

芫花药材中 4 个黄酮苷元的定性鉴别定量分析*

李尧尧¹, 王彩芳^{1,2}, 黄兰岚^{1,3}, 原思通¹, 张易⁴

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 郑州大学药学院, 郑州 450052;

3. 江西中医学院, 南昌 330008; 4. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069)

摘要 目的: 建立芫花药材中木犀草素、芹菜素、羟基芫花素、芫花素 4 个黄酮苷元的定性鉴别与定量分析方法。方法: 采用薄层色谱法鉴别芫花药材中木犀草素、芹菜素、羟基芫花素和芫花素; 采用高效液相色谱法同时测定这 4 个黄酮苷元的含量并制订含量限度要求。薄层色谱条件: 以甲苯-乙酸乙酯-甲酸 (8: 4: 0.2) 系统展开, 置 365 nm 下检视荧光。高效液相色谱条件: Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (60: 40: 0.5), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 350 nm (木犀草素、羟基芫花素)、338 nm (芹菜素、芫花素), 柱温 40℃, 记录时间 40 min。结果: 芫花药材中木犀草素、芹菜素、羟基芫花素、芫花素 4 个成分的薄层色谱鉴别特征明显、专属性强。采用高效液相色谱法测定含量, 木犀草素、芹菜素、羟基芫花素、芫花素的线性范围依次为 0.032~0.16 μg (r = 0.9994), 0.072~0.36 μg (r = 0.9995), 0.098~0.49 μg (r = 0.9995), 0.15~0.75 μg (r = 0.9997); 平均回收率 (n = 5) 依次为 99.86% (RSD = 1.8%), 101.0% (RSD = 2.6%), 100.3% (RSD = 1.8%), 100.7% (RSD = 2.6%); 芫花药材中 4 种成分的总含量应不低于 0.6%, 其中木犀草素的含量不低于 0.01%, 芹菜素不低于 0.2%, 羟基芫花素不低于 0.05%, 芫花素不低于 0.2%。结论: 本方法操作简便, 结果准确, 能够同时测定芫花药材中 4 个黄酮苷元的含量, 提高了芫花药材的质量控制标准, 为其临床用药的安全性和有效性提供质量保证。

关键词: 芫花药材; 木犀草素; 芹菜素; 羟基芫花素; 芫花素; 薄层色谱; 高效液相色谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)06-0894-04

Qualitative identification and quantitative analysis on 4 flavonoid aglycones of Flos Genkwa*

LI Rao-rao¹, WANG Cai-fang^{1,2}, HUANG Lan-lan^{1,3}, YUAN Si-tong¹, ZHANG Yi⁴

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. School of Materia Medica, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 3. Jiangxi College of Chinese Traditional Medicine, Nanchang 330008, China

4. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract Objective To develop qualitative identification and quantitative analysis method on 4 flavonoid aglycones of Flos genkwa. **Method** Luteolin, apigenin, 3'-hydroxygenkwainin and genkwainin were identified by thin-layer chromatography in Flos Genkwa. Toluene-ethyl acetate-formic acid (8: 4: 0.2) was used as developing solvent and the fluorescent of the compounds were observed under 365 nm. Their contents were determined by HPLC. Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used. The mobile phase was methanol-water-glacial acetic acid (60: 40: 0.5) at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The column temperature was 40℃. The detection wavelength of luteolin and 3'-hydroxygenkwainin were set at 350 nm, as well as apigenin and genkwainin were set at 338 nm. The record time was 40 min. **Results** The linear ranges of luteolin, apigenin, 3'-hydroxygenkwainin and genkwainin were 0.032~0.16 μg (r = 0.9994), 0.072~0.36 μg (r = 0.9995), 0.098~0.49 μg (r = 0.9995), and 0.15~0.75 μg (r = 0.9997), respectively. The average recoveries (n = 5) were 99.86% with RSD = 1.8%, 101.0% with RSD = 2.6%, 100.3% with RSD = 1.8%, and 100.7% with RSD = 2.6%, respectively. By this HPLC method, the total content of four compounds should be equal or over 0.6%, and the content of luteolin, apigenin, 3'-hydroxygenkwainin, genkwainin should be equal or over 0.01%, 0.2%, 0.05%, 0.2%, separately. **Conclusion** These ana-

* 国家科技基础条件平台工作中药材质量标准项目 (编号: 2003DJ13J031); 《中国药典》2010 版一部标准研究项目 (YD-174)

第一作者 Tel: (010) 64014411-2975; E-mail: leerao@163.com

lytical methods are simple, accurate with good reproducibility. Satisfactory results are obtained for the simultaneous determination of the four main flavonoid aglycones. There are suitable for quality control of Flos Genkwa.

