

HPLC 测定大风艾中 5 种二氢黄酮类成分的含量

谭道鹏^{1,2}, 杜艺玫¹, 秦琳¹, 鲁艳柳¹, 张倩茹¹, 何芋岐^{1*} (1.遵义医科大学药学院, 贵州 遵义 563009; 2.贵州医科大学省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550014)

摘要: 目的 测定大风艾药材中 3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮、3',5,5',7-四羟基二氢黄酮、3,3',4',5-四羟基-7-甲氧基二氢黄酮、3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮、艾纳香素 5 种二氢黄酮类成分的含量。方法 采用高效液相色谱法测定, 色谱柱为 AKZONOBEL Kromasil 100-5C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.2%冰醋酸(B), 梯度洗脱(0~10 min, 20%A; 10~15 min, 20%→25%A; 15~25 min, 25%A; 25~50 min, 25%→65%A); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 289 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μL。结果 5 种二氢黄酮类成分的线性关系良好, 加样回收率为 98.73%~101.84%。结论 该方法简便、准确, 可用作大风艾药材质量控制的方法。

关键词: 大风艾; 二氢黄酮; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2021)05-0615-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.05.019

引用本文: 谭道鹏, 杜艺玫, 秦琳, 等. HPLC 测定大风艾中 5 种二氢黄酮类成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(5): 615-618.

Simultaneous Determination of Five Flavanones in *Blumea Balsamifera* by HPLC

TAN Daopeng^{1,2}, DU Yimei¹, QIN Lin¹, LU Yanliu¹, ZHANG Qianru¹, HE Yuqi^{1*} (1.School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563009, China; 2.State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine content of 5 flavanones of 3,3',5,7- tetrahydroxy-4'-methoxyflavanone, 3',5,5',7-tetrahydroxy-flavanone, 3,3',4',5-tetrahydroxy-7-methoxyflavanone, 3,3',5-trihydroxy-4',7-dimethoxyflavanone, 5-blumeatin in *Blumea balsamifera*. **METHODS** The chromatographic separation was achieved on AKZONOBEL Kromasil 100-5C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column with the mobile phase consisting of acetonitrile(A)-0.2% HAc(B) by gradient elution program(0-10 min, 20%A; 10-15 min, 20%→25%A; 15-25 min, 25%A; 25-50 min, 25%→65%A) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, detection wavelength was set at 289 nm, and the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 10 μL. **RESULTS** Linearity relationships of 5 flavanones were good, and the average recoveries were from 98.73% to 101.84%. **CONCLUSION** The method is simple, accurate and repeatable and it is suitable for quality control of *Blumea balsamifera*. **KEYWORDS:** *Blumea balsamifera*; flavanones; content determination

大风艾又名艾纳香、冰片艾、大黄草等, 是菊科植物艾纳香 *Blumea balsamifera* 的干燥叶或嫩枝, 主产于贵州、云南、广西、广东等地^[1], 具有温中活血、调经、祛风除湿的功效^[2]。大风艾中含有丰富的黄酮类成分, 其中以二氢黄酮类成分为主^[3-6], 具有清除自由基^[7]、保护肝损伤^[8]及抑制肺癌细胞增殖和转移^[9]的作用。大风艾药材中不同成分的含量测定已有部分报道^[10-13], 但这些研究仅限于 1~2 个化学成分, 且这些成分在药材中的含量较低, 不具有代表性。为更好地评价大风艾药材的质量, 本研究在前期^[4-6]对大风艾化学成分的研究基础上, 采用 HPLC 测定大风艾药材中 5 种主要二氢黄酮类成分的含量, 可以为大风艾药材的质量控制及其药用开发提供参考。

1 仪器和试剂

高效液相色谱仪包含 Waters e2695 Separations Module 系统, Waters 2998 二极管阵列检测器(PDA)和 Empower 软件(美国 Waters 公司)。BT25S 天平[赛多利斯(上海)有限公司]; DK-S24 型恒温水浴锅(广州市默菲仪器有限公司)。

3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮、3',5,5',7-四羟基二氢黄酮、3,3',4',5-四羟基-7-甲氧基二氢黄

基金项目: 贵州医科大学药用植物功效利用国家重点实验室资助项目(FAMP201909K); 贵州省科技计划项目(黔科合平台人才[2017]5101, [2019]5657 号); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究项目(QZYY-2019-056)

作者简介: 谭道鹏, 男, 博士, 副教授 Tel: 13538201893 E-mail: tdp2003@163.com *通信作者: 何芋岐, 男, 博士, 教授 Tel: 13538201893 E-mail: HyqJeff@foxmail.com

