

· 化学与分析 ·

HPLC-DAD 测定白花蛇舌草中 6 个活性黄酮成分的含量

曹广尚¹, 杨培民^{1*}, 李芳^{1,2}, 李军¹

(1. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011; 2. 山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的:建立 HPLC-DAD 同时测定白花蛇舌草中 6 个活性黄酮成分(槲皮素-3-*O*-桑布双糖苷、芦丁、槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、槲皮素、山柰酚)含量的方法。方法:采用 Kromasil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 流动相乙腈-0.05% 磷酸梯度洗脱, 检测波长 254 nm, 体积流量 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 $^{\circ}$ C。结果:6 种活性黄酮成分线性、精密度、稳定性、重复性均符合方法学相关要求, 加样回收率为 99.40% ~ 99.70%。应用所建方法测定了不同产地白花蛇舌草中 6 个活性黄酮成分的量。结论:所建方法简单、可行、准确, 可用于白花蛇舌草中活性黄酮成分的质量控制。

[关键词] 白花蛇舌草; 高效液相色谱-二级管阵列; 活性黄酮成分

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0052-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014210052

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140915.1114.007.html>

[网络出版时间] 2014-09-15 11:14

Determination of Six Active Flavonoids in *Oldenlandia diffusa* Based on HPLC-DAD

CAO Guang-shang¹, YANG Pei-min^{1*}, LI Fang^{1,2}, LI Jun¹

(1. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250011, China;
2. Shandong University of TCM, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method of high performance liquid chromatography coupled with a photodiode array detector (HPLC-DAD) for the content determination of six active flavonoids (quercetin-3-*O*-sambubioside, rutin and quercetin-3-*O*- β -*D*-glucopyranside, kaempferol-3-*O*- β -*D*-glucopyranside, quercetin, kaempferol) in *Oldenlandia diffusa*. **Method:** The analyses were performed on a Diamonsil-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m) eluted with acetonitrile and 0.05% phosphoric acid in gradient mode. The flow rate was 1 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was set at 30 $^{\circ}$ C. **Result:** Six flavonoids have good linear relationship, precision, stability, and repeatability according to the requirements of the methodology determination. The recoveries were 99.40% -99.70%. Six flavonoids in *O. diffusa* from different origins were determined by HPLC-DAD. **Conclusion:** The method is simple, accurate, replicable, and can be used for the quality control of flavonoids in olden landia diffusa.

[Key words] *Oldenlandia diffusa*; HPLC-DAD; active flavonoids

白花蛇舌草具有清热解毒、活血化瘀、利湿通淋 等功效^[1]。主要含有黄酮、环烯醚萜、萜醌和多糖

[收稿日期] 20140525(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274052);山东省自然科学基金项目(ZR2011HL043);山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2013YY052)

[第一作者] 曹广尚, 硕士, 主管药师, 从事中药制剂研究, Tel:13793159405, 0531-68617919, E-mail: cgs198041@163.com

[通讯作者] * 杨培民, 博士, 教授、主任药师, 博士生导师, 从事中药制剂相关研究, Tel:0531-68617607, E-mail: jnymp7777@126.com

等成分,具有抗肿瘤、抗炎、调节免疫、抗氧化等作用^[2-7]。白花蛇舌草是目前少有的 2010 年版《中国药典》和地方收载标准均无含量测定项记载的临床常用中药,随着临床应用和研究的深入,建立科学合理、方便可行的质控方法对于控制其药材和其制剂质量、保障临床疗效具有重要的意义。本课题组前期已经从白花蛇舌草中分离纯化出多种黄酮、核苷类成分并证实其药理活性^[9-10]。未见对其中多种活性黄酮成分进行含量测定的报道,本研究采用 HPLC-DAD 建立白花蛇舌草中 6 个活性黄酮成分的测定方法并进行了含量测定,为建立白花蛇舌草质量控制方法提供科学参考。

1 材料

1260 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),AE200s 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),KQ5200DA 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

