

UPLC法测定射干药材中10个异黄酮类成分的含量^Δ

姜 鸿*,王光函,辛旭阳,邹桂欣,李国信*(辽宁省中医药研究院,沈阳 110034)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)23-3216-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.23.09

摘要 目的:建立同时测定射干药材中10个异黄酮类成分含量的测定方法,并用于评价不同产地射干药材中各成分的含量差异。方法:采用超高效液相色谱(UPLC)法。色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈,流动相水相组成为含0.5%甲基-β-环糊精、0.1%磷酸的水溶液,有机相为乙腈,梯度洗脱,流速为0.2 mL/min,柱温为35℃,检测波长为265 nm,进样量为2 μL,分析时间为20 min。对来自于8个省份的26个样品中的10个异黄酮类成分射干苷、鸢尾甲苷A、鸢尾甲苷B、野鸢尾苷、鸢尾黄素、鸢尾甲黄素B、鸢尾甲黄素A、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素、白射干素进行含量测定。结果:射干苷、鸢尾甲苷A、鸢尾甲苷B、野鸢尾苷、鸢尾黄素、鸢尾甲黄素B、鸢尾甲黄素A、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素、白射干素检测质量浓度线性范围分别为8.569 5~342.78、0.643~25.72、1.119 8~44.79、2.187 8~87.51、0.770 3~30.81、0.421 3~16.85、0.288 5~11.54、1.795 3~71.81、0.560 8~22.43、0.086~3.44 μg/mL(r 均 $\geq 0.999 6$),定量限分别为0.015、0.102、0.096、0.013、0.036、0.088、0.102、0.019、0.067、0.092 μg/mL;精密性、稳定性(24 h)、重复性试验的RSD均 $< 2.00\%$ ($n=6$);加样回收率为95.30%~103.30%(RSD均 $\leq 2.33\%$, $n=6$)。在26个射干样品中,以射干苷含量最高(3.66%~57.79%),白射干素含量最低(0.09%~0.59%),次野鸢尾黄素含量为0.29~2.80 mg/g,且不同产地中各异黄酮类成分含量差异较大。结论:建立的含量测定方法灵敏、分析时间较短、重复性较好,可以用于同时测定射干药材中10个异黄酮类成分的含量及评价各成分含量差异。

关键词 射干;不同产地;异黄酮类成分;含量测定;超高效液相色谱法

Content Determination of 10 Isoflavones in *Belamcanda chinensis* by UPLC

JIANG Hong, WANG Guanghan, XIN Xuyang, ZOU Guixin, LI Guoxin (Medical Research Institute of Liaoning Province, Shenyang 110034, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of 10 isoflavones in *Belamcanda chinensis*, and to evaluate the differences of active ingredient content of *B. chinensis* from different areas. METHODS: UPLC method was adopted. The determination was performed on Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.5% methyl-β-cyclodextrin and 0.1% phosphate as water phase, acetonitrile as organic phase (gradient elution) at the flow rate of 0.2 mL/min. The column temperature was set at 35℃, and the detection wavelength was set at 265 nm. The sample size was 2 μL, and analysis time was 20 min. The contents of 10 isoflavones in 26 samples from 8 provinces, including tectoridin, iristectorin A, iristectorin B, iridin, tectorigenin, iristectorigenin B, iristectorigenin A, irigenin, irisfloreantin, dichotomitin, were determined. RESULTS: The linear ranges of tectoridin, iristectorin A, iristectorin B, iridin, tectorigenin, iristectorigenin B, iristectorigenin A, irigenin, irisfloreantin, dichotomitin were 8.569 5-342.78, 0.643-25.72, 1.119 8-44.79, 2.187 8-87.51, 0.770 3-30.81, 0.421 3-16.85, 0.288 5-11.54, 1.795 3-71.81, 0.560 8-22.43, 0.086-3.44 μg/mL (all $r \geq 0.999 6$). The limits of quantitation were 0.015, 0.102, 0.096, 0.013, 0.036, 0.088, 0.102, 0.019, 0.067, 0.092 μg/mL. RSDs of precision, stability (24 h) and reproducibility tests were lower than 2.00% ($n=6$). The recoveries ranged 95.30%-103.30% (all RSD $\leq 2.33\%$, $n=6$). Among 26 samples of *B. chinensis*, the content of tectoridin was the highest (3.66%-57.79%), and the content of dichotomitin was the lowest (0.09%-0.59%), the contents of irisfloreantin were 0.29-2.80 mg/g. The contents of isoflavones in *B. chinensis* from different areas were different greatly. CONCLUSIONS: The established method is sensitive, with short analysis time and good repeatability, and can be used to determine the content of 10 isoflavones and evaluate the content difference of each component.

