

半枝莲的质量标准研究^Δ

李富强*,毛坤军,周萍,陈东东,李祥#,陈建伟(南京中医药大学药学院,南京 210023)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)21-2980-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.21.36

摘要 目的:完善中药半枝莲的质量标准。方法:采用薄层色谱法,以木犀草素、芹菜素对照品以及半枝莲对照药材对中药半枝莲进行定性鉴别。采用高效液相色谱法测定半枝莲中木犀草素、野黄芩苷含量,色谱柱为 Hanbon-C₁₈,流动相为甲醇-酸水[水-乙酸(61:4)]梯度洗脱,流速为 1.0 ml/min,检测波长为 335 nm,柱温为 35 ℃,进样量为 10 μl。结果:野黄芩苷、木犀草素的进样量分别在 0.299 5~1.872 0 μg($r=0.999 8$)和 0.015 1~0.094 4 μg($r=0.999 5$)范围内与峰面积线性关系良好;精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均 ≤2.61%;平均加样回收率分别为 100.42%(RSD=0.81%, $n=6$)、100.65%(RSD=1.64%, $n=6$)。结论:本试验所建立的方法稳定可靠,简便易行,可作为中药半枝莲的质量控制标准。

关键词 半枝莲;质量标准;野黄芩苷;木犀草素;薄层色谱法;高效液相色谱法

Study on Standard Revision of *Portulaca grandiflora*

LI Fu-qiang, MAO Kun-jun, ZHOU Ping, CHEN Dong-dong, LI Xiang, CHEN Jian-wei (College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To improve the quality standard of *Portulaca grandiflora*. METHODS: TLC was used to identify the *P. grandiflora* with the reference of letuolin and apigenin. HPLC was performed on the column of Hanbon-C₁₈ with the mobile phase of methanol-acid gradient[water-acetic acid(61:4)] at the flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 335 nm, the temperature was 35 ℃ and the volume was 10 μl. RESULTS: There was a good linear relationship in the quality concentration of scutellarin and luteolin respectively in the range of 0.299 5-1.872 0 μg ($r=0.999 8$) and 0.015 1-0.094 4 μg($r=0.999 5$); the RSDs of precision, stability and reproducibility tests were ≤2.61%. The average recovery was respectively 100.42% (RSD=0.81%, $n=6$) and 100.65% (RSD=1.64%, $n=6$). CONCLUSIONS: The established TLC and HPLC are stable, reliable, simple and can be used for the qualitative and quantitative analysis of *P. grandiflora*.

KEYWORDS *Portulaca grandiflora*; Quality standard; Scutellarin; Letuolin; TLC; HPLC

半枝莲为唇形科 (*Labiatae*) 黄芩属 (*Scutellaria*) 植物半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don 的干燥全草。夏、秋二季茎叶茂盛时采挖,洗净,晒干。其性寒,味辛、苦,用于清热解毒、散瘀止血、利尿消肿;主治热毒痈肿、咽喉疼痛、毒蛇咬伤、跌打损伤、水肿、腹水及癌症^[1]。现代药理研究表明,其具有抗肿瘤^[2]、保肝^[3]、抗氧化^[4]、增强免疫^[5]、抗菌^[6]等作用,现代化学研究表明其主要含有黄酮类及二萜类成分^[7]。2010年版《中国药典》(一部)中半枝莲仅以性状、总黄酮含量及野黄芩苷含量进行质量控制,无法有效控制半枝莲药材质量。鉴于半枝莲药材分布广泛、来源复杂,本研究在2010年版《中国药典》(一部)基础上增加了薄层色谱(TLC)定性鉴别、木犀草素高效液相色谱(HPLC)含量测定,以为完善半枝莲质量控制标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

2695型HPLC仪,包括2489型二级管阵列(PDA)检测器、Empower工作站(美国Waters公司);AG285型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);KQ-2200B(500W)型超声波清洗器(昆

山市超声仪器有限公司);纯水仪(南京易普易达科技发展有限公司)。

1.2 试剂

硅胶G预制板(青岛海洋化工厂分厂生产)、野黄芩苷对照品(批号:110842-200605)、木犀草素对照品(批号:111520-200504)、芹菜素对照品(批号:111616-200703)、半枝莲对照药材(批号:121293-201003)均购于中国食品药品检定研究院。甲醇、醋酸、甲苯、甲酸甲酯和甲酸(北京化工厂);水为去离子水。

