

蒙药铁杆蒿的定性和定量分析

白彪¹, 王青虎^{2*}, 何祥², 毕力格图², 包文强²(1.内蒙古民族大学附属医院, 内蒙古 通辽 028000; 2.内蒙古民族大学蒙医药学院, 内蒙古 通辽 028000)

摘要: 目的 建立铁杆蒿的 TLC 鉴别及 HPLC 定量分析方法。方法 采用 TLC 和 HPLC 对采集于内蒙古通辽市 5 个不同地区的铁杆蒿进行定性和定量分析。TLC 条件: 对照品为 8-羟基-6,7-二甲氧基香豆素和 7-羟基-6-甲氧基香豆素, 吸附剂为硅胶 G, 展开剂为二氯甲烷-丙酮(7:1), 于紫外灯下显色观察; 对照品为 6,8-二甲氧基香豆素-7-O-β-D-葡萄糖苷, 吸附剂为硅胶 G, 展开剂为二氯甲烷-甲醇(5:1), 于紫外灯下显色观察。HPLC 条件: 色谱柱为 Topsisil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱, 检测波长为 263 nm, 柱温为 30 ℃。结果 对照品 8-羟基-6,7-二甲氧基香豆素、7-羟基-6-甲氧基香豆素和 6,8-二甲氧基香豆素-7-O-β-D-葡萄糖苷与不同样品具有 R_f 值相同的特征斑点, 重复性好, 易于鉴别; 在选用的 HPLC 条件下, 所检测化合物(1~7)表现出良好的线性关系($r \geq 0.9993$), 其平均回收率分别为 98.5, 95.0, 97.0, 98.3, 96.0, 98.9, 99.1, RSD 均 <2.0%。结论 建立了一种简便、稳定和可靠的铁杆蒿定性定量分析方法, 为综合评价该药材质量提供依据。

关键词: 铁杆蒿; 香豆素; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)14-1704-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.14.007

引用本文: 白彪, 王青虎, 何祥, 等. 蒙药铁杆蒿的定性和定量分析[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(14): 1704-1707.

Qualitative and Quantitative Analysis of Mongolian Medicine *Artemisa Sacrorum* Ledeb

BAI Biao¹, WANG Qinghu^{2*}, HE Xiang², Biligetu², BAO Wenqiang²(1. Affiliated Hospital of Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao 028000, China; 2. College of Traditional Mongolian Medicine, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the TLC identification and HPLC quantitative analysis method for *Artemisa sacrorum* Ledeb. **METHODS** TLC and HPLC were used for qualitative and quantitative analysis of *Artemisa sacrorum* Ledeb collected from five different regions in Tongliao, Inner Mongolia. TLC conditions were as follow: The reference substances were 8-hydroxy-6,7-dimethoxycoumarin and 7-hydroxy-6-methoxycoumarin, the adsorbent with silica gel G, the developing agent with dichloromethane-acetone(7:1) and the chromogenic reagent with ultraviolet lamp; The reference substance was 6,8-dimethoxycoumarin-7-O-β-D-glucoside, the adsorbent with silica gel G, the developing agent with dichloromethane-methanol(5:1) and the chromogenic reagent with ultraviolet lamp. HPLC conditions were as follow: The separation was performed on Topsisil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); The mobile phase was comprised of water(A)-acetonitrile(B) with a gradient elution. The detection wavelength was 263 nm with column temperature at 30 ℃. **RESULTS** The spots in TLC of reference substances(8-hydroxy-6,7-dimethoxycoumarin, 7-hydroxy-6-methoxycoumarin and 6,8-dimethoxycoumarin-7-O-β-D-glucoside) and different samples had the same R_f value, with good repeatability and easy to be identified. Under the HPLC conditions adopted in this study, all calibration curves compound 1~7 exhibited good linearity($r \geq 0.9993$). The recoveries of the method were 98.5, 95.0, 97.0, 98.3, 96.0, 98.9, 99.1, respectively. RSD were <2.0%. **CONCLUSION** A simple, stable and reliable method for qualitative and quantitative analysis method of *Artemisa sacrorum* Ledeb, which provides a basis for comprehensive evaluation of the quality of *Artemisa sacrorum* Ledeb.

