

# 高效毛细管电泳法同时测定小白蒿 5 种黄酮类化合物的含量

王青虎\*, 奥乌力吉, 包建华

(内蒙古民族大学蒙医药学院, 内蒙古 通辽 028000)

**[摘要]** 目的:建立小白蒿中 5 种黄酮类化合物的同时测定方法,为综合评价小白蒿最佳采集时间提供参考依据。方法:采用高效毛细管电泳法测定小白蒿中 5 种黄酮类化合物的含量,并对不同采集时间小白蒿和不同部位中 5 种黄酮类化合物的含量进行比较。结果:在所用的实验操作条件下,5 种对照品溶液分别在 1.00~40.00 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9998$ ), 2.00~80.00 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9999$ ), 0.50~80.00 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9996$ ), 1.00~40.00 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9993$ ) 和 1.00~40.00 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9994$ ) 具有良好的线性关系,平均回收率分别为 99.31% (RSD 1.60%), 98.14% (RSD 1.03%), 98.37% (RSD 1.57%), 97.92% (RSD 0.94%), 98.16% (RSD 1.20%)。结论:实验结果表明,小白蒿花中黄酮类化合物的相对含量较高,最佳采集时间为 6 月中旬到 7 月末。

**[关键词]** 小白蒿;高效毛细管电泳法;黄酮类;同时测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0063-04

## Simultaneous Determination of Five Flavonoids in *Artemisia frigida* by HPCE

WANG Qing-hu\*, AO Wu-li-ji, BAO Jian-hua

(College of Traditional Mongolian Medicine, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for determining five flavonoids in *Artemisia frigida* in order to review the collection time. **Method:** The content of five flavonoids in different collection time and parts of *A. frigida* was determined by HPCE and the content was compared to predicate the collection time. **Result:** The linear ranges of five flavonoids were 1.00-40.00 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9998$ ), 2.00-80.00 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9999$ ), 0.50-80.00 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9996$ ), 1.00-40.00 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9993$ ) and 1.00-40.00 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9994$ ) respectively. The average recoveries of five flavonoids were 99.31% (RSD 1.60%), 98.14% (RSD 1.03%), 98.37% (RSD 1.57%), 97.92% (RSD 0.94%), 98.16% (RSD 1.20%). **Conclusion:** The content of five flavonoids in the flower is more than that in other parts. The optimal collection time is from the middle of June to the end of July.

**[Key words]** *Artemisia frigida*; HPCE; flavonoids; simultaneous determination

小白蒿别名冷蒿蒙名阿各,系菊科蒿属植物冷蒿 *Artemisia frigida* Willd. 的地上部分,主治各种出血,关节肿胀,肾热,月经不调,疮痍,也是蒙医常用

的“人造圣水组成之一”<sup>[1]</sup>。主要分布于我国的内蒙古、青海、甘肃、山西和东北地区。作者在小白蒿化学成分研究的前期工作中,从全草中分离出多种黄酮类化合物。现代药理研究<sup>[2-4]</sup>表明,黄酮类化合物具有扩张血管、抗氧化、抗炎和调血脂作用。其药理作用与蒙医经典验方<sup>[5-6]</sup>和现代临床用药比较吻合。黄酮类化合物是小白蒿的主要活性成分之一。但经查阅近几十年来的国内外相关药理学文献,作者发现目前国内外对小白蒿的采集时期以及采集后的

**[收稿日期]** 20110227(005)

**[基金项目]** 国家民委和教育部重点实验室开发基金

**[通讯作者]** \*王青虎,副教授,博士,从事蒙药有效成分的提取分离鉴定及质量标准研究, E-mail: wqh693@163.com

加工工艺还没有一个明确的标准。本实验建立了高效毛细管电泳法同时测定其中 5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮、5,3'-二羟基-6,7,4'-二甲氧基黄酮、槲皮素、5,7,3'-三羟基-6,4'-三甲氧基黄酮和木犀草素的含量,并对不同采集时间小白蒿和不同部位中 5 种黄酮类化合物的含量进行比较,以其为综合评价小白蒿最佳采集时间提供参考依据。

