

HPLC 法测定不同产地荆芥中 6 种黄酮类成分

樊佳新¹, 王 帅^{1,2,3}, 孟宪生^{1,2,3*}, 包永睿^{1,2,3}, 李天娇^{1,2,3}

1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600

2. 辽宁省组分中药工程技术研究中心, 辽宁 大连 116600

3. 辽宁省现代中药研究工程实验室, 辽宁 大连 116600

摘 要: 目的 通过对不同产地荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* 中 6 种黄酮类成分的检测, 为其质量控制提供依据。方法 采用高效液相色谱 (HPLC) 法建立荆芥药材中黄酮类成分的检测方法, 并以 6 种黄酮类成分的量数据来源, 对其进行聚类分析。结果 不同产地荆芥中 6 种黄酮类成分的量差异较大, 木犀草苷、槲皮苷、橙皮苷、木犀草素、芹菜素、香叶木素的线性范围分别是 0.030~0.148 μg 、0.222~1.108 μg 、0.357~1.784 μg 、0.058~0.292 μg 、0.054~0.269 μg 、0.050~0.247 μg , 加样回收率为 96.32%~99.97%, $\text{RSD}<2.20\%$; 其中, 安徽产地聚为一类, 河南 1 与广东产地为聚一类, 河南 2、河北、云南、四川、湖北、甘肃产地聚为一类。结论 建立的方法简单、灵敏, 可用于荆芥的多指标成分的质量控制; 其次, 河南 1、河南 2、河北、云南、四川、湖北、广东、甘肃的亲缘关系较近, 可以作为同一药用来源。

关键词: 荆芥; HPLC; 黄酮; 聚类分析; 香叶木素; 木犀草苷; 槲皮苷; 橙皮苷; 木犀草素; 芹菜素

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)11-2292-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.11.023

Determination of six flavonoids in *Schizonepeta tenuifolia* from different areas by HPLC

FAN Jia-xin¹, WANG Shuai^{1,2,3}, MENG Xian-sheng^{1,2,3}, BAO Yong-rui^{1,2,3}, LI Tian-jiao^{1,2,3}

1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

2. Liaoning Province Component of traditional Chinese medicine and Engineering Research Center, Dalian 116600, China

3. Liaoning Province Modern Traditional Chinese Medicine Research and Engineering Laboratory, Dalian 116600, China

Abstract: Objective To detect the contents of six kinds of flavonoids in *Schizonepeta tenuifolia* from different areas, so as to provide a basis for their quality control. **Methods** Ultra performance liquid chromatography (UPLC) was used to establish the detection scheme of flavonoids content, and clustering analysis was conducted by the results of content detection. **Results** The contents of six kinds of flavonoids in *S. tenuifolia* from different areas had large differences. The linear ranges were: 0.030—0.148 μg for cynaroside, 0.222—1.108 μg for quercetin, 0.357—1.784 μg for hesperidin, 0.058—0.292 μg for luteolin, 0.054—0.269 μg for apigenin, and 0.050—0.247 μg for diosmetin, respectively. The average recovery rate was between 96.32% and 99.97%, $\text{RSD}<2.20\%$; Among this, the *Schizonepeta* Briq. herb from Anhui was as one class, the herbs from Henan 1 and Guangdong were as one class, and the herbs from Henan 2, Hebei, Yunnan, Sichuan, Hubei, and Gansu were as the other class. **Conclusion** The method used for quality control of the multi-index level in this experiment is simple and sensitive; on the other hand, the herbs from Henan 1, Henan 2, Hebei, Yunnan, Sichuan, Hubei, Guangdong and Gansu have a close relationship; They can be used as the same medicinal source.

Key words: *Schizonepeta* Briq.; HPLC; flavonoids; clustering analysis; diosmetin; cynaroside; quercitrin; hesperidin; luteolin; apigenin

荆芥为唇形科植物荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* Briq. 的干燥地上部分^[1], 具有解表、透疹的功效, 临床中多用作解表药。鉴于前期“谱效关系”实验

研究发现荆芥药材中 6 种黄酮类成分对于体外抗肿瘤作用具有一定的相关性^[2-4], 所以本实验以黄酮类成分为研究对象, 在前期研究的基础上^[5-6], 采用

收稿日期: 2016-11-29

基金项目: “十二五”重大新药创制科技重大专项 (2013ZX09507005-005); 辽宁省教育厅一般项目 (L201605, L201608)

