

UPLC 法测定羊红膻药材中 2 种黄酮苷类成分的含量

刘瑞, 王志英, 张丹丹, 裴妙荣

(山西中医学院, 晋中 030619)

摘要 目的: 采用超高效液相色谱法测定羊红膻中木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷和芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷 2 种黄酮苷的含量。**方法:** 采用 BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m), 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.4 mL \cdot min⁻¹, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 345 nm。**结果:** 木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷质量浓度在 19.38~487.6 μ g \cdot mL⁻¹ 范围内具有良好线性关系 ($r=0.9996$, $n=5$), 3 批羊红膻药材中其含量分别为 4.62、4.23、3.88 mg \cdot g⁻¹; 芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷质量浓度在 21.16~423.2 μ g \cdot mL⁻¹ 的范围内具有良好线性关系 ($r=0.9997$, $n=5$), 3 批羊红膻药材中其含量分别为 3.81、3.36、4.01 mg \cdot g⁻¹。**结论:** 此方法可用于药材羊红膻中上述 2 个黄酮苷成分的含量测定, 测定结果可为该药材质量标准的完善提供依据。

关键词: 羊红膻; 黄酮苷; 木犀草素葡萄糖醛酸苷; 芹菜素葡萄糖醛酸苷; 超高效液相色谱

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2017) 08-1509-04

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.08.22

UPLC determination of two flavonoid glycosides in Yanghongshan

LIU Rui, WANG Zhi-ying, ZHANG Dan-dan, PEI Miao-rong

(Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

Abstract Objective: To establish an UPLC method for determination of two flavonoid glycosides luteolin-7-O- β -D-glucuronopyranoside and apigenin-7-O- β -D-glucuronopyranoside in Yanghongshan the whole plant or the radix of *Pimpinella thellungiana* Wolff. **Methods:** The chromatographic separation was performed at 30 $^{\circ}$ C on a BEH C₁₈ column (2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μ m). The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% formic acid water using a gradient elution. The flow rate was set at 0.4 mL \cdot min⁻¹ with the detection wavelength of 345 nm. **Results:** The standard curve of the luteolin-7-O- β -D-glucuronopyranoside showed good linearity in the range of 19.38 to 487.6 μ g \cdot mL⁻¹ ($r=0.9996$). The content of 3 batches of Yanghongshan was 4.62 mg \cdot g⁻¹, 4.23 mg \cdot g⁻¹ and 3.88 mg \cdot g⁻¹ for luteolin-7-O- β -D-glucuronopyranoside, respectively. The standard curve of the apigenin-7-O- β -D-glucuronopyranoside was linear in the range of 21.16 to 423.2 μ g \cdot mL⁻¹ ($r=0.9997$) and the contents of 3 batches of Yanghongshan were 3.81 mg \cdot g⁻¹, 3.36 mg \cdot g⁻¹ and 4.01 mg \cdot g⁻¹ for apigenin-7-O- β -D-glucuronopyranoside, respectively. **Conclusion:** The established method can be used for the determination of flavonoid glycosides in Yanghongshan. Moreover, the quantitative results may be useful for the quality improvement of this herbal medicine.

Keywords: Yanghongshan; flavonoid glycosides; luteolin-glucuronopyranoside; apigenin-glucuronopyranoside; UPLC

第一作者 Tel: 15333512182; E-mail: liurui0126@163.com

羊红膻药材为伞形科茴芹属缺刻叶茴芹 (*Pimpinella thellungiana* Wolff) 的根或全草^[1], 始载于《陕北草药》, 多年野生草本植物, 主要分布在陕西、山西、河北及东北等地区, 因其有一种羊膻气, 故得此名, 别名有苦参菜、百路通、野当归、羊膻七、羊膻草等。羊红膻药材是一味有悠久历史的草药^[2], 原本陕北民间用作牛羊等牲畜的复壮剂, 民谚曰: “家有羊红膻, 骡马拴满圈”, 同时具有补肾及壮元阳的功效, 现代研究表明羊红膻药材还具有降压、降脂、降低心肌耗氧量、提高耐缺氧能力和提高免疫等功效, 对于高血压、冠心病和克山病有较好的疗效, 是中国药典品种正心降脂片的君药^[3]。

