

UPLC 同时测定苕草花中 7 种指标成分的含量

王爱民, 鄢艳, 郑林, 谭安菊, 李勇军, 王永林*

(贵阳医学院药学院, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 本研究采用 UPLC 建立了同时测定贵州产苕草花药材中没食子酸、儿茶素、高橐朮木素、花旗松素、山柰素-3-O- β -D-葡萄糖苷、槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷、山柰素-3-O- α -L-鼠李糖苷 7 种指标成分的含量测定方法。方法: 采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 1.7 μ m), 流动相为 0.1% 甲酸乙腈-0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱, 流速为 0.3 mL · min⁻¹, 梯度洗脱, 检测波长 280 nm, 柱温 45 °C。结果: 7 个指标成分在选定的范围内线性关系良好($r \geq 0.9999$), 平均加样回收率($n=6$) 在 97.90% ~ 101.4%, RSD 2.3% ~ 3.8%。结论: 试验结果显示贵州产苕草花药材所含化学成分基本相同, 但被测成分的含量有一定差异, 8 月中下旬采收的药材中被测成分的含量相对较高, 质量较好。

[关键词] 苕草花; 多指标成分; 超高效液相色谱(UPLC)

苕草 *Polygonum orientale* L. 为贵州省民间及少数民族常用药物, 收载于“贵州省中药材、民族药材质量标准”2003 年版, 其药用部位为“干燥果穗及带叶茎枝”, 具有清热解毒、祛风除湿、活血消肿, 临床用于风湿性关节炎、冠心病、心胃气痛等症^[1], 对治疗冠心病心绞痛疗效确切, 苕草药材民间用药部位不尽相同, 据《中华本草》、《中药大辞典》等记载苕草的茎叶、果实、根和花均可作为不同部位入药, 而且功能主治有所差异。作者对苕草药材的栽培种植、化学成分、质量标准、药理作用、临床应用等进行了相关的研究, 并取得一定的成果^[2-8], 在苕草的后续研究中发现苕草“花序”比“干燥果穗及带叶茎枝”有更明显的抗心肌缺血作用, 具有开发治疗心血管病药物的价值, 为了明确苕草“花序”的药效物质基础, 从苕草“花序”有效部位中分离出 20 个化合物^[9-10], 并选择其中含量较高的七种化合物, 建立了苕草花药材的多指标含量测定方法, 用于控制药材的质量。

1 材料

1.1 仪器 超高效液相色谱系统(ACQUITY UPLC, 美国沃特世公司, 包括二元梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Em-

power 2 工作站); AE240 1/10 万电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); 高速离心机(TGL-16G, 上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂 没食子酸(1)、儿茶素(2)、高橐朮木素(3)、花旗松素(4)、山柰素-3-O- β -D-葡萄糖苷(5)、槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷(6)、山柰素-3-O- α -L-鼠李糖苷(7) 7 种对照品均由作者从苕草花中提取分离制备所得, 采用¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS, UV, IR 波谱进行结构鉴定, 上述对照品分别用 UPLC-PDA 在多个检测波长下测定, 其峰面积归一化纯度均大于 98.0%; 乙腈(色谱纯, 美国 TEDIA 有限公司); 甲酸(色谱纯, 美国 TEDIA 有限公司); 甲醇(分析纯, 上海振兴化工一厂); 纯净水(广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

1.3 药材 试验用 11 批药材为贵州益佰制药股份有限公司和贵阳医学院贵州省中药民族药研究开发中心采用同一种源种植于贵州清镇市长岭岗药材种植基地、贵阳市鹿冲关贵州省植物园、贵州遵义鸭溪、贵州清镇市百花湖乡, 由贵阳医学院药学院药用植物与生药教研室龙庆德副教授鉴定为苕草 *P. orientale* 的花序, 样本信息见表 1。

2 方法

2.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 1.7 μ m); 流动相 0.1% 甲酸乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B), 流速 0.3 mL · min⁻¹, 梯度洗脱, 0 ~ 20 min, 5% ~ 20% A; 20 ~