作者简介: 樊佳新 (1991—), 女, 在读硕士研究生, 专业方向为药物分析。Tel: 15140349009 E-mail: fjx4834@163.com

*通信作者 孟宪生 Tel: (0411)85890185 E-mail: mxsvvv@126.com

HPLC 法同时测定荆芥药材中香叶木素、木犀草苷、槲皮苷、橙皮苷、木犀草素和芹菜素 6 种黄酮类成分的量,为进一步更好、更全面地控制其质量提供依据。

1 仪器与试药

Agilent 1290 Infinity II 超高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司,包括二元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器、OpenLAB CDS 色谱工作站);CP225D 电子分析天平(德国赛多利斯公司)。

荆芥药材(分别来自云南、安徽、河北、河南、四川、甘肃、广东、湖北)经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为唇形科植物荆芥的干燥地上部分;香叶木素、木犀草苷、槲皮苷、橙皮苷、木犀草素、芹菜素对照品(均购自中国食品药品检定研究院,质量分数 $\geq 98\%$,批号分别是 151103、151111、151016、160509、150415、150915);乙腈、甲酸、甲醇为色谱纯(Merck 公司),水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent poroshell SB-C₁₈ 色谱柱(100 mm $\times$ 4.6 mm, 2.7 μ m),流动相为 0.02%甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0~10 min, 12% B; 10~18 min, 12%~13% B; 18~25 min, 13%~14% B; 25~30 min, 14%~15% B; 30~50 min, 15%~20% B; 50~80 min, 20%~30% B; 80~85 min, 30%~50% B; 85~90 min, 50%~100% B, 体积流量 1.0 mL/min;柱温 30 $^{\circ}$ C;进样量 2 μ L;检测波长 283 nm。混合对照品及样品的液相色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取香叶木素、木犀草苷、槲皮苷、橙皮苷、木犀草素和芹菜素对照品适量,加甲醇,摇匀,制成含有木犀草苷、槲皮苷、橙皮苷、木犀草素、

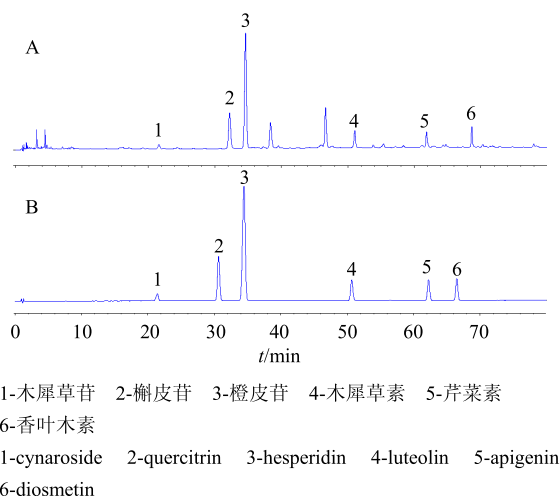


图 1 荆芥药材 (A) 和对照品 (B) 的液相色谱图

Fig. 1 HPLC of *Schizonepeta* Briq. samples (A) and reference substances (B)

芹菜素、香叶木素质量浓度分别为 14.8、110.8、178.4、29.16、26.88、24.7 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备^[5-6]

精密称取不同产地荆芥药材粉末 40.0 g,分别置圆底烧瓶中,加入 600 mL 75%乙醇溶液,回流提取 3 次,每次 1 h,经 HPD-300 型大孔吸附树脂纯化 2 次,洗脱液经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,制得供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 2、3、5、7、9、10 μ L,按“2.1”项色谱条件下进样分析,以各成分峰面积为纵坐标(Y),以进样量为横坐标(X),进行线性回归,结果见表 1。木犀草苷、槲皮苷、橙皮苷、木犀草素、芹菜素、香叶木素 6 种黄酮类成分在线性范围内与峰面积线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 2 μ L,

表 1 6 种黄酮类化合物的回归方程及线性范围

Table 1 Regression equations and linear ranges of six kinds of flavonoids

成分	回归方程	r	线性范围/ μ g
木犀草苷	$Y=1\ 278.9\ X-0.876\ 11$	0.999 5	0.030~0.148
槲皮苷	$Y=979.91\ X+0.063\ 72$	1.000 0	0.222~1.108
橙皮苷	$Y=1\ 891.7\ X+17.732$	0.999 9	0.357~1.784
木犀草素	$Y=1\ 815\ X-3.336\ 3$	0.999 9	0.058~0.292
芹菜素	$Y=1\ 916.7\ X+0.688\ 5$	0.999 9	0.054~0.269
香叶木素	$Y=2\ 059\ X-0.437\ 17$	0.999 5	0.050~0.247