王长岱等^[4]研究表明羊红膻全草中主要含有挥发油、苯丙素、黄酮和香豆素等类化合物, 并且总黄酮苷有降低心肌耗氧量以及降低血管阻力等作用^[5]。目前有关羊红膻的质量控制研究较少, 仅有几篇文献对其显微鉴别^[6]、薄层鉴别和总黄酮 UV 测定^[7]等进行了研究。为了能有效地控制羊红膻药材的质量, 本文建立了羊红膻药材中木犀草素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷和芹菜素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷含量同时测定的 UPLC 法, 测定结果可为该药材质量标准的完善提供依据。

1 仪器与试剂

Waters 公司 ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱仪和 Empower 色谱工作站, Waters 公司 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μ m; 填料: 亚乙基桥杂化十八烷基硅烷键合硅胶); 昆山市超声仪器有限公司 KQ5200E 型超声清洗器, Sartorius BT25 十万分之一电子分析天平 ($d=0.01$ mg)。

羊红膻药材购自陕西省黄安县, 经山西中医

学院王兵老师鉴定为伞形科茴芹属缺刻叶茴芹 (*Pimpinella thellungiana* Wolff) 的带根全草。芹菜素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷 (批号 160130, 纯度 $\geq 98\%$) 和木犀草素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷 (批号 160130, 纯度 $\geq 98\%$) 均购自上海融禾医药科技有限公司。乙腈为色谱纯, 甲醇、甲酸等为分析纯试剂, 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

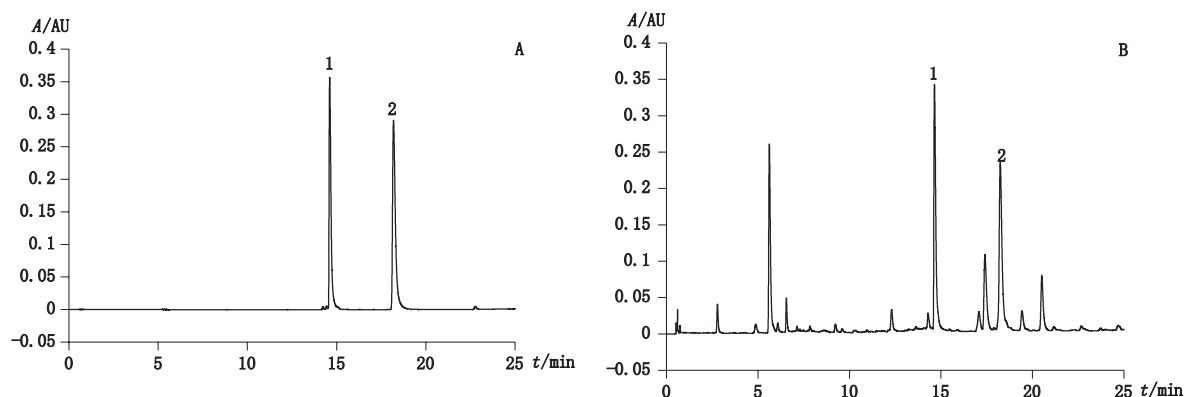
2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液 取木犀草素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷和芹菜素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷的对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇水配成 0.487 6 mg · mL⁻¹ 和 0.423 2 mg · mL⁻¹ 的溶液, 作为混合对照品储备液; 精密量取该储备液 5 mL 置 10 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇水定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.2 供试品溶液 取粉碎至粗粉的羊红膻全草药材 1.0 g, 精密称定, 置于 250 mL 圆底烧瓶中, 加 50% 甲醇水 40 mL, 80 °C 回流提取 1 h, 滤过, 残渣再用 50% 甲醇水 40 mL 回流 2 次, 每次 1 h, 合并 3 次滤液, 旋转蒸干溶剂后, 残渣加 50% 甲醇水溶解, 并转移至 10 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇水稀释至刻度, 摇匀, 用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2 色谱条件

采用 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μ m), 流动相为 0.1% 甲酸水 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~13 min, 5%B → 15%B; 13~17 min, 15%B; 17~25 min, 15%B → 35%B), 流速 0.4 mL · min⁻¹, 检测波长 345 nm, 柱温 30 °C, 进样量 2 μ L。对照品及样品色谱图见图 1。



1. 木犀草素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷 (luteolin-7-O- β -D-glucuronopyranoside) 2. 芹菜素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷 (apigenin-7-O- β -D-glucuronopyranoside)

图 1 混合对照品 (A) 与样品 (B) 的 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and sample (B)

