

HPLC 同时测定细梗香草中 2 个专属性黄酮苷的含量

张昆艳^{1,2}, 洪挺^{1*}, 王栋³, 简勇学⁴, 赵凯⁴, 黄建丽⁴, 杨毅生^{1*} (1.江西省药品检验检测研究院, 江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心, 南昌 330029; 2.江西中医药大学, 南昌 330004; 3.江西省食品检验检测研究院, 江西国家果蔬产品及加工食品质量监督检验中心, 南昌 330001; 4.江西欧氏药业有限责任公司, 江西 新余 338004)

摘要: 目的 建立 HPLC 同时测定细梗香草中 Quercetin-3-*O*-(2'',6''-di-*O*- α -rhamnopyranosyl)- β -galactopyranoside 和 Kaempferol-3-*O*-[2-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)rhamnopyranosyl-6-rhamnopyranosyl]- β -*D*-galactopyranoside 含量的方法。方法 采用 SHIMADZU Shim-pack VP-ODS C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 乙腈-0.3%磷酸溶液为流动相, 线性梯度洗脱, 流速为 1 mL $\cdot$ min⁻¹; 柱温为 30 $^{\circ}$ C, 检测波长为 350 nm。结果 Quercetin-3-*O*-(2'',6''-di-*O*- α -rhamnopyranosyl)- β -galactopyranoside 和 Kaempferol-3-*O*-[2-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)rhamnopyranosyl-6-rhamnopyranosyl]- β -*D*-galactopyranoside 分别在 0.041 46~2.072 8 μ g $\cdot$ mL⁻¹($r=0.999\ 9$), 0.088 95~4.447 5 μ g $\cdot$ mL⁻¹($r=0.999\ 9$)内呈良好的线性关系, 平均加样回收率($n=6$)分别为 98.19%, 98.85%; RSD 分别为 1.94%, 1.81%。结论 建立的方法操作简单、专属性强, 可用于同时测定细梗香草中 2 个专属黄酮苷类成分含量。

关键词: 细梗香草; 高效液相色谱法; 黄酮苷; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)13-1570-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.13.006

引用本文: 张昆艳, 洪挺, 王栋, 等. HPLC 同时测定细梗香草中 2 个专属性黄酮苷的含量[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(13): 1570-1573.

Simultaneous Determination of Two Specific Flavonoid Glycosides in *Lysimachia Capillipes* Hemsl. by HPLC

ZHANG Kunyan^{1,2}, HONG Ting^{1*}, WANG Dong³, JIAN Yongxue⁴, ZHAO Kai⁴, HUANG Jianli⁴, YANG Yisheng^{1*} (1.Jiangxi Provincial Institute for Drug Control, Jiangxi Provincial Engineering Research Center for Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China; 2.Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 3.Food Inspection and Testing Institute of Jiangxi Province, Jiangxi National Center for Quality Supervision and Inspection of Fruits, Vegetables, and Processed Food, Nanchang 330001, China; 4.Jiangxi Ourshi Pharmaceutical Co., Ltd, Xinyu 338004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for the simultaneous determination of Quercetin-3-*O*-(2'',6''-di-*O*- α -rhamnopyranosyl)- β -galactopyranoside and Kaempferol-3-*O*-[2-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)rhamnopyranosyl-6-rhamnopyranosyl]- β -*D*-galactopyranoside in *Lysimachia capillipes* Hemsl. **METHODS** The HPLC analysis was carried on SHIMADZU Shim-pack VP-ODS C₁₈ column(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) with mobile phase consisted of acetonitrile-0.3% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution) at the flow rate of 1 mL $\cdot$ min⁻¹. The column temperature was set at 30 $^{\circ}$ C, and the detection wavelength was set at 350 nm. **RESULTS** Quercetin-3-*O*-(2'',6''-di-*O*- α -rhamnopyranosyl)- β -galactopyranoside and Kaempferol-3-*O*-[2-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)rhamnopyranosyl-6-rhamnopyranosyl]- β -*D*-galactopyranoside were showed good linear relationships within the ranges of 0.041 46~2.072 8 μ g $\cdot$ mL⁻¹($r=0.999\ 9$) and 0.088 95~4.447 5 μ g $\cdot$ mL⁻¹($r=0.999\ 9$). The average recoveries ($n=6$) were 98.19% and 98.85%, RSDs were 1.94% and 1.81%, respectively. **CONCLUSION** The established method is simple, specific, and suitable for simultaneous determination of two components of specific flavonoid glycosides in *Lysimachia capillipes* Hemsl.