Key words Flos genkwa; luteolin; apigenin; 3'-hydroxygenkwain; genkwain; TLC; HPLC

芫花为瑞香科植物芫花 *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. 的干燥花蕾, 具有泻水逐饮、解毒杀虫的功效, 用于治疗水肿、痰饮积聚、气逆喘咳等症^[1]。现代研究表明芫花可用于治疗慢性支气管炎、肝炎, 还具有抗肿瘤等多种活性^[2]。

芫花所含芫花素、羟基芫花素、木犀草素和芹菜素等多个黄酮类成分为其镇咳祛痰的有效成分^[2]。木犀草素具有利尿、利胆、抗炎活性, 对多种实体瘤、腹水癌和白血病细胞有显著抑制作用^[3]。芹菜素具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化活性, 且与其他黄酮类成分(如槲皮素)相比, 还有低毒、无诱变性等优点^[4]。

作为多组分药材, 对其主要的黄酮类成分进行定性鉴别与定量分析对于提高芫花药材的质控标准具有重要意义。芫花药材中芫花素的含量测定方法以及含量限度要求已经另文发表^[5], 对 4 个黄酮苷元同时进行定性鉴别与定量分析研究尚未见到报道。本文对此进行试验研究, 以期为提高芫花药材的质量控制水平提供试验数据。

1 仪器与试药

薄层成像系统为 TRANS LLVM NATOR 2020D 型(冷泉港科技有限公司)。Merck TLC 板(德国 Merck 公司)。Waters 高效液相色谱仪(600 Pump, Waters 600 Controller, Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector) Millennium 32 色谱管理软件(美国 Waters 公司)。CX-250 超声波清洗器(北京医疗设备二厂, 功率 250 W, 频率 40 kHz)。

对照品羟基芫花素、芫花素均为自制, 经 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 鉴定结构, HPLC 检测其纯度, 经面积归一化法计算各对照品的含量均在 98% 以上, 符合对照品纯度要求。甲醇为色谱纯, 水为自制高纯水。其余试剂均为分析纯。芫花对照药材(1062-9801)、木犀草素对照品(111520-200504)购自中国药品生物制品检定所; 芹菜素对照品(06091420)购自上海生化技术有限公司, 经 HPLC 检识, 面积归一化法计算其纯度大于 98%, 符合含量测定要求。甲醇为色谱纯, 水为自制高纯水, 其余试剂均为分析纯。

芫花药材 17 批, 其中采集品 2 批, 市售品 15 批, 经原思通研究员鉴定均来源于瑞香科(Thymelaeaceae) 芫花(*Daphne genkwa* Sieb. et Zucc.) 的干燥花蕾。

2 定性鉴别

取本品粉末(过 60 目筛) 1 g 加甲醇 25 mL, 超声处理(功率 250 W, 频率 25 kHz) 10 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加乙醇 1 mL 使溶解, 即得供试品溶液; 另取芫花对照药材 1 g 同法制成对照药材溶液; 再分别取对照品木犀草素、芹菜素、羟基芫花素、芫花素适量, 各加甲醇制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(中国药典 2005 年版附录 IV B) 试验, 吸取上述溶液各 15 μ L, 分别点于同一 Merck 板上, 以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(8:4:0.2) 系统展开, 展距为 8.5 cm, 取出晾干, 置紫外灯(365 nm) 下检视。样品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。

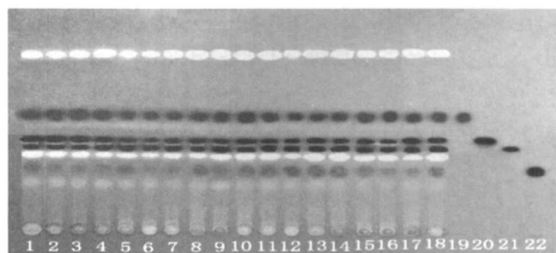


图 1 芫花药材的薄层鉴别

Fig 1 TLC of Flos Genkwa

1. 芫花对照药材 (reference crude drug of Flos Genkwa) 2~18. 样品 1~17号 (sample No. 1 to 17) 19. 芫花素对照品 (genkwain reference substance) 20. 芹菜素对照品 (apigenin reference substance) 21. 羟基芫花素对照品 (3'-hydroxygenkwain reference substance) 22. 木犀草素对照品 (luteolin reference substance)