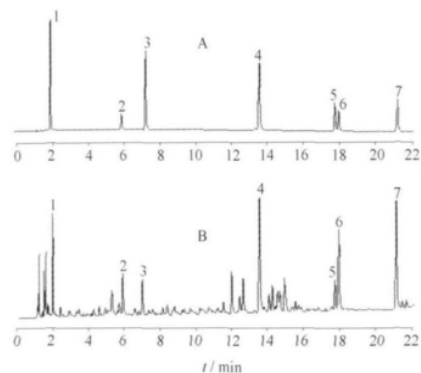
[稿件编号] 20110524002

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30860366); 贵州省重大专项项目(黔科合重大专项字[2007]6010 号); 贵州省科技攻关项目(黔科合 SY 字[2009]3092)

[通信作者] * 王永林, Tel: (0851) 6908899, E-mail: gywam100@gmail.com

表 1 荭草花样品来源

批号	产地	采收日期
20050901	贵州清镇市百花湖乡	2005-09-01
20060825	贵州遵义鸭溪	2006-08-25
20070725	贵州清镇市长岭岗药材种植基地 东西面地	2007-07-25
20090714	贵阳市鹿冲关贵州省植物园	2009-07-14
20090717	贵州清镇市长岭岗药材种植基地	2009-07-17
20090810	贵阳市鹿冲关贵州省植物园	2009-08-10
LCG20090822	贵阳市鹿冲关贵州省植物园	2009-08-22
20090822-R	贵州清镇市长岭岗药材种植基地 地东面地	2009-08-22
20090822-L	贵州清镇市长岭岗药材种植基地 地西面地	2009-08-22
20100815	贵阳市鹿冲关贵州省植物园	2010-08-15
20100822	贵州清镇市长岭岗药材种植基地	2010-08-22



1. 没食子酸; 2. 儿茶素; 3. 高腺朊木素; 4. 花旗松素; 5. 山柰素-3-O-β-D-葡萄糖苷; 6. 槲皮素-3-O-α-L-鼠李糖苷; 7. 山柰素-3-O-α-L-鼠李糖苷。

图 1 7 种混合对照品(A) 和荭草花样品(B) 色谱图

30 min, 20% ~ 40% A; 柱温 45 ℃。检测器为阵列二极管检测器(PDA) 检测波长为 280 nm。

2.2 专属性试验 分别吸取 7 种混合对照品溶液和药材供试品溶液各 1 μL, 在上述色谱条件下测定, 结果 7 种被测定成分分离良好, 在药材供试品溶液色谱中与其他化合物色谱峰分离度均良好见图 1。同时供试品中被测定化合物色谱图与对照品色谱图比较, 供试品中被测定化合物的保留时间分别与 7 个对照品的保留时间一致, 从 PDA 获得的被测定成分和对照品紫外光谱图比较, 供试品色谱中, 与对照品色谱保留时间相同的色谱峰紫外光谱图一致, 说明该方法具有良好的专属性。

2.3 供试品溶液的制备 取荭草花药材粉末(过 40 目筛) 1 g, 精密称定, 精密加入 80% 甲醇 50 mL, 称定质量, 加热回流 4 h, 冷却, 再称定质量, 用 80% 甲醇补足失重, 摇匀, 滤过, 精密吸取滤液 25 mL, 挥至 2 ~ 3 mL, 用 50% 甲醇溶解并定容至 10 mL,

10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 即得。

2.4 线性关系考察 分别称取没食子酸 11.4 mg, 儿茶素 20.2 mg, 高腺朊木素 11.3 mg, 花旗松素 20.3 mg, 山柰素-3-O-β-D-葡萄糖苷 11.4 mg, 槲皮素-3-O-α-L-鼠李糖苷 31.3 mg, 山柰素-3-O-α-L-鼠李糖苷 31.5 mg 至 7 个 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度。分别精密量取上述 7 种对照品储备液 0.3 μL, 0.5 μL, 0.2 μL, 0.4 μL, 0.5 μL, 0.5 mL 置同一个 10 mL 量瓶中, 加 20% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得混合对照品中间液 1, 再精密量取该液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加 20% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得混合对照品中间液 2。

分别精密吸取混合对照品中间液 2 和中间液 1 各 1, 2, 4 μL 和 1, 2, 4, 6 μL, 按拟定的色谱条件, 注入 UPLC 中, 测定, 将测定结果以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制工作曲线, 计算回归方程见表 2。

