

阿尔泰锦鸡儿不同药用部位主要黄酮苷的含量测定

迪里木拉提·毛里明¹, 郭玉娟¹, 程煜凤¹, 任丽君², 姚军^{1*} (1.新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2.新疆昌吉职业技术学院, 新疆 昌吉 831100)

摘要: 目的 测定采集于新疆阿勒泰地区的 10 批次阿尔泰锦鸡儿根、茎、叶、花与果实药材中芦丁和山奈酚-3-O-芸香糖苷的含量。方法 色谱条件: Inertsil ODS-3 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 检测波长 254 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 5 μL, 柱温 25 °C, 流动相为 0.2%磷酸(A)-乙腈(B), 线性梯度洗脱(0~5 min, 10%→14%B; 5~10 min, 14%→17%B; 10~16 min, 17%→20%B; 16~21 min, 20%→22%B; 21~30 min, 22%→25%B; 30~40 min, 25%B)。结果 10 批次阿尔泰锦鸡儿叶、花与果实药材中芦丁的平均含量为: 果实 6.83 mg·g⁻¹, 叶 6.16 mg·g⁻¹, 花 3.58 mg·g⁻¹; 山奈酚-3-O-芸香糖苷的平均含量为: 果实 1.48 mg·g⁻¹, 叶 2.44 mg·g⁻¹, 花 1.01 mg·g⁻¹。根与茎供试品溶液中均未检测到这 2 种黄酮苷成分。结论 建立的方法简便、稳定性、重复性良好, 为阿尔泰锦鸡儿药材黄酮类成分的研究提供了实验基础, 亦为建立该药材的质量标准提供了重要的实验数据。

关键词: 阿尔泰锦鸡儿; 不同药用部位; 黄酮苷; 芦丁; 山奈酚-3-O-芸香糖苷; 含量测定

中图分类号: R284.1; R971.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2018)05-0704-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.05.018

引用本文: 迪里木拉提·毛里明, 郭玉娟, 程煜凤, 等. 阿尔泰锦鸡儿不同药用部位主要黄酮苷的含量测定[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(5): 704-707.

Study on Content Determination of Main Flavonoid Glycosides in Different Medical Parts of *Caragana Altaica Kom. pojark*

DILIMULATI Maoliming¹, GUO Yujuan¹, CHENG Yufeng¹, REN Lijun², YAO Jun^{1*} (1.College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2.Xinjiang Changji Vocational and Technical College, Changji 831100, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the content of rutin and kaempferol-3-O-rutinoside in the roots, stems, leaves, flowers and fruits of *Caragana altaica kom. pojark* from Xinjiang Altai Region. **METHODS** HPLC conditions: Inertsil ODS-3 column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), detection wavelength at 254 nm, flow rate at 1.0 mL·min⁻¹, injection volume was 5 μL and column temperature was 25 °C. A gradient elution of 0.2% phosphoric acid (A) and acetonitrile (B) solution were performed with following procedure: 0~5 min, 10%→14%B; 5~10 min, 14%→17%B; 10~16 min, 17%→20%B; 16~21 min, 20%→22%B; 21~30 min, 22%→25%B; 30~40 min, 25%B. **RESULTS** The average content of rutin in 10 batches of fruits, leaves and flowers was 6.83, 6.16, 3.58 mg·g⁻¹ and the average content of kaempferol-3-O-rutinoside was 1.48, 2.44, 1.01 mg·g⁻¹, respectively. However, neither rutin nor kaempferol-3-O-rutinoside were detected in the roots and stems of *Caragana altaica kom. pojark*. **CONCLUSION** The content determination method established in this study is simple and shows good stability and repeatability. Furthermore, this study provides experimental basis for the study of flavonoid glycosides in *Caragana altaica kom. pojark*. and provides essential experimental data for the establishment of quality standard of that plant.