KEYWORDS: *Lysimachia capillipes* Hemsl; HPLC; flavonoid glycosides; component determination

细梗香草是报春花科珍珠菜属植物细梗香草(*Lysimachia capillipes* Hemsl.)的干燥全草, 又称作排香、香排草, 在江西、福建、浙江、湖南、广东等省份均有分布。民间习称“满山香”, 而“满

山香”药材基源复杂, 其中“细梗香草”为唯一的草本“满山香”, 是 20 世纪 70 年代初从江西乐安县民间发掘出的江西特色中草药资源, 并被载入《江西省中药材标准》。细梗香草性甘, 味平,

基金项目: 江西省重点研发计划项目(20161BBG70236); 江西省食品药品监督管理局科技计划项目(2015YP08); 国家药典委员会 2015 年国家药品标准提高项目(163)

作者简介: 张昆艳, 女, 硕士生 Tel: 18779116911 E-mail: 2395961036@qq.com *通信作者: 洪挺, 男, 主管药师 Tel: 13257008805 E-mail: 174635475@qq.com 杨毅生, 男, 主任中药师 Tel: 18170815599 E-mail: 1020115850@qq.com

全草入药,具有清热解毒、止咳、祛风的功效^[1-3]。主要用于治疗感冒咳嗽、气管炎、月经不调、神经衰弱等^[4-6]。据文献报道,细梗香草药材中主要含黄酮、皂苷、挥发性成分和其他类成分^[7-8]。笔者已从细梗香草乙醇提取物中分离得到多个黄酮苷类化合物,其中以 Quercetin-3-*O*-(2'',6''-di-*O*- α -rhamnopyranosyl)- β -galactopyranoside 和 Kaempferol-3-*O*-[2-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)rhamnopyranosyl-6-rhamnopyranosyl]- β -*D*-galactopyranoside 这 2 种成分含量最高,并且文献报道这 2 种成分具有抗炎、止咳平喘、提高免疫力等生物活性^[9-11],这也与细梗香草治疗感冒咳嗽作用基本吻合。细梗香草化学成分丰富,但相关质量标准研究较少,且目前尚未见黄酮苷类成分含量测定方法报道。因此,开展细梗香草的质量控制方法研究,建立细梗香草活性成分的含量测定方法对于该药材的质量评价尤为重要^[12-16]。本实验利用 HPLC 同时测定细梗香草中这 2 种成分的含量,以期建立准确度高、灵敏度高、稳定可靠的药材多指标质量控制方法,为进一步完善细梗香草的质量控制标准提供理论依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 科技有限公司);ML204-电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);Milli-Q Direct 16 超纯水仪(德国 Merck Millipore 公司)。

细梗香草对照品均由课题组对细梗香草化学成分分离精制得到:Quercetin-3-*O*-(2'',6''-di-*O*- α -rhamnopyranosyl)- β -galactopyranoside(化合物 A,纯度 $\geq 89.5\%$);Kaempferol-3-*O*-[2-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)rhamnopyranosyl-6-rhamnopyranosyl]- β -*D*-galactopyranoside(化合物 B,纯度 $\geq 99.9\%$);乙腈(色谱纯,Sigma 公司,批号:WXBC5997X);磷酸(分析纯,西陇科学股份有限公司,批号:171206);水为超纯水。细梗香草(批号:S1~S6,于 2018 年 7 月—9 月采集自江西永丰县石马镇济民村;江西本真药业有限责任公司,批号:20161102,20170533,20181023),经江西中医药大学刘勇教授和江西省药品检验检测研究院万林春副主任中药师鉴定均为报春花科珍珠菜属细梗香草(*Lysimachia capillipes* Hemsl.)的干燥全草。

