

线叶菊有效部位 HPLC 特征图谱研究及 5 种成分含量测定

吕邵娃¹, 赵敏¹, 赵爽¹, 陈智力¹, 匡海学¹, 王秋红^{1,2*}

1. 黑龙江中医药大学 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 广东药科大学, 广东 广州 510024

摘要: 目的 建立 10 个不同批次线叶菊有效部位醋酸乙酯层的 HPLC 特征图谱, 并测定 5 种成分的含有量。方法 线叶菊有效部位的分析采用色谱柱 Thermo Acclaim™120 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈 (B)-PBS (A) 系统 (0.1 mol/L 磷酸二氢钠和 2%冰醋酸 1:1 混合), 梯度洗脱, 检测波长 360 nm, 体积流量 0.8 mL/min, 柱温 35 ℃。结果 建立了线叶菊有效部位 HPLC 特征图谱, 确立了 10 个共有峰。测定的 5 种成分异荭草素、异牡荆苷、异槲皮苷、木犀草苷、异鼠李素-3-*O*-β-*D*-葡萄糖分别在 0.018~0.108、0.066 8~0.400 8、0.088~0.528、0.118 4~0.710 4、0.017 6~0.105 6 μg 范围内线性关系良好, 平均加样回收率分别为 98.67%、97.93%、98.95%、99.81%、97.33%, RSD 分别为 1.10%、0.93%、1.10%、0.62%、1.48%。10 批药材中 8 个批次样品的相似度在 0.9 以上, 其中 2 批样品的相似度为 0.688、0.695, 含量偏低, 差异性较大。各采收期样品中 5 种成分含有量差异明显, 开花率高的药材黄酮类成分的含量高, 提示线叶菊药材黄酮类成分的高低与采收期开花率有关。结论 该方法建立了线叶菊有效部位的 HPLC 特征图谱, 确定了共有特征峰, 可用于线叶菊药材的质量控制。

关键词: 线叶菊有效部位; HPLC 特征图谱; 含量测定; 异荭草素; 异牡荆苷; 异槲皮苷; 木犀草苷; 异鼠李素-3-*O*-β-*D*-葡萄糖苷

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)05-1160-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.05.026

Study on HPLC specific chromatograms of effective parts and determination of five components of *Filifolium sibiricum*

LV Shao-wa¹, ZHAO Min¹, ZHAO Shuang¹, CHEN Zhi-li¹, KUANG Hai-xue¹, WANG Qiu-hong^{1,2}

1. Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine and Effective Substance Basis of Natural Medicine, Key Laboratory of Basis and Application Research of North Medicine, Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510024, China

Abstract: Objective To establish the HPLC specific chromatograms of the ethyl acetate layer in ten batches of effective parts of *Filifolium sibiricum* and to determine the contents of five components. **Methods** The analysis of effective parts of *F. sibiricum* was performed on a Thermo Acclaim™120 C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile (B)-PBS (A) (0.1 mol/L sodium dihydrogen phosphate-2% glacial acetic acid, 1:1) as the mobile phase in a gradient elution mode, the detection wavelength was set at 360 nm, the flow rate was 0.8 mL/min, and the column temperature was 35 ℃. **Results** The specific chromatograms of *F. sibiricum* effective parts were established and ten common peaks were designated. Among them, five components including isorientin, isovitexin, isoquercitrin, luteoloside and isorhamnetin-3-*O*-β-*D*-glucose all showed good linear relationship within the ranges of 0.018—0.108, 0.066 8—0.400 8, 0.088—0.528, 0.118 4—0.710 4 and 0.017 6—0.105 6 μg, respectively. The average recovery was 98.67%, 97.93%, 98.95%, 99.81%, and 97.33% with the RSD value at 1.10%, 0.93%, 1.10%, 0.62%, and 1.48%, respectively. Moreover, the similarity of the eight batches of samples was above 0.9 in the ten batches of medicinal herbs, the similarity of the two batches of which was 0.688 and 0.695, indicating that its content was lower and the difference was greater. In addition, there were significant differences in the content of five components in each harvest time. The content of flavonoids in medicinal herbs was

收稿日期: 2017-08-19

基金项目: 国家“十一五”重大新药创制项目 (2009ZX09103358); 黑龙江中医药大学创新人才基金 (优秀学术带头人项目)

作者简介: 吕邵娃 (1971—), 女, 教授, 博士, 研究方向为中药药效物质基础及新药开发。Tel: (0451)87266916 E-mail: lswwa5599@sina.com

*通信作者 王秋红 (1969—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向主要为中药炮制研究、中药药效物质基础及新药开发工作。

Tel: (020)39353242 E-mail: QiuHong_Wang@hotmail.com

higher with high flower percentage. It was suggested that the content of flavonoids in *F. sibiricum* was related to the flower percentage of harvest period. **Conclusion** The HPLC specific chromatograms of the *F. sibiricum* effective parts were established and the common characteristic peaks were determined, which could be used for quality control of the *F. sibiricum*.