按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,测定峰面积。结果木犀草苷、槲皮苷、橙皮苷、木犀草素、芹菜素、香叶木素峰面积的 RSD 分别为 0.28%、0.62%、0.81%、0.73%、1.93%、1.39%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 按“2.3”项下方法制备供试品溶液 1 份,于室温放置 0、3、6、12、24、48 h,按“2.1”项下色谱条件,以峰面积指标进样分析。结果木犀草苷、槲皮苷、橙皮苷、木犀草素、芹菜素、香叶木素 48 h 内峰面积的 RSD 分别为 0.67%、0.66%、0.28%、1.42%、1.91%、0.71%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.4.4 重复性试验 取同一批药材粉末 6 份,精密称定,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行分析。结果木犀草苷、槲皮苷、橙皮苷、木犀草素、芹菜素、香叶木素质量分数的 RSD 分别为 1.04%、0.50%、0.98%、1.31%、1.37%、

0.72%,表明方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取已测定的荆芥药材 6 份,每份约 0.5 g,分别精密加入含木犀草苷 25.01 $\mu\text{g/mL}$ 、槲皮苷 239.2 $\mu\text{g/mL}$ 、橙皮苷 211.4 $\mu\text{g/mL}$ 、木犀草素 48.78 $\mu\text{g/mL}$ 、芹菜素 25.03 $\mu\text{g/mL}$ 、香叶木素 45.61 $\mu\text{g/mL}$ 混合对照品溶液 10 mL,按照“2.3”项下制成供试品溶液,按“2.1”项下分析,计算回收率,木犀草苷、槲皮苷、橙皮苷、木犀草素、芹菜素、香叶木素的平均回收率分别为 99.61%、99.97%、96.32%、99.30%、97.97%、96.42%; RSD 分别为 0.34%、0.68%、2.20%、0.48%、1.31%、2.11%。

2.5 样品测定

分别取 9 种不同产地荆芥药材粉末 2.0 g,精密称定,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定峰面积,并用外标法计算样品中木犀草苷、槲皮苷、橙皮苷、木犀草素、芹菜素、香叶木素的量,结果见表 2。

表 2 不同产地荆芥 6 种成分测定结果

Table 2 Results of different samples

产地	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)					
	木犀草苷	槲皮苷	橙皮苷	木犀草素	芹菜素	香叶木素
安徽	4.541 5	6.429 0	4.437 4	1.093 9	0.358 1	1.054 8
河南 2	1.570 3	2.328 6	2.448 5	0.580 9	0.327 5	0.382 4
河南 1	0	3.847 2	4.229 9	0.635 2	0.544 0	0.353 1
河北	0	3.346 5	2.439 2	1.197 5	0.161 8	0.435 7
云南	1.797 3	3.888 4	3.664 7	1.194 4	0.423 4	0.511 1
四川	1.910 8	4.213 2	3.644 9	0.857 9	0.523 8	0.527 7
湖北	0.500 4	4.778 2	4.227 7	0.975 8	0.501 0	0.911 5
广东	2.960 9	2.478 6	3.065 4	1.207 6	0.326 4	0.432 8
甘肃	1.565 6	3.170 7	4.158 1	0.804 1	0.599 4	0.501 0

由表 2 可以看出,9 批来自不同产地的荆芥药材中 6 种黄酮类成分的量差异较大,其中芹菜素、木犀草素与香叶木素的量相对于槲皮苷、橙皮苷在样品中较低。

2.6 聚类分析

以表 2 中 6 种黄酮类成分的量影响因素进行聚类分析,其结果显示(图 2),9 种产地药材共分为 3 类,安徽产地药材为第 1 类,河南 1 与广东产地药材聚为第 2 类,河南 2、河北、云南、四川、湖北与甘肃产地药材聚为第 3 类。

3 讨论

荆芥,药用部分为干燥地上部分,具有解表散风、透疹等功效,为我国传统中药之一。我国大部分地区均有分布,但主产于安徽、湖北、河北等地,多系人工栽培。夏秋两季开花到顶部,穗绿时采割。