2.3 线性关系考察

精密量取混合对照品溶液 0.5、1、2、5 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇水定容至刻度, 摇匀, 即得系列混合对照品稀释液。取上述系列混合对照品稀释液和混合对照品溶液, 按“2.2”项下的

色谱条件依次进样, 记录色谱峰面积。以对照品的峰面积为纵坐标, 对照品质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线。回归方程及线性范围见表 1。结果表明各对照品在各自质量浓度范围内呈良好的线性关系。

表 1 各被测成分的回归方程及线性范围

Tab. 1 Regression equations and linear ranges of the investigated components

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range) / (μg · mL ⁻¹)
木犀草素 -7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷 (luteolin-7-O-β-D-glucuronopyranoside)	$Y=1.14 \times 10^7 X+8.35 \times 10^4$	0.999 6	19.38~487.6
芹菜素 -7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷 (apigenin-7-O-β-D-glucuronopyranoside)	$Y=1.25 \times 10^7 X-5.48 \times 10^4$	0.999 7	21.16~423.2

2.3.2 精密度试验 精密量取混合对照品溶液 2 μL, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 以峰面积计算, 木犀草素 -7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷和芹菜素 -7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷色谱峰峰面积的 RSD 分别为 0.27% 和 0.32%, 表明仪器的精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品溶液, 按照“2.2”项色谱条件下, 分别于 0、1、2、4、12 h 进样检测, 各色谱峰峰面积的 RSD 分别为 0.26% 和 0.64%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.4 重复性试验 取同一批羊红膻药材, 按照“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按照“2.2”项下

色谱条件进样检测, 求得羊红膻药材中木犀草素 -7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的平均含量为 4.62 mg · g⁻¹, RSD 为 2.8%; 芹菜素 -7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的平均含量为 3.81 mg · g⁻¹, RSD 为 2.6%。结果表明方法重复性较好。

2.3.5 加样回收率试验 取“2.3.4”项下已测知含量的羊红膻样品 0.50 g 共 6 份, 精密称定, 精密加入混合对照溶液 0.5 mL, 按“2.1.2”项下的方法制备供试溶液并测定, 分别计算加样回收率, 结果(表 2)表明方法准确性较好。

表 2 加样回收率测定结果

Tab. 2 The results of recovery test

化合物 (compound)	样品含量 (content) /mg	对照品加入量 (spiked) /mg	测得总量 (found) /mg	回收率 (recovery) /%	平均回收率 (average recovery) /%	RSD /%
木犀草素 -7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷 (luteolin-7-O-β-D-glucuronopyranoside)	2.291	2.438	4.872	103.0	102.7	2.1
	2.284	2.438	4.705	99.6		
	2.287	2.438	4.913	104.0		
	2.285	2.438	4.999	105.8		
	2.288	2.438	4.852	102.7		
	2.286	2.438	4.785	101.3		
芹菜素 -7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷 (apigenin-7-O-β-D-glucuronopyranoside)	1.928	2.116	4.304	106.4	105.2	2.5
	1.923	2.116	4.133	102.3		
	1.925	2.116	4.374	108.2		
	1.923	2.116	4.328	107.2		
	1.926	2.116	4.258	105.3		
	1.924	2.116	4.108	101.7		

2.4 样品测定

取不同批次的羊红膻药材样品, 分别称取 1.00 g, 精密称定, 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.2”项下色谱条件进样检测, 记录色谱图, 以外标法计算得药材羊红膻中芹菜素 -7-O-β-D-葡

萄糖醛酸苷和木犀草素 -7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的含量, 结果见表 3。

3 讨论

3.1 药材的前处理

羊红膻的用药部位为根或全草, 鉴于药材不同

部位的黄酮含量可能会不一样,为使取样准确,结果可靠,重复性强,因此本次实验中将羊红膻药材全草

(带根)粉碎均匀后再进行称取,以消除取样时的不均匀导致的误差。

表 3 羊红膻样品含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab. 3 The content determination of two components in Yanghongshan

样品号 (sample No.)	木犀草素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷含量 (luteolin-7-O- β -D-glucuronopyranoside content)	芹菜素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷含量 (apigenin-7-O- β -D-glucuronopyranoside content)
1	4.62	3.81
2	4.23	3.36
3	3.88	4.01

3.2 检测波长的选择

羊红膻药材中木犀草素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷和芹菜素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷均属于黄酮类成分。实验中发现 345 nm 条件下,目标色谱峰峰形对称,响应较强,且与其他色谱峰分离良好,故选择 345 nm 为检测波长。

