

高效毛细管电泳法测定小白蒿不同加工品中5种黄酮类成分

海平¹, 苏雅乐其其格², 王青虎³

1. 内蒙古民族大学化学化工学院, 内蒙古 通辽 028043

2. 内蒙古民族大学农学院, 内蒙古 通辽 028043

3. 内蒙古民族大学蒙医药学院, 内蒙古 通辽 028043

摘要: **目的** 建立高效毛细管电泳(HPCE)法同时测定蒙药小白蒿不同加工品中5种黄酮类成分的方法。**方法** 小白蒿经不同加工工艺处理后, 用HPCE法分别测定其中5种黄酮类成分, 并对其进行比较。**结果** 回归方程分别为5, 7, 3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮 $Y=0.1143X+0.0327$, $r=0.9998$; 5, 3'-二羟基-6, 7, 4'-三甲氧基黄酮 $Y=0.1009X+0.0485$, $r=0.9996$; 槲皮素 $Y=0.0555X+0.0268$, $r=0.9996$; 5, 7, 3'-三羟基-6, 4'-二甲氧基黄酮 $Y=0.1132X-0.0161$, $r=0.9993$; 木犀草素 $Y=0.0979X-0.0295$, $r=0.9994$ 。5种黄酮类成分分别在1.00~40.00、10.00~200.00、5.00~100.00、1.00~40.00、1.00~40.00 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。平均回收率分别为98.44%、97.75%、97.73%、97.98%、98.07%; RSD分别为1.60%、1.03%、1.57%、0.94%、1.20%。**结论** 不同加工工艺对小白蒿中5种黄酮类成分有一定影响; 以5种黄酮类成分为分析指标, 小白蒿最佳加工工艺为60℃加热干燥。

关键词: 蒙药; 小白蒿; 高效毛细管电泳法; 加工工艺; 黄酮类

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)05-0893-04

Determination of five flavonoids from different processing products of *Artemisia frigida* by HPCE

HAI Ping¹, Suyaleqiqige², WANG Qing-hu³

1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028043, China

2. College of Agronomy, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028043, China

3. College of Traditional Mongolian Medicine, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028043, China

Abstract: **Objective** Determining the content of five flavonoids in *Artemisia frigida* by high performance capillary electrophoresis (HPCE) method to provide reference data for the evaluation of processing products of *A. frigida*. **Methods** Treated by different processing technologies, the content of five flavonoids compounds can be determined and compared by HPCE. **Results** Regression equations were 5,7,3'-triterhydroxy-4'-methoxyflavone $Y=0.1143X+0.0327$, $r=0.9998$; 5,3'-dihydroxy-6,7,4'-tritermethoxyflavone $Y=0.1009X+0.0485$, $r=0.9996$; quercetin $Y=0.0555X+0.0268$, $r=0.9996$; 5,7,3'-triterhydroxy-6,4'-dimethoxyflavone $Y=0.1132X-0.0161$, $r=0.9993$; luteolin $Y=0.0979X-0.0295$, $r=0.9994$. Five kinds of flavonoids were good linear relationship at 1.00—40.00, 10.00—200.00, 5.00—100.00, 1.00—40.00, 1.00—40.00 $\mu\text{g/mL}$. The average recoveries were 98.44%, 97.75%, 97.73%, 97.98%, and 98.07%. And RSD were 1.60%, 1.03%, 1.57%, 0.94%, and 1.20%. **Conclusion** The results reveal that the different processing technologies have different effects on the content determination of five flavonoids compounds in *A. frigida*. Using the five flavonoids as testing indexes, the best processing technology of *A. frigida* is heating and drying to constant weight at 60℃.

Key words: Mongolian medicine; *Artemisia frigida* Willd; high performance capillary electrophoresis (HPCE); processing technology; flavonoids

小白蒿, 别名冷蒿, 蒙名阿各, 系菊科蒿属植物冷蒿 *Artemisia frigida* Willd. 的地上部分。主治各

种出血、关节肿胀、肾热、月经不调、疮痈, 也是蒙医上常用的人造圣水组成之一^[1-2]。主要分布于我

收稿日期: 2010-07-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30960525)