酮、3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮、艾纳香素对照品分离自大风艾药材^[4-6],经 NMR、HPLC 检测纯度>98%。乙腈为色谱纯,水为蒸馏水,其他试剂为分析纯。

大风艾药材(批号:1101,1102)于2018年11月分别采自贵州罗甸、望谟;大风艾药材(批号:1001)于2018年10月采自广西玉林;大风艾药材(批号:0819)于2020年8月采自贵州江口,经遵义医科大学吴发明副教授鉴定为艾纳香 *Blumea balsamifera* 的干燥叶及嫩枝,样品标本保存于遵义医科大学药学院药学实验中心。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:AKZONOBEL Kromasil 100-5C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.2%冰醋酸(B),梯度洗脱(0~10 min,20%A;10~15 min,20%→25%A;15~25 min,25%A;25~50 min,25%→65%A);流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:289 nm;柱温:35℃;进样量:10 μL。对照品及样品高效液相色谱图见图1。

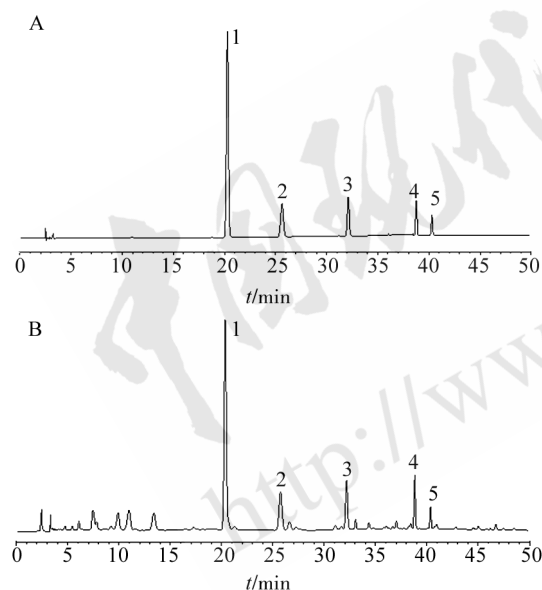


图1 高效液相色谱图

A-对照品;B-样品;1-3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮;2-3',5,5',7-四羟基二氢黄酮;3-3,3',4',5-四羟基-7-甲氧基二氢黄酮;4-3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮;5-艾纳香素。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-reference substance; B-sample; 1-3,3',5,7-tetrahydroxy-4'-methoxyflavanone; 2-3',5,5',7-tetrahydroxy-flavanone; 3-3,3',4',5-tetrahydroxy-7-methoxyflavanone; 4-3,3',5-trihydroxy-4',7-dimethoxyflavanone; 5-blumeatin.

2.2 检测波长选择

经紫外吸收波长扫描,3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮、3',5,5',7-四羟基二氢黄酮、3,3',4',5-

四羟基-7-甲氧基二氢黄酮、3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮、艾纳香素等5种二氢黄酮类化合物在289 nm波长处均有最大吸收,因此将检测波长设定为289 nm。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮、3',5,5',7-四羟基二氢黄酮、3,3',4',5-四羟基-7-甲氧基二氢黄酮、3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮、艾纳香素对照品适量,加85%甲醇制成每毫升分别约含150,30,30,20,10 μg的混合对照品溶液,即得。

2.4 供试品溶液的制备

取大风艾药材,粉碎过3号筛,精密称定大风艾药材粉末约0.6 g,置圆底烧瓶中,精密加入85%甲醇25 mL,称重,回流提取60 min,放冷,再称重,以85%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,过0.45 μm微孔滤膜,即得。

2.5 检测限与定量限

分别以信噪比3:1($n=3$)和10:1($n=3$)计算各成分的检测限和定量限分别为:3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮0.28,0.55 μg·mL⁻¹;3',5,5',7-四羟基二氢黄酮0.12,0.24 μg·mL⁻¹;3,3',4',5-四羟基-7-甲氧基二氢黄酮0.24,0.61 μg·mL⁻¹;3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮0.07,0.14 μg·mL⁻¹;艾纳香素0.06,0.16 μg·mL⁻¹。

2.6 线性关系考察

分别取上述5种二氢黄酮成分对照品适量,精密称定,以85%甲醇配置成梯度浓度的对照品溶液,准确吸取对照品溶液10 μL,按“2.1”项下色谱条件进行测定,分别以对照品的含量(X)为横坐标,峰面积积分值(Y)为纵坐标,绘制5种二氢黄酮成分的线性方程为:3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮 $Y=7.18X-5.97(R^2=0.9998, 2.76\sim 276.40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 、3',5,5',7-四羟基二氢黄酮 $Y=8.29X-9.56(R^2=0.9998, 2.94\sim 58.82 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 、3,3',4',5-四羟基-7-甲氧基二氢黄酮 $Y=5.82X-4.66(R^2=0.9994, 3.04\sim 60.80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 、3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮 $Y=7.99X-1.24(R^2=0.9998, 0.96\sim 34.50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 、艾纳香素 $Y=8.26X-1.57(R^2=0.9997, 0.81\sim 16.29 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 。