Key words: effective parts of *Filifolium sibiricum*; HPLC specific chromatograms; determination; isorientin; isovitexin; isoquercitrin; luteoloside; isorhamnetin-3-*O*- β -D-glucose

随着环境污染的加剧和抗生素滥用,细菌耐药性问题愈加严重,中药在治疗上述疾病方面的具有显著的优势^[1]。线叶菊是菊科线叶菊属植物线叶菊 *Filifolium sibiricum* (L.) Kitam. 的干燥全草,以其为原料开发的线叶菊总黄酮胶囊是一种抗耐药性细菌感染的创新药物。前期研究结果显示线叶菊有效部位对耐药金黄色葡萄球菌、耐药大肠杆菌、耐药绿脓杆菌、耐药肺炎克雷伯氏菌等耐药性细菌显示出较强的抑菌和杀菌作用,具有抗炎、抗菌、镇静、镇痛、镇咳、解热的作用,对慢性支气管炎和肾盂肾炎治疗作用显著^[2-3]。研究发现线叶菊药材抗菌活性与其化学成分含量有关^[4-6]。同时,线叶菊有效部位中含有众多结构相近的黄酮类化合物,所以建立全成分的图谱一般需要较长的分析时间,目前研究鲜见对线叶菊指纹图谱研究的报道,质量控制亦是局限在对总黄酮成分的定量测定方面,特征性不强^[7-8]。中药特征图谱能够对同一药材群体化学成分和相似性进行表征,可以反映特征性化学成分的种类和数量,能够比较全面、综合地控制中药的质量。本实验对不同批次的线叶菊有效部位建立 HPLC 特征图谱,比较分析指纹特征的异同及谱图的专属性,并测定其中 5 种主要成分的含量,旨在建立线叶菊药材多指标质量控制体系,为线叶菊抗耐药性新药研究提供借鉴。

1 仪器与材料

UltiMate3000 HPLC(美国戴安公司); AB265-S 分析电子天平(美国 METTLER-TOLEDO 公司); SB25-12DTD 超声清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司); 电热恒温水浴锅(北京科伟永鑫实验仪器设备厂); SHB-III 循环水式多用真空系(郑州长城科工贸有限公司); BUCHI R-210 型旋转蒸发器(瑞士步琪有限公司)。

甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Fisher Scientific),乙醇(分析纯,天津市广成化学试剂有限公司),冰醋酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司),磷酸二氢钠(天津市致远化学试剂有限公司),其余试剂均为分析纯,实验用水为娃哈哈纯净水。

对照品异荛草素(批号 4261-42-1)、木犀草苷(批号 5373-11-5)、异鼠李素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷(批号 5041-82-7)、异牡荆苷(批号 29702-25-8)、异槲皮苷(批号 21637-25-2)均来自于中国食品药品检定研究院。不同批次线叶菊药材分别采收于 2014 年 6—8 月黑龙江省大庆市林甸县,经黑龙江中医药大学研究生院王振月教授鉴定为菊科线叶菊属植物线叶菊 *Filifolium sibiricum* (L.) Kitam. 全草(表 1)。

表 1 线叶菊药材样品信息

Table 1 Samples information of *F. sibiricum*

编号	采收时间	形态
S1	2014-06-10	100%开花率
S2	2014-06-22	20%开花率
S3	2014-07-07	40%开花率
S4	2014-07-13	未开花率
S5	2014-07-21	90%开花率
S6	2014-07-30	60%开花率
S7	2014-08-09	20%开花率
S8	2014-08-15	未开花率
S9	2014-08-19	100%开花率
S10	2014-08-26	70%开花率

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

取异荛草素、异牡荆苷、异槲皮苷、木犀草苷、异鼠李素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷对照品适量,精密称定,分别加 40%甲醇制成异荛草素 0.450 mg/mL、异牡荆苷 0.344 mg/mL、异槲皮苷 0.440 mg/mL、木犀草苷 0.592 mg/mL、异鼠李素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷 0.440 mg/mL 的单一对照品溶液,精密量取适量的单一对照品溶液,置于 5 mL 量瓶中稀释,定量成异荛草素 9.0 μ g/mL、异牡荆苷 34.4 μ g/mL、异槲皮苷 44.0 μ g/mL、木犀草苷 59.2 μ g/mL、异鼠李素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷 8.8 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