1.3 药材

18批半枝莲药材经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定为唇形科黄芩素植物半枝莲 *P. grandiflora*。样品信息详见表1。

2 方法与结果

2.1 TLC法定性鉴别

取半枝莲药材和半枝莲对照药材粉末(过20目筛)1.0 g,加甲醇30 ml,超声(功率:300 W,频率:40 kHz)处理40 min,静置滤过,挥干滤液,加甲醇溶解并定容至2 ml,作为供试品溶液与对照药材溶液。精密称取木犀草素、芹菜素对照品各适量,置于2.0 ml量瓶中,加甲醇至刻度,得木犀草素、芹菜素质量浓度均为1.0 mg/ml的对照品溶液。按TLC法^[1],取上述供试品溶液3 μl,木犀草素、芹菜素对照品溶液各1 μl,半枝莲对照药

^Δ 基金项目:国家药品标准提高暨2015版药典科研课题(X6)

* 博士研究生。研究方向:中药药效物质基础。E-mail: 1064635497@qq.com

通信作者:博士生导师。研究方向:中药药效物质基础和中药新药。电话:025-85811512。E-mail: lixiang_8182@163.com

表1 半枝莲药材样品信息

Tab 1 Information of *P. grandiflora* medicinal materials sample

编号	产地	批号	生产厂家	药用部位	样品状态
1	河南	130122	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	全草	药材
2	湖北	121020	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	全草	药材
3	河北	121106	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	全草	药材
4	山东	121020	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	全草	药材
5	江西	121126	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	全草	药材
6	江苏	121009	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	全草	药材
7	浙江	111022	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	全草	药材
8	福建	121106	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	全草	药材
9	安徽	130601	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	全草	药材
10	陕西	130706	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	全草	药材
11	四川	130202	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	全草	药材
12	河北	130611	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	全草	药材
13	山西	130701	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	全草	药材
14	山东	130106	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	全草	药材
15	湖北	130508	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	全草	药材
16	河南	130322	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	全草	药材
17	湖南	130611	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	全草	药材
18	广西	130616	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	全草	药材

材溶液3 μl 点于硅胶G薄层板上,以甲苯-甲酸乙酯-甲酸(3:3:1, V/V/V)为展开剂,预饱和20 min,展开,取出晾干,喷以1%氯化铝溶液,105℃烘干,置于紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品色谱中,与对照品相应的位置上显相同颜色的荧光斑点,详见图1。

2.2 野黄芩苷和木犀草素含量测定

2.2.1 色谱条件及系统适应性 色谱柱: Hanbon-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇(A)-酸水溶液[B, 水-乙酸(61:4)]梯度洗脱, 洗脱程序详见表2; 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 335 nm; 柱温: 35℃; 进样量: 10 μl。理论板数按野黄芩苷计应不低于4 200, 详见图2。

表2 洗脱程序

Tab 2 Elution program

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0~25	35	65
25~35	35~55	65~45
35~45	55	45
45~55	55~95	45~5
55~60	95~35	5~65

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取野黄芩苷23.40 mg、木犀草素1.18 mg, 置于25 ml量瓶中, 分别加流动相至刻度, 即得含野黄芩苷936.0 μg/ml、木犀草素47.2 μg/ml的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取不同产地的半枝莲药材粉末(过20目筛)约1.0 g, 精密称定。置平底烧瓶中, 精密加入80 ml石油醚, 水浴回流1 h, 滤过, 弃去滤液; 药渣加70%甲醇80 ml, 称定质量, 继续回流1 h, 再称定质量; 滤过, 残渣用少量70%甲醇洗涤, 合并滤液转移至100 ml量瓶中, 加70%甲醇至刻度。精密量取25 ml, 蒸干, 残渣用流动相溶液溶解, 转移至25 ml量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 线性关系考察 分别精密量取“2.2.2”项下对照品溶液0.8、1.6、2.4、3.2、4.0、5.0 ml, 置于25 ml量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 得到系列浓度的对照品溶液。取上述系列对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件, 吸取10 μl注入HPLC仪进行测