表 2 7 个指标成分的线性关系

No	名称	线性回归方程	r	线性范围/μg
1	没食子酸	$Y = 1.20 \times 10^7 X - 4.31 \times 10^3$	0.999 9	0.003 42 ~ 0.205
2	儿茶素	$Y = 2.15 \times 10^6 X - 5.40 \times 10^3$	0.999 9	0.010 1 ~ 0.606
3	高腺朊木素	$Y = 1.26 \times 10^7 X - 3.87 \times 10^3$	0.999 9	0.002 26 ~ 0.136
4	花旗松素	$Y = 1.10 \times 10^7 X - 4.00 \times 10^4$	0.999 9	0.008 12 ~ 0.487
5	山柰素-3-O-β-D-葡萄糖苷	$Y = 5.62 \times 10^6 X - 3.54 \times 10^3$	0.999 9	0.004 56 ~ 0.274
6	槲皮素-3-O-α-L-鼠李糖苷	$Y = 3.69 \times 10^6 X - 1.51 \times 10^4$	0.999 9	0.015 6 ~ 0.939
7	山柰素-3-O-α-L-鼠李糖苷	$Y = 5.68 \times 10^6 X - 2.09 \times 10^4$	0.999 9	0.015 8 ~ 0.945

2.5 精密度试验 取同一供试品溶液, 分别进样测定 6 次, 结果被测定的 7 成分峰面积平均值的 RSD

分别为 2.6% , 1.9% , 0.50% , 0.60% , 0.60% , 0.50% , 0.70% , 表明精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批号的样品 6 份 , 按 2.3 项下方法制备供试品溶液 , 测定。结果没食子酸、儿茶素、高橐朮木素、花旗松素、山柰素-3-O- β -D-葡萄糖苷、槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷、山柰素-3-O- α -L-鼠李糖苷平均质量分数分别为 0.048 0% , 0.186 0% , 0.032 9% , 0.133 7% , 0.064 0% , 0.269 8% , 0.280 8% , RSD 分别为 2.0% , 2.7% , 1.9% , 2.3% , 2.8% , 1.2% , 1.7% ($n=6$) 。

2.7 中间精密度试验 分别于 2 个工作日 2 名人员取与重复性同一批号的供试品 6 份 , 对其进行测定 , 结果被测定成分含量的 RSD 分别为 1.6% , 1.2% , 2.6% , 0.6% , 2.1% , 2.5% , 2.3% , 2.5%

($n=6$) 结果显示方法中间精密度良好。

2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液 , 于室温下 0 , 2 , 4 , 6 , 8 , 12 , 24 h 分别进行测定 , 以峰面积为指标计算 7 个被测成分的 RSD 分别为 2.8% , 1.8% , 0.7% , 1.4% , 0.70% , 0.70% , 1.0% , 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 回收率试验 分别称取已测定含量的荭草花药材 6 份 , 精密加入 7 种被测成分混合对照品甲醇溶液 1 mL (没食子酸、儿茶素、高橐朮木素、花旗松素、山柰素-3-O- β -D-葡萄糖苷、槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷、山柰素-3-O- α -L-鼠李糖苷分别为 0.238 5 , 0.950 5 , 0.171 1 , 0.701 5 , 0.331 2 , 1.406 0 , 1.396 4 $g \cdot L^{-1}$ 的混合溶液) , 室温挥干 , 按 2.3 项下方法制备供试品溶液 , 测定 , 结果见表 3。

