共和县、互助县南门峡、祁连县冰大坂产者依次为槲皮素>山柰素>异鼠李素;天峻县舟群乡、玛沁县果洛军牧场、互助县北山、祁连县卓尔山、祁连县阿柔乡、祁连县油葫芦沟产者依次为山柰素>槲皮素>异鼠李素;仅天峻县舟群乡、玛沁县果洛军牧场、共和县、互助县南门峡产者检测出异鼠李素,而且含有量很低;总黄酮醇苷含有量依次为玛沁县果洛军牧场>天峻县舟群乡>共和县>互助县北山>祁连县冰大坂>祁连县卓尔山

>互助县南门峡>祁连县油葫芦沟>祁连县阿柔乡,并且前2个产地药材中该成分含有量均高于《中国药典》规定的银杏叶总黄酮醇苷含有量^[13]。由此可知,乳白香青中总黄酮醇苷含有量与海拔高度不呈线性关系,可能与其生长环境有关。

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[M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] 罗达尚. 中华藏本草[M]. 北京: 民族出版社, 1997.
- [3] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991.
- [4] 任召言. 乳白香青、珠光香青和翅茎风毛菊化学成分研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2009.
- [5] 张纪宁, 杨洁. 黄酮类化合物的生物活性研究进展[J]. 伊犁师范学院学报(自然科学版), 2009(2): 29-31.
- [6] 王慧. 黄酮类化合物生物活性的研究进展[J]. 食品与药品, 2010, 12(9): 347-350.
- [7] 王瑛, 张本印, 党军, 等. 两种香青中总黄酮含量测定及抗氧化活性[J]. 光谱实验室, 2013, 30(5): 2104-2108.
- [8] 袁彦平, 刘兆平, 金东庆. 乳白香青治疗气管炎的动物实验研究[J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(6): 388.
- [9] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [10] 张铁军, 许浚, 韩彦琪, 等. 中药质量标志物(Q-marker)研究: 延胡索质量评价及质量标准研究[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1458-1467.
- [11] 包锦渊, 卢永昌, 白鹤松. 乳白香青中黄酮类成分的定性定量分析[J]. 分子科学学报, 2009, 25(1): 72-74.
- [12] 马陶陶, 张群林, 李俊. 中药总黄酮的含量测定方法[J]. 安徽医药, 2007, 11(11): 1030-1032.
- [13] 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: 316.