KEY WORDS: *Caragana altaica kom. pojark*; different medical parts; flavonoid glycosides; rutin; kaempferol-3-O-rutinoside; content determination

阿尔泰锦鸡儿(*Caragana altaica kom. pojark*)为豆科(Leguminosae)锦鸡儿属(*Caragana Fabr*)植物, 分布于新疆阿勒泰地区布尔津县、富蕴县、福海县、哈巴河县、青河县等地^[1-2], 花期 2~3 个月, 其花称为金雀花, 又称金孔雀。锦鸡儿属植物除具有保持水土、防风固沙、绿化荒山、改善

环境的作用^[3], 还具有良好的药用价值。阿尔泰锦鸡儿为一种哈萨克民间药材, 其根、茎、叶、花与果实均可入药, 主要用于治疗高血压^[4]。在化学成分上, 锦鸡儿属植物富含黄酮类、二苯乙烯类、苯丙素类、甾体及萜类化合物^[5-7]。

黄酮类化合物为植物药中重要的降压活性组

基金项目: 新疆地产中药民族药新药研发培育项目(2017-02-03)

作者简介: 迪里木拉提·毛里明, 男, 硕士生 Tel: 13629940515
Tel: 18999250641 E-mail: xydyaojun@163.com

E-mail: 982663735@qq.com

*通信作者: 姚军, 男, 教授, 博导

分之一^[8-12],其种类和含量与降压效果具有一定的相关性。课题组对阿尔泰锦鸡儿的前期研究^[13-14]中,将阿尔泰锦鸡儿花醇提物经酸水解处理,发现了其中槲皮素、山奈酚和异鼠李素等3种黄酮苷元。然而,植物中黄酮类化合物主要以黄酮苷的形式存在。因此,本研究测定阿尔泰锦鸡儿不同药用部位主要黄酮苷类化合物的含量,为该药材的开发和利用提供实验基础。

1 仪器与试剂

Agilent 1220 型高效液相色谱仪, DAD 检测器,二元泵, Agilent OpenLAB 工作站(美国 Agilent 公司); Inertsil ODS-3 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(日本岛津公司); AB135-S 电子分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); HH-S4 数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂)。

乙腈(色谱纯,美国 Fisher Scientific 公司);95%乙醇(分析纯,安徽安特生物化学有限公司);磷酸(色谱纯,成都市新都区木兰镇工业开发区);超纯水(新疆医科大学中心实验室);芦丁对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:Y19N7S25244;纯度≥98%);山奈酚-3-*O*-芸香糖苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:66PF-WRMR;纯度≥98%)。

10 批次阿尔泰锦鸡儿花药材于 2016 年 5 月采集于新疆阿勒泰地区。10 批次阿尔泰锦鸡儿根、茎、叶与果实药材于 2016 年 7 月分别采集于和 10 批次花药材相对应的地点。药材均由新疆医科大学药学院帕丽达·阿不力孜教授鉴定为豆科(*Leguminosae*)锦鸡儿属(*Caragana Fabr*)植物阿尔泰锦鸡儿(*Caragana altaica kom. pojark*)的全草。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Inertsil ODS-3 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为 0.2%磷酸(A)-乙腈(B)^[15];线性梯度洗脱(0~5 min, 10%→14% B; 5~10 min, 14%→17% B; 10~16 min, 17%→20% B; 16~21 min, 20%→22% B; 21~30 min, 22%→25% B; 30~40 min, 25% B);流速 1.0 mL·min⁻¹;进样量 5 μL;柱温 25 °C;检测波长 254 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取芦丁和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷对照品 6.55 和 2.07 mg,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,即得芦丁和山奈酚

-3-*O*-芸香糖苷质量浓度分别为 655 和 207 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液,备用。