### 1 仪器与试剂

CAPEL-105 型高效毛细管电泳仪;弹性石英毛细管(郑州英诺高科有限公司);UV-3000 型双波长双光束紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);PB-20 型数式酸度计(北京赛多利斯有限公司);AUW220D 型自动电子天平(日本岛津公司)对照品:5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮、5,3'-二羟基-6,7,4'-二甲氧基黄酮、槲皮素、5,7,3'-三羟基-6,4'-三甲氧基黄酮和木犀草素均为自制并用高效毛细管电泳仪分别测定其含量均 > 99.5%,内标物为山奈酚。实验中所用的小白蒿采集地点为内蒙古通辽市扎鲁特旗罕山,采集时间见表 1。乙腈为色谱纯(天津市光复精细化工研究所),水为超纯水,大孔树脂 D101(天津市北联精细化学品开发有限公司),其他所用试剂均为分析纯。

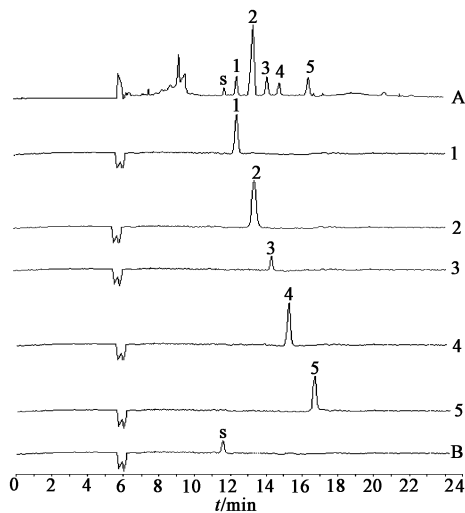
表 1 小白蒿的采集时间和不同部位

No.	采集时间和部位	采集人
1	2009-05-19	金泉
2	2009-06-08	金泉
3	2009-06-27	孟和巴根那
4	2009-07-12	孟和巴根那
5	2009-07-25	孟和巴根那
6	2009-08-10	孟和巴根那
7	2009-08-28	孟和巴根那
8	茎	王青虎
9	花	王青虎
10	叶	王青虎

### 2 方法与结果

**2.1 电泳条件** 弹性石英毛细管柱 75  $\mu\text{m} \times 50$  cm,进样方式为电动进样 15 s,分离电压为 18 kV,毛细管温度 25  $^{\circ}\text{C}$ ,检测波长 283 nm。运行缓冲液 0.25  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硼砂 30% 乙腈溶液。每天开机使用前均用 0.5  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液在 25  $^{\circ}\text{C}$  下冲洗 10 min,再用 0.5  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的氢氧化钠溶液在 25  $^{\circ}\text{C}$  下冲洗 10

min,然后分别用 0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液、0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的氢氧化钠溶液、超纯水和缓冲液冲洗 5 min。平行测定之间用 0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠、超纯水和缓冲液在 25  $^{\circ}\text{C}$  条件下各冲洗 5 min。进样前 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤在操作条件下,所测 5 种黄酮类化合物的分离度良好,结果见图 1。



A. 样品溶液;B. 内标物溶液;1. 5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮;2. 5,3'-二羟基-6,7,4'-二甲氧基黄酮;3. 槲皮素;4. 5,7,3'-三羟基-6,4'-三甲氧基黄酮;5. 木犀草素(表 2~4 同)

图 1 样品溶液和对照溶液的 HPCE

### 2.2 供试液的制备

**2.2.1 样品供试液的制备** 分别称取样品 0.4 g,精密称定,加三氯甲烷 25 mL,超声处理 30 min,滤过。分别吸取续滤液 10 mL,蒸干,加 10 mL 20% 甲醇溶解,放入已装好 40 g 大孔树脂(D101)的色谱柱,先用 20% 乙醇溶液 50 mL 洗脱,然后用无水乙醇 100 mL 洗脱。把无水乙醇部分减压回收至干,加色谱乙腈溶解并定容至 5 mL,即得样品供试液 1~10。

**2.2.2 对照品和内标溶液的制备** 分别精密称取 5 种黄酮对照品和内标物适量,分别加色谱乙腈溶解并配成浓度为 3  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品储备液和内标溶液。

**2.3 线性关系的考察** 精密吸取 5 种黄酮对照品储备液适量,分别加入相同量内标液,然后用色谱乙腈配成不同浓度的系列对照品溶液,在选定操作条件下分析测定,以对照品的质量浓度为横坐标,对照品和内标物的峰面积比为纵坐标绘制标准曲线,计算其回归方程式。结果见表 2。