将采集的线叶菊全草阴干,碎段,精密称取 20 g, 50%乙醇加热回流提取,去除叶绿素,滤液上大

孔吸附树脂柱,洗脱液减压回收溶剂至干,作为线叶菊有效部位。取上述有效部位加水溶解,用等量醋酸乙酯萃取 2 次,合并 2 次萃取液,回收溶剂,得醋酸乙酯萃取物,加 40% 甲醇配制成 1 mg/mL 的溶液作为供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱: Thermo Acclaim™120 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1 mol/L 磷酸二氢钠与 2% 冰醋酸 1:1 混合水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱, 0~60 min, 12%~18% B; 柱温 35 °C; 检测波长 360 nm; 分析时间 60 min; 体积流量 0.8 mL/min; 进样量: 10 μL。理论塔板数按异荛草素计算不低于 5 000, 5 种成分与其他组分分离良好, 分离度均大于 1.50, 见图 1。

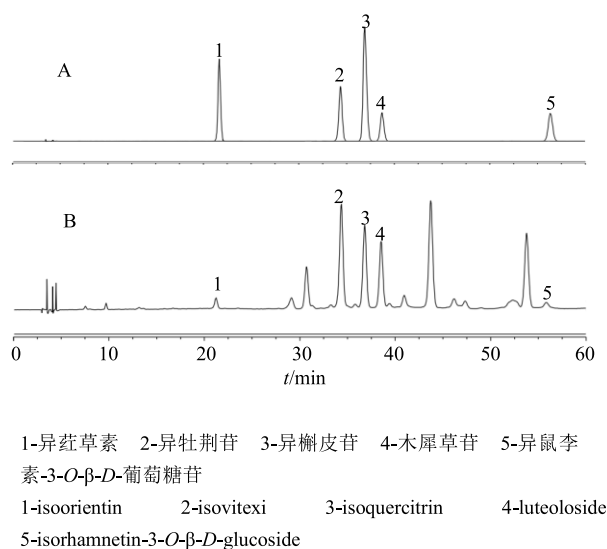


图 1 对照品 (A) 和样品 (B) HPLC 色谱图

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

2.4 指纹图谱方法学考察^[9-10]

2.4.1 精密度试验 精密吸取同一份供试品溶液 (S1 样品) 10 μL, 连续进样 6 次, 结果 6 次进样的各共有峰保留时间与峰面积的 RSD 值均小于 3.0%, 表明仪器精密度良好, 符合指纹图谱研究要求。

2.4.2 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液 (S1 样品) 10 μL, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样, 结果 6 次进样的各共有峰保留时间与峰面积的 RSD 值均小于 3.0%, 表明 24 h 内供试品溶液稳定性较好, 符合指纹图谱研究要求。

2.4.3 重复性试验 取同一采收期样品 (S1 样品), 依法制备 6 份供试品溶液并进样分析, 结果 6 份供试品的各共有峰保留时间与峰面积的 RSD 值均小于 3.0%, 表明重复性良好, 符合指纹图谱研究要求。

2.5 定量测定

2.5.1 线性关系考察 精密量取“2.1”项下混合对照品溶液, 按照“2.3”项下色谱条件测定。横坐标 (X) 为对照品溶液的质量, 纵坐标 (Y) 为峰面积, 绘制标准曲线, 结果见表 2, 表明各成分在各自范围内均呈良好的线性关系。

2.5.2 精密度试验 取“2.1”项下混合对照品溶液, 按照“2.3”项下色谱条件进样 6 次, 测得异荛草素、异牡荆苷、异槲皮苷、木犀草苷、异鼠李素-3-O-β-D-葡萄糖苷 5 种成分的峰面积的 RSD 值分别为 1.10%、0.23%、0.63%、0.41%、0.68%, 表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液 (S1 样品) 10 μL, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样, 测得异荛草素、木犀草苷、异鼠李素-3-O-β-D-葡萄糖苷、异牡荆苷、异槲皮苷 5 种成分峰面积的

表 2 5 种成分的线性关系

Table 2 Linear relationships of five constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/μg
异荛草素	$Y=26.399 X-0.009 4$	0.999 8	0.018 0~0.108 0
异牡荆苷	$Y=29.525 X-0.019 1$	1.000 0	0.066 8~0.400 8
异槲皮苷	$Y=27.511 X-0.027 0$	1.000 0	0.088 0~0.528 0
木犀草苷	$Y=35.461 X-0.055 9$	1.000 0	0.118 4~0.710 4
异鼠李素-3-O-β-D-葡萄糖苷	$Y=22.927 X-0.031 5$	0.999 9	0.017 6~0.105 6