2 方法与结果

2.1 测定方法

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 SHIMADZU

Shimpack VP-ODS C₁₈(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)-0.3%磷酸(B),梯度洗脱(0~5 min, 10% $\rightarrow$ 13% A;5~35 min, 13% $\rightarrow$ 14% A;35~40 min, 14% A);检测波长为 350 nm;流速为 1 mL $\cdot$ min⁻¹;柱温为 30 $^{\circ}$ C;进样量为 10 μ L。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称取化合物 A 和化合物 B 对照品适量,加 75%甲醇制成每 1 mL 含化合物 A 345.5 μ g、化合物 B 444.8 μ g 的溶液,作为储备液。精密吸取 2 种储备液制成每 1 mL 含化合物 A 41.46 μ g、化合物 B 88.95 μ g 的混合溶液,作为混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取细梗香草粉末 1.0 g(过 3 号筛),置圆底烧瓶中,精密加入 75%甲醇 50 mL,密塞,称定质量,回流提取 1.0 h,放冷,再称定质量,用 75%甲醇补足减失质量,摇匀,用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.2 方法学考察

2.2.1 系统适用性试验 分别精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L,按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,并记录色谱图,目标峰与其相邻色谱峰的分离度 >1.5 ,理论板数 $>3\ 000$,具有良好的分离效果,结果见图 1。

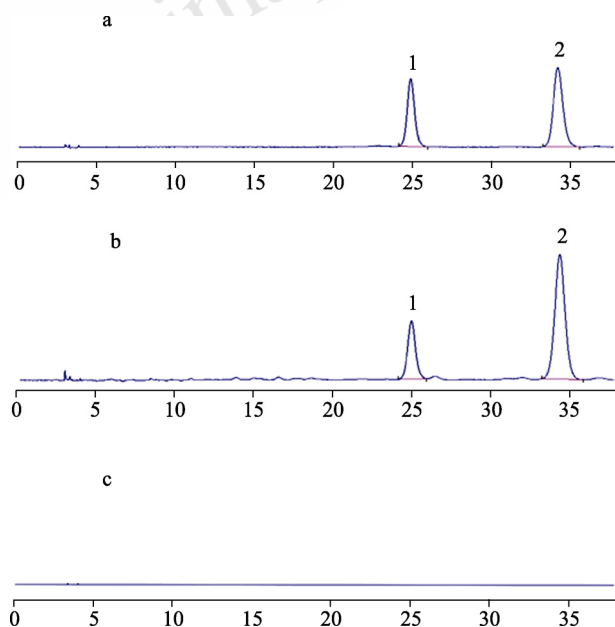


图 1 高效液相色谱图

a-混合对照品; b-*Lysimachia capillipes* Hemsl.; c-空白样品溶液; 1-化合物 A; 2-化合物 B。

Fig. 1 HPLC chromatograms

a-mixed control solution; b-*Lysimachia capillipes* Hemsl.; c-blank sample solution; 1-compound A; 2-compound B.