**2.4 精密度试验** 在选定的操作条件下,精密吸取 5 种黄酮储备液 10  $\mu\text{L}$ ,再加入内标液 10  $\mu\text{L}$ ,然后用

表2 5种黄酮对照品溶液的线性关系

对照品	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
1	$Y=0.1143X+0.0327$	0.9998	1.00~40.00
2	$Y=0.1000X+0.0595$	0.9999	2.00~80.00
3	$Y=0.0555X+0.0268$	0.9996	0.50~80.00
4	$Y=0.1132X-0.0161$	0.9993	1.00~40.00
5	$Y=0.0979X-0.0295$	0.9994	1.00~40.00

注:Y轴为对照品与内标物的峰面积比值,X轴为对照品溶液浓度( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

色谱乙腈定容至3 mL,电动进样15 s,记录其毛细管电泳谱图,并根据回归方程计算出其浓度,连续测定6次,结果RSD分别为1.02%,0.98%,1.85%,1.04%,1.76%。

**2.5 稳定性试验** 精密吸取供试液(4)0.5 mL,再加入内标液10  $\mu\text{L}$ ,然后用色谱乙腈定容至3 mL,在上述测定条件下48 h内每隔一定时间测定1次,进行稳定性考察。在48 h内测定6次,数据稳定。5种黄酮对照品的RSD分别为1.13%,0.87%,1.46%,1.22%,1.80%。

**2.6 回收率试验** 取已知含量的样品(4)6份,每份为0.2 g,精密称定。分别加入对照品适量,依照上述方法提取并测定,计算回收率。结果见表3。

**2.7 样品含量测定** 分别吸取不同样品供试液0.5 mL,再加入内标液10  $\mu\text{L}$ ,然后用色谱乙腈定容至3 mL,在选定的操作条件下进行测定,计算含量。见表4。

表3 5种黄酮成分加样回收率试验( $n=6$ )

对照品	样品中含量	加入量	测得量	回收率	RSD/%
	/mg	/mg	/mg	/%	
1	0.2713	0.60	0.8658	99.08	1.60
	0.2697	0.60	0.8855	102.4	
	0.2617	0.30	0.5595	99.27	
	0.2729	0.30	0.5688	98.63	
	0.2678	0.15	0.4146	97.87	
	0.2719	0.15	0.4198	98.60	
2	1.3268	1.20	2.4879	96.76	1.03
	1.3838	1.20	2.5465	96.89	
	1.3577	0.60	1.3444	97.78	
	1.3783	0.60	1.9708	98.75	
	1.3755	0.30	1.6723	98.93	
	1.3667	0.30	1.6659	99.73	
3	0.6474	1.20	1.7798	96.03	1.57
	0.6752	1.20	1.8511	97.99	
	0.6624	0.60	1.2613	99.82	
	0.6725	0.60	1.2699	99.57	
	0.6711	0.30	0.9684	99.10	
	0.6671	0.30	0.9602	97.70	
4	0.1977	0.30	0.4912	97.83	0.94
	0.2062	0.30	0.4983	97.37	
	0.2023	0.15	0.3496	98.20	
	0.2054	0.15	0.3501	96.47	
	0.2050	0.09	0.2938	98.67	
	0.2038	0.09	0.2929	99.00	
5	0.3220	0.60	0.8997	96.28	1.20
	0.3359	0.60	0.9283	98.73	
	0.3295	0.30	0.6212	97.23	
	0.3345	0.30	0.6322	99.23	
	0.3339	0.15	0.4807	97.87	
	0.3319	0.15	0.4813	99.60	

表4 样品中5种黄酮化合物的测定( $n=5$ )

No.	对照品1	对照品2	对照品3	对照品4	对照品5
1	0.501	2.404	2.156	0.453	0.784
2	0.979	2.822	2.247	0.572	0.575
3	1.072	5.271	3.176	0.457	0.814
4	1.354	6.864	3.349	1.023	1.666
5	0.664	2.724	1.987	0.380	0.542
6	0.630	2.737	0.897	0.727	0.574
7	0.548	2.508	1.942	0.458	0.547
8	0.595	2.473	0.895	0.417	0.557
9	1.638	8.766	3.583	0.983	0.872
10	0.800	4.074	1.761	0.812	0.832