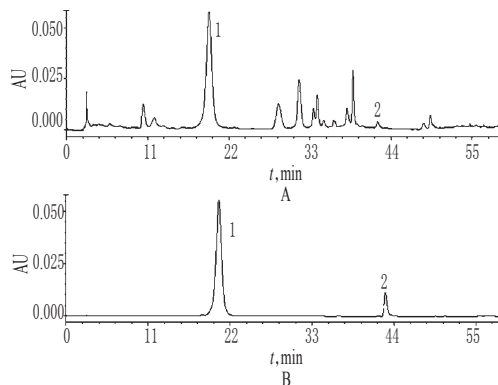


图2 高效液相色谱图

A.供试品; B.对照品; 1.野黄芩苷; 2.木犀草素

Fig 2 HPLC chromatograms

A. test samples; B. reference substances; 1. scutellarin; 2. letuolin

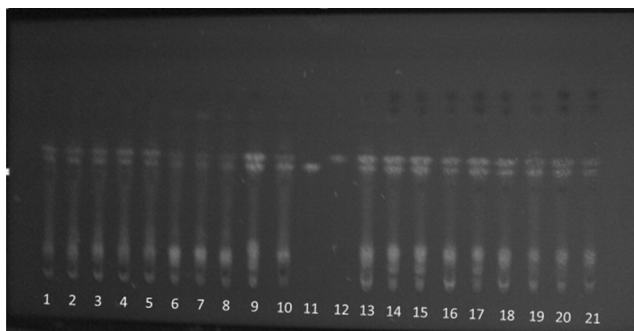


图1 半枝莲药材TLC鉴别色谱图

1~9、13~21.供试品; 10.对照药材; 11.木犀草素对照品; 12.芹菜素对照品

Fig 1 TLC chromatogram of *P. grandiflora* medicinal materials

1-9, 13-21. test samples; 10. reference medicinal materials; 11. letuolin reference; 12. apigenin reference

定。以进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得野黄芩苷和木犀草素的回归方程分别为 $y=32\ 851\ 934x-203\ 086$ ($r=0.999\ 8$)、 $y=36\ 260\ 173x-22\ 580$ ($r=0.999\ 5$)。结果表明, 野黄芩苷和木犀草素的进样量分别在0.299 5~1.872 0 μg和0.015 1~0.094 4 μg范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 取“2.2.2”项下对照品溶液适量, 按“2.2.1”项下色谱条件重复进样6次, 记录峰面积。结果, 野黄芩苷峰面积RSD=0.83%, 木犀草素峰面积RSD=1.34%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一批(批号: 130322)供试品溶液分别于配制0、2、4、6、8、12、24 h进行测定, 记录峰面积。结果, 野黄芩苷峰面积RSD=2.61%, 木犀草素峰面积RSD=2.49%, 表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.7 重复性试验 取同一批次(批号: 130322)样品, 按“2.2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液, 精密进样10 μl。结果, 野黄芩苷和木犀草素的平均质量分数分别为1.180%、0.025%, RSD分别为2.00%、2.18%, 表明本方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取同一批次(批号: 河南130322)已知含量的样品0.5 g, 共6份, 按1:1比例加入野黄芩苷和木犀草素对照品各适量, 按“2.2.3”项下方法制备供试品

表3 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 3 Results of recovery test(n=6)

待测成分	称样量, mg	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
野黄芩苷	0.499 8	5.336 5	5.335 0	10.671 0	99.99	100.42	0.81
	0.500 3	5.341 2	5.335 0	10.686 2	100.19		
	0.510 2	5.431 1	5.335 0	10.796 0	100.56		
	0.503 4	5.368 1	5.335 0	10.673 0	99.44		
	0.498 2	5.321 4	5.335 0	10.756 4	101.87		
	0.499 6	5.336 9	5.335 0	10.695 6	100.44		
木犀草素	0.499 8	0.142 0	0.142 0	0.288 0	102.82	100.65	1.64
	0.500 3	0.142 1	0.142 0	0.282 7	99.01		
	0.510 2	0.143 6	0.142 0	0.288 6	102.11		
	0.503 4	0.142 6	0.142 0	0.283 6	99.30		
	0.498 2	0.141 7	0.142 0	0.282 7	99.30		
	0.499 6	0.141 9	0.142 0	0.285 8	101.34		

表4 含量测定结果(n=3)

Tab 4 Results of content determination(n=3)