表 3 7 个指标成分的回收率

化合物 ¹⁾	称量/g	含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.510 1	0.244 8	0.238 5	0.472 3	95.37	101.0	3.4
	0.503 1	0.241 5	0.238 5	0.476 9	98.71		
	0.517 5	0.248 4	0.238 5	0.492 1	102.2		
	0.501 3	0.240 6	0.238 5	0.482 5	101.4		
	0.500 9	0.240 4	0.238 5	0.491 2	105.1		
	0.500 4	0.240 2	0.238 5	0.485 6	102.9		
2	0.510 1	0.948 8	0.950 5	1.930 1	103.2	99.74	2.9
	0.503 1	0.935 8	0.950 5	1.875 2	98.84		
	0.517 5	0.962 6	0.950 5	1.906 9	99.35		
	0.501 3	0.932 4	0.950 5	1.851 6	96.71		
	0.500 9	0.931 7	0.950 5	1.913 8	103.3		
	0.500 4	0.930 7	0.950 5	1.852 7	97.00		
3	0.510 1	0.167 8	0.171 1	0.329 6	94.55	98.51	3.2
	0.503 1	0.165 5	0.171 1	0.335 1	99.11		
	0.517 5	0.170 3	0.171 1	0.337 7	97.86		
	0.501 3	0.164 9	0.171 1	0.342 9	104.0		
	0.500 9	0.164 8	0.171 1	0.334 2	99.01		
	0.500 4	0.164 6	0.171 1	0.329 8	96.53		
4	0.510 1	0.682 0	0.701 5	1.396 2	101.8	99.44	2.4
	0.503 1	0.672 6	0.701 5	1.365 3	98.74		
	0.517 5	0.691 9	0.701 5	1.376 2	97.55		
	0.501 3	0.670 2	0.701 5	1.350 4	96.96		
	0.500 9	0.669 7	0.701 5	1.391 3	102.9		
	0.500 4	0.669 0	0.701 5	1.361 7	98.74		
5	0.510 1	0.326 5	0.331 2	0.675 8	105.5	101.4	3.8
	0.503 1	0.322 0	0.331 2	0.661 8	102.6		
	0.517 5	0.331 2	0.331 2	0.653 4	97.28		
	0.501 3	0.320 8	0.331 2	0.662 3	103.1		
	0.500 9	0.320 6	0.331 2	0.638 7	96.05		
	0.500 4	0.320 3	0.331 2	0.664 9	104.1		
6	0.510 1	1.376 2	1.406	2.718 6	95.47	97.90	2.3

续表 3

化合物 ¹⁾	称量/g	含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
7	0.503 1	1.357 4	1.406	2.722 5	97.09	100.6	2.7
	0.517 5	1.396 2	1.406	2.783 2	98.65		
	0.501 3	1.352 5	1.406	2.711 9	96.69		
	0.500 9	1.351 4	1.406	2.722 8	97.54		
	0.500 4	1.350 1	1.406	2.784 1	102.0		
	0.510 1	1.432 4	1.396 4	2.872 7	103.1		
	0.503 1	1.412 7	1.396 4	2.844 1	102.5		
	0.517 5	1.453 1	1.396 4	2.799 7	96.43		
	0.501 3	1.407 7	1.396 4	2.807 4	100.2		
	0.500 9	1.406 5	1.396 4	2.841 6	102.8		
	0.500 4	1.405 1	1.396 4	2.782 9	98.67		

注: ¹⁾ 化合物编号见表 2 表 4 同。

2.10 样品测定 取 11 批次荭草花药材粉末(过 40 目筛) 1 g 精密称定 照 2.3 项下方法制备供试品 溶液 按拟定好的色谱条件进样测定 进样 1 μL 以控制被测定成分在线性范围内见表 4。

表 4 11 批样品含量($n=2$) %

批号	化合物 ¹⁾							质量分数
	1	2	3	4	5	6	7	
20050901	0.034 4	0.039 9	0.013 3	0.188 2	0.049 0	0.139	0.255 5	0.719
20060825	0.033 8	0.209 8	0.008 1	0.297 8	0.040 4	0.096 6	0.124 8	0.811
20070725	0.059 5	0.096 5	0.013 8	0.114 2	0.039 8	0.177 4	0.175 0	0.676
20090714	0.043 6	0.153 4	0.019 4	0.114 7	0.066 8	0.205 4	0.289 5	0.893
20090717	0.055 0	0.058 7	0.012 0	0.118 7	0.029 1	0.247 3	0.130 2	0.651
20090810	0.038 0	0.105 5	0.019 2	0.561 7	0.042 8	0.142 9	0.306 9	1.22
20090822	0.044 9	0.148 4	0.016 0	0.626 7	0.060 9	0.106 8	0.341 5	1.35
20090822-R	0.029 9	0.100 9	0.012 4	0.476 5	0.025 6	0.098 5	0.109 2	0.853
20090822-L	0.032 9	0.105 1	0.012 0	0.448 3	0.028 7	0.114 6	0.139 5	0.881
20100815	0.048 0	0.186	0.032 9	0.133 7	0.064 0	0.269 8	0.280 8	1.02
20100822	0.030 8	0.084 4	0.008 4	0.384 3	0.027 6	0.122 3	0.338 1	0.996

