

高效液相色谱法同时测定不同来源水翁花中的 2 种活性成分

邱宏聪¹ 陈 昭^{2,3} 柴 玲¹ 刘布鸣¹

(1 广西中药质量标准研究重点实验室(广西中医药研究院), 南宁, 530001; 2 广东省第二中医院(广东省中医药工程技术研究院), 广州, 510095; 3 广东省中医药研究开发重点实验室, 广州, 510095)

摘要 目的: 对水翁花中的熊果苷和 2',4'-二羟基-6'-甲氧基-3'-5'-二甲基查耳酮进行含量测定研究, 建立药材的质量标准。方法: 采用高效液相色谱(HPLC)法: 以 Diamonsil-C₁₈ (5 μ m, 250 $\times$ 4.6 mm) 为色谱柱, 以乙腈-0.05% 磷酸(60:40) 为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 254 nm, 流速 1.0 mL/min, 柱温 25 $^{\circ}$ C; 结果: 采用 HPLC 法建立了 8 批药材的指标性成分指纹图谱并进行准确定量; 结论: 该方法快速、高效、准确, 能够全面、有针对性地对水翁花药材的质量优劣进行评价。

关键词 水翁花; 高效液相色谱法; 活性成分

Simultaneous Determination of Two Active Components in Flos Cleistocalycis Operculati by High Performance Liquid Chromatography

Qiu Hongcong¹, Chen Zhao^{2,3}, Chai Ling¹, Liu Buming¹

(1 Guangxi Key Laboratory of TCM Quality Standards (Guangxi Institute of Chinese Medicine and Pharmaceutical Science), Nanning 530001, China; 2 Guangdong Second TCM Hospital (Guangdong Provincial Engineering Technology Research Institute of TCM), Guangzhou 510095, China; 3 Guangdong Provincial Key Laboratory of Research and Development in Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China)

Abstract Objective: To evaluate the quality of Flos Cleistocalycis Operculati by quantitatively determining arbutin and 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3'-5'-dimethylchalcone. **Methods:** HPLC was used for determination, with Diamonsil-C₁₈ (5 μ m, 250 $\times$ 4.6 mm) column and a mobile phase containing acetonitrile-0.05% phosphoric acid; the detection wavelength was 254 nm, column temperature 25 $^{\circ}$ C and the elution mode was gradient, with a flow rate of 1.0 mL/min; **Results:** Eight batches of herb samples were accurately determined and established fingerprints. **Conclusion:** The proposed method was fast, efficient and accurate, which can be used in quality evaluation of Flos Cleistocalycis Operculati comprehensively and specifically.

Key Words Flos Cleistocalycis Operculati; High performance liquid chromatography; Active components

中图分类号: R286 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.10.050

水翁花(*Flos Cleistocalycis Operculati*)为桃金娘科植物水翁(*Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr. Et Perry)的花蕾, 始载于《岭南采药录》, 为《广东省中药材标准》(第一册) 收载品种^[1]。主分布于广东、海南、广西、福建等省区。具有清热解暑、生津止渴、去湿消滞之功效, 用于夏天暑湿食滞所致的发热、咽干、口渴腹胀或呕吐泄泻^[1-2]。常作为夏季消暑解暑的中药复方“清热凉茶”的主要原料之一, 在民间使用非常广泛。是岭南地区的代表药之一。

迄今为止, 对于水翁花的相关研究中, 除有成分提取分离。陈建等^[2]利用水蒸汽蒸馏(SDE)和超临界 CO₂ 萃取技术(SFE)提取水翁花的挥发油。

Chun-Lin Ye 等^[3]运用气相色谱以及气质联合色谱等分析技术从水翁花中提取分离 5 种黄酮类化合物。还有药理学方面的研究, 除了传统的清热解暑的疗效外, 水翁花还具有其他药理活性。罗清等^[4]通过研究表明, 水翁花具有镇痛, 抗内毒素的作用; 程少璋等^[5]的研究证实, 其具有抗炎镇痛解热的作用; 叶春林^[6]等通过研究表明, 水翁花中的成分 2', 4'-二羟基-6'-甲氧基-3'-5'-二甲基查耳酮(2', 4-Dihydroxy-3-Methoxychalcone, DMC)能够诱导肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡, 为水翁花在抗肿瘤方向提供了一定的试验和理论基础^[7]。熊果苷则具有抗菌、镇咳、平喘、祛痰、抗氧化、利尿、抗溃疡、抗肿瘤、抑制胰岛