3 含量测定

3.1 色谱条件 采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m), 以甲醇-水-冰醋酸 (60:40:0.5) 为流动相, 流速 0.8 mL $\cdot$ min⁻¹, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 木犀草素和羟基芫花素的检测波长为 350 nm, 芹菜素和芫花素的检测波长为 338 nm。

3.2 溶液制备

3.2.1 对照品溶液 分别称取对照品木犀草素约 0.4 mg, 芹菜素约 0.9 mg, 羟基芫花素约 1.2 mg, 芫花素对照品约 1.8 mg, 精密称定, 置同一 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 每 1 mL 中含 4 个黄酮苷元依次为 16.04, 36.05, 49.09, 75.06 μ g。

3.2.2 供试品溶液 取芫花药材样品 (60 目粉末)

约 0.5 g 精密称定, 准确加入甲醇 25 mL, 称重, 回流 1 h 放置, 待其冷却至室温, 称重, 用甲醇补足损失重量, 摇匀, 滤过, 过 0.45 μm 滤膜, 即得。

3.3 线性关系考察 分别精密吸取“3.2.1”项下的对照品溶液 2 4 6 8 10 μL 进行 HPLC 分析, 以对照品峰面积 *Y* 为纵坐标, 以对照品进样质量 *X* (μg) 为横坐标, 绘制标准曲线。木犀草素、芹菜素、羟基芫花素、芫花素的进样量分别在 0.032~0.16 0.072~0.36 0.098~0.49 0.15~0.75 μg 范围内, 与峰面积呈良好的线性关系。回归方程依次为:

$$Y = 5.616 \times 10^6 X - 6.255 \times 10^4 \quad r = 0.9994$$
$$Y = 4.927 \times 10^6 X + 9.502 \times 10^3 \quad r = 0.9995$$
$$Y = 7.144 \times 10^6 X - 4.816 \times 10^5 \quad r = 0.9995$$
$$Y = 1.496 \times 10^6 X - 1.541 \times 10^4 \quad r = 0.9997$$

3.4 方法学考察

3.4.1 精密度试验 取 9 号样品的供试品溶液 10 μL, 连续进样 5 次, 按“3.1”项色谱条件测定峰面积, 结果木犀草素、芹菜素、羟基芫花素、芫花素的 RSD 分别为 1.5%, 1.8%, 1.8%, 1.6%。表明仪器性能良好。

3.4.2 重复性试验 取同一样品 5 份, 按照“3.2.2”项下的方法制备供试品溶液, 分别进样 10 μL 测定, 记录各成分色谱峰的峰面积, 计算含量。

表 1 芫花药材中 4 个黄酮苷元的含量测定结果 (%)

Tab 1 Results of content of 4 flavonoid aglycones in Flos Genkwa

样品编号 (sample No.)	市售地 (shopping region)	产地 (source region)	生长时间 (growing time)	木犀草素 (luteolin)	芹菜素 (apigenin)	羟基芫花素 (3'-hydroxy-genkwanin)	芫花素 (genkwanin)	总量 (total content)
1	河北安国 (Anguo, Hebei)	-	-	0.053	1.01	0.15	0.39	1.60
2	河北安国 (Anguo, Hebei)	-	-	0.047	0.97	0.13	0.39	1.54
3	河北安国 (Anguo, Hebei)	安徽 (Anhui)	-	0.071	0.92	0.23	0.32	1.54
4	广州清平市场 (Qingping Market, Guangzhou)	*	-	0.011	0.42	0.07	0.30	0.80
5	广西南宁 (Guangxi Nanning)	广西 (Guangxi)	2004	0.038	0.92	0.15	0.40	1.51
6	广西南宁 (Guangxi Nanning)	安徽 (Anhui)	2004	0.041	0.92	0.13	0.38	1.47
7	广西南宁 (Guangxi Nanning)	湖北 (Hubei)	2004	0.038	0.89	0.06	0.37	1.36
8	广西南宁 (Guangxi Nanning)	河北 (Hebei)	2004	0.070	0.79	0.15	0.31	1.32
9	-	河南信阳 (Xinyang, Henan)	2005	0.063	0.49	0.19	0.26	1.01
10	-	河南信阳 (Xinyang, Henan)	2005	0.035	0.30	0.16	0.25	0.75
11	安徽亳州市场 (Bozhou Market, Anhui)	安徽南部 (South of Anhui)	2004	0.048	0.76	0.09	0.31	1.21
12	安徽亳州市场 (Bozhou Market, Anhui)	安徽 (Anhui)	2004	0.054	1.04	0.10	0.32	1.51
13	河南登封 (Dengfeng, Henan)	河南登封 (Dengfeng, Henan)	1992	0.074	0.61	0.19	0.24	1.12
14	河南登封 (Dengfeng, Henan)	河南登封 (Dengfeng, Henan)	-	0.072	0.62	0.21	0.24	1.14
15	河南登封 (Dengfeng, Henan)	河南登封 (Dengfeng, Henan)	-	0.056	0.67	0.14	0.26	1.12
16	河南西峡 (Xixia, Henan)	河南西峡 (Xixia, Henan)	2004	0.019	0.64	0.07	0.36	1.08
17	河南禹州 (Yuzhou, Henan)	河南禹州 (Yuzhou, Henan)	2004	0.065	0.54	0.28	0.27	1.15
含量下限				0.01	0.2	0.05	0.2	

