

· 研究报告 ·

用 HPLC 法测定百蕊草中 3 个黄酮苷的含量

宣伟东, 成 熙, 叶曙娜, 徐德东 (海军军医大学附属长海医院药学部, 上海 200081)

[摘要] **目的** 建立 HPLC 法同时测定百蕊草中 3 个黄酮苷类化合物的含量。**方法** 色谱柱为 DIKMA C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (21:79, V/V), 用冰醋酸调节 pH 至 4.61, 流速: 1.0 ml/min, 柱温: 25℃, 检测波长: 346 nm。**结果** 3 个黄酮苷化合物山奈酚-3-O-L-吡喃鼠李糖基(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖苷(百蕊草素 I)、山奈酚-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(紫云英苷)、山奈酚-3-O-L-吡喃鼠李糖基(1→2)-[6-O-乙酰基]-β-D-吡喃葡萄糖苷(6'-乙酰氧基百蕊草素 I) 的进样浓度分别在 125~200、2.5~40、5.0~80 μg/ml 范围内线性关系良好 ($r=0.999\ 9$), 平均加样回收率分别为 101.63%、99.82% 和 102.02%, RSD 分别为 1.72%、2.34% 和 1.94% ($n=6$)。**结论** 该方法准确, 稳定性、重现性好, 可作为百蕊草药材及制剂的质控方法。

[关键词] 百蕊草; 黄酮苷; 高效液相色谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2019)05-0460-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.05.014

Determination of three flavonoid glycosides in *Thesium chinensis* Turcz by HPLC method

XUAN Weidong, CHENG Xi, YE Shuna, XU Dedong (Department of Pharmacy, Changhai Hospital Affiliated to Naval Medical University, Shanghai 200081, China)

[Abstract] **Objective** To establish an assay method for three flavonoid glycosides: kaempferol-3-O-L-rhamnopyranosyl(1→2)-β-D-glucopyranoside, kaempferol-3-O-glucoside and kaempferol-3-O-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-[6-O-acetyl]-β-D-glucopyranoside in *Thesium chinensis* Turcz by HPLC. **Methods** Dikma C₁₈ column (520 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with the mobile phase of acetonitrile-water (21:79, adjusted pH to 4.61 with acetic acid) at a flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 346 nm, and the column temperature was 25 °C. **Results** The linear range of those three flavonoid glycosides was 125-200 μg/ml, 2.5-40 μg/ml and 5.0-80 μg/ml ($r=0.999\ 9$). The average recoveries ($n=6$) were 101.63%, 99.82% and 102.02%. RSD was 1.72%, 2.34% and 1.94% ($n=6$) respectively. **Conclusion** This method is simple and accurate. It can be used for the quality control of *Thesium chinensis* Turcz and related preparations.

[Key words] *Thesium chinensis* Turcz; flavonoid glycosides; HPLC; content determination

百蕊草 *Thesium chinensis* Turcz, 为檀香科百蕊草属多年生寄生草本, 别名细须草、一棵松、青龙草等, 常附着在其他活体植物根上生长, 在我国分布较广, 主要产地为安徽、浙江和湖北等省。百蕊草性寒, 味辛、涩, 归肺、肾二经, 有清热解毒、补肾固精之功效, 现代药理研究表明, 百蕊草具有良好的抗炎、解热、镇痛、抗菌等作用^[1-2]。本课题组研究发现, 百蕊草水提取物对肾病综合征大鼠和 IgA 肾病大鼠均有良好的治疗效果^[3-4], 其水提物经 AB-8 大孔树脂吸附后, 中等极性的洗出物是其抗炎活性部位^[5]。进一步的化学成分分离纯化研究表明, 以山奈酚为

母核的黄酮苷类化合物是活性部位的主要化学成分^[6]。其中, 含量较高的 3 个黄酮苷类化合物分别是: 山奈酚-3-O-L-吡喃鼠李糖基(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖苷(百蕊草素 I)、山奈酚-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(紫云英苷)、山奈酚-3-O-L-吡喃鼠李糖基(1→2)-[6-O-乙酰基]-β-D-吡喃葡萄糖苷(6'-乙酰氧基百蕊草素 I)。笔者采用 HPLC 法, 以外标法同时测定百蕊草全草中上述 3 个黄酮苷类化合物的含量, 为百蕊草及其制剂的研究提供一种简便、快速的质量控制方法。