基金项目: 广西中医药研究院系统研究课题(桂中重自 201401)

作者简介: 邱宏聪(1983. 11—), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 中药和药物分析及质量标准研究工作, E-mail: 364374130@qq.com

通信作者: 刘布鸣(1953. 06—), 男, 本科, 研究员, 研究方向: 有机、天然产物化学成分以及新药开发与质量标准研究, E-mail: zybzzsys@163.com

素降解、增强免疫等作用^[8-11]。根据预实验结果和文献报道,上述 2 种成分在水翁花中有较高的含量,因此可以作为控制该药材质量的指标性成分。但是有关水翁花的药理作用仍停留在其传统功效“清热解暑”,并未得到很好的利用。除提取分离与含量测定外,对水翁花中所含化学成分也无相关深入性的研究报道^[12]。罗清^[13]虽然对水翁花所含的活性成分进行了大致的分离和鉴定,但仍未对这些化合物中与疗效关系最为密切的化合物进行筛选和确定,与此同时,也没有以此为基础形成与现有技术条件相适宜的质量标准。综上所述,选取熊果苷和 DMC 作为水翁花质量标准的指标性成分,能够更为贴近其功效主治,并准确反应其内在的质量信息。

本文对水翁花的主要有效成分进行提取分离及对其质量标准进行研究,通过运用柱色谱、薄层色谱、高效液相色谱等现代化分离分析技术,寻找并准确测定相关的活性化合物。同时,根据现有文献报道的各类活性成分提取工艺^[13,15-17],结合其所含化合物理化性质,完善相关化合物的提取工艺并最终形成质量标准。建立全面、实用、专属性强、能够反映水翁花质量控制标准,使其得到更多的使用和发展,进一步促进地方特色药材与常见病治疗药材的资源保护和可持续利用。

1 仪器与试药

1.1 仪器 高效液相色谱仪(Waterse2695-2489);色谱柱 Diamonsil-C₁₈(5 μm,250×4.6 mm);旋转蒸发器(RE-52AA);MilliPore Advantage A10 自动纯水机;Mettler XS205DU 电子分析天平;ADAM CB101 天平(1 000 g×0.1 g);CAMAG ATS4 型薄层自动点样仪;CAMAG REPROSTAR3 薄层色谱自动成像系统;HH 系列数显恒温水浴锅;电 DHG-9203A 热恒温风干干燥箱;KQ-700DE 超声波清洗器。

1.2 试药和试剂 熊果苷对照品(批号:110742-200314)、2',4'-二羟基-6'-甲氧基-3'-5'-二甲基查耳酮(DMC)单体为自制、D101-大孔树脂,由广东省中医药工程技术研究院提供。提取和液相色谱所使用的水均为 MilliPore 超纯水,其他试剂均属于(广州化学制剂厂)分析纯。流动相磷酸(Fisher)、甲醇(Merck)、乙腈(Merck)等为色谱纯。

1.3 分析样品 水翁花药材(产地批号见表 1)共 8 批,均购于广州市中芝源中药有限公司,经广西中医药研究院赖茂祥研究员鉴定为桃金娘科植物水翁。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 以 Diamonsil-C₁₈(5 μm,250×4.6

mm 为色谱柱,以乙腈(B)-0.05% 磷酸(D)为流动相,采用梯度洗脱,梯度程序为 0~10 min,10% B:90% D;10~20 min,30% B:70% D;20~50 min,60% B:40% D;50~60 min,10% B:90% D。所检测波长 254 nm;流速 1.0 mL/min;柱温 25 ℃;所有样品进样量均为 10 μL。对照品色谱图见图 1。