“*”表示可能来源于河南、山东、山西 (means the resource of Flos Genkwamight be Henan, Shandong or Shanxi); “-”表示无此项或内容不详 (means no content or the content was not sure)

结果木犀草素、芹菜素、羟基芫花素、芫花素含量的平均值 (*n* = 5) 分别为 0.042%, 0.28%, 0.20%, 0.26%; RSD 分别为 1.4%, 1.3%, 2.0%, 1.3%, 表明本方法重复性较好。

3.4.3 稳定性试验 取同一样品的供试品溶液, 分别在 0 2 4 6 8 12 24 h 各进样 10 μL, 测定各成分色谱峰的峰面积, 计算木犀草素、芹菜素、羟基芫花素、芫花素 RSD 分别为 1.6%, 1.9%, 1.8%, 1.8%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。

3.4.4 加样回收率试验 精密称取已测知木犀草素、芹菜素、羟基芫花素、芫花素含量的 9 号样品约 0.25 g 共 5 份, 依次精密加入上述 4 个对照品 0.13 0.23 0.37 0.28 mg 按“3.2.2”项下的方法制备所需溶液, 精密吸取 10 μL 进行 HPLC 分析, 记录峰面积, 计算含量。结果木犀草素、芹菜素、羟基芫花素、芫花素的平均回收率 (*n* = 5) 依次为 99.86% (RSD = 1.8%), 101.0% (RSD = 2.6%), 100.3% (RSD = 1.8%), 100.7% (RSD = 2.6%)。

3.5 样品测定 精密吸取按“3.2”项下方法制备的对照品溶液和供试品溶液各 10 μL, 进样测定, 17 批样品含量测定结果见表 1, 色谱图见图 2。

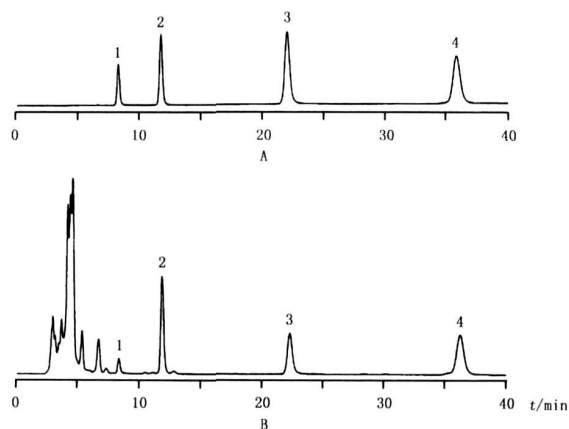


图 2 对照品 (A) 及 9 号样品 (B) 的高效液相色谱图

Fig 2 Chromatograms of reference substances (A) and sample No. 9 (B)

1. 木犀草素 (luteolin) 2. 芹菜素 (apigenin) 3. 羟基芫花素 (3'-hydroxygenkwainin) 4. 芫花素 (genkwainin)

4 讨论

4.1 薄层色谱条件的选择 依据文献 [5] 的方法选择样品的提取溶剂、溶解溶剂和展开系统, 根据木犀草素、芹菜素、羟基芫花素、芫花素 4 个成分的薄层效果确定甲醇为提取溶剂、乙醇为溶解溶剂、甲苯-乙酸乙酯-甲酸为展开系统。在显色方法选择过程中, 比较了 365 nm 下观察荧光、氨熏后 365 nm 下观察荧光、1% 三氯化铁-1% 铁氰化钾 (1:1, 用时现配) 可见光下观察的方法, 结果在薄层图谱上, 第 1 种方法显示 7 个斑点; 而其他 2 种方法仅显示 4 个所需要鉴别成分的斑点, 考虑操作的简便性和图谱鉴别的特征性, 选择薄层识识方法为 365 nm 下观察荧光。