3 讨论

从各样品含量测定结果可见,贵州不同产地和不同采收期荭草花所含的化学成分基本相同,但各成分的含量有一定差异,所测定的成分均是荭草有效部位中的化学成分^[8-10],因此,通过对其含量的测定,可有效控制荭草花药材的质量。

荭草花的花期主要在每年七月至八月,九月中旬后荭草花和叶基本掉完,从表 4 测定结果可见,同一产地同时采集的东西两地的荭草花药材,其中所测定的 7 种成分含量基本一致(批号 20090822-R 和 20090822-L),说明同一产地的荭草花药材质量较为均匀。7 月中下旬采收的荭草花中所测定成分的总含量较八月中下旬采收的总含量低,因此,通过对不同产地、不同采收期荭草花多成分含量测定结果可

知 8 月中下旬采收荭草花较为适宜,其质量较好。

【参考文献】

[1] 贵州省药品监督管理局编. 贵州省中药民族药质量标准 2003 年版[S]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003: 267

[2] 王爱民, 迟明艳, 王永林, 等. UPLC 同时测定荭草药材中 8 种指标成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(13): 1723.

[3] 王爱民, 王永林, 刘丽娜, 等. 荭草药材的质量研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(13): 1047.

[4] 李勇军, 何迅, 刘丽娜, 等. 荭草化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(6): 444.

[5] 郑尚珍, 王定勇, 刘武霞, 等. 荭草中的黄酮类化合物[J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 1999, 35(4): 37.

[6] 陶玲, 沈祥春, 王永林, 等. 复方荭草冻干粉针剂对麻醉犬血流动力学的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2006, 31(2): 142.

- [7] 刘志宝, 兰燕宇, 王永林, 等. 注射用复方荭草中荭草不同工艺提取物对大鼠心肌缺血的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(8): 21.
- [8] 黄勇, 郑林, 王爱民, 等. 荭草不同药用部位抗心肌缺血作用及化学成分比较研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2520.
- [9] 李勇军, 何迅, 刘志宝, 等. 荭草花化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(20): 2013.
- [10] 李勇军, 何迅, 刘志宝, 等. 荭草花水溶性化学成分的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(1): 14.

Simultaneous determination of seven compounds in flowers of *Polygonum Orientale* by ultra performance liquid chromatography coupled with photo diode array detection

WANG Aimin, YAN Yan, ZHENG Lin, TAN Anju, LI Yongjun, WANG Yonglin*
(School of Pharmacy, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

[Abstract] To establish a UPLC method for simultaneous determination of seven chemical markers (gallic acid, catechin, al-phonin, taxifolin, kaempferol-3-O- β -D-glucoside, quercetin-3-O- α -L-rhamnoside, and kaempferol-3-O- α -L-rhamnoside) of the flowers of *Polygonum Orientale* collected from Guizhou province. Separation was performed at 45 °C on a ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm) with a gradient solvent system of 0.1% formic acid in acetonitrile-0.1% aqueous formic acid as the mobile phase. The flow rate was 0.3 mL · min⁻¹, the detection wavelength was 280 nm, and the sample injection volume was 1 μL. In the selected linear range, all calibration curves of the seven chemical markers showed good linearity. The recoveries (n=6) were in the range of 97.90%-101.4% and RSD were less than 3.8%. The results showed that the seven compounds contained in all the samples of the flowers of *P. orientale* can be chosen as their chemical markers and that this UPLC-PAD method is simple, reliable and suitable for the quality control of the flowers of *P. orientale*. However, the chemical markers may be present at different levels for samples collected in different areas and at different times. A collection time of mid-to-late August with relatively high content of the chemical markers was suggested for the flowers of *P. orientale*.

[Key words] flowers of *Polygonum orientale*; multiple chemical markers; ultra performance liquid chromatography

doi: 10.4268/cjcm20112217

[责任编辑 丁广治]