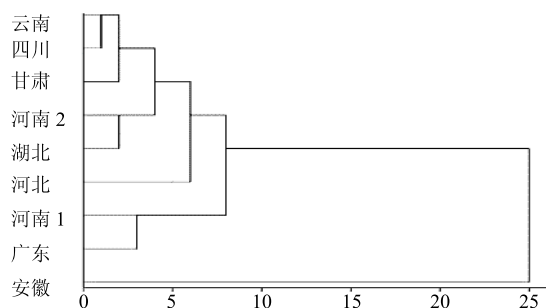


图 2 不同产地药材聚类分析结果

Fig. 2 Clustering analysis of different samples

《中国药典》2015 年版规定:合格的荆芥药材中挥发油的量不得低于 0.60%^[1],本研究从其余的非挥发类黄酮成分入手,对其荆芥黄酮类成分进行含量检测,从而进一步弥补其药典中单一挥发油类成分进行质量检测的不足。

其定量测定结果显示,不同产地荆芥药材具有一定的差异性,其中木犀草苷、槲皮苷、橙皮苷和香叶木素量最高的为安徽,分别为 4.541 5、6.429 0、4.437 4、1.054 82 mg/g;木犀草素量最高的为广东,为 1.207 6 mg/g;芹菜素量最高的为甘肃,为 0.599 4 mg/g,其中不难发现 6 种化学成分量多以安徽产地药材量最多。相关文献报道显示芹菜素对多种肿瘤细胞具有一定的抑制作用,尤其是女性生殖系统肿瘤^[7];槲皮苷具有止咳平喘、抗炎、抗氧化、抗癌等多种药理作用,其中抗肝癌作用报道较多^[8];木犀草素对于神经系统以及心血管系统具有一定的保护作用,可以减少炎症因子对机体造成的损伤,并且还可以抑制肿瘤细胞的增殖^[9];橙皮苷具有抗肿瘤、抗心律失常、舒张血管、调整脂质代谢等多种作用,对心肌缺血以及自发性高血压也具有一定的治疗作用^[10];木犀草苷具有较强的呼吸系统的杀菌作用,多数药理实验研究表明为治疗咳、痰、喘等症状的良药^[11];香叶木素具有诱导肿瘤细胞凋亡以及升高血压的作用^[12];鉴于上述文献调研的结果可以清楚地说明虽然 6 种成分均属于黄酮类成分,但是由于其结构的微小差异导致其具有不同的药理活性。本实验根据 6 种化学成分的量指标进行聚类分析,结果显示:安徽产地药材为第一类,河南 1 与广东产地药材聚为第 2 类,河南 2、河北、云南、四川、湖北与甘肃产地药材聚为第 3 类。一方面,可以更加有针对性地根据病例选择不同产地的药物,加大药物使用的特异性及精准性。另一方面,更加充分地表明非挥发性成分的量检测可以进一步

完善荆芥药材多指标成分质量控制评价体系,为其质量的准确控制提供一定的实验依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 胡军华,刘莉莉,张艳军,等. HPLC 法同时测定不同产地紫苏叶和荆芥中咖啡酸和迷迭香酸 [J]. 中草药, 2015, 46(14): 2155-2159.
- [3] 张援虎,胡峻,石任兵,等. 荆芥化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(13): 1118-1119.
- [4] 樊佳新,王帅,孟宪生,等. 基于微流控芯片技术的荆芥诱导肺肿瘤细胞凋亡谱效关系研究 [J]. 药学报, 2017, 52(1): 126-131.
- [5] 马聪,王帅,孟宪生,等. 基于灰色关联度分析的荆芥抗 Caco-2 细胞总黄酮纯化工艺研究 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1615-1619.
- [6] 马聪,包永睿,孟宪生,等. 基于层次分析和量效对比法优选荆芥总黄酮提取工艺 [J]. 中药材, 2015, 38(2): 381-385.
- [7] 王海娣,刘艾林,杜冠华. 芹菜素药理作用的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(18): 1561-1565.
- [8] 杨琳. 槲皮苷药理活性研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(6): 61-62.
- [9] 王继双,何焱,张文静,等. 木犀草素的药理作用研究进展 [J]. 生命科学, 2013, 25(6): 560-565.
- [10] 李雪飞,江洪. 橙皮苷药理学作用机制及研究进展 [J]. 海南医学, 2016, 27(14): 2337-2340.
- [11] 管仁伟,曲永胜,顾正位,等. 木犀草苷的药理作用研究 [J]. 中国野生植物资源, 2014, 33(1): 1-3.
- [12] 杨阳,林满洲,黄艺文,等. 香叶木素诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡及周期阻滞的机制研究 [J]. 海南医学, 2016, 27(3): 354-357.