作者简介: 海平(1967—)男, 内蒙古通辽市库伦旗人, 副教授, 硕士, 研究方向为有机合成及天然产物化学。

Tel: 15847562916 E-mail: tlyl2006@163.com

国的内蒙古、青海、甘肃、山西和东北地区。Liu 等已从小白蒿全草中分离出多种倍半萜内酯类化合物, 为卡尼 (canin)、阿利特长尼 (arteconin)、利得亭 (ridentin) [3] 及 8-去氧可马波林 (8-desoxycumambrin B) [4]; 王青虎等 [5-7] 系统研究了蒙药小白蒿中挥发性成分, 从小白蒿全草中分离出多种黄酮类化合物, 并采用 HPLC 法测定不同产地的小白蒿中 7-羟基香豆素和 5, 3'-二羟基-6, 7, 4'-三甲氧基黄酮含量。目前国内外对小白蒿采集后的加工工艺还没有一个明确的标准。本实验建立了高效毛细管电泳 (HPCE) 法 [8-9] 同时测定其中 5, 7, 3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮、5, 3'-二羟基-6, 7, 4'-三甲氧基黄酮、槲皮素、5, 7, 3'-三羟基-6, 4'-二甲氧基黄酮和木犀草素的量, 并对小白蒿加工品中 5 种黄酮类成分进行比较, 以期评价小白蒿最佳加工工艺提供参考依据。

1 仪器与材料

CAPEL—105 型高效毛细管电泳仪 (俄罗斯 Lumex 公司); 弹性石英毛细管 (郑州英诺高科有限公司); UV—3000 型双波长/双光束紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司); PB—20 型数字式酸度计 (北京赛多利斯有限公司); AUW220D 型自动电子天平 (日本岛津公司)。

对照品 5, 7, 3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮、5, 3'-二羟基-6, 7, 4'-三甲氧基黄酮、槲皮素、5, 7, 3'-三羟基-6, 4'-二甲氧基黄酮和木犀草素均为自制, 经高效毛细管电泳仪检测, 质量分数均大于 98%。内标物为三硝基苯酚。小白蒿药材采自内蒙古通辽市扎鲁特旗罕山, 其加工工艺见表 1。乙腈为色谱纯 (天津市光复精细化工研究所), 水为超纯水, D₁₀₁ 大孔树脂 (天津市北联精细化学品开发有限公司), 其他试剂均为分析纯。

表 1 小白蒿的加工工艺

Table 1 Processing technology of *A. frigida*

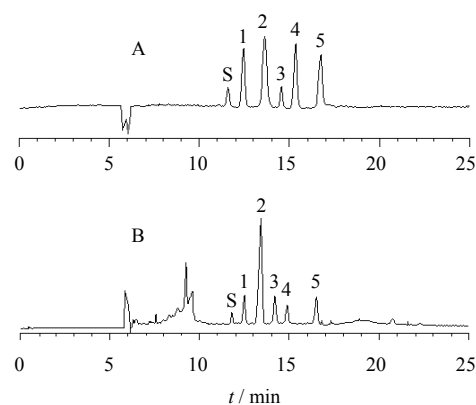
样 品	加工工艺	样 品	加工工艺
1	阴干	5	50 °C 干燥
2	曝光	6	60 °C 干燥
3	30 °C 干燥	7	70 °C 干燥
4	40 °C 干燥	8	80 °C 干燥

2 方法与结果

2.1 电泳条件

弹性石英毛细管柱 (50 cm×75 μm), 进样方

式为电动进样 15 s, 分离电压 18 kV, 毛细管温度 25 °C, 检测波长 283 nm。运行缓冲液为 0.25 mol/L 硼砂 30% 乙腈溶液。每天开机使用前均用 0.5 mol/L 盐酸溶液在 25 °C 下冲洗 10 min, 再用 0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液在 25 °C 下冲洗 10 min, 然后分别用 0.1 mol/L 盐酸溶液、0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液、超纯水和缓冲液冲洗 5 min。平行测定之间用 0.1 mol/L 氢氧化钠、超纯水和缓冲液在 25 °C 条件下各冲洗 5 min。在操作条件下, 所测 5 种黄酮类化合物的分离度良好, 结果见图 1。



1-5, 7, 3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮 2-5, 3'-二羟基-6, 7, 4'-三甲氧基黄酮
3-槲皮素 4-5, 7, 3'-三羟基-6, 4'-二甲氧基黄酮 5-木犀草素
S-三硝基苯酚

1-5, 7, 3'-triterhydroxy-4'-methoxyflavone 2-5, 3'-dihydroxy-6, 7, 4'-tritermethoxyflavone
3-quercetin 4-5, 7, 3'-triterhydroxy-6, 4'-dimethoxy-flavone
5-luteolin S-trinitrophenol

图 1 混和对照品 (A) 和样品 (B) 的电泳图

Fig. 1 Electropherograms of mixture reference substance (A) and sample (B)