KEYWORDS: *Artemisa sacrorum* Ledeb; coumarin; TLC; HPLC

铁杆蒿(*Artemisa sacrorum* Ledeb)系菊科蒿属植物, 半灌木, 主根木质, 分布于我国西北部陕西、内蒙古、甘肃、宁夏、青海、新疆和西南部的西藏等省区, 具有破痞、杀虫、消肿、止痛及

燥黄水之功效^[1]。至今, 有机酸类、黄酮类化合物、萜类和香豆素等次级代谢产物已从该植物中分离得到^[2], 然而铁杆蒿化学成分的定性和定量分析未有明确的标准。

基金项目: 内蒙古自治区蒙医药标准化项目(MB017)

作者简介: 白彪, 男, 主治医师 Tel: 15048268384 E-mail: baibiao2013@163.com *通信作者: 王青虎, 男, 博士, 教授 Tel: 15894890037 E-mail: wqh693@163.com

· 1704 · Chin J Mod Appl Pharm, 2020 July, Vol.37 No.14

中国现代应用药学 2020 年 7 月第 37 卷第 14 期

蒿属植物含有丰富的黄酮、香豆素、炔烃及萜类化合物,也是其主要的生物活性成分^[3]。课题组在采集于内蒙古通辽市后旗的铁杆蒿化学成分研究过程中分离得到 25 个化合物^[4-5],其中黄酮 3 个、二苯乙烯类 2 个、一般苯丙素 6 个、香豆素 3 个、苯乙酮类 5 个和其他化合物 6 个。故本研究根据参考文献^[6-11]中记载的 TLC 和 HPLC 研究思路,以已分离得到的化合物咖啡酸(1)、阿魏酸(2)、sacroflavone A(3)、2-羟基-6-甲氧基苯乙酮-4-*O*- β -D-葡萄糖苷(4)、苯乙酮-4-*O*- β -D-葡萄糖苷(5)、6-甲氧基香豆素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷(6)、6,8-二甲氧基香豆素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷(7)为指标,采用 HPLC 同时测定采集于不同地区的 5 批样品中 2 个苯丙素、1 个黄酮、2 个苯乙酮和 2 个香豆素素的含量,并以 8-羟基-6,7-二甲氧基香豆素、7-羟基-6-甲氧基香豆素和 6,8-二甲氧基香豆素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷为对照品,对 5 批样品进行 TLC 鉴别,为综合评价铁杆蒿的质量控制提供参考。

1 材料

LC-20 型高效液相色谱仪(LC-20AT 输液泵、SPD-M20A 检测器、CBM-20A 工作站、CTO-22A 柱温箱)、AUW220D 电子天平均来自日本岛津;KQ-600DB 超声波冲洗器(昆山市超声仪器有限公司);柱色谱硅胶、硅胶 G 均来自上海海洋化工厂。

咖啡酸(1)、阿魏酸(2)、sacroflavone A(3)、2-羟基-6-甲氧基苯乙酮-4-*O*- β -D-葡萄糖苷(4)、苯乙酮-4-*O*- β -D-葡萄糖苷(5)、6-甲氧基香豆素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷(6)、6,8-二甲氧基香豆素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷(7)均为自制,经 HPLC 检测其纯度均>97.0%;乙腈(色谱纯,美国飞世尔科学世界公司);水为超纯水;其余试剂均为分析纯。

铁杆蒿采集于内蒙古通辽市科左后旗、科左中旗、扎鲁特旗、奈曼旗、库伦旗等 5 个产地,编号分别为 TKH、TKZ、TZL、TNM 和 TKL,由内蒙古民族大学蒙医药学院蒙药生药教研室布和巴特尔教授鉴定为菊科植物黑铁杆蒿(*Artemisa sacrorum* Ledeb)的地上部分。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

2.1.1 供试品溶液制备 称取铁杆蒿 2.0 g,加乙醇 20 mL,超声(功率 600 W,频率 40 kHz)处理 30 min,滤过,滤液浓缩至 3 mL,加少量硅胶拌样,自然晾干。晾干后的样品加入已装好 10 g 硅