3.3 供试品溶液制备方法的考察

分别对提取溶剂和提取方法进行了考察。试验中比较了甲醇、50% 甲醇水、乙醇、50% 乙醇水、水等溶剂,结果表明 50% 甲醇水作为提取溶剂时总黄酮含量较高。通过比较超声、回流、碱提酸沉、浸渍后超声等不同提取方法,发现回流提取效率明显优于其他提取方法,可有效地提取出被测成分。

3.4 色谱条件的优化

实验中分别研究了乙腈-水、乙腈-甲酸水、甲醇-水、甲醇-乙酸水、甲醇-甲酸水等不同体系的流动相和不同比例的酸种类和浓度,结果表明采用乙腈-0.1% 甲酸水进行梯度洗脱,木犀草素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷和芹菜素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷的分离度和峰形均比较好,可满足测定的要求。

3.5 色谱图中其他色谱峰的结构类型推测

实验中采用 PDA 查看样品色谱图中其他色谱峰的 UV 光谱图,发现样品色谱图中其他多个色谱峰也具有黄酮类成分的典型光谱特征,提示羊红膻药材除以上 2 个黄酮类成分外,还含有多种黄酮类成分,因此可考虑采用液质联用并参考文献确定其结构,从而更好地控制药材的质量。

3.6 小结

本研究首次采用 UPLC 方法同时测定羊红膻药材中木犀草素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷和芹菜素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷的含量,方法简便,灵敏度高。木犀草素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷和芹菜素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷具有明显扩张冠脉,降低冠脉血管阻力的作用^[8],测定结果表明羊红膻药材

中这 2 种黄酮类成分含量较高,可为今后羊红膻药材的质量评价和质量标准完善提供参考。

参考文献

- [1] 金振国,王忙生. 草药羊红膻的研究进展[J]. 商洛学院学报, 2008, 22(5): 43
JIN ZG, WANG MS. Advances in studies of herbal of *Pimpinella thellungiana* Wolff [J]. J Shangluo Univ, 2008, 22(5): 43
- [2] 陈忠孝,邵富生,石会丽. 浅谈草药羊红膻[J]. 陕西中医, 1999, 20(12): 566
CHEN ZX, SHAO FS, SHI HL. Preliminary discussion on Yanghongshan [J]. Shaanxi J Tradit Chin Med, 1999, 20(12): 566
- [3] 中国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 750
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 750
- [4] 王长岱,丁凯,郭五保. 羊红膻化学成分的研究[J]. 陕西新医药, 1980, 9(8): 49
WANG CD, DING K, GUO WB. Studies on the chemical constituents of Yanghongshan (I) [J]. Shaanxi Med J, 1980, 9(8): 49
- [5] 许青媛,沈雅琴,王德华. 羊红膻黄酮苷药理作用研究[J]. 中草药, 1994, 25(1): 51
XU QY, SHEN YQ, WANG DH. Studies on pharmacological action of flavonoid glycoside in Yanghongshan [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 1994, 25(1): 51
- [6] 石会丽,冯一凡,刘珍,等. 羊红膻药材中总黄酮的含量测定方法研究[J]. 西北药学杂志, 2009, 24(1): 18
SHI HL, FENG YF, LIU Z, et al. Content determination of total flavonoids in Yanghongshan [J]. Northwest Pharm J, 2009, 24(1): 18
- [7] 石会丽,杨智锋,李富贤. 羊红膻的显微及薄层鉴别研究[J]. 西北药学杂志, 2013, 28(5): 453
SHI HL, YANG ZF, LI FX. The microscopic identification and TLC of Yanghongshan [J]. Northwest Pharm J, 2013, 28(5): 453
- [8] 马思萌,刘睿,任晓亮,等. HPLC-DAD 法测定苦碟子中木犀草素 7-O- β -D-葡萄糖苷、木犀草素 7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷和芹菜素 7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(4): 377
MA SM, LIU R, REN XL, et al. Determination of luteolin-7-O- β -D-glucopyranoside, luteolin-7-O- β -D-glucuronopyranoside and apigenin-7-O- β -D-glucuronopyranoside in *Ilexis sonchifolia* by HPLC-DAD [J]. Drugs Clin, 2014, 29(4): 377

(本文于 2016 年 9 月 8 日收到)