KEYWORDS *Belamcanda chinensis*; Different producing areas; Isoflavone; Content determination; UPLC

射干为鸢尾科植物射干 [*Belamcanda chinensis* (L.) DC.] 的根茎,具有清热解毒、消痰、利咽的功效,主要用于咽喉肿痛、痰涎壅盛、咳嗽气喘^[1],为临床常用药材。

^Δ基金项目:科技部“十三五”科技重大专项(No.2017ZX09301019)

* 研究员,硕士。研究方向:中药药效物质基础与中药新药研发。电话:024-86803005。E-mail: jh0723@126.com

通信作者:主任医师,博士生导师,博士。研究方向:临床药理学。电话:024-86803316。E-mail: syyljdlgx024@126.com

大量研究表明,射干含有大量黄酮和异黄酮类化合物,其中的异黄酮类化合物具有抗炎、抗病毒、抗氧化、抑菌、止咳、抗癌、类雌激素作用等药理活性^[2-7]。射干药材为多年生草本植物,生长和种植范围很广,各产地或同一产地不同生长年限、不同采收季节射干药材中异黄酮类成分含量差异较大^[8-10]。目前,2015年版《中国药典》(一部)^[1]中射干药材只是以次野鸢尾黄素含量标定药材质量,而中药的药理作用是多种化学成分综合作用的

结果,单一或少数几个指标性成分无法代表中药材的总体质量。因此,建立一个科学的射干药材质量评价方法具有重要的科学意义。

笔者查阅有关射干和鸢尾属药材的含量测定文献,已有研究者建立了可以同时测定射干或鸢尾属药材中6或7个异黄酮类成分含量的方法^[11-12],但笔者采用这些方法欲同时测定射干中的10个异黄酮类成分(射干苷、鸢尾甲苷A、鸢尾甲苷B、野鸢尾苷、鸢尾黄素、鸢尾甲黄素B、鸢尾甲黄素A、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素、白射干素)时,发现部分峰之间不易分开,分离效果不好。由于射干中的上述异黄酮类成分中有很多化学结构比较相似或接近,如鸢尾甲苷A、B及鸢尾甲黄素A、B分别互为同分异构体,而野鸢尾黄素在结构上也只比鸢尾甲黄素A多一个甲氧基。因此,采用常规的高效液相色谱(HPLC)法在C₁₈柱上很难实现上述所有成分的有效分离。笔者曾采用梯度洗脱方法,耗时将近4h才能勉强将各成分有效分离,但大部分色谱峰峰形较差。之后,笔者通过在流动相中添加甲基-β-环糊精,采用超高效液相色谱(UPLC)法,发现可在20min内(若采用HPLC法,分析时间为60min)将射干中上述10个异黄酮类成分完全分离。最终,笔者成功建立了同时测定射干中10个异黄酮类成分含量的方法,并采用此法对不同产地、不同生长年限、不同采收季节的射干药材的异黄酮类成分含量进行了测定及比较,以期合理选择产地药材提供参考。

1 材料

1.1 仪器

UPLC仪、全自动进样器、二极管阵列检测器(美国Waters公司);电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);KQ3200超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,本文试验所用超声功率均为120W,工作频率均为40kHz)。