1 仪器与试剂

LC-10AT 色谱泵, SPD-10A 紫外检测仪(日本岛津公司), N2000 色谱工作站(浙江大学智能信息

工程研究所), AB104-N 电子分析天平(梅特勒-托利多)。DIKMA C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。对照品百蕊草素 I、紫云英苷、6'-乙酰氧基百蕊草素 I 均由本课题组从百蕊草水提取物中等极性部位分离纯化得到, HPLC 纯度测定含量 > 98.5%^[6]。3 批百蕊草产地分别为: 湖北荆州(安徽亳州中药材市场, 批号: 20150510)、安徽池州(安徽亳州中药材市场, 批号: 20150518)、河南泌阳(金满农场, 批号: 20150915), 均由海军军医大学药学院中药鉴定学教研室孙莲娜副教授鉴定为檀香科百蕊草属百蕊草 *Thesium chinensis* Turcz 的干燥全草。甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为注射用水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

百蕊草素 I、紫云英苷、6'-乙酰氧基百蕊草素 I 对照品, 经 105 °C 减压干燥至恒重。分别精密称定上述对照品各 20、4、8 mg, 分别置于 100 ml 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。精密量取上述 3 种对照品溶液各 10 ml, 置于同一容量瓶中, 混匀, 即得对照品混合溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取干燥百蕊草全草药材, 剪成 1~2 cm 小段。

取上述药材 10 g, 放入圆底烧瓶中, 加入 50% 乙醇适量, 水浴加热回流提取 2 次, 每次 1 h。合并提取液, 减压回收至无醇味。浓缩液转移至 100 ml 分液漏斗, 用 20 ml 水混悬, 用石油醚(10 ml) 萃取 2 次。水层减压回收成浸膏, 加 50% 乙醇适量溶解, 转移至 100 ml 量瓶中, 再用 50% 乙醇稀释至刻度, 摇匀。取上述溶液适量, 过滤, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.3 色谱条件与系统适应性试验

色谱柱: DIKMA C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(21 : 79, V/V), 用冰醋酸调节 pH 为 4.61; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 25 °C; 检测波长: 346 nm。对照品混合溶液和供试品溶液各进样 20 μl, 分别记录色谱图, 各组分理论塔板数均 > 3 000, 分离度 > 1.5, 色谱图见图 1。

2.4 线性关系考察

分别精密量取混合对照品溶液适量, 分别置于 10 ml 容量瓶, 用流动相稀释、定容, 配制不同浓度(μg/ml) 的对照品混合溶液。上述对照品混合溶液各进样 20 μl, 进样 3 次, 分别记录峰面积, 计算各对照品的峰面积平均值(\bar{X}), 结果见表 1。

以浓度(X , μg/ml) 为横坐标, 面积(Y) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程, 结果见表 2。

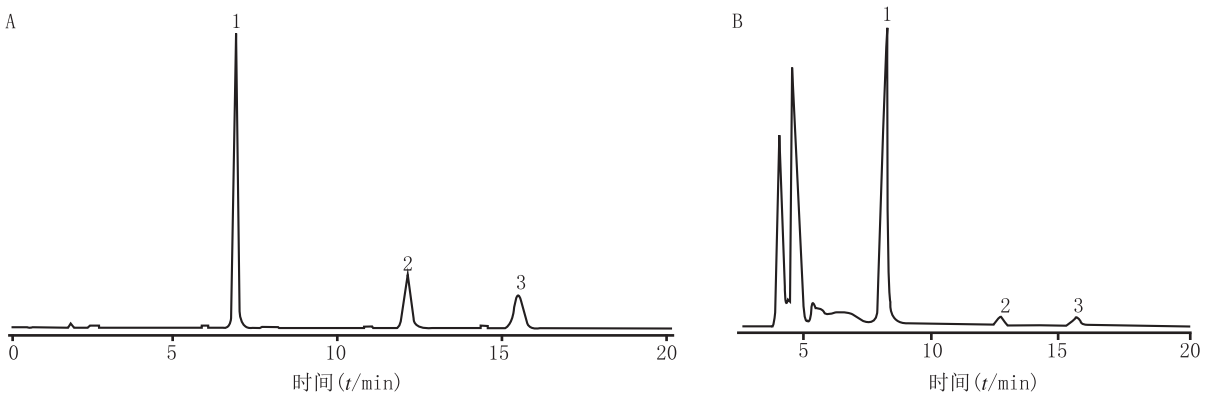


图 1 对照品及供试品溶液的 HPLC 图

A. 混合对照品溶液; B. 供试品溶液 1. 百蕊草素 I; 2. 紫云英苷; 3. 6'-乙酰氧基百蕊草素 I

表 1 不同浓度梯度时各对照品峰面积平均值

序号	百蕊草素 I		紫云英苷		6'-乙酰氧基百蕊草素 I	
	μg/ml	\bar{X}	μg/ml	\bar{X}	μg/ml	\bar{X}
1	200	1 351 312	40	408 658.3	80	346 103.5
2	100	682 344.5	20	202 105.9	40	171 401.2
3	50	346 551.6	10	102 179.6	20	87 646.4
4	25	172 325.4	5.0	52 171.8	10	45 186.6
5	12.5	90 388	2.5	26 366.4	5.0	23 100.4