2.2.2 阿尔泰锦鸡儿根、茎、叶、花与果实的供试品溶液 分别称取阿尔泰锦鸡儿根、茎、叶、花与果实药材各 10 g,粉碎,过 60 目筛,称取药材粉末各 0.5 g,分别置于 100 mL 圆底烧瓶中加入 50 mL 体积分数 75%乙醇,80 °C 下加热回流提取 1.5 h,过滤,药渣再次加入 50 mL 体积分数 75%乙醇,同法提取 1.5 h。合并 2 次滤液,减压浓缩至浸膏,将浸膏转移至 25 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,即得。

2.2.3 测定 按“2.1”项下色谱条件分别测定混合对照品溶液和阿尔泰锦鸡儿根、茎、叶、花与果实供试品溶液,色谱图见图 1。

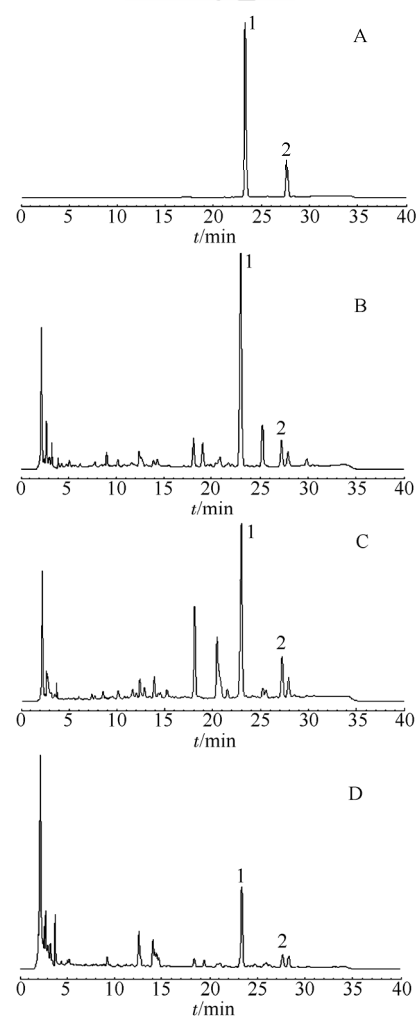


图 1 高效液相色谱图

A-混合对照品溶液; B-果实供试品溶液; C-叶供试品溶液; D-花供试品溶液; 1-芦丁; 2-山奈酚-3-*O*-芸香糖苷。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-mixed reference sample solution; B-fruit sample solution; C-leaf sample solution; D-flower sample solution; 1-rutin; 2-kaempferol-3-*O*-rutinoside.

2.3 检测限和定量限

取“2.2.1”项下方法配制的芦丁和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷混合对照品溶液,用甲醇逐级稀释,在“2.1”项下色谱条件测定,以基线噪声的10倍($S/N \approx 10$)作为定量限,以基线噪声的3倍($S/N \approx 3$)作为检测限。结果,芦丁和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷的定量限分别为 $1.98 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($n=3$, $RSD=2.61$)和 $2.86 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($n=3$, $RSD=1.75$),检测限分别为 0.59 和 $0.86 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4 线性关系考察

分别吸取“2.2”项下制备的混合对照品溶液4, 2, 1, 0.5 mL, 分别加入10 mL量瓶中,用甲醇定容即得芦丁和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷质量浓度分别为 262 和 $82.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 131 和 $41.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 65.5 和 $20.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 32.75 和 $10.35 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列浓度混合对照品溶液,将各系列浓度混合对照品溶液在“2.1”项下色谱条件测定,以峰面积(Y)对浓度(X)进行线性回归,得芦丁和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷的回归方程、回归系数(r)和线性范围。结果,芦丁和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷分别在 $32.75 \sim 655 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与 $10.35 \sim 207 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性良好,回归方程分别为 $Y=166\,909.31X-1\,229\,107.82$, $r=0.999\,6$ 和 $Y=123\,738.13X-195\,970.83$, $r=0.999\,6$ 。