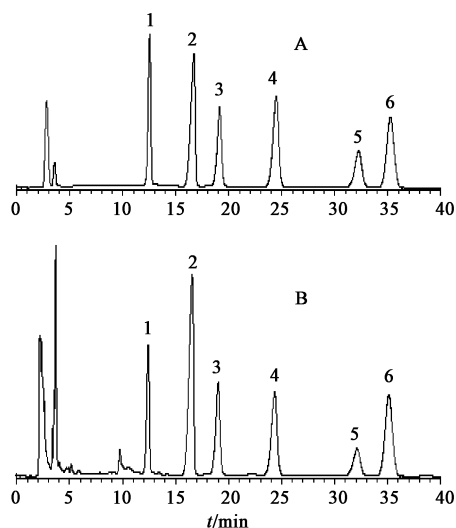
芦丁(批号 100080-200707)、槲皮素(批号 100081-200907)、山柰酚(批号 110861-200808)对照品购自中国食品药品检定研究院,均为含量测定用;槲皮素-3-*O*-桑布双糖苷($C_{26}H_{28}O_{16}$)、槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷($C_{21}H_{20}O_{12}$)、山柰酚-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷($C_{21}H_{20}O_{11}$)对照品均为本课题组自制,经液相等分析质量分数大于 98.0%。白花蛇舌草产地分别为江苏泰州、河南驻马店、安徽亳州、山东临沂、广东江门、福建漳州、云南昆明、江西吉安,经山东中医药大学李峰教授鉴定为茜草科植物白花蛇舌草 *Oldenlandia diffusa* Willd. 的干燥全草。乙腈、磷酸为色谱纯(美国 Fisher 公司),水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m),流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 5% ~ 10% A; 10 ~ 20 min, 10% ~ 20% A; 20 ~ 40 min, 20% ~ 40% A; 40 ~ 50 min, 40% ~ 5% A),检测波长 254 nm,柱温 30 $^{\circ}$ C,体积流量 1 mL·min⁻¹,进样量 10 μ L。各成分间的分离度良好,对照品及供试品色谱图见图 1。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取槲皮素-3-*O*-桑布双糖苷、芦丁、槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、槲皮素、山柰酚对照品适量,分别用甲醇配制成质量浓度为 0.645, 0.708, 0.603, 0.426, 0.328, 0.381 g·L⁻¹ 的对照品



A. 对照品; B. 供试品; 1. 槲皮素-3-*O*-桑布双糖苷;

2. 芦丁; 3. 槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷;

4. 山柰酚-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷; 5. 槲皮素; 6. 山柰酚

图 1 白花蛇舌草 HPLC

储备液。取上述储备液适量,加 70% 甲醇稀释成质量浓度分别为 129.0, 141.60, 120.60, 85.20, 65.60, 76.20 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取白花蛇舌草药材粉末(过 40 目筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,微孔滤膜(0.22 μ m)滤过,取续滤液,即得。

2.3 标准曲线的绘制 分别精密量取混合对照品溶液 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL,置 10 mL 量瓶中,加 70% 甲醇定容至刻度,摇匀,分别取 10 μ L,在上述色谱条件下进样分析。以对照品溶液质量分数为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,计算回归方程,结果见表 1。

2.4 精密度试验 精密量取混合对照品溶液 2 mL,置 5 mL 量瓶中,加 70% 甲醇定容至刻度,摇匀,按上述色谱条件连续进样 6 次,结果槲皮素-3-*O*-桑布双糖苷、芦丁、槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、槲皮素、山柰酚峰面积 RSD 分别为 1.3%, 1.6%, 0.9%, 1.8%, 0.8%, 1.2%,表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 取供试品溶液分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样分析,槲皮素-3-*O*-桑布双糖苷、芦丁、槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、槲皮素、山柰酚含量的 RSD 分别为 2.8%, 1.5%, 1.8%, 2.4%, 2.7%, 1.2%, 1.6%,表

表 1 6 个成分的回归方程和线性范围

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
槲皮素-3-O-桑布双糖苷	$Y = 4\ 617.45X - 120.26$	0.999 7	0.129 ~ 1.290
芦丁	$Y = 3\ 618.20X - 356.72$	0.999 8	0.142 ~ 1.416
槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷	$Y = 4\ 514.53X - 243.03$	0.999 8	0.120 6 ~ 1.206
山柰酚-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷	$Y = 3\ 719.29X - 162.18$	0.999 6	0.085 2 ~ 0.852
槲皮素	$Y = 3\ 329.94X - 256.36$	0.999 8	0.065 6 ~ 0.656
山柰酚	$Y = 4\ 618.76X - 145.86$	0.999 9	0.076 2 ~ 0.762