表 2 各对照品线性关系考察结果

成分	回归方程	线性范围($\mu\text{g/ml}$)	相关系数(r)
百蕊草素 I	$Y=7 \times 10^6 X + 7\ 130.9$	125~200	0.999 9
紫云英苷	$Y=10\ 192 X + 187.05$	2.5~40	0.999 9
6'-乙酰氧基百蕊草素 I	$Y=4\ 299.6 X + 1\ 348$	5.0~80	0.999 9

2.5 精密度试验

取线性关系考察项中序号 3 对照品混合溶液(百蕊草素 I: 50 $\mu\text{g/ml}$ 、紫云英苷: 10 $\mu\text{g/ml}$ 、6'-乙酰氧基百蕊草素 I: 20 $\mu\text{g/ml}$), 进样 20 μl , 连续进样 6 次, 记录峰面积。对照品百蕊草素 I、紫云英苷、6'-乙酰氧基百蕊草素 I 的平均峰面积分别为 366 795.9、971 50.82、746 25.32, RSD($n=6$) 分别为 1.08%、1.20%、1.77%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一份供试品溶液 I (批号: 20150510), 分别于 0、2、4、8、12、24 h 按上述色谱条件进样 20 μl , 记录色谱图和各成分峰面积。供试品中百蕊草素 I、紫云英苷、6'-乙酰氧基百蕊草素 I 的平均峰面积分别为 408 302.5、107 108.6、904 45.45, RSD($n=6$) 分别为 0.85%、1.32%、2.09%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批次百蕊草药材 6 份(批号: 20150510), 每份各约 10.0 g, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 各进样 20 μl , 分别记录色谱图和各成分峰面积。各供试品中百蕊草素 I、紫云英苷、6'-乙酰氧基百

蕊草素 I 的平均峰面积分别为 335 104.2、110 128、819 38.33, RSD($n=6$) 分别为 2.43%、2.22%、1.72%, 表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

依据重复性考察结果, 按外标法计算 10.0 g 百蕊草中(批号: 20150510)百蕊草素 I、紫云英苷、6'-乙酰氧基百蕊草素 I 的含量分别为: 45.7、1.1、2.2 mg。取上述百蕊草药材 6 份, 每份约 5.0 g, 分别置于圆底烧瓶中, 每份中均加入干燥的对照品百蕊草素 I (22.9 mg)、紫云英苷(0.55 mg)和 6'-乙酰氧基百蕊草素 I (1.1 mg), 按“2.2”项下方法平行制备供试品溶液并按上述色谱条件进样 20 μl 进行测定, 记录峰面积并计算各成分平均回收率($n=6$)。结果见表 3。

2.9 样品含量测定

取 3 批百蕊草药材(批号: 20150510、20150518、20150925), 按“2.2”项下方法制备供试品溶液。供试品溶液和对照品混合溶液各进样 20 μl 测定, 记录峰面积。采用外标法分别计算 3 批百蕊草药材中百蕊草素 I、紫云英苷、6'-乙酰氧基百蕊草素 I 的含量。结果见表 4。

表 3 加样回收率试验测定结果($n=6$)

成分	样品量(m/g)	样品含量(m/mg)	加入量(m/mg)	测得量(m/mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
百蕊草素 I	5	22.9	22.9	45.669 2	99.71	101.63	1.72
	5	22.9	22.9	46.950 5	102.51		
	5	22.9	22.9	47.859 7	104.50		
	5	22.9	22.9	46.483 5	101.49		
	5	22.9	22.9	46.518 0	101.57		
	5	22.9	22.9	45.797 7	99.99		
紫云英苷	5	0.55	0.55	1.137 0	103.36	99.82	2.43
	5	0.55	0.55	1.107 8	100.71		
	5	0.55	0.55	1.082 4	98.40		
	5	0.55	0.55	1.066 3	96.94		
	5	0.55	0.55	1.116 1	101.46		
	5	0.55	0.55	1.078 2	98.02		
6'-乙酰氧基百蕊草素 I	5	1.1	1.1	2.257 5	102.61	102.02	1.94
	5	1.1	1.1	2.237 3	100.71		
	5	1.1	1.1	2.323 7	105.62		
	5	1.1	1.1	2.215 6	100.71		
	5	1.1	1.1	2.233 3	101.51		
	5	1.1	1.1	2.199 4	99.97		