2.5 仪器精密度试验

取“2.4”项下芦丁和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷浓度分别为 262 和 $82.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,测定芦丁和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷的峰面积。结果,芦丁和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷峰面积的RSD分别为 0.94% 和 0.74% ,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下制备的同一批阿尔泰锦鸡儿花供试品溶液1份,按“2.1”项下色谱条件分别于0, 4, 12, 16, 24 h后测定。结果,阿尔泰锦鸡儿花供试品溶液中芦丁和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷峰的面积RSD分别为 4.85% 和 1.75% ,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批阿尔泰锦鸡儿花药材5份,按“2.2.2”项下方法制备花供试品溶液,于“2.1”项下色谱条件分别测定。结果,5份花供试品溶液中芦丁和

山奈酚-3-*O*-芸香糖苷的峰面积RSD分别为 2.18% 和 2.56% ,表明方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取同一批已测知含量的阿尔泰锦鸡儿花药材9份,分别按低、中、高剂量加入相应量的芦丁和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备花供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定花供试品溶液中芦丁和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷的峰面积,代入回归方程计算芦丁和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷的含量,计算回收率,见表1。

表1 芦丁和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷的加样回收率试验结果($n=3$)

Tab. 1 Results of recovery test of rutin and kaempferol-3-*O*-rutinoside ($n=3$)

化合物	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
芦丁	0.403 3	0.264 8	0.668 6	100.08	102.35	2.52
		0.264 8	0.670 8	100.41		
		0.264 8	0.674 2	100.91		
		0.353 2	0.764 0	100.99		
		0.353 2	0.781 7	103.34		
		0.353 2	0.818 1	108.14		
		0.441 5	0.852 6	100.92		
		0.441 5	0.862 0	102.03		
		0.441 5	0.881 1	104.30		
		0.125 0	0.211 1	100.86		
山奈酚 -3- <i>O</i> -芸 香糖苷	0.084 3	0.125 0	0.215 7	103.06	100.79	1.27
		0.125 0	0.214 9	102.66		
		0.150 0	0.232 4	99.18		
		0.150 0	0.234 0	99.87		
		0.150 0	0.234 8	100.19		
		0.175 0	0.259 7	100.15		
		0.175 0	0.260 4	100.41		
		0.175 0	0.261 2	100.72		

2.9 样品含量测定

取编号为S1~S10的阿尔泰锦鸡儿根、茎、叶、花与果实药材各1份,“2.2.2”项下方法制备阿尔泰锦鸡儿根、茎、叶、花与果实的供试品溶液,每一份供试品溶液在“2.1”项下色谱条件连续测定3次,代入回归方程计算浓度,将计算结果换算成质量浓度[化合物质量(mg)/相应生药质量(g)]。结果,根与茎供试品溶液中均未检测到芦丁和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷,花、叶与果实供试品溶液中均含有这2种黄酮苷,见表2。

表 2 10 批次阿尔泰锦鸡儿药材中芦丁和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷的含量测定结果($n=3$)

Tab. 2 Content determination results of rutin and kaempferol-3-*O*-rutinoside in 10 batches of *Caragana altaica* kom. pojark($n=3$) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

批号	芦丁			山奈酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷		
	花	叶	果实	花	叶	果实
S1	2.87	5.87	6.90	0.80	2.35	1.53
S2	3.57	6.10	7.11	1.01	2.46	1.56
S3	3.52	6.28	6.77	1.01	2.49	1.48
S4	4.10	6.21	6.52	1.17	2.46	1.41
S5	3.44	6.14	6.54	1.01	2.43	1.46
S6	3.46	5.89	7.01	1.00	2.35	1.50
S7	3.57	6.14	7.28	0.99	2.43	1.56
S8	3.50	6.50	6.83	0.98	2.57	1.47
S9	3.64	6.28	6.61	1.04	2.47	1.42
S10	4.15	6.16	6.68	1.15	2.42	1.44