胶的柱色谱中,先用石油醚-丙酮(80:1,100 mL)洗脱,然后依次用石油醚-丙酮(60:1,500 mL)和石油醚-丙酮(20:1,300 mL)洗脱,分别收集后得到洗脱液 1 和 2,浓缩至 10 mL,洗脱液 1 供 8-羟基-6,7-二甲氧基香豆素和 7-羟基-6-甲氧基香豆素的 TLC 鉴别备用,而洗脱液 2 供 6,8-二甲氧基香豆素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷的 TLC 鉴别备用。

2.1.2 对照品溶液制备 称取 8-羟基-6,7-二甲氧基香豆素、7-羟基-6-甲氧基香豆素和 6,8-二甲氧基香豆素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷对照品各 10 mg,加甲醇各 25 mL,溶解,溶液各取 1 mL,甲醇稀释至 10 mL,即得。

2.1.3 8-羟基-6,7-二甲氧基香豆素和 7-羟基-6-甲氧基香豆素的鉴别 吸附剂为硅胶 G,展开剂为二氯甲烷-丙酮(7:1),紫外灯下显色观察。供试品溶液和对照品溶液各 20 μ L,点于同一硅胶板上,展开,取出,晾干,显色,结果见图 1。

2.1.4 6,8-二甲氧基香豆素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷的鉴别 吸附剂为硅胶 G,展开剂为二氯甲烷-甲醇(5:1),紫外灯下显色观察。供试品溶液和对照品溶液各 20 μ L,点于同一硅胶板上,展开,取出,晾干,显色,结果见图 1。

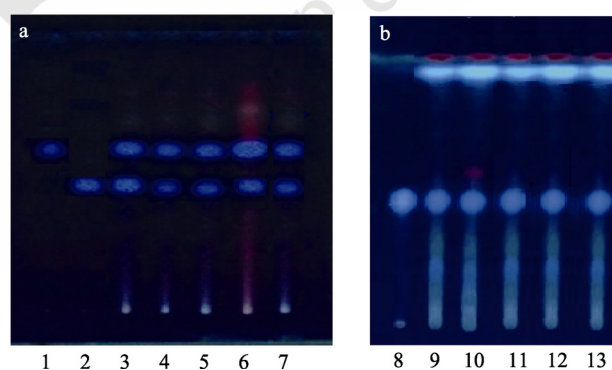


图 1 8-羟基-6,7-二甲氧基香豆素、7-羟基-6-甲氧基香豆素(a)和二甲氧基香豆素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷(b)TLC 鉴别图 1-8-羟基-6,7-二甲氧基香豆素对照品溶液;2-7-羟基-6-甲氧基香豆素对照品溶液;3~7,9~13-供试品溶液;8-二甲氧基香豆素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷对照品溶液。

Fig. 1 8-hydroxy-6,7-dimethoxycoumarin, 7-hydroxy-6-methoxycoumarin(a) and 6,8-dimethoxycoumarin-7-*O*- β -D-glucoside(b) TLC identification

1-8-hydroxy-6,7-dimethoxycoumarin reference solution; 2-7-hydroxy-6-methoxycoumarin reference solution; 3-7, 9-13-sample solutions; 8-6,8-dimethoxycoumarin-7-*O*- β -D-glucoside reference solution.

2.2 HPLC 分析

2.2.1 对照品储备液的制备 精密称取化合物 1~7 的对照品适量,分别用色谱甲醇制备成浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 储备液,并在 4 $^{\circ}$ C 下储存备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 称取不同产地铁杆蒿(TKH、TKZ、TZL、TNM 和 TKL)各 1.0 g, 精密称定, 分别放入 50 mL 的具塞锥形瓶中, 加甲醇 25 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液浓缩至 2 mL, 加少量硅胶拌样, 自然晾干。晾干后的样品加入已装好 10 g 硅胶的柱色谱中, 先用石油醚-丙酮(60 : 1, 500 mL)洗脱, 然后用乙酸乙酯(300 mL)洗脱。乙酸乙酯洗脱液浓缩至干, 加色谱甲醇溶解, 并用色谱甲醇定容至 10 mL, 即得供试液, 并在 4 °C 下储存备用。