2.2 对照品储备液及内标溶液的制备

精密称取 5 种黄酮对照品和内标物适量, 分别加乙腈溶解并配成质量浓度为 3 mg/mL 的对照品储备液和内标溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取样品 1.0 g, 精密称定, 加甲醇 20 mL, 超声处理 30 min, 滤过。吸取滤液 10 mL, 放入已装好 40 g D₁₀₁ 大孔树脂的色谱柱, 先用 20% 乙醇溶液 50 mL 洗脱, 再用无水乙醇 100 mL 洗脱。无水乙醇洗脱液减压回收至干, 加乙腈溶解并定容至 5 mL, 即得供试品溶液。

2.4 线性关系考察

精密吸取 5 种黄酮对照品储备液适量, 分别加入 10 μL 内标液, 加乙腈配制不同质量浓度的系

列对照品溶液,在上述电泳条件下分析测定。以对照品质量浓度为横坐标,对照品与内标物的峰面积比为纵坐标进行线性回归,得回归方程:5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮 $Y=0.114\ 3\ X+0.032\ 7$, $r=0.999\ 8$;5,3'-二羟基-6,7,4'-三甲氧基黄酮 $Y=0.100\ 9\ X+0.048\ 5$, $r=0.999\ 6$;槲皮素 $Y=0.055\ 5\ X+0.026\ 8$, $r=0.999\ 6$;5,7,3'-三羟基-6,4'-二甲氧基黄酮 $Y=0.113\ 2\ X-0.016\ 1$, $r=0.999\ 3$;木犀草素 $Y=0.097\ 9\ X-0.029\ 5$, $r=0.999\ 4$;表明5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮在1.00~40.00 $\mu\text{g/mL}$,5,3'-二羟基-6,7,4'-三甲氧基黄酮在10.00~200.00 $\mu\text{g/mL}$,槲皮素在5.00~100.00 $\mu\text{g/mL}$,5,7,3'-三羟基-6,4'-二甲氧基黄酮在1.00~40.00 $\mu\text{g/mL}$,木犀草素在1.00~40.00 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.5 精密度试验

在上述电泳条件下,精密吸取5种对照品储备液10 μL ,加入内标液10 μL ,乙腈定容至3 mL,电动进样15 s,记录其毛细管电泳谱图,连续测定6次,计算其峰面积比的RSD分别为1.02%、0.98%、1.85%、1.04%、1.76%。

2.6 稳定性试验

精密吸取样品1制备的供试品溶液0.5 mL,加入内标液10 μL ,乙腈定容至3 mL,在上述电泳条件下分别于0、4、8、16、24、36、48 h测定,计算得5种黄酮对照品峰面积比的RSD分别为1.73%、1.87%、1.08%、1.52%、1.54%。

2.7 重现性试验

取样品1 1.0 g,精密称定,共6份,制备供试品溶液,依法测定,记录其毛细管电泳谱图,根据回归方程计算5种黄酮类成分的质量分数,结果5种黄酮类成分质量分数的RSD分别为1.65%、1.32%、1.49%、1.86%、1.75%。

2.8 回收率试验

取已测定的样品1 6份,每份为0.5g,精密称定。分别加入5种黄酮对照品适量,依照上述方法制备供试品溶液并测定,并计算5种黄酮成分的回收率。结果5种黄酮成分的平均回收率分别为98.44%、97.75%、97.73%、97.98%、98.07%,RSD分别为1.60%、1.03%、1.57%、0.94%、1.20%。

2.9 样品测定

分别取1~8号样品,制备供试品溶液;精密吸取各供试品溶液0.5 mL,加入内标液10 μL ,乙腈定容至3 mL,在上述电泳条件下进行测定,并根据

回归方程计算5种黄酮成分的量。结果见表2。在阴干、曝光和30~80 $^{\circ}\text{C}$ 加热干燥8种加工工艺条件下,样品中5种黄酮成分的量有一定差异,且30~60 $^{\circ}\text{C}$ 时随温度上升各成分的量均有所升高,60 $^{\circ}\text{C}$ 时最大,而后逐渐变小。产生这种现象的原因可能是化合物到一定温度后不稳定所引起的。综合分析可知小白蒿的最佳加工工艺为60 $^{\circ}\text{C}$ 加热干燥。

表2 5种黄酮类成分测定结果($n=5$)
Table 2 Determination of five flavonoids ($n=5$)