明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6 重复性试验 精密称定同一批药材细粉(过 40 目筛)6 份,按供试品溶液方法制备,并依上法测定计算。槲皮素-3-O-桑布双糖苷、芦丁、槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、山柰酚-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、槲皮素、山柰酚含量的 RSD 分别为 2.4%, 1.8%, 1.7%, 1.6%, 1.8%, 1.0%, 2.2%。结果表明,该方法的重复性良好。

2.7 加样回收率试验 精密称取已知含量的白花蛇舌草药材 6 份,各约 0.25 g,分别精密加入一定量对照品溶液,同上法制备供试品溶液。按上述色谱条件测定,槲皮素-3-O-桑布双糖苷、芦丁、槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、山柰酚-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、槲皮素、山柰酚含量的平均回收率分别为 99.43%, 99.68%, 99.40%, 99.70%, 99.69%, 99.57%, RSD 分别为 0.74%, 0.35%, 1.01%, 0.38%, 0.59%, 1.06%。

表 2 白花蛇舌草中 6 个成分的加样回收率试验

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
槲皮素-3-O- 桑布双糖苷	1.307 2	1.32	2.607 2	98.48	99.43	0.74
	1.305 1	1.32	2.619 6	99.58		
	1.313 5	1.32	2.627 6	99.55		
	1.306 9	1.32	2.618 7	99.38		
	1.294 7	1.32	2.623 2	100.64		
	1.289 6	1.32	2.595 3	98.92		
芦丁	2.804 5	2.81	5.600 5	99.50	99.68	0.35
	2.815 8	2.81	5.605 4	99.27		
	2.807 6	2.81	5.615 6	99.93		
	2.812 4	2.81	5.608 9	99.52		
	2.795 2	2.81	5.611 7	100.23		
	2.800 7	2.81	5.599 8	99.61		
槲皮素-3-O- β -D-吡喃	0.900 4	0.89	1.790 1	99.97	99.40	1.01
	0.899 8	0.89	1.799 3	101.07		

续表 2

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
葡萄糖苷	0.904 5	0.89	1.786 4	99.09		
	0.898 7	0.89	1.773 5	98.29		
	0.905 9	0.89	1.790 2	99.36		
	0.909 1	0.89	1.786 9	98.63		
山柰酚-3-O- β -D-吡喃 葡萄糖苷	0.562 5	0.55	1.110 3	99.60	99.70	0.38
	0.554 9	0.55	1.103 9	99.82		
	0.560 7	0.55	1.108 5	99.60		
	0.570 1	0.55	1.121 4	100.24		
槲皮素	0.559 9	0.55	1.104 8	99.07		
	0.566 8	0.55	1.115 9	99.84		
	0.140 9	0.151	0.291 8	99.93	99.69	0.59
	0.147 6	0.151	0.2972	99.07		
山柰酚	0.149 1	0.151	0.298 9	99.21		
	0.141 7	0.151	0.293 7	100.67		
	0.147 8	0.151	0.298 6	99.87		
	0.149 2	0.151	0.299 3	99.40		
	0.397 5	0.385	0.778 1	98.86	99.57	1.06
	0.392 7	0.385	0.780 3	100.68		
山柰酚	0.395 8	0.385	0.784 2	100.88		
	0.399 1	0.385	0.779 6	98.83		
	0.392 3	0.385	0.776 7	99.84		
	0.391 6	0.385	0.770 2	98.34		

2.8 样品含量测定 取 8 个不同产地野生或栽培白花蛇舌草药材,按前述方法制备供试品溶液,进样分析并计算,平行 3 次试验,计算槲皮素-3-O-桑布双糖苷、芦丁、槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、山柰酚-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、槲皮素、山柰酚的平均含量,结果见表 3。

表 3 不同产地白花蛇舌草样品中 6 个成分测定 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

产地	质量分数					
	1	2	3	4	5	6
江苏泰州(栽培)	5.24	11.23	3.56	2.25	0.56	1.59
河南驻马店(栽培)	2.13	10.56	1.12	0.79	0.58	1.21
安徽亳州(栽培)	3.37	12.64	6.90	2.65	1.72	1.96
山东临沂(栽培)	2.45	4.92	3.79	3.56	0.97	0.98
广东江门(野生)	6.32	5.79	10.23	7.98	1.12	1.53
福建漳州(野生)	1.36	2.34	2.78	2.34	0.78	0.75
云南昆明(野生)	2.36	15.78	0.98	1.46	0.89	1.24
江西吉安(栽培)	3.15	7.25	4.21	2.35	0.52	2.15