样品序号	产地	批号	质量分数, %	
			野黄芩苷	木犀草素
1	河南	130122	1.404	0.021
2	湖北	121020	1.411	0.019
3	河北	121106	1.383	0.021
4	山东	121020	1.535	0.021
5	江西	121126	1.310	0.020
6	江苏	121009	0.349	0.006
7	浙江	111022	0.406	0.007
8	福建	121106	0.559	0.014
9	安徽	130601	0.255	0.141
10	陕西	130706	0.489	0.045
11	四川	130202	0.209	0.089
12	河北	130611	0.316	0.043
13	山西	130701	0.535	0.032
14	山东	130106	0.196	0.157
15	湖北	130508	0.466	0.061
16	河南	130322	0.178	0.157
17	湖南	130611	0.253	0.152
18	广西	130616	0.311	0.038

溶液,再按“2.2.1”项下条件进样 10 μ l,记录峰面积,计算加样回收率,结果详见表3。

2.2.9 样品含量测定 取各批次半枝莲药材样品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,取 10 μ l 注入 HPLC 仪分析,按外标法计算含量,结果详见表4。

3 讨论

木犀草素是存在于多种药用植物中的弱酸性黄酮类化合物,是半枝莲抗肿瘤作用不可或缺的有效成分^[8-12]。故本试验将木犀草素作为半枝莲 HPLC 含量测定的指标成分之一。

根据 18 批半枝莲药材样品实测结果,不同产地药材中野黄芩苷、木犀草素质量分数差异较大,18 批样品中野黄芩苷、木犀草素质量分数分别在 0.178%~1.535% 和 0.006%~0.157% 之间。其中,野黄芩苷质量分数大于 0.25% 的有 15 批样品,占总样品批次的 83%;木犀草素质量分数大于 0.02% 的有 14 批样品,占总样品批次的 78%。若同时将两者作为质量分数指标,将有 7 批样品不合格,占样品总质量分数的 39%。故建议以野黄芩苷质量分数不低于 0.25% 或木犀草素质量分

数不低于 0.02% 作为含量限度。

本试验首次建立了以木犀草素、芹菜素对照品和半枝莲对照药材为对照的 TLC 鉴别方法,色谱分离度好、方法可行。笔者在半枝莲质量标准中还增加了 TLC 常规鉴别项,增加了 HPLC 木犀草素含量测定指标,并对流动相条件作了进一步优化,对供试品溶液的提取方法及提取溶剂作了考察,并简化了提取步骤、优化了提取工艺、提高了提取率。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010 年版.北京:中国医药科技出版社,2010:109、附录 34、附录 36.
- [2] 张海方,许化溪.半枝莲化学成分及生物学活性的研究进展[J].江苏大学学报:医学版,2006,16(1):74.
- [3] 李卓,李幸旻,王海云,等.半枝莲粗提物对人肝脏细胞色素 P₄₅₀ 酶的影响[J].中南药学,2008,6(1):53.
- [4] 杨容,王志,习洋,等.中药半枝莲中黄酮类化合物的抗氧化活性[J].河北大学学报:自然科学版,2007,27(5):489.
- [5] 马维坤,仰榴青,吴向阳,等.半枝莲多糖提取工艺及其免疫活性初步研究[J].江苏大学学报:医学版,2007,4(4):315.
- [6] 傅若秋,余琼,孟德胜,等.21 种中草药提取物对 MRSA 的抗菌作用研究[J].中国药房,2011,22(43):4 056.
- [7] 李园园,唐旭利,李平林,等.半枝莲化学成分研究[J].中国海洋大学学报:自然科学版,2013,43(1):77.
- [8] Choi AY, Choi JH, Yoon H, et al. Luteolin induces apoptosis through endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in Neuro-2a mouse neuroblastoma cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011,668(1/2):115.
- [9] Lee HZ, Yang WH, Bao BY, et al. Proteomic analysis reveals ATP-dependent steps and chaperones involvement in luteolin-induced lung cancer CH27 cell apoptosis[J].*Eur J Pharmacol*,2010,642(1/2/3):19.
- [10] 李星霞,郭澄.木犀草素的药理活性研究[J].中国药房,2007,18(18):1 421.
- [11] Horinaka M, Yoshida T, Shiraishi T, et al. Luteolin induces apoptosis via death receptor 5 upregulation in human malignant tumor cells[J]. *Oncogene*, 2005, 24(48): 7 180.
- [12] Tang X, Wang H, Fan L, et al. Luteolin inhibits Nrf 2 leading to negative regulation of the Nrf 2/ARE pathway and sensitization of human lung carcinoma A549 cells to therapeutic drugs[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(11): 1 599.

(收稿日期:2014-09-24 修回日期:2015-03-04)

(编辑:余庆华)