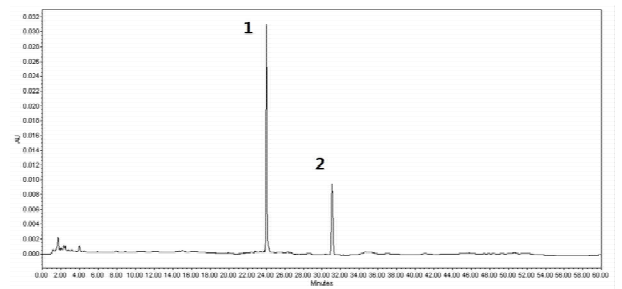


图 1 熊果酸和 DMC 对照品色谱图

注:1 为熊果酸,2 为 DMC,含量均为 20 μg/mL

2.2 对照品溶液的制备 分别取熊果酸对照品、DMC 对照品各 10 mg,精密称定,置同一 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,即得含 2 种化合物均为 1 mg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取本品 3 g,加入 70% 甲醇 75 mL,室温下静置提取 1 d。过滤,取续滤液作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察 精密吸取 2.3 项下 2 种对照品溶液适量,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,分别配制成 5、10、20、50、100 μg/mL 的溶液。分别精密吸取上述溶液 10 μL 进样,记录各浓度点色谱峰峰面积积分值,结果如表 3、表 4 所示。以对照品溶液浓度(μg/mL)为横坐标 X,峰面积积分值为纵坐标 Y,绘制标准曲线,如图 6、图 7,回归方程为:熊果酸:Y = 22 045X - 27 676, r² = 0.999 3;DMC: Y = 10 018X + 2 656.5 r² = 0.999 1。2 种对照品溶液浓度在 5~100 μg/mL 范围内线性良好。能够对水翁花药材中的 2 个目标化合物进行准确定量。

2.5 精密度和准确度 精密吸取同一批号药材供试品溶液 10 μL,照 4.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录熊果酸、DMC 峰面积积分值,并计算回收率和 RSD。结果显示,方法准确度和精密度良好。

表 1 准确度和精密度试验结果(n = 6)

化合物	日内		日间	
	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
熊果苷	103.13	1.30	102.04	1.98
DMC	98.97	1.52	100.69	1.72

2.6 重复性试验 称取同一批号的样品(批号:141001—5)6 份,按 2.2 项供试品溶液的制备方法

处理,分别进样 10 μL,测定峰面积并计算 *RSD*。结果显示,熊果酸和 DMC 的 *RSD* 分别为 1.5% 和 1.3%,表明该方法重复性良好。

2.7 加样回收实验 取同一批已知含量的药材样品(批号:141001—4)3 g,精密称定 5 份,按照 2.2 项供试品溶液的制备方法进行处理,精密吸取续滤液 5 mL,再精密加入 100 μg/mL 对照品溶液 1 mL,用甲醇稀释至刻度。精密吸取上述溶液 10 μL,进 HPLC,照 4.2 项下色谱条件分析,测定峰面积,计算含量及回收率,结果显示(表 2,表 3),方法回收率良好,能够对水翁花中的熊果酸和 DMC 进行准确定量。

表 2 熊果酸加样回收实验结果(<i>n</i> = 3)						
样品	取样量 (g)	加入熊果酸 对照品量 (μg/mL)	测得熊果酸 含量 (μg/mL)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	<i>RSD</i> (%)
1	3.026	10	40.531	101.51		
2	3.044	10	40.679	102.99		
3	3.096	10	39.883	95.03	101.11	3.42
4	3.07	10	40.652	102.72		
5	3.138	10	40.708	103.28		

表 3 DMC 加样回收实验结果						
样品	取样量 (g)	加入 DMC 对照品量 (μg/mL)	测得 DMC 含量 (μg/mL)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	<i>RSD</i> (%)
1	3.026	10	15.875	100.45		
2	3.044	10	15.931	101.01		
3	3.096	10	15.796	99.66	100.26	2.47
4	3.07	10	16.183	103.53		
5	3.138	10	15.497	96.67		

2.8 样品含量测定结果 取不同产地,批次的水翁花药材,共 8 批(表 4),按照 4.2 项下供试品溶液制备方法处理,得供试品溶液,分别精密吸取上述供试品溶液 10 μL,注入 HPLC,按 2.4 项下色谱条件进行分析,记录熊果酸和 DMC 峰面积并计算含量。含量测定结果见表 4,8 批药材的 HPLC 指纹图见图 2。