2.7 精密度试验

准确吸取供试品溶液10 μL,连续进样5次,测定3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮、3',5,5',7-

四羟基二氢黄酮、3,3',4',5-四羟基-7-甲氧基二氢黄酮、3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮、艾纳香素的峰面积, 计算日内精密度的 RSD 分别为 0.68%, 0.73%, 3.18%, 1.96%和 1.52%。取上述供试品溶液分别连续测定 3 d, 每天测定 5 次, 测定上述 5 个成分的峰面积, 计算日间精密度的 RSD 分别为 0.90%, 0.96%, 2.50%, 0.83%和 1.56%, 表明方法精密度良好。

2.8 稳定性试验

取大风艾药材(批号: 1101)粉末约 0.6 g, 精密称定, 按“2.4”项下方法操作, 按“2.1”项下色谱条件分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 h 测定, 测得上述 5 种二氢黄酮成分的峰面积, 计算 RSD 分别为 0.87%, 0.92%, 2.69%, 1.77%和 1.71%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

表 1 大风艾药材中 5 中成分加样回收率

Tab. 1 Recovery of 5 components in *Blumea balsamifera*

化学成分	称样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮	0.299 8	1.726 8	1.752 0	3.488 8	100.57	98.73	1.77
	0.300 1	1.728 6	1.752 0	3.468 0	99.28		
	0.299 5	1.725 1	1.752 0	3.396 1	95.38		
	0.298 7	1.720 5	1.752 0	3.456 5	99.09		
	0.301 2	1.734 9	1.752 0	3.471 6	99.13		
3',5,5',7-四羟基二氢黄酮	0.298 1	1.717 1	1.752 0	3.450 2	98.92	101.72	1.37
	0.299 8	0.368 8	0.404 0	0.782 6	102.44		
	0.300 1	0.369 1	0.404 0	0.776 5	100.84		
	0.299 5	0.368 4	0.404 0	0.784 2	102.92		
	0.298 7	0.367 4	0.404 0	0.779 6	102.03		
3,3',4',5-四羟基-7-甲氧基二氢黄酮	0.301 2	0.370 5	0.404 0	0.771 8	99.34	100.73	1.26
	0.298 1	0.366 7	0.404 0	0.781 9	102.78		
	0.299 8	0.380 7	0.405 0	0.788 6	100.70		
	0.300 1	0.381 1	0.405 0	0.780 1	98.51		
	0.299 5	0.380 4	0.405 0	0.795 2	102.43		
3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮	0.298 7	0.379 3	0.405 0	0.789 4	101.25	101.84	1.18
	0.301 2	0.382 5	0.405 0	0.790 3	100.69		
	0.298 1	0.378 6	0.405 0	0.786 8	100.79		
	0.299 8	0.422 7	0.411 0	0.846 2	103.04		
	0.300 1	0.423 1	0.411 0	0.842 8	102.11		
艾纳香素	0.299 5	0.422 3	0.411 0	0.839 5	101.51	99.74	2.58
	0.298 7	0.421 2	0.411 0	0.830 7	99.64		
	0.301 2	0.424 7	0.411 0	0.846 8	102.70		
	0.298 1	0.420 3	0.411 0	0.839 7	102.04		
	0.299 8	0.101 9	0.108 2	0.211 6	101.36		
	0.300 1	0.102 0	0.108 2	0.211 8	101.45		
	0.299 5	0.101 8	0.108 2	0.208 6	98.68		
	0.298 7	0.101 6	0.108 2	0.206 3	96.80		
	0.301 2	0.102 4	0.108 2	0.213 9	103.04		
	0.298 1	0.101 4	0.108 2	0.206 4	97.09		

2.9 重复性试验

取同一批大风艾药材(批号: 1101)粉末 6 份, 精密称定, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 测得上述 5 种二氢黄酮成分含量, 计算其 RSD 分别为 1.12%, 1.40%, 1.14%, 1.33%和 2.06%, 表明重复性良好。

2.10 加样回收率试验

取已知含量的大风艾药材(批号: 1101)粉末 6 份, 约 0.3 g, 精密称定, 分别按已知含量的 100% 加入 5 种二氢黄酮成分对照品, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 平均加样回收率分别为 98.73% (RSD=1.77%), 101.72% (RSD=1.37%), 100.73% (RSD=1.26%), 101.84% (RSD=1.18%), 99.74% (RSD=2.58%), 结果见表 1。