2.2.3 HPLC 条件 Topsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱, 0~10 min, 11%→15%B; 10~25 min, 15%→25%B; 25~35 min, 25%→55%B; 35~50 min, 55%→75%B。检测波长为 263 nm, 柱温为 30 °C, 流速: 1.0 mL·min⁻¹。在上述 HPLC 条件下, 化合物 1~7 达到基线分离(*R*>1.5), 理论板数均≥10 000, 色谱图见图 2。

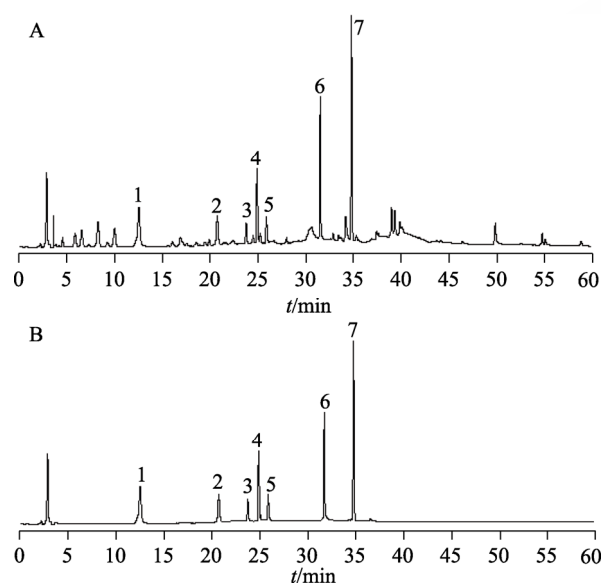


图 2 供试品溶液(A)和混合对照品溶液(B)HPLC 色谱图
1-咖啡酸; 2-阿魏酸; 3-sacroflavone A; 4-2-羟基-6-甲氧基苯乙酮-4-*O*-β-D-葡萄糖苷; 5-苯乙酮-4-*O*-β-D-葡萄糖苷; 6-6-甲氧基香豆素-7-*O*-β-D-葡萄糖苷; 7-6,8-二甲氧基香豆素-7-*O*-β-D-葡萄糖苷。

Fig. 2 HPLC chromatograms of sample(A) and reference (B) solution

1-caffeic acid; 2-ferulic acid; 3-sacroflavone A; 4-2-hydroxy-6-methoxyacetophenone-4-*O*-β-D-glucoside; 5-acetophenone-4-*O*-β-D-glucoside; 6-6-methoxycoumarin-7-*O*-β-D-glucoside; 7-6,8-dimethoxycoumarin-7-*O*-β-D-glucoside.

2.2.4 线性关系考察 精密吸取化合物 1~7 的对照品储备液适量, 用色谱乙腈制备成不同质量浓度的系列对照品溶液, 0.45 μm 微孔滤膜过滤。按“2.2.3”项下色谱条件进行测定, 进样量为 20 μL,

计算回归方程式, 结果见表 1。

2.2.5 定量限与检测限 用色谱乙腈将化合物 1~7 的对照品储备液逐步稀释, 定量限和检测限分别以色谱图中信噪比(*S/N*)为 10 和 3 时各对照品的进样浓度计算, 结果见表 1。

表 1 7 个化合物标准曲线

Tab. 1 Calibration curve for seven compounds

化合物	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg·mL ⁻¹	检测限/ μg·mL ⁻¹	定量限/ μg·mL ⁻¹
1	$y=1.18 \times 10^3 x - 208$	0.999 6	10.0~100.0	3.00	10.0
2	$y=5.09 \times 10^2 x + 118$	0.999 7	5.0~25.0	2.00	5.00
3	$y=7.22 \times 10^2 x - 101$	0.999 3	5.0~25.0	2.00	5.00
4	$y=2.75 \times 10^3 x - 186$	0.999 6	10.0~100.0	3.00	10.0
5	$y=6.12 \times 10^2 x - 201$	0.999 8	5.0~25.0	2.00	5.00
6	$y=3.78 \times 10^3 x - 5 123$	0.999 6	20.0~200.0	6.00	20.0
7	$y=9.47 \times 10^3 x - 7 861$	0.999 8	100.0~500.0	30.00	100.0