RSD 值均小于 3.0%, 表明 24 h 内供试品溶液稳定性较好。

2.5.4 重复性试验 取同一采收期样品 (S1 样品), 依法制备 6 份供试品溶液按照“2.3”项下色谱条件

进样分析, 测得异荛草素、木犀草苷、异鼠李素-3-O-β-D-葡萄糖苷、异牡荆苷、异槲皮苷 5 种成分相对峰面积的 RSD 值均小于 3.0%, 表明该方法的重复性良好。

2.5.5 加样回收率试验 精密称取含量已知的样品 (S1 样品) 6 份, 每份约 20 mg 加入适量对照品溶液, 按照“2.3”项色谱条件测定, 计算回收率, 异荭草素、木犀草苷、异鼠李素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷、异牡荆苷、异槲皮苷平均加样回收率分别为 98.67%、97.93%、98.95%、99.81%、97.33%; RSD 值分别为 1.10%、0.93%、1.10%、0.62%、1.48%。

3 结果与分析

3.1 线叶菊有效部位 HPLC 特征图谱的建立

取不同采收期的 10 批线叶菊样品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 进行检测, 得各样品的 HPLC 谱图, 通过《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2010 版软件, 以 S1 为指定参照谱图, 采用中位数法, 时间窗宽度为 0.2, 经比较分别确立了 10 个采收期样品的 HPLC 特征图谱 (图 2)。根据各批样品 HPLC 特征图谱的各共有峰相对保留时间及相对峰面积的相关参数, 对共有峰峰面积较稳定的色谱峰进行标定 (图 3), 共标定出 10 个共有峰。经与对照品比对确定 2、4、5、6、10 号峰分别为异荭草素、异牡荆苷、异槲皮苷、木犀草苷、异鼠李素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷。

3.2 线叶菊有效部位 HPLC 特征图谱相似度评价

取不同采收期 10 批线叶菊药材, 按“2.3”项下色谱条件检测, 数据通过国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004 A 版) 进行相似度分析, S1~S10 分别为 0.959、0.901、0.987、0.688、0.959、0.958、0.969、0.695、0.973、0.950, 其中 S4、S8 药材的相似度具有很大的差异性。

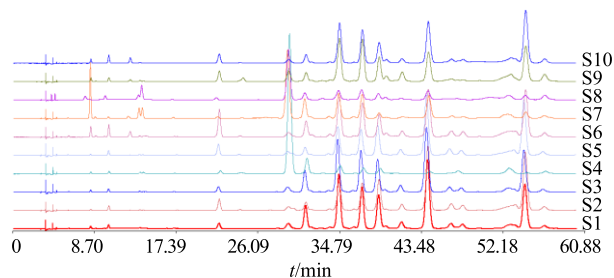


图 2 HPLC 特征图谱

Fig. 2 HPLC specific chromatogram

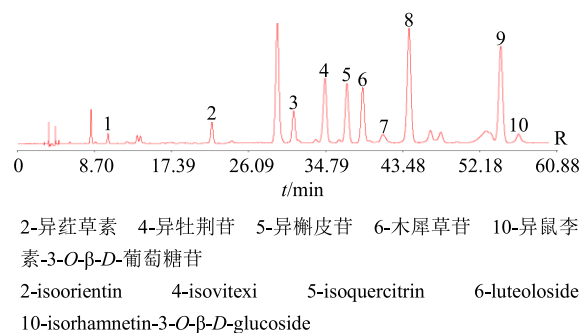


图 3 对照指纹图谱

Fig. 3 Reference chromatogram

3.3 样品测定

精密称取 10 批样品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3”项色谱条件下测定, 结果见表 3。

4 讨论

4.1 供试品溶液制备方法的考察

线叶菊有效部位成分较为多样, 且理化性质接近, 因此本实验分别采用甲醇超声、稀乙醇超声以及醋酸乙酯萃取 3 种不同的处理方式对样品进行处

表 3 5 种成分含量测定结果

Table 3 Results of content determination of five constituents

批次	异荭草素/(mg·g ⁻¹)	异牡荆苷/(mg·g ⁻¹)	异槲皮苷/(mg·g ⁻¹)	木犀草苷/(mg·g ⁻¹)	异鼠李素-3- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷/(mg·g ⁻¹)
S1	6.097	70.279	58.097	35.828	4.131
S2	10.840	36.442	34.309	30.828	4.771
S3	11.227	45.812	37.848	23.528	7.764
S4	3.127	11.035	7.870	7.917	4.124
S5	12.214	56.732	49.580	28.629	8.845
S6	25.675	49.238	42.104	20.470	4.890
S7	11.729	22.709	32.788	25.388	4.137
S8	2.675	9.113	15.249	11.394	6.670
S9	10.642	56.762	57.664	22.338	9.278
S10	9.078	50.121	43.399	19.850	5.064