1.2 药品与试剂

射干苷对照品(批号:111632-200501,纯度:>98%)、次野鸢尾黄素对照品(批号:111557-200602,纯度:>98%)均购于中国食品药品检定研究院;野鸢尾苷对照品(批号:13030803,纯度:>93%)、野鸢尾黄素对照品(批号:130514023,纯度:>98%)均购于成都普瑞法科技公司;鸢尾黄素对照品(批号:12081808,纯度:>98%)购于成都生物科技有限公司;鸢尾甲苷A对照品(批号:100287)、鸢尾甲苷B对照品(批号:100763)、鸢尾甲黄素A对照品(批号:20140724)、鸢尾甲黄素B对照品(批号:20140616)、白射干素对照品(批号:20140621),纯度:均>98.5%,均购于江苏永健医药科技有限公司;磷酸、乙腈均为色谱纯;水为屈臣氏蒸馏制法饮用水(批号:20190223);甲基-β-环糊精(美国Aladdin公司,购于国药集团化学试剂沈阳有限公司,平均分子量:1310,批号:G1529014);各不同产地、不同季节采集

或购买的射干药材,经辽宁省中医药研究院药学研究室王光函研究员鉴定,均为鸢尾科植物射干[*Belamcanda chinensis*(L.)DC],样品产地及采集或购买日期信息见表1(部分产地具体信息不明)。

表1 样品产地及采集或购买日期信息

Tab 1 Producing areas, sample collection or purchase date

样品编号	产地	采集或购买日期信息
1	海南三亚(野生)	2019-03采集
2	贵州黔西种植	2018-04购买
3	湖南廉桥种植	2018-10购买
4	湖南长沙种植	2018-03购买
5	四川荷花池市场	2018-11购买
6	四川成都龙桥镇种植	2018-11采集
7	湖北团风GAP基地	2015-11采集
8	湖北团风GAP基地	2016-11采集
9	湖北团风GAP基地	2017-11采集
10	湖北团风GAP基地	2018-11采集
11	湖北团风GAP基地	2019-04采集
12	河南南阳	2017-05购买
13	河南南阳桐柏月河镇	2018-11采集
14	河南南阳桐柏月河镇	2019-04采集
15	河南南阳桐柏固县镇	2019-04采集
16	河南南阳桐柏程湾镇	2019-04采集
17	河南南阳桐柏黄岗镇	2019-04采集
18	安徽亳州	2017-05购买
19	安徽亳州	2018-11购买
20	安徽亳州	2019-04购买
21	河北安国	2017-05购买
22	河北安国	2018-03购买
23	河北安国祁州镇	2018-11采集
24	河北安国西付路乡	2018-11采集
25	河北安国祁州镇	2019-04采集
26	河北安国西付路乡	2019-04采集

注:GAP指良好农业规范

Note:GAP means Good Agricultural Practices

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100mm×2.1mm,1.7μm);流动相A相(水相)为水溶液(含0.5%甲基-β-环糊精、0.1%磷酸),B相(有机相)为乙腈,梯度洗脱,流速为0.2mL/min;柱温为35℃;检测波长为265nm;进样量为2μL,分析时间为20min。梯度洗脱条件见表2。

表2 梯度洗脱条件

Tab 2 Condition of gradient elution

时间,min	A相占比,%	B相占比,%
0	95	5
1.7	83	17
4.2	80	20
9.2	69	31
12.8	65	35
16	65	35
17	95	5
20	95	5

2.2 溶液制备

2.2.1 混合对照品溶液制备 精密称取射干苷、鸢尾甲苷A、鸢尾甲苷B、野鸢尾苷、鸢尾黄素、鸢尾甲黄素B、鸢尾甲黄素A、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素、白射干素对照品适量,加甲醇制成质量浓度依次为342.78、25.72、44.79、87.51、30.81、16.85、11.54、71.81、22.43、3.44 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 取射干药材适量,粉碎成细粉;精密称取0.1 g,精密加入70%乙醇25 mL,超声提取30 min,放至室温,用70%乙醇补足损失质量,用0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液适量即得。

2.3 系统适用性试验

取“2.2.1”“2.2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液,分别进样2 μL ,测定。结果,在该色谱条件下,各成分色谱峰均能达到基线分离,且相邻两峰之间分离度均大于1.5,10个成分色谱峰的理论板数均不低于3 000。色谱图见图1。