3 讨论

3.1 流动相系统的选择

本研究考察了甲醇-水、甲醇-0.2%磷酸、乙腈-水、乙腈-0.2%磷酸溶液等流动相系统。结果发现,以乙腈-0.2%磷酸溶液为流动相系统时样品中各种成分分离较好,提供了丰富的色谱信息。因此确定乙腈-0.2%磷酸溶液为流动相。

3.2 检测波长的选择

实验中,先在 200~400 nm 波长范围内对供试品溶液进行 UV 扫描,结果在 254 和 360 nm 波长处有较大吸收,360 nm 处色谱峰数目较少,但丰度较高。260 nm 处色谱峰数目较多且基线噪音较低,而丰度降低,分离度较好,基线稳定。考虑到各组分的检测信号强度与灵敏度,本实验选择波长为 254 nm。

3.3 不同药用部位黄酮苷的含量差异分析

阿尔泰锦鸡儿不同药用部位中芦丁与山奈酚-3-*O*-芸香糖苷的含量具有显著差异。芦丁在果实和叶中含量最高并且含量差异不大,相当于花中含量的 2~3 倍。山奈酚-3-*O*-芸香糖苷在叶中含量

较高,花和果实中的含量相差不大并均小于叶中含量。叶、花、果实中芦丁含量均大于山奈酚-3-*O*-芸香糖苷,预示着阿尔泰锦鸡儿叶、花、果实中黄酮类化合物较为丰富而在根、茎中相对较少。

REFERENCES

- [1] NIU X W. The distribution and description of *Caragana Fabr.* in China [J]. Acta Bot Boreal Occiden Sin(西北植物学报), 1999, 19(5): 107-133.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第四十二卷. 第一分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1993: 15.
- [3] JIA L, QU S Z. The study progress on the genus *Caragana Fabr.* [J]. Med Plant(植物研究), 2011, 21(4): 515-518.
- [4] 徐新, 巴哈尔古丽·黄尔汗. 哈萨克药志(一卷) [M]. 北京: 民族出版社, 2009.
- [5] WANG S G. Study on chemical constituents and quality standards of *Caragana sinica* [D]. Shanghai: Fudan University, 2004.
- [6] SHU N. Study on chemical constituents, content and its changes of *Caragana sinica* [D]. Shanghai: Fudan University, 2006.
- [7] 朴惠顺, 金光洙. 锦鸡儿属植物研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(5): 430-432.
- [8] CHENG J, HU S A. Antihypertensive effects and mechanisms of quercetin [J]. Pract Pharm Clin Remed(实用药物与临床), 2015, 18(3): 334-337.
- [9] 孙振国. 天然黄酮类化合物对心脑血管的药理分析 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(80): 121-124.
- [10] YI W S. Research progress of flavonoids biological activity [J]. Guangzhou Chem Indust(广州化工), 2012, 40(2): 47-50.
- [11] ZHOU X, LI H J. Bioactivities and clinical applications of flavonoids [J]. Chin New Drugs J(中国新药杂志), 2007, 16(5): 350-355.
- [12] 周宗宝, 王红, 叶晓川, 等. 黄酮类化合物的结构修饰及生物活性研究进展 [J]. 医药导报, 2017, 36(2): 181-185.
- [13] 徐学君, 张秀芳, 徐德琴, 等. 黄酮类化合物调节血脂作用的研究进展 [J]. 中国药房, 2016, 27(1): 114-117.
- [14] CHENG Y F, WANG D, LI L. On determination of flavonoids in the flower of *Caragana altaica* kom. pojark by HPLC and thin-layer chromatography [J]. J Xinjiang Med Univ (新疆医科大学学报), 2013, 36(8): 1094-1097.
- [15] WU Y, LI D Y, YAO J. Determination of three flavonoids in *Caragana sinica* and establishment of its fingerprints [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2016, 38(10): 2204-2208.

收稿日期: 2017-09-09

(本文责编: 曹粤锋)