2.2.6 仪器精密度试验 吸取供试品溶液(TKH), 按“2.2.3”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 计算化合物 1~7 的峰面积 RSD, 分别为 1.52%, 1.60%, 1.73%, 1.52%, 1.53%, 1.61%和 1.24%。

2.2.7 稳定性试验 吸取供试品溶液(TKH), 按“2.2.3”项下色谱条件分别于 0, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样, 计算化合物 1~7 的峰面积 RSD, 分别为 1.72%, 1.59%, 1.66%, 1.70%, 1.48%, 1.67%和 1.41%。

2.2.8 重复性试验 取样品(TKH)6 份, 精密称定, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液。吸取供试品溶液, 按“2.2.3”项下色谱条件进行测定, 计算化合物 1~7 的质量分数, RSD 分别 1.86%, 1.71%, 1.53%, 1.67%, 1.55%, 1.53%和 1.39%。

2.2.9 回收率试验 称取样品(TKH) 0.5 g 6 份, 精密称定, 精密加入化合物 1~7 适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液。取供试品溶液, 按“2.2.3”项下色谱条件进行测定, 计算加样回收率和 RSD, 结果见表 2。

表 2 回收率结果(*n*=6)

Tab. 2 Results of recovery(*n*=6)

化合物	原有量/mg	加样量/mg	测得量/mg	回收率/%	RSD/%
1	0.262	0.20	0.459±0.007	98.5	1.53
2	0.074	0.10	0.169±0.003	95.0	1.78
3	0.104	0.10	0.201±0.004	97.0	1.99
4	0.430	0.40	0.823±0.013	98.3	1.58
5	0.095	0.10	0.191±0.003	96.0	1.57
6	0.560	0.60	1.153±0.020	98.9	1.73
7	1.551	1.50	3.037±0.044	99.1	1.45

2.2.10 样品测定 吸取不同产地铁杆蒿(TKH、TKZ、TZL、TNM 和 TKL)供试品溶液各 3 份,按“2.2.3”项下色谱条件进行测定,按外标两点法计算样品中化合物 1~7 的质量分数,结果见表 3。

表 3 不同样品定量分析结果($n=3$)

Tab. 3 Quantitative analytical results of various samples($n=3$)

化合物	样品含量/mg·g ⁻¹ (RSD/%)				
	TKH	TKZ	TZL	TNM	TKL
1	0.523(1.5)	0.487(1.4)	0.601(1.7)	0.540(1.3)	0.522(1.2)
2	0.147(1.4)	0.201(1.5)	0.189(0.52)	0.175(1.1)	0.181(1.7)
3	0.209(1.4)	0.198(1.0)	0.203(1.5)	0.156(1.3)	0.168(0.60)
4	0.861(1.5)	0.789(1.4)	0.869(1.6)	0.984(1.5)	0.908(1.3)
5	0.189(1.6)	0.122(0.82)	0.164(1.2)	0.201(1.5)	0.197(1.0)
6	1.121(1.6)	1.027(1.6)	0.905(1.5)	1.207(1.4)	1.278(1.6)
7	3.102(1.4)	2.871(1.3)	3.001(1.5)	2.687(1.6)	2.963(1.3)

3 讨论

本研究以 8-羟基-6,7-二甲氧基香豆素、7-羟基-6-甲氧基香豆素和 6,8-二甲氧基香豆素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷为对照品,选用 3 种展开系统对不同产地铁杆蒿进行了 TLC 鉴别。从图 1 可知,当 8-羟基-6,7-二甲氧基香豆素和 7-羟基-6-甲氧基香豆素以二氯甲烷-丙酮(7:1)为展开剂和 6,8-二甲氧基香豆素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷以二氯甲烷-甲醇(5:1)为展开剂时,斑点清晰,重复性好,易于鉴别。