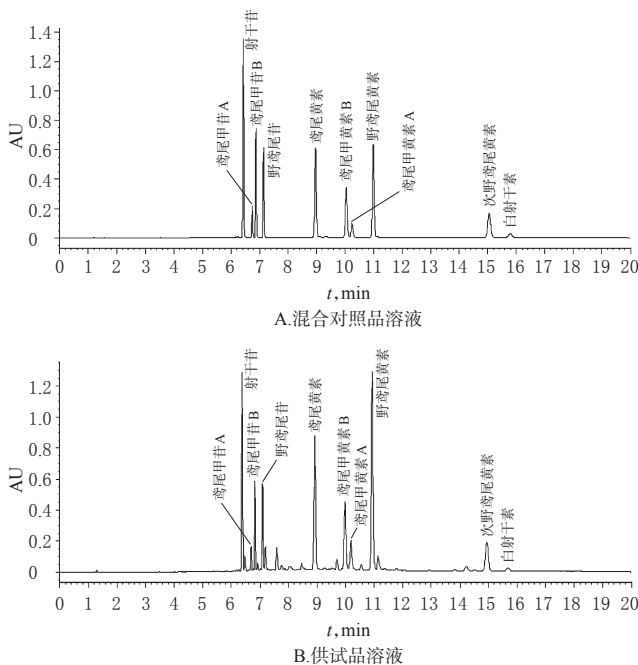


图1 超高效液相色谱图

Fig 1 UPLC chromatogram

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.125、0.25、0.5、2、2.5 mL,分别置于5 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制备成包含原液在内的共6个质量浓度的系列混合对照品溶液。分别精密吸取各质量浓度的对照品混合溶液进样测定。以各色谱峰面积(y)为纵坐标,相应的对照品溶液质量浓度(x)为横坐标进行线性回归,得回归方程及线性范围,结果见表3。

2.4.2 定量限考察 精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释后测定,以信噪比为10:1计算定量限。结果,射干苷、鸢尾甲苷A、鸢尾甲苷B、野鸢尾苷、鸢

尾黄素、鸢尾甲黄素B、鸢尾甲黄素A、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素、白射干素的定量限依次为0.015、0.102、0.096、0.013、0.036、0.088、0.102、0.019、0.067、0.092 $\mu\text{g/mL}$ 。

表3 10个成分的线性范围

Tab 3 Linear range of 10 components

成分	回归方程	r	线性范围, $\mu\text{g/mL}$
射干苷	$y=17.171x+66.804$	0.9999	8.569 5~342.78
鸢尾甲苷A	$y=26.806x+4.550 8$	0.999 8	0.643~25.72
鸢尾甲苷B	$y=19.923x+14.466$	0.999 9	1.119 8~44.79
野鸢尾苷	$y=17.828x+17.918$	0.999 8	2.187 8~87.51
鸢尾黄素	$y=33.063x+19.471$	0.999 8	0.770 3~30.81
鸢尾甲黄素B	$y=27.493x+9.944 9$	0.999 9	0.421 3~16.85
鸢尾甲黄素A	$y=18.001x+5.538 6$	0.999 6	0.288 5~11.54
野鸢尾黄素	$y=20.392x+37.477$	0.999 7	1.795 3~71.81
次野鸢尾黄素	$y=25.334x+10.854$	0.999 6	0.560 8~22.43
白射干素	$y=19.577x+1.687 1$	0.999 6	0.086~3.44

2.4.3 精密度试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(样品编号10)适量,连续进样测定6次,记录峰面积。结果,射干苷、鸢尾甲苷A、鸢尾甲苷B、野鸢尾苷、鸢尾黄素、鸢尾甲黄素B、鸢尾甲黄素A、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素、白射干素峰面积的RSD依次为0.38%、0.52%、0.33%、0.35%、0.72%、0.67%、1.15%、1.02%、0.51%、1.53% ($n=6$),表明本测定方法精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(样品编号10)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,射干苷、鸢尾甲苷A、鸢尾甲苷B、野鸢尾苷、鸢尾黄素、鸢尾甲黄素B、鸢尾甲黄素A、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素、白射干素峰面积的RSD依次为0.56%、0.71%、0.39%、0.28%、0.66%、0.93%、1.21%、1.39%、0.59%、1.72% ($n=6$),表明供试品溶液于室温下放置24 h内基本稳定。