2.2.2 线性关系考察 分别精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液 1, 2, 5, 10, 20, 50 μL , 按“2.1.1”项下色谱条件进样。以峰面积(Y)为纵坐标, 进样量(X)为横坐标, 绘制标准曲线。得到化合物 A、化合物 B 的回归方程分别为 $Y=318.62X-0.010\ 9(r=0.999\ 9)$ 、 $Y=354.16X-0.080\ 8(r=0.999\ 9)$ 。结果表明二者分别在 0.041 46~2.072 8, 0.088 95~4.447 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内呈良好的线性关系。

2.2.3 仪器精密度试验 取同一批供试品溶液(批号: S1), 按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测定峰面积。计算化合物 A 和化合物 B 峰面积 RSD 分别为 0.97% 和 0.50%, 结果表明仪器精密度良好。

2.2.4 稳定性试验 取同一批供试品溶液(批号: S1), 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按“2.1.1”项下色谱条件进样, 结果化合物 A 和化合物 B 的峰面积 RSD 分别为 1.03% 和 0.36%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.5 重复性试验 精密称取同一批样品(批号: S1)6 份, 各 1.0 g, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 结果化合物 A 和化合物 B 的含量 RSD 分别为 1.22% 和 0.38%, 表明提取方法的重复性良好。

2.2.6 加样回收率试验 取已知含量的同一批样品(批号: S1)6 份, 每份约 0.5 g, 分别精密加入化合物 A 和化合物 B 对照品溶液适量, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 计算加样回收率。结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab. 1 Results of recovery test($n=6$)

组分	药材 含量/mg	加入量/ mg	检出量/ mg	回收率/ %	平均 回收率/%	RSD/ %
化合物 A	0.489 0	0.422 4	0.901 0	97.53	98.19	1.94
	0.499 9	0.422 4	0.929 3	101.65		
	0.486 9	0.422 4	0.896 3	96.90		
	0.487 6	0.422 4	0.906 5	99.16		
	0.486 6	0.422 4	0.896 3	96.97		
	0.486 7	0.422 4	0.896 3	96.94		
化合物 B	1.268 4	1.000 0	2.234 0	96.56	98.85	1.81
	1.296 6	1.000 0	2.309 6	101.30		
	1.263 1	1.000 0	2.234 0	97.09		
	1.264 8	1.000 0	2.253 1	98.82		
	1.262 3	1.000 0	2.263 0	100.07		
	1.262 6	1.000 0	2.255 2	99.26		

2.2.7 样品含量测定 取各批次样品, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 计算含量, 结果见表 2。

表 2 样品的含量测定结果($n=2$)

Tab. 2 Results of content determination of sample($n=2$)

批号	化合物 A/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	化合物 B/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
S1	0.97	2.52
S2	4.12	5.16
S3	1.45	3.48
S4	0.22	1.86
S5	0.70	2.38
S6	1.37	3.05
20161102	1.72	3.52
20170533	0.44	1.99
20181023	2.22	3.69

3 讨论

3.1 检测波长的选择

实验前期采用二极管阵列检测器在 190~400 nm 波长范围内对 2 种成分进行光谱扫描发现, 对照品 A 和对照品 B 均在 350 nm 波长处有最大吸收, 故选择 350 nm 为检测波长。

3.2 提取方法与流动相的考察

本研究对细梗香草的提取方法进行优化, 首先分别考察了提取溶剂甲醇、乙醇和 75% 甲醇, 其次考察了提取时间 0.5, 1, 2 h 3 个时间段, 另外还考察了提取方式(加热回流提取和超声提取), 通过计算含量确定最佳实验条件为 75% 甲醇作为提取溶剂, 加热回流提取 1 h。流动相系统考察了甲醇(乙腈)-水、甲醇(乙腈)-0.3% 磷酸及其不同比例配比的分离效果, 结果表明乙腈-0.3% 磷酸溶液梯度洗脱时供试品色谱峰分离度和峰形最佳。

3.3 结论

细梗香草药材相关质量控制文献较少, 目前只有薄层鉴别文献 1 篇、HPLC 测定细梗香草中皂苷类成分文献 1 篇, HPLC 测定细梗香草中山柰素与槲皮素文献 1 篇。课题组发现细梗香草中含游离山柰素和槲皮素量很少, 其含量测定都是通过水解黄酮苷得到, 而山柰素和槲皮素是在很多药材中都非常常见的黄酮类化合物, 不具有专属性, 因此选择具有代表性和专属性的指标成分进行质量控制意义重大。