### 3 讨论

在选择提取溶剂时,考察了三氯甲烷、三氯甲烷-甲醇(1:1)和甲醇等溶剂对5种黄酮类化合物的

提取率。实验结果表明,三氯甲烷的提取率不仅与甲醇和三氯甲烷-甲醇(1:1)的接近,而且预处理后的电泳图清晰,分离度较好。预处理中先用20%的

乙醇 50 mL 洗脱,5 种黄酮类化合物均没有洗脱下来,然后用无水乙醇 100 mL 洗脱,5 种黄酮类化合物均完全洗脱下来并且与其他杂质分离。

实验所用的对照品 5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮、5,3'-二羟基-6,7,4'-三甲氧基黄酮、槲皮素、5,7,3'-三羟基-6,4'-二甲氧基黄酮和木犀草素,经药材 95% 乙醇提取,三氯甲烷层采用硅胶、Sephadex LH-20 等柱色谱法进行分离,NMR 等波谱学方法结构鉴定,并用高效毛细管电泳仪归一化法分别测定其含量均 >99.5%。

加大毛细管柱两端的电泳电压能够缩短分析时间,但当电压增加到一定程度时黄酮类化合物的分离度下降,电泳电压加大后,还会使仪器的噪音明显增大。综合考虑,实验采用 18 kV 电泳电压较好,既保持了仪器的低噪音,又能使黄酮类化合物有较好的分离度。

毛细管柱温度较低时,溶液黏度增大,淌度降低,峰形展宽,迁移时间延长;温度较高时,溶液黏度减小,淌度增加,迁移时间缩短,分离度下降。当 25 ℃ 时,5 种对照品和内标物的峰形和分离度较好,分析完一个样品所需时间(20 min)也较为适中,所以毛细管电泳的温度确定在 25 ℃。

选用几种缓冲体系进行实验,结果表明硼砂缓冲体系对 5 种黄酮类化合物分离度较好。分别用 0.01,0.02,0.025,0.03,0.035 mol·L<sup>-1</sup> 5 种不同浓度的硼砂溶液考察浓度对黄酮类化合物分离度的影响,硼砂浓度为 0.02 mol·L<sup>-1</sup> 以下时,5 种黄酮类化合物不能很好地分离;浓度为 0.03 mol·L<sup>-1</sup> 时,分离度增加,迁移时间延长。选用 0.025 mol·L<sup>-1</sup> 时,迁移时间适中,分离度和重复性较好。

在缓冲溶液中加入有机添加剂不仅能使不溶于水的被测物质溶解度增大,而且还能有效地改善被测组分的分离度。5 种黄酮类化合物的水溶性差,

易溶于乙腈。所以在 0.025 mol·L<sup>-1</sup> 硼砂溶液分别用 10%,20%,30%,40%,50% 的乙腈配制,考察其分离情况。结果表明,30% 乙腈配制的硼砂溶液对 5 种黄酮类化合物既保证了较好的分离效果,又保证了较快的分析速度。

采集失时,有“药效难保”之忧。《新修本草》说:“乖于采摘,乃物是而实非”。叶、全草类药材通常在花蕾将开或花朵盛开、枝叶茂盛时采收,因此时植物已完全生长,生命力最旺盛。据文献报道小白蒿花期为 7~8 月,故我们采集时间从 5 月到 8 月末,共采集了 7 个样品。根据表 4 可知,不同采集时间样品中黄酮化合物的含量有一定的规律性的变化。5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮、5,3'-二羟基-6,7,4'-二甲氧基黄酮、槲皮素从 5 月中旬开始逐渐增高,至 7 月中旬达到最高点,然后又呈下降趋势,总体分析 7 月 12 日采集样品中 5 种黄酮类化合物的相对含量均高于其他采集点。另外,花中黄酮类化合物的量高于叶和茎。综合分析小白蒿的采集时间应为 6 月中旬到 7 月末。

#### [参考文献]

- [1] 白清云. 中国医学百科全书[M]. 赤峰:内蒙古科学技术出版社,1986:322.
- [2] 李荣,李俊. 黄酮类化合物药理活性及其构效关系研究进展[J]. 安徽医药,2005,9(7):481.
- [3] 华辉,郭勇. 黄酮类化合物药理研究进展[J]. 广东药学,1999,9(4):9.
- [4] 曹伟国,刘志勤,邵云,等. 黄酮类化合物药理研究进展[J]. 西北植物学报,2003,23(12):2241.
- [5] 吉格木德丹,金扎木苏. 通瓦嘎吉德[M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社出版,1999:219.
- [6] 金巴. 临症医药鉴[M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,1977:899.

[责任编辑 蔡仲德]