2.4.5 重复性试验 精密称取样品(样品编号10)粉末适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算各待测成分含量。结果,射干苷、鸢尾甲苷A、鸢尾甲苷B、野鸢尾苷、鸢尾黄素、鸢尾甲黄素B、鸢尾甲黄素A、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素、白射干素的含量依次为14.09、1.19、2.85、3.65、3.45、1.94、1.36、6.46、1.62、0.36 mg/g;含量的RSD依次为0.66%、1.23%、1.05%、0.87%、0.69%、1.77%、1.58%、0.62%、1.11%、1.85% ($n=6$),表明本含量测定方法重复性良好。

2.4.6 回收率试验 取已知含量的样品(样品编号10)粉末0.05 g,共6份,精密称定,分别加入混合对照品溶液(射干苷、鸢尾甲苷A、鸢尾甲苷B、野鸢尾苷、鸢尾黄素、鸢尾甲黄素B、鸢尾甲黄素A、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素、白射干素对照品适量,加甲醇制成质量浓度依次为702.8、58.26、143.35、181.62、175.33、97.37、68.62、325.18、80.92、18.17 $\mu\text{g/mL}$)的溶液1 mL,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率,结果见表4。

表4 回收率试验结果(n=6)

Tab 4 Results of recovery test (n=6)

成分	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
射干苷	0.713 0	0.702 8	1.416 8	100.15	97.85	1.76
	0.707 3	0.702 8	1.377 1	95.30		
	0.721 4	0.702 8	1.405 7	97.37		
	0.714 4	0.702 8	1.403 2	98.01		
	0.725 6	0.702 8	1.423 4	99.28		
	0.711 5	0.702 8	1.393 1	96.98		
鸢尾甲苷A	0.060 2	0.058 3	0.116 7	96.89	97.37	1.54
	0.059 7	0.058 3	0.115 6	95.82		
	0.060 9	0.058 3	0.117 3	96.69		
	0.060 3	0.058 3	0.118 6	99.94		
	0.061 3	0.058 3	0.118 6	98.31		
	0.060 1	0.058 3	0.116 4	96.58		
鸢尾甲苷B	0.144 2	0.143 4	0.284 3	97.69	98.06	1.50
	0.143 1	0.143 4	0.285 6	99.39		
	0.145 9	0.143 4	0.286 1	97.75		
	0.144 5	0.143 4	0.286 1	98.75		
	0.146 8	0.143 4	0.289 2	99.32		
	0.143 9	0.143 4	0.280 8	95.45		
野鸢尾苷	0.184 7	0.181 6	0.366 4	100.08	98.45	1.35
	0.183 2	0.181 6	0.362 6	98.79		
	0.186 9	0.181 6	0.364 7	97.92		
	0.185 1	0.181 6	0.361 5	97.17		
	0.188 0	0.181 6	0.369 2	99.81		
	0.184 3	0.181 6	0.360 3	96.91		
鸢尾黄素	0.174 6	0.175 3	0.345 3	97.37	97.45	1.63
	0.173 2	0.175 3	0.341 4	95.96		
	0.176 6	0.175 3	0.351 8	99.90		
	0.174 9	0.175 3	0.348 1	98.80		
	0.177 7	0.175 3	0.346 3	96.18		
	0.174 2	0.175 3	0.343 4	96.50		
鸢尾甲黄素B	0.098 2	0.097 4	0.198 8	103.30	99.57	2.33
	0.097 4	0.097 4	0.192 4	97.57		
	0.099 3	0.097 4	0.197 0	100.26		
	0.098 4	0.097 4	0.196 1	100.31		
	0.099 9	0.097 4	0.194 2	96.79		
	0.098 0	0.097 4	0.194 6	99.18		
鸢尾甲黄素A	0.068 8	0.068 6	0.138 2	101.10	99.19	2.00
	0.068 3	0.068 6	0.137 4	100.72		
	0.069 6	0.068 6	0.138 1	99.77		
	0.069 0	0.068 6	0.135 0	96.34		
	0.070 0	0.068 6	0.136 7	97.11		
	0.068 7	0.068 6	0.137 3	100.08		
野鸢尾黄素	0.326 9	0.325 2	0.649 4	99.18	97.78	1.83
	0.324 3	0.325 2	0.637 7	96.38		
	0.330 8	0.325 2	0.649 9	98.15		
	0.327 5	0.325 2	0.637 2	95.24		
	0.332 7	0.325 2	0.650 2	97.64		
	0.326 2	0.325 2	0.651 8	100.12		
次野鸢尾黄素	0.082 0	0.080 9	0.161 0	97.72	97.50	1.87
	0.081 3	0.080 9	0.158 5	95.45		
	0.082 9	0.080 9	0.160 8	96.20		
	0.082 1	0.080 9	0.163 1	100.05		
	0.083 4	0.080 9	0.161 4	96.35		
	0.081 8	0.080 9	0.162 1	99.23		
白射干素	0.018 2	0.018 2	0.036 6	101.17	98.55	1.90
	0.018 1	0.018 2	0.035 8	97.65		
	0.018 4	0.018 2	0.036 3	98.30		
	0.018 3	0.018 2	0.036 5	100.17		
	0.018 5	0.018 2	0.036 0	95.93		
	0.018 2	0.018 2	0.036 0	98.06		