实验结果显示, 细梗香草药材黄酮苷类成分含量上有较大差异, 这可能是受其生长环境、采

收时间等因素的影响。综上, 本研究所建立的方法操作简单, 稳定可靠, 专属性强, 可用于同时测定细梗香草中这 2 个专属性黄酮苷成分含量, 并为今后的质量控制和资源利用提供了参考。

REFERENCES

- [1] Department of Health of Jiangxi Province. Chinese Medicinal Material Standards of Jiangxi Province [M]. Nanchang: Jiangxi Science and Technology Press(江西科学技术出版社), 1997: 210-212.
- [2] Jiangxi Food and Drug Administration. Chinese Medicinal Material Standards of Jiangxi Province [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers(上海科技出版社), 2014: 337-339.
- [3] TIAN J K. Studies on the Chemical Constituents of Two Medicinal Plants of *Lysimachia* Genus [M]. Beijing: Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical sciences(中国协和医科大学中国医学科学院), 2002.
- [4] YING H M. Study on the preparation process of total saponins in *Lysimachia capillipes* Hemsl. and the establishment of quality standard [D]. Zhejiang University(浙江大学), 2011.
- [5] LV W Q, YU J B, SONG Y X, et al. HPLC method was used to determine the contents of kaempferin in *Lysimachia capillipes* Hemsl. [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2004, (4): 101-103.
- [6] LIU Y, ZHANG Q, CHEN M, et al. Study on pharmacognosy of *Lysimachia capillipes* Hemsl. [J]. Lishizhen Med and Mate Med Res(时珍国医国药), 2015, 26(9): 2178-2180.
- [7] YING H M, QI Z J, GUO D W, et al. Quantitative determination of capilliposide B and capilliposide C in *Lysimachia capillipes* by HPLC-ELSD assay [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2011, 46(9): 704-706.
- [8] HONG T, QIAN Y, YANG Y S. Review on chemical compositions and antitumor activities of *Lysimachia capillipes* Hemsl [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30(6): 1092-1097.
- [9] HIROSE Y, FUJITA T, ISHII T, et al. Antioxidative properties and flavonoid composition of *Chenopodium quinoa* seeds cultivated in Japan [J]. Food Chem, 2010, 119(4): 1300-1306.
- [10] SANNOMIYA M, VILEGAS W, RASTRELLI L, et al. A flavonoid glycoside from *Maytenus aquifolium* [J]. Phytochemistry, 1998, 49(1): 237-239.
- [11] LIU S Y, ZHANG X Q, WANG H Y, et al. Study on HPLC characteristic spectrum of Jiangzhi Qingshen tea and determination of four active components [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(1): 77-80.
- [12] WANG W P, LI X M, ZHOU Y Y, et al. Simultaneous determination of irisflorelin and piperine in Danlyu Bushen capsules by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(7): 1001-1003.
- [13] CHENG Z Z. The metabolism and pharmacokinetics of capilliposides B and capilliposides C in *Lysimachia capillipes* Hemsl. extract [D]. Huazhong University of Science and Technology(华中科技大学), 2015.
- [14] LIN G B, LUO G M, XU Y P, et al. Determining quercetin and kaempferol in *Lysimachia capillipes* Hemsl. with HPLC [J]. Hubei Agric Sci(湖北农业科学), 2014, 53(23): 5848-5850, 5854.
- [15] XIE C, XU L Z, ZHAO B H, et al. Studies on the chemical constituents of hairystalk loosestrife (*Lysimachia capillipes*) [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2000, 31(2): 81-83.
- [16] TIAN J K, ZOU Z M, XU L Z, et al. Studies on chemical constituents of *Lysimachia capillipes* [J]. J Chin Pharm(中国药理学杂志), 2006, 41(3): 171-173.

收稿日期: 2019-06-25
(本文责编: 曹粤锋)