理,对有效部位进行了提取方法考察,从而得到了较清晰、稳定的特征图谱。结果表明,3个方法的预处理中,醋酸乙酯萃取后图谱中,各峰分离效果良好,峰形稳定;故样品前处理方法选取水溶解后用醋酸乙酯萃取。

4.2 色谱条件的考察

分别考察了乙腈-水(0.1%磷酸)、乙腈-PBS系统(0.1 mol/L 磷酸二氢钠和 2%冰醋酸以 1:1 混合)流动相系统。从结果得知,乙腈-PBS 系统比乙腈-水(0.1%磷酸)的峰形好,所以选择乙腈-PBS 系统作为流动相并得到较好的分离。根据黄酮类成分的紫外吸收特点,选取了 254、280、360、380 nm 4 个波长。选择 360 nm 作为测定波长,分离度和峰形都比较理想,大部分色谱峰在此波长吸光度较大。考察了 25、30、35 °C 等柱温对图谱的影响,发现随着温度的降低,出峰时间滞后且峰形变差,故选择 35 °C 为本次实验的柱温。在其他色谱条件一致的情况下,分别对 0.8、1.0、1.2 mL/min 的体积流量条件进行考察。结果表明,不同的分析体积流量对本品色谱峰的分离影响很大,随着体积流量的增加,峰形变差,选择 0.8 mL/min 的体积流量较为适宜。

4.3 不同批次线叶菊有效部位 HPLC 特征谱图的比较

线叶菊有效部位的 HPLC 特征谱图发现,相似度差别较大的两批药材均为无花药材。同时,不同采收批次的药材黄酮类成分的含量也有明显不同,其中开花率较高的药材黄酮含量也较高,而上述 2 批无花药材黄酮含量最低。由此可知,不同批次的线叶菊药材有效成分含量受到花期和开花率的影响较大。为了提高药材中黄酮类成分的含量,非常有必要建立一种能够快速反映多指标性成分含量的定量方法。

中药特征图谱是在中药指纹图谱研究的基础上,忽略由于产地、采收期以及加工工艺等方面的

差异所产生相对峰面积较小或者重现性较差的色谱峰,选择特征性和重现性较好的色谱峰组合作为特征图谱,使得图谱更具特征性、整体性和模糊性等特点,是中药质量控制未来发展的主要方向。本实验建立的特征图谱可对不同批次线叶菊药材进行特征识别,测定方法可对异荛草素、异牡荆苷、异槲皮苷、木犀草苷、异鼠李素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷的含量进行分析,能分别从定性与定量 2 个方面对线叶菊的质量进行控制。

参考文献

- [1] 王秋红,刘玉婕,吕邵娃,等.线叶菊抗菌作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(22):142.
- [2] 匡海学,吕邵娃,王秋红,等.线叶菊抗感染有效部位对大鼠肾盂肾炎的疗效[J].中国实验方剂学杂志,2011,10(20):141-144.
- [3] 刘玉婕,王秋红,肖洪彬,等.线叶菊总黄酮部位治疗慢性支气管炎的初步药理作用研究[J].中成药,2012,34(6):1160-1163.
- [4] 王秋红,刘玉婕,匡海学,等.线叶菊抗感染有效部位化学成分的研究(I)[J].中草药,2012,43(1):43-46.
- [5] 刘玉婕,王秋红,匡海学,等.线叶菊抗感染有效部位化学成分的研究(II)[J].中医药学报,2011,39(4):67-69.
- [6] 吕邵娃,杨阳,赵爽,等.线叶菊抗耐药性细菌感染有效部位的抗菌活性谱效关系[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(23):63-68.
- [7] 王俊杰,马睿婷,乔俊缠,等.线叶菊的高效液相色谱指纹图谱研究[J].时珍国医国药,2015,26(5):1141-1143.
- [8] 杨卿,李杰,朱庆玲.线叶菊总黄酮测定的方法学研究[J].长治医学院学报,2009,23(6):415-417.
- [9] 闫慧娇,王志伟,赵恒强,等.菏泽牡丹花 HPLC 特征图谱研究及 8 种成分测定[J].中草药,2017,48(9):1886-1871.
- [10] 何燕宁,赵引利,杨冬丽,等.不同产地及采收期的葎草中木犀草苷、芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷、木犀草素定量比较研究[J].中草药,2016,47(20):3707-3771.