注:1. 槲皮素-3-O-桑布双糖苷;2. 芦丁;3. 槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷;4. 山柰酚-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷;5. 槲皮素;6. 山柰酚。

3 小结与讨论

《中国药典》2010 年版没有收载白花蛇舌草药材标准,地方收载标准也没有对其进行指标成分含量控制。黄酮类成分是经证实的主要活性成分,本研究采用 HPLC-DAD 对白花蛇舌草中 6 个活性黄酮成分进行质量控制,为国家及地方药材标准的建立提供参考,同时对于提高白花蛇舌草药材质量、保障临床疗效都具有积极意义。

采用 DAD 检测器进行全波长扫描(190~400 nm),分析 6 种黄酮成分的紫外吸收光谱,结果表明,检测波长为 254 nm 时,6 个黄酮成分均有较强吸收,且杂质少,各成分分离效果好。综合考虑选择以 254 nm 为检测波长。

根据指标性成分的理化性质和色谱行为,参考相关文献^[11-12],考察了流动相甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.2% 磷酸水、乙腈-0.05% 磷酸水梯度洗脱,其中以乙腈-0.05% 磷酸水梯度洗脱测定指标成分,对照品峰保留时间适中,基线低平,供试品中各指标成分峰之间分离好,故最终确定此流动相。同时分别优化了柱温(20,30,40 $^{\circ}\text{C}$)和体积流量(0.8,1.0,1.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$),结果表明在柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,体积流量 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时基线稳定,色谱图分离效果较好。

供试品制备中曾分别以甲醇超声和甲醇回流处理样品,结果提取率相差不大,由于超声提取操作简便易行,故选用以甲醇超声提取,并继续考察了超声 15,30,45 min 对提取率的影响,结果发现超声 30 min 成分已提取完全,故最终确定文中供试品制备方法。

结果表明,白花蛇舌草野生和栽培品之间成分含量差异无明显规律,不同产地白花蛇舌草中 6 种活性黄酮成分差异较大,可知地域环境等对其成分影响较大,这也为白花蛇舌草栽培地区的选择提供参考。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录 23.
- [2] Liang Z, Jiang Z, Ho H, et al. Comparative analysis of *Oldenlandia diffusa* and its substitutes by high performance liquid chromatographic finger print and mass spectrometric analysis [J]. *Planta Med*, 2007, 73 (14):1502.
- [3] Wang N, Li D Y, Niu H Y, et al. 2-hydroxy-3-methylanthraquinone from *Hedyotis diffusa* Willd induces apoptosis in human leukemic U937 cells through modulation of MAPK pathway [J]. *Arch Pharm Res*, 2013, 36(6):752.
- [4] Ganbold M, Barker J, Ma R, et al. Cytotoxicity and bioavailability studies on decoction of *Oldenlandia diffusa* and its fractions separated by HPLC [J]. *J Ethnopharmacology*, 2010, 131(2):396.
- [5] Kim D H, Lee H J, Oh Y J, et al. Iridoid glycosides isolated from *Oldenlandia diffusa* inhibit LDL-oxidation [J]. *Arch Pharm Res*, 2005, 28(10):1156.
- [6] 黄卫华,李友宾,蒋建勤. 白花蛇舌草化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(5):524.
- [7] 王宇翎,张艳,方明,等. 白花蛇舌草总黄酮的抗炎及抗菌作用 [J]. *中国药理学报*, 2005, 21(3):348.
- [8] 王宇翎,张艳,方明,等. 白花蛇舌草总黄酮的免疫调节作用 [J]. *中国药理学报*, 2005, 21(4):444.
- [9] 杨培民,代龙,魏永利. 大孔吸附树脂分离纯化白花蛇舌草总黄酮的研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2010, 33(6):417.
- [10] 张创峰,杨友亮,刘晋,等. 白花蛇舌草化学成分和药理作用研究进展 [J]. *西北药学杂志*, 2012, 27(4):379.
- [11] 邵振中,贾晓斌,施峰,等. HPLC 同时测定白花蛇舌草中咖啡酸、槲皮素和山柰酚 [J]. *中成药*, 2009, 31(12):1894.
- [12] 张洪飞,张华燕,李燕,等. 反相 HPLC 同时测定白花蛇舌草口服液 4 种组分含量 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(20):2329.

[责任编辑 顾雪竹]