表4 百蕊草中3种成分含量测定结果(n=3)

批号	成分	峰面积		含量(mg/g)
		样品峰面积	对照品峰面积	
20150510	百蕊草素 I	345 094.8	359 436.7	4.800 4
	紫云英苷	102 107.6	93 069.79	0.109 7
	6'-乙酰氧基百蕊草素 I	84 046.03	75 011.41	0.224 1
20150518	百蕊草素 I	368 131.6	357 628.3	5.146 8
	紫云英苷	121 983.3	92 854.9	0.131 3
	6'-乙酰氧基百蕊草素 I	92 332.11	74 883.99	0.251 9
20150925	百蕊草素 I	450 111.3	360 131.1	6.249 2
	紫云英苷	171 736.5	92 997.7	0.183 5
	6'-乙酰氧基百蕊草素 I	97 653.3	74 797.9	0.261 1

3 讨论

文献报道的百蕊草药材以及上市制剂“百瑞含片”的质量标准中^[7-8],多以山奈酚为测定指标。因山奈酚在百蕊草中含量极低,故采用酸水解法提取药材后制备供试品溶液,以提高山奈酚的含量。经酸水解之后制备的供试液中,山奈酚的含量已非药材天然含有的水平,不能真实反映药材及制剂中真实的含量。且酸水解为化学反应,可带来不可预知的副反应及其他产物,水解时的pH值、时间和温度等因素均会导致水解程度不同,影响含量的准确性。有报道提示,选用50%乙醇溶液回流提取2次,每次1h,紫云英苷的提取率最高^[7]。本实验测定的3个黄酮苷类化合物为紫云英苷及其衍生物,结构中均含有糖分子,在含水溶剂中溶解度较大,不溶于低极性的有机溶剂。因此,在供试品溶液制备时,选用50%乙醇溶液提取2次,并用石油醚萃取提取液,去除极性较小的成分,从而排除脂溶性成分对液相色谱的干扰。

通过对混合对照品溶液的紫外扫描,分别在265、346、378 nm处出现山奈酚的特征吸收峰。由于265 nm处多数成分均有吸收,专属性不强,对基线干扰大,而368 nm的吸光度较小,故采用346 nm作为检测波长,可以获得分离度较好的HPLC图谱。基于有文献采用一测多评法测定百蕊草中山奈酚、百蕊草素I及百蕊草素II的含量,采用相对校正因子计算和外标法测定3个成分的含量无显著差异^[9],故本实验采用外标法直接测定含量。

在百蕊草活性成分分离纯化的基础上,以3个黄酮苷化合物为对照,采用HPLC法,对湖北、安徽、河南产地的3批全草进行了活性成分的含量测定,首次建立了一次同时测定百蕊草中3个黄酮苷类组分的方法,可为百蕊草及其制剂的质量控制提供一种新的、简便、快速的分析手段。

【参考文献】

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,2005.
- [2] PARVEEN Z, DENG Y, SAEED MK, et al. Antiinflammatory and analgesic activities of *Thesium chinense* Turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside[J]. Yakugaku Zasshi, 2007, 127(8): 1275-1279.
- [3] 宣伟东, 唐大海, 卞俊, 等. 百蕊草对阿霉素肾病大鼠治疗作用的实验研究[J]. 药学实践杂志, 2012, 30(6): 443-446.
- [4] 宣伟东, 唐大海, 范正平. 百蕊口服液对阿霉素肾病大鼠综合症的治疗作用[J]. 中国药业, 2014, 23(9): 8-10.
- [5] 闫俊, 唐大海, 宣伟东, 等. 百蕊草提取物对免疫球蛋白A肾病模型大鼠的治疗作用[J]. 药学实践杂志, 2015, 33(1): 28-31, 35.
- [6] 宣伟东, 范正平, 胡水根, 等. 百蕊草亲水性化学成分研究[J]. 药学实践杂志, 2018, 36(3): 270-273.
- [7] 刘洋, 邓玉林, 禹玉洪, 等. RP-HPLC测定百蕊草中紫云英苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(21): 1766-1767.
- [8] 唐慧文, 宋晓宁, 骆红梅. HPLC法测定百蕊草中山奈酚的含量[J]. 贵阳中医学院学报, 2006, 28(4): 60-61.
- [9] 储晓琴, 蒋建勤, 徐江慧, 等. 一测多评法测定百蕊草中百蕊草素I、百蕊草素II和山奈酚的含量[J]. 云南中医学院学报, 2016, 39(2): 30-33.

【收稿日期】 2019-01-23 【修回日期】 2019-03-06
【本文编辑】 李睿雯