表 4 不同产地、批次水翁花含量测定给结果		
产地批次	含量(mg/g)	
	熊果酸	DMC
广东 141001—1	1.351	0.189
广东 141001—2	1.545	0.273
广东 141001—3	1.224	0.189
广东 141001—4	1.312	0.205
广东 141001—4	1.519	0.291
广西 141001	1.126	0.208
海南 141001	0.550	0.134
云南 141001	1.021	0.075

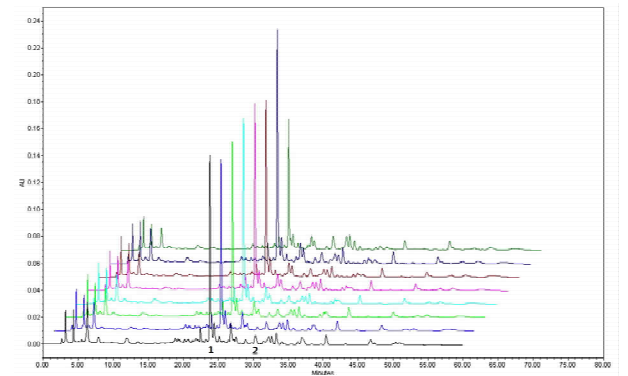


图 2 8 批药材供试品色谱图

3 讨论

3.1 提取分离条件的考察和优化 为确保水翁花的目标化合物成分能在指纹图谱中体现,本文根据其理化性质以及查阅文献^[15-16],分别采用了 70% 甲醇、乙醇、水等溶剂对其进行提取。最后选用 70% 甲醇作为溶剂,再利用柱色谱的原理,将提取液用不同比例的甲醇-水溶液进行洗脱,分离有效成分,进行测定,可知其提取液中目标化合物提取率较高,色谱峰信息较丰富。

3.2 HPLC 指纹图谱的建立和优化 本课题根据文献调研结果发现,水翁花中所含活性成分多为黄酮类,结合预实验结果,我们发现,有机相采用乙腈时,较甲醇分离效果更佳,且出峰时间较短,故选用;在水相选择方面,研究发现,向水相中加入一定浓度的磷酸能够有助于改善峰型,提高分离度,但磷酸浓度过高易对色谱柱产生损伤,因此,经过反复试验,将磷酸浓度固定在 0.5% (v/v)。

洗脱程序选择方面,鉴于水翁花中所含活性成分较多,且结构较为类似,单纯的等度洗脱很难将待测物与其他干扰性成分成功区分,因此选择梯度洗脱。经反复试验,2.4 项下所述的色谱条件能够成功区分待测物与其他干扰性成分,故选用。

3.3 不同产地、批次药材指纹图谱及质量信息研究 由 2.5 项下各不同批次、产地药材中熊果酸和 DMC 的测定结果可知,广东产水翁花药材中上述成分含量最高,海南产药材中上述成分含量最低。提示水翁花可能受种植地气候、土壤、地理环境等因素的影响,造成上述差异,在后续的规范化种植及药材选用中,应谨慎选择产地,确保药材质量。

3.4 结论 本研究采用柱层析和 HPLC 法,对水翁花中的活性成分进行了分离和测定,该方法快速、高效,能够较为准确全面地反映水翁花中活性成分的含量信息,并用于对不同来源、产地和采收时节的药材质量进行评价。