样 品	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)				
	5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮	5,3'-二羟基-6,7,4'-三甲氧基黄酮	槲皮素	5,7,3'-三羟基-6,4'-二甲氧基黄酮	木犀草素
1	0.692	6.606	3.603	0.779	1.651
2	1.083	6.654	3.739	1.039	1.563
3	0.671	6.659	3.766	0.757	1.062
4	0.748	6.832	3.915	0.849	1.277
5	1.070	6.677	4.092	1.079	1.537
6	1.511	9.882	4.777	1.524	1.870
7	1.296	9.103	4.651	1.233	1.719
8	1.155	6.814	4.287	0.831	1.615

3 讨论

选择提取溶剂时,比较了氯仿、氯仿-甲醇(1:1)和甲醇等溶剂对5种黄酮类化合物的提取率。结果表明,甲醇的提取率不仅比其他两种溶剂的要高,而且预处理后的电泳图清晰,分离度较好。

预处理中先用20%乙醇50 mL洗脱,5种黄酮类化合物均没有洗脱下来,后用无水乙醇100 mL洗脱,5种黄酮类化合物均完全洗脱下来,且与其他杂质分离良好。

实验用5种对照品由药材经95%乙醇提取,氯仿层采用硅胶、Sephadex LH-20等柱色谱法分离,NMR等波谱学方法结构鉴定,并用高效毛细管电泳仪分别检测,其质量分数均高于98%。

加大毛细管柱两端电泳电压能缩短分析时间,但当电压增加到一定程度时黄酮类化合物的分离度下降,电泳电压加大后,还会使仪器噪音明显增大。综合考虑,实验采用电泳电压18 kV较好,既保持了仪器的低噪音,又能使黄酮类化合物有较好的分离度。

毛细管柱温度较低时,溶液黏度增大,淌度降低,峰形展宽,迁移时间延长;温度较高时,溶液

黏度减小,淌度增加,迁移时间缩短,分离度下降。25 ℃时 5 种对照品和内标物的峰形和分离度较好,分析完一个样品所需时间(20 min)适中,所以毛细管电泳的温度确定为 25 ℃。

选用几种缓冲体系进行实验,结果表明,硼砂缓冲体系对 5 种黄酮类化合物分离度较好。分别用 0.01、0.02、0.025、0.03、0.035 mol/L 5 种不同浓度的硼砂溶液考察了缓冲体系的浓度对黄酮类化合物分离度的影响,当硼砂浓度为 0.02 mol/L 以下时,5 种黄酮类化合物不能很好地分离;浓度为 0.03 mol/L 时,分离度增加,迁移时间延长。选用 0.025 mol/L 时,迁移时间适中,分离度和重现性均较好。

缓冲溶液中加入有机添加剂不仅能使不溶于水的被测物溶解度增大,而且还能有效地改善被测组分的分离度。5 种黄酮类化合物的水溶性均较差,却易溶于乙腈,实验考察了分别使用 10%、20%、30%、40%、50%乙腈配制的 0.025 mol/L 硼砂溶液对 5 种黄酮类成分分离情况的影响。结果表明 30%乙腈配制的硼砂溶液对 5 种黄酮类化合物既保证了较好的分离效果,又保证了较快的分析速度。

参考文献

- [1] 白清云. 中国医学百科全书 [M]. 赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 1986.
- [2] 内蒙古卫生厅. 内蒙古蒙药材标准 [M]. 赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 1987.
- [3] Liu Y L, Mabry T J. Sesquiterpene lactones from *Artemisia frigida* [J]. *J Nat Prod*, 1981, 44(6): 722-728.
- [4] Bohlmann F, Ang W, Trinks C, et al. Dimeric guaianolides from *Artemisia sieversiana* [J]. *Phytochemistry*, 1985, 24(5): 1009-1015.
- [5] 王青虎, 乌仁苏布德, 韩石柱, 等. 蒙药小白蒿中挥发性成分的 GC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 253-256.
- [6] 王青虎, 王金辉, 额尔登巴格那, 等. 蒙药小白蒿化学成分的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(10): 1540-1543.
- [7] 王青虎, 特格喜巴雅尔, 斯日棍其其格, 等. 蒙药小白蒿的质量标准研究 [J]. 中成药, 2010, 32(4): 616-619.
- [8] 李俊松, 宋建平, 刘训红, 等. 山茱萸饮片的高效毛细管电泳指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 1981-1985.
- [9] 仝战旗, 高建义, 陈丙跃. 高效毛细管电泳法测定复方苦参结肠溶胶囊中氧化苦参碱 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 725-727.