4.2 供试品溶液制备方法的选择 依据文献 [5] 的方法选择样品的提取溶剂、提取方法、提取溶剂的用量, 结果显示, 药材粉末过 60 目筛、甲醇用量 25 mL、回流提取 1 h 时提取结果最佳。

4.3 液相色谱条件的选择

4.3.1 检测波长的确定 分别取木犀草素、芹菜素、羟基芫花素和芫花素的对照品溶液, 以流动相为空白, 在 200~400 nm 的范围内进行 DAD 全波长扫描, 木犀草素和羟基芫花素在 350 nm 处有最大吸收, 芹菜素和芫花素在 338 nm 处有最大吸收。因此选择 350 nm 为木犀草素和羟基芫花素的检测波长, 338 nm 为芹菜素和芫花素的检测波长。

4.3.2 流动相的选择 试验中, 为了使 4 个成分的色谱峰达到较好的分离效果, 曾对比过乙腈-水-冰醋酸系统和甲醇-水-冰醋酸系统, 结果显示后者的分离效果较好; 在流动相比比例方面, 曾对比过甲醇-水-冰醋酸 (65:35:0.5) 和 (60:40:0.5), 结

果显示, 后者分离效果较好, 因此选择甲醇-水-冰醋酸 (60:40:0.5) 为流动相。

4.4 小结

本文对所收集的 17 批样品中所含的木犀草素、芹菜素、羟基芫花素和芫花素进行定性鉴别, 薄层结果显示各地样品中均检出 4 个成分的斑点, 各个斑点均与其他斑点的分离较好; 与对照药材相比, 显相同颜色的荧光斑点。薄层鉴别具有特征性和专属性。

根据所收集 17 批样品中所含的木犀草素、芹菜素、羟基芫花素和芫花素 4 个成分的含量分别在 0.011%~0.074%, 0.30%~1.04%, 0.06%~0.28%, 0.24%~0.40% 范围内。各地药材中 4 个黄酮苷元的平均含量 (%) 从高到低依次为芹菜素、芫花素、羟基芫花素、木犀草素; 除 4 号样品和 10 号样品的黄酮苷元总含量低于 1% 外, 其余样品均高于 1%; 12 号样品中 4 个黄酮苷元的单个含量及总含量均较高, 而在 4 号样品中均较低。根据上述实验结果, 初步制订芫花药材 (以干燥品计算) 4 种成分的总含量不得低于 0.6%, 其中木犀草素、芹菜素、羟基芫花素和芫花素应分别不低于 0.01%, 0.2%, 0.05%, 0.2%。

本文所提供的芫花药材薄层鉴别方法既采用了 4 个对照品对照的方法, 同时也采用了对照药材对照的方法, 能够较为全面地反映不同产地芫花药材中多个成分的含量变化。本文所确定的 4 个黄酮苷元的高效液相色谱含量测定方法简单易操作, 准确性高, 适用于提高芫花药材的质量控制标准。本含量限度要求是在所收集的 17 批样品的测定结果上确定, 虽有一定的代表性, 尚需进一步收集实验样品, 以验证该含量限度的合理性。

参考文献

- 1 ChP (中国药典). 2005. Vol II (一部): 109
- 2 ZHANG Bao-xian (张保献), YUAN Si-tong (原思通), ZHANG Jing-xin (张静修), et al General research of Fbs Genkwa (芫花的现代研究概况). *Chin J Inf TCM* (中国中医药信息杂志), 1995 2(10): 21
- 3 ZHANG Fang-fang (张芳芳), SHEN Han-ming (沈汉明), ZHU Xin-qiang (朱心强). Research progress on anti-tumor effects of luteolin (木犀草素抗肿瘤作用的研究进展). *J Zhejiang Univ (Med Sci)* (浙江大学学报 医学版), 2006 35(5): 573
- 4 SUN Bin (孙斌), ZHAI Wei-jing (翟伟菁), ZHANG Xiao-ling (张晓玲). Research progress on pharmacological action of apigenin (芹菜素的药理作用研究进展). *J Chin Med Mater* (中药材), 2004, 27(7): 531
- 5 LEI Pei-lin (雷沛霖), LI Rao-mao (李娆娆), HUANG Lan-lan (黄兰岚), et al Study on quality specifications of Fbs Genkwa (芫花药材质量标准研究). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2008 28(5): 91

(本文于 2008 年 11 月 25 日修改回)