参考文献

- [1] 广东省食品药品监督管理局. 中药材标准(第一册)[S]. 广东科技出版社,2004:62-63.
- [2] 胡晨霞. 广东习用清热类药材的研究概况[J]. 现代食品与药品杂志,2007,17(5):25-27.
- [3] 陈健,姜建国,郑艾初,水翁花挥发油提取工艺研究[J]. 食品科学,2006,27(10):409-411.
- [4] Chun-LinYe, Yan-HuaLu, Dong-ZhiWei. Flavonoids from Cleistocalyx operculatus[J]. Phytochemistry,2004,65(4):445.
- [5] 罗清,梅全喜,范文昌,水翁花的镇痛和抗内毒素研究[J]. 中华中医药学刊,2011,29(7):1569-1570.
- [6] 程少璋,罗清,高玉桥,水翁花抗炎镇痛解热作用研究[J]. 时珍国医国药,2013,24(2):375-376.
- [7] 叶春林,赖依峰,刘宣淦,等. 水翁花黄酮 DMC 诱导肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡的机制研究[J]. 2014,39(15):2942-2945.
- [8] 唐婕妤,彭菲. 熊果苷的药理作用与资源获取途径研究进展[J]. 今日药学,2015,25(9):673-677.
- [9] 陆彬,楼鸳鸯,陈楚楚,等. 熊果苷抑制斑马鱼胚胎黑色素合成的研究[J]. 湖南科技大学学报:自然科学版,2015,1:116-120.
- [10] 李丽梅,赵哲,何近刚,等. 不同品种梨果实酚类物质和抗氧化性能分析[J]. 食品科学,2014,35(17):83-88.
- [11] Lee HJ, Kim KW. Anti-inflammatory effects of arbutin in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells[J]. Inflamm Res. 2012,61(8):817-825.
- [12] 孟小斌,曲彩红. HPLC 法测定熊果背乳膏中熊果背的含量[J]. 中国药房,2013,24(31):2944-2946.
- [13] 罗清,梅全喜,广东省地产药材水翁花的研究概述[J]. 亚太传统医药,2009,5(2):130-132.
- [14] 李娇晓,刘忆明. α -熊果苷合成研究进展[J]. 保山学院学报,2014,34(2):18-21.
- [15] 梅全喜,范文昌,曾聪彦. 论广东地产药材的研究与开发[J]. 今日药学,2009,19(2):14.
- [16] 木合塔尔·吐尔洪,买买提·吐尔逊,热萨莱提·伊敏. RP-HPLC 法同时测定昆仑雪菊中绿原酸、芦丁、槲皮素和木犀草素的量[J]. 中草药,2016,47(9):1601-1604.
- [17] 张志荣,吴文辉,陶周超. 吴兴铁线莲总黄酮的提取及体外抗肿瘤活性研究[J]. 中国现代应用药学,2016,33(7):879-883.

(2016-08-01 收稿 责任编辑:徐颖)

(上接第 2473 页)

参考文献

- [1] 石志红,石志福. 中医对过敏性鼻炎病因病机的认识[J]. 内蒙古医学院学报,2012,34(5):842-846.
- [2] 赛佳洋,赵琰,王雪茜,等. 王庆国教授运用六经辨证治疗过敏性鼻炎举隅[J]. 中国中医急症,2013,22(12):2046-2047.
- [3] 梁少瑜,谭晓梅,曾永长,等. 细辛挥发油对过敏性鼻炎豚鼠鼻黏膜和组胺影响的初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2002,22(9):520-521.
- [4] 李小莉,张永忠. 辛夷挥发油的抗过敏实验研究[J]. 中国医院药学杂志,2011,17(2):149-151.
- [5] 李俊川,李建春. 辛夷挥发油对小鼠 I 型超敏反应的影响[J]. 中华中医药学刊,2012,30(5):1136-1139.
- [6] 杨金蓉,宋军,马晓文,等. 川芎挥发油对环氧化酶-2 活性的选择性抑制作用[J]. 甘肃中医,2008,21(2):50-51.
- [7] 孟庆刚,王微,李强,等. 黄芩解热作用的谱效关系研究[J]. 北京中医药大学学报,2011,34(6):379-383.
- [8] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典一部和四部[S]. 2015 年版. 北京:化学工业出版社.
- [9] 赵越平,雷其云,苏永芝,等. 黄芩中黄芩甙不同提取方法的比较[J]. 第四军医大学学报,1996,17(6):475-476.
- [10] 唐海燕,牛雪平,卢慧斌,等. 黄芩中黄芩甙的提取工艺研究[J]. 内蒙古大学学报,2004,45(3):355-357.
- [11] 于良富,赵宇,鲍旭. 黄芩回流提取工艺优选[J]. 中国中医药现代远程教育,2016,14(17):138-139.
- [12] 朱玉,王晓华. 正交法优选黄芩的提取工艺[J]. 安徽医药,2006,10(4):250-251.

(2016-09-19 收稿 责任编辑:徐颖)