2.11 样品测定

分别取不同批次大风艾药材粉末约 0.6 g, 精密称定, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液。分别精密吸取对照品溶液及供试品溶液各 10 μ L, 注入高效液相色谱仪测定, 结果见表 2。

表 2 大风艾药材中 5 种二氢黄酮成分的含量测定结果 ($n=2$)

Tab. 2 Contents of five flavanones in *Blumea balsamifera* ($n=2$)

化学成分	平均含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$			
	贵州罗甸(批号: 1101)	广西玉林(批号: 1001)	贵州望谟(批号: 1102)	贵州江口(批号: 0819)
3,3',5,7-四羟基-4'-甲氧基二氢黄酮	5.76	4.63	4.79	4.98
3',5,5',7-四羟基二氢黄酮	1.23	0.98	1.15	0.64
3,3',4',5-四羟基-7-甲氧基二氢黄酮	1.27	0.13	0.99	0.43
3,3',5-三羟基-4',7-二甲氧基二氢黄酮	1.41	0.24	0.85	0.11
艾纳香素	0.34	0.19	0.37	0.09

3 讨论

大风艾是中国西南地区资源丰富的一种民族药材, 目前主要用于提取艾片。化学成分研究表明, 大风艾中含有丰富的黄酮类成分, 尤以二氢黄酮类成分为主, 特别是大风艾中二氢黄酮类成分报道具有多种生物活性。本研究在前期^[4-6]对大风艾化学成分的研究基础上, 对大风艾药材中 5 种主要的二氢黄酮类成分进行了含量测定方法研究, 可以为大风艾药材中二氢黄酮类成分的开发利用提供参考。

通过对提取溶剂、提取方法及提取时间等因素的考察, 确定 25 mL 85% 甲醇, 回流提取 1 h, 可完全提取 0.6 g 大风艾药材中的 5 种二氢黄酮类成分。

按含量测定色谱条件以及改变色谱条件后进样分析, 考察不同品牌色谱柱、流速、pH 值、柱温、流动相比对测定结果的影响, 结果表明, 建立的大风艾药材中的 5 种二氢黄酮成分含量测

定方法具有较好的耐受性。本研究对大风艾药材中的 5 种二氢黄酮成分的测定结果表明该方法准确、简便, 可以作为大风艾药材的质量控制方法, 并为大风艾药材资源的综合利用提供依据。

REFERENCES

- [1] PANG Y X, XIE X L, CHEN Z X, et al. Textual research of *Blumea balsamifera*[J]. Guizhou Agric Sci(贵州农业科学), 2014, 42(6): 10-13.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997.
- [3] CHEN M, JIN H Z, YAN L, et al. Flavonoids from *Blumea balsamifera*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2010, 22(6): 991-994.
- [4] YAN Q X, TAN D P, KANG H, et al. Study on flavonoids constituents of *Blumea balsamifera*[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(5): 86-89.
- [5] TAN D P, YAN Q X, KANG H, et al. Chemical constituents of *Blumea balsamifera* DC. [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2012, 24(6): 718-721.
- [6] TAN D P, YAN Q X, KANG H. Chemical constituents from *Blumea balsamifera*[J]. Chem Nat Compd, 2013, 48(6): 1072-1073.
- [7] NESSA F, ISMAIL Z, MOHAMED N, et al. Free radical-scavenging activity of organic extracts and of pure flavonoids of *Blumea balsamifera* DC. leaves[J]. Food Chem, 2004, 88(2): 243-252.
- [8] 许实波, 赵金华. 艾纳香二氢黄酮对大鼠实验性肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 1998(14): 191-192.
- [9] 张亚琛. 彝族“黄药”黄酮类化学成分分离、鉴定及抗肿瘤活性研究[D]. 北京: 中央民族大学, 2018.
- [10] HUANG Y L, WEN Y X, ZHAO Z G, et al. Determination of flavanones and flavanols in *Blumea balsamifera* DC. by RP-HPLC[J]. Guangxi Sci(广西科学), 2007, 14(2): 140-142.
- [11] XIE D P, SANG T, GONG X Z. Determination of protocatechuic acid in *Blumea riparia* (Bl.) DC. by RP-HPLC [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2000, 25(4): 227-230.
- [12] WEN Y X, HUANG Y L, ZHU T C, et al. Analysis of xanthoxylin in different section of *Blumea balsamifera* DC. by RP-HPLC[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2007, 18(9): 2137-2138.
- [13] WEI Y L, TANG H M, MO S F, et al. Determination of L-borneol in *Blumea balsamifera*(Linn.) DC. of different areas in Guizhou[J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2015, 30(1): 278-280.

收稿日期: 2020-02-27
(本文责编: 蔡珊珊)