2.5 样品含量测定

取来自于8个省份的26个样品,按“2.2.2”项下制备成供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,结果见表5。

表5 样品含量测定结果(% ,mg/g,n=2)

Tab 5 Results of content determination of samples (% ,mg/g,n=2)

样品序号	射干苷	鸢尾甲苷A	鸢尾甲苷B	野鸢尾苷	鸢尾黄素	鸢尾甲黄素B	鸢尾甲黄素A	野鸢尾黄素	次野鸢尾黄素	白射干素
1	22.27	4.38	3.91	11.32	0.61	0.96	0.61	3.02	1.03	0.11
2	17.48	1.32	3.53	7.89	0.27	0.39	0.24	3.37	0.29	0.09
3	35.21	1.89	1.35	3.02	0.69	0.31	0.61	1.36	0.73	0.11
4	57.79	3.16	1.92	4.83	0.81	0.29	0.88	1.66	0.94	0.12
5	13.41	0.73	1.97	5.67	0.21	0.39	0.17	2.22	0.89	0.16
6	13.01	0.44	1.62	3.91	0.35	0.73	0.34	4.51	1.68	0.19
7	11.96	1.06	2.95	3.27	6.35	3.11	1.76	7.48	2.09	0.59
8	11.96	1.14	3.29	4.96	1.35	1.18	0.69	4.93	1.71	0.36
9	12.15	1.09	3.38	4.47	1.58	1.17	0.66	4.23	1.24	0.33
10	14.09	1.19	2.85	3.65	3.45	1.94	1.36	6.46	1.62	0.36
11	13.88	1.99	3.52	5.25	2.89	1.68	0.91	5.11	2.80	0.49
12	4.79	0.91	2.19	5.43	0.23	0.43	0.22	3.28	1.32	0.30
13	13.85	1.84	1.93	5.67	1.78	1.93	0.39	3.04	1.24	0.28
14	9.29	1.62	3.51	6.06	0.91	1.38	0.50	3.97	1.40	0.36
15	9.12	1.69	3.23	8.15	1.03	1.19	0.42	5.79	2.56	0.34
16	11.07	1.63	3.95	8.08	1.18	1.41	0.46	4.94	1.59	0.31
17	10.51	1.38	2.80	7.34	1.12	1.21	0.48	5.69	1.81	0.31
18	3.66	0.60	1.88	4.71	1.61	0.84	0.38	5.34	1.72	0.37
19	3.92	0.60	1.58	4.34	1.33	0.84	0.66	6.26	2.11	0.30
20	4.73	0.79	2.22	5.69	1.04	0.78	0.57	5.66	2.00	0.34
21	4.72	0.87	2.13	5.18	0.27	0.38	0.21	2.96	1.15	0.30
22	4.14	0.73	2.38	5.58	0.22	0.30	0.17	2.37	1.90	0.41
23	4.55	0.83	2.17	6.22	0.34	0.77	0.32	4.44	1.61	0.33
24	3.81	0.59	1.63	4.01	0.25	0.63	0.20	3.84	1.72	0.37
25	4.11	0.81	2.46	4.67	0.87	0.95	0.30	3.31	1.76	0.24
26	3.91	0.92	3.62	7.83	0.26	0.50	0.22	3.96	1.96	0.34