HPLC 条件包括流动相组成和检测波长进行了优化,当流动相为水(A)-乙腈(B),其梯度洗脱顺序为 0~10 min, 11%→15%B; 10~25 min, 15%→25%B; 25~35 min, 25%→55%B; 35~50 min, 55%→75%B 时,化合物 1~7 分离效果较好,分析时间适当。化合物 1~7 经二极管阵列检测器在 200~400 nm 内进行扫描,化合物 1~7 约在 263 nm 处有最大吸收,故 263 nm 为检测波长。

从表 1 可知,化合物 1~7 在较宽的浓度范围内表现出良好的线性关系($r \geq 0.9993$);本实验所建立方法的精密度、稳定性和重复性均较好,RSD 均<2.0%;化合物 1~7 的平均回收率在 95.0%~99.1%内,RSD 也均<2.0%。

本研究所建立的 HPLC 成功应用于不同产地铁杆蒿中咖啡酸、阿魏酸、sacroflavone A、2-羟基-6-甲氧基苯乙酮-4-*O*- β -D-葡萄糖苷、苯乙酮-4-*O*- β -D-葡萄糖苷、6-甲氧基香豆素-7-*O*- β -D-葡萄糖

苷、6,8-二甲氧基香豆素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷的含量测定。从表 3 可知,化合物 1~7 的质量分数变化分别为 0.487~0.601, 0.147~0.201, 0.156~0.209, 0.789~0.984, 0.122~0.201, 0.905~1.278, 2.687~3.102 mg·g⁻¹。铁杆蒿中特征化学成分的含量变化可能与生长环境、气候、采集时间和生长年龄相关。

本研究建立了铁杆蒿质量多指标成分评价方法,其简便、快速、准确,可为评价该药材质量提供依据。

REFERENCES

- [1] WANG Q H, WU R J, QI G Q, et al. Chemical constituents of *Artemisia sacrorum* Ledeb [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2015, 50(16): 1380-1383.
- [2] MA Q Q, CUI Y L, XU S Y, et al. Synergistic inhibitory effects of acacetin and 11 other flavonoids isolated from *Artemisia sacrorum* on lipid accumulation in 3T3-L1 cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(49): 12931-12940.
- [3] WANG M X, HUANG F H, LIU C S, et al. Study on antioxidative effects of natural antioxidants to α -ethyl linolenate [J]. *Chin J Oil Crop Sci*(中国油料作物学报), 2007, 29(4): 466-469.
- [4] WANG Q H, WU J S, WU R J, et al. Two new flavonoids from *Artemisia sacrorum* Ledeb and their antifungal activity [J]. *J Mol Struct*, 2015(1088): 34-37.
- [5] WANG Q H, HAN N R C K T, DAI N Y T, et al. Analgesic effects and structural elucidation of two new flavone C-glycosides from *Artemisia sacrorum* [J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(10): 786-790.
- [6] WANG Q H, AO W L J, DAI N Y T. Structural elucidation and HPLC analysis of six flavone glycosides from *Artemisia frigida* Willd [J]. *Chem Res Chin Univ*, 2013, 29(3): 439-444.
- [7] JIN Y R, DU Y F, SHI X W, et al. Simultaneous quantification of 19 diterpenoids in *Isodon amethystoides* by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(3): 403-411.
- [8] GUO S, CUI X Q, JIANG M, et al. Simultaneous characterization and quantification of 17 main compounds in *Rabdosia rubescens* by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Drug Anal*, 2017, 25(2): 417-424.
- [9] LIU B. Simultaneous determination of six kinds of components in Yixintong capsules by HPLC-DAD [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2019, 36(14): 1792-1796.
- [10] FENG X, LU X G, KAN Z B, et al. Quality standard study on Tibetan medicine Wuwei jinse pill [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2019, 36(16): 1992-1997.
- [11] HUANG F, CHEN H B, DU J. Study on quality control method of Jianwei mixture [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2019, 36(11): 1375-1378.

收稿日期: 2019-06-13

(本文责编: 沈倩)