3 讨论

3.1 环糊精作为流动相添加剂的分离机制

环糊精可用于手性化合物的异构体、对映体的分离,一般的化合物分子能够嵌入环糊精内腔并发生包络作用,但由于各化合物分子结构不同,于是在包络络合差异上较大,由此为不同结构化合物的分离产生了条件。也有些化合物,其碳原子上的羟基能够与环糊精腔体上的羟基结合成氢键产生相互作用,由于羟基位置不同,因而使得化合物之间的色谱行为差异扩大,并提高分离度^[13-14]。

β -环糊精及其衍生物以其独特的分子结构、尺寸和性能,常被作为流动相的手性添加剂,这样即使采用常规色谱柱也可实现手性化合物与同分异构体的分离,具有使用方便、不干扰检测信号、分离效果好、分析成本低等优点。目前, β -环糊精及其衍生物已有多种商品化产品,笔者在前期试验中曾考察了 β -环糊精、甲基- β -环糊精、羟丙基- β -环糊精、三甲基- β -环糊精环糊精、羧甲基- β -环糊精对射干中10个异黄酮化合物分离的影响,最后综合考虑各色谱峰的分离效果,发现用甲基- β -环糊精作为流动相添加剂效果。

3.2 甲基-β-环糊精浓度对分离的影响

在前期研究中,笔者曾考察了流动相中分别添加0.1%、0.25%、0.5%、1%等不同浓度甲基-β-环糊精的分离效果,发现随着甲基-β-环糊精浓度的提高,容量因子迅速降低,分离度增大。但甲基-β-环糊精浓度太高时,由于溶解度的限制,会影响其在流动相中的溶解,使流动相变浑浊。综合考虑,以水相中含0.5%的甲基-β-环糊精较为合适,在此条件下各色谱峰均能达到良好的分离。

3.3 流动相有机改性剂对分离的影响

在前期试验中,选用有机改性剂时分别选择了甲醇和乙腈,观察供试品溶液中各成分的分离情况。结果发现,当有机相使用乙腈时,各成分均能达到良好的分离,而且基线没有漂移现象,各成分色谱峰峰形良好。

3.4 流动相中磷酸的加入对分离的影响

笔者在本研究中发现,当流动相水相中加入0.1%的磷酸时,可以使各成分的色谱峰峰形有很大改善,同时也可以改善分离度,且磷酸的加入没有造成基线漂移现象。

3.5 柱温对分离的影响

笔者在本研究中发现,随着色谱柱柱温的升高,各色谱峰峰形变好,分析时间变短,但有些成分的分离度也随着减小。这可能是因为温度对各成分的影响不一致,或者柱温过高时,有些化合物与环糊精形成的络合物的稳定性变差了,从而降低了手性分离作用。因此,综合考虑分离度、色谱峰形和保留时间等因素,最终选择35℃作为色谱柱的温度。

3.6 多成分分析评价中药材质量

中药材成分复杂,具有多成分、多靶点、多途径、整体协同作用的特点,一般的单一化学成分不能完全代表药材的真实质量。在本研究中,笔者采用了同时测定不同成分的分析评价方法,此法可为中药质量评价提供有益的思路和方法,能够较全面地分析药材质量,为中药药材质量综合评价提供了参考,具有较好的实际应用价值。

3.7 不同产地及采收期对药材有效成分含量的影响

一般来说,药材所含的有效成分在生长发育的不同时期含量各不相同,由此可导致药物临床疗效及副作用方面的差异。唐朝孙思邈在《千金要方》中云:“早则药势未成,晚则盛时已歇”^[15];明朝陈嘉谟在《本草蒙筌》中总结出中药采制的原则,并专列出“出产择地土”“采收按时月”“凡诸草、木、虫产之有地,根、叶、花、实采之有时。失其地,则性味少异,失其时,则气味不全”^[16]。上述论著均强调了药材产地和适时采收的重要性,且药材质量受其生长地的气候、土壤等条件的影响也非常大。

从收集的各产地射干药材的含量测定结果可以看出,异黄酮类成分含量差异较大,但次野鸢尾黄素含量为0.29%~2.80%(mg/g),符合2015年版《中国药典》

(一部)^[1]中>0.10%的标准。苷类成分由南向北有减少的趋势,尤其是射干苷更为明显;而苷元类成分,以鸢尾黄素、野鸢尾黄素为代表,由南向北略有增加趋势。从10个异黄酮类成分含量均衡性看,湖北黄冈市团风县射干良好农业规范基地、河南南阳桐柏的射干药材较好,各成分含量相对均衡,更符合多成分、多靶点、多途径整体协同作用的中医药特点。由于这些成分具有抗病毒、抗炎、抑菌、止咳、抑制肿瘤细胞、类雌激素作用等药理活性^[4-7],因此,有必要对射干进一步进行系统研究,确认其中发挥不同药理作用的相应活性成分,以便在临床应用时,根据药材中各活性成分含量情况,选择不同产地射干药材,用于不同的临床症状,使其更能充分发挥临床疗效。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:285.
- [2] 罗森,袁崇均,陈帅,等.川射干叶的化学成分研究[J].中国药房,2016,27(30):4267-4269.
- [3] 张杰,曾铖,常义生,等.射干化学成分研究[J].安徽农业科学,2015,43(24):57-59.
- [4] 王振飞,刘丽,陈永霞,等.射干提取物抑制肺癌细胞恶性行为的研究[J].国医论坛,2018,33(2):57-59.
- [5] 徐倩.射干不同有效成分体外抗病毒药效学作用分析[J].亚太传统医药,2015,11(18):9-10.
- [6] 张琳,张妮.川射干的化学及药理研究进展[J].陕西中医学院学报,2014,37(5):91-93.
- [7] 温雯,马跃海,朱竟赫,等.射干传统功效考证及其实验药理学验证[J].世界科学技术:中医药现代化,2017,19(5):846-850.
- [8] 普冰清,朱艳,许方云,等.射干不同采收期黄酮类成分的动态变化规律[J].药学与临床研究,2014,22(3):212-215.
- [9] 李霞,崔月曦.射干质量的影响因素[J].中国医药指南,2014,12(18):289-290.
- [10] 陈帅,袁崇均,罗森,等.不同产地川射干中异黄酮成分含量比较研究[J].药物分析杂志,2018,38(7):1280-1284.
- [11] 卞娅,刘孟生,张丽媛,等.射干、鸢尾不同部位6种活性成分定量分析及抗炎作用初探[J].中国中药杂志,2018,43(1):119-122.
- [12] 陈帅,袁崇均,罗森,等.超高效液相色谱法同时测定川射干中7个异黄酮成分的含量[J].天然产物研究与开发,2018,30(2):256-260,217.
- [13] 徐雄,宁卫红,瞿志荣,等.HPLC手性流动相添加剂及其用于药物对映体拆分中的影响因素[J].生物化工,2018,4(5):150-155.
- [14] 郑振,陈秀娟,赵亮,等.衍生化β-环糊精手性固定相高效液相色谱法拆分米那普仑对映体及其分离机制[J].色谱,2017,35(3):286-290.
- [15] 孙思邈.千金方[M].北京:中国中医药出版社,1998:18.
- [16] 陈嘉谟.本草蒙筌[M].北京:人民卫生出版社,1988:1-2.

(收稿日期:2019-07-26 修回日期:2019-09-15)

(编辑:刘萍)