

线纹香茶菜中咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷的含量动态变化研究

卢琴*(湖北省中西医结合医院,武汉 430015)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)30-4271-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.30.34

摘要 目的:建立同时测定线纹香茶菜中咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷含量的方法,以确定线纹香茶菜的最佳采摘期。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Diamondsil C₁₈,流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为0.8 ml/min,检测波长为334 nm,柱温为25 ℃,进样量为15 μl。结果:咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷检测的质量浓度线性范围分别为0.23~5.68、0.31~7.76、0.45~11.30 μg/ml($r=0.999\ 9$ 、 $0.999\ 8$ 、 $0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为95.1%~98.9%、97.4%~101.3%、95.5%~98.8%,RSD分别为1.8%、1.7%、1.4%($n=6$)。采收于每年4~5月、7~8月的线纹香茶菜中上述3种成分含量最高。结论:该方法简便、准确、重复性好,可用于同时测定线纹香茶菜中咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷的含量;线纹香茶菜的最佳采摘期为每年4~5月、7~8月。

关键词 线纹香茶菜;咖啡酸;新西兰牡荆苷2;异夏佛塔苷;高效液相色谱法

Study on the Content Dynamic Changes of Caffeic Acid, Vicenin-2 and Isoschaftoside in *Rabdosia lophanthoides*

LU Qin(Chinese and Western Medicine Hospital of Hubei Province, Wuhan 430015, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of caffeic acid, vicenin-2 and isoschaftoside in *Rabdosia lophanthoides* to assess its optimal harvest period. METHODS: HPLC was performed on the column of Diamondsil C₁₈ with mobile phase of methanol-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution) at a flow rate of 0.8 ml/min, detection wavelength was 334 nm, column temperature was 25 ℃ and volume injection was 15 μl. RESULTS: The linear range was 0.23-5.68 μg/ml for caffeic acid($r=0.999\ 9$), 0.31-7.76 μg/ml for vicenin-2($r=0.999\ 8$) and 0.45-11.30 μg/ml for isoschaftoside($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%, average recoveries were 95.1%-98.9% (RSD=1.8%, $n=6$), 97.4%-101.3% (RSD=1.7%, $n=6$) and 95.5%-98.8% (RSD=1.4%, $n=6$), respectively. The contents of above-mentioned 3 ingredients of *R. lophanthoides* were the highest harvested in Apr. to May and Jul. to Aug. in a year. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the simultaneous determination of caffeic acid, vicenin-2 and isoschaftoside in *R. lophanthoides*. The optimal harvest period is Apr. to May and Jul. to Aug. in a year.

KEYWORDS *Rabdosia lophanthoides*; Caffeic acid; Vicenin-2; Isoschaftoside; HPLC

表2 样品含量测定结果($n=10$, μg/kg)

Tab 2 Results of contents determination of samples ($n=10$, μg/kg)

批次	黄曲霉素G ₂	黄曲霉素G ₁	黄曲霉素B ₂	黄曲霉素B ₁
S1	未检出	6.83	未检出	5.44
S2	未检出	0.95	0.06	0.30
S3	未检出	0.63	0.06	0.27
S4	未检出	2.03	0.11	0.89
S5	1.82	48.12	0.19	2.30
S6	0.26	10.60	0.06	1.03
S7	1.24	56.67	0.35	5.94
S8	2.31	198.09	1.20	33.35
S9	未检出	1.09	未检出	0.21
S10	未检出	未检出	未检出	未检出

样品测定结果显示,10批样品仅1批未检出,若按2010年版《中国药典》(一部)对陈皮、僵蚕、胖大海等5个品种所规定的限度来判定,则S1、S5、S6、S7、S8 5批次样品不合格,现状不

*副主任药师。研究方向:药品质量标准。E-mail: luqing20150601@163.com

容乐观。因此,有必要在土鳖虫的检查项下增加黄曲霉素的含量测定,以更好地控制其质量。

综上所述,本方法简便、准确、重复性好,可用于测定土鳖虫中黄曲霉素的含量。

参考文献

- [1] 林浪,林景涛,庄华,等.肝癌高发区福建同安居民AF-TB₁摄入量及膳食营养状况分析[J].福建医学院学报,1994,28(4):405.
- [2] 何水桂.高要市1995—1997年土榨花生油中酸价黄曲霉毒素B₁含量调查[J].广东卫生防疫,1998,24(4):57.
- [3] 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:附录61—62.
- [4] 赵宁,郭玉梅,姚妍妍,等.高效液相色谱法测定花生中黄曲霉素的含量[J].科技信息,2009(25):44.

(收稿日期:2014-12-29 修回日期:2015-08-25)

(编辑:陈宏)

唇形科植物线纹香茶菜 *Rabdosia lophanthoides* 是中药溪黄草的来源之一^[1],喜生于山坡、沟边、河旁或林下沼泽、潮湿处,全草入药^[2]。其性味苦、甘、寒,归肝、胆经,具有清热利湿、凉血散瘀、退黄之功效,临床上主要用于治疗急性黄疸型肝炎、急性胆囊炎、湿热痢疾、肠炎、跌打瘀肿等^[3]。线纹香茶菜含萜类、黄酮类、酚酸类等多种化学成分,其中黄酮类、酚酸类多为水溶性成分^[4-5]。目前,线纹香茶菜在资源开发与种植方面研究得比较全面系统,但其质量控制相关报道多集中于二萜类、三萜类成分^[6],而以水溶性成分为指标的文献报道较少。本研究建立了以高效液相色谱(HPLC)法同时测定线纹香茶菜中咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷含量的方法,并对不同采摘时间的线纹香茶菜中上述3种成分的含量动态变化进行对比分析,为确定其最佳采摘期及其质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT型HPLC仪,包括紫外检测器(日本岛津公司);BP110S型万分之一电子天平(德国Sartorius公司);KQ-250DB型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

咖啡酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110885-200102,纯度>98%);新西兰牡荆苷2对照品(批号:20140622)、异夏佛塔苷对照品(批号:20140806)均为广州中医药大学新药开发研究中心自制,经电喷雾质谱(ESI-MS)法、核磁共振氢谱(¹H-NMR)和核磁共振碳谱(¹³C-NMR)确认,并经HPLC法测定,纯度均>98%;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯;水为双蒸水。

1.3 药材

线纹香茶菜采摘自广州白云山和记黄埔公司线纹香茶菜培植基地,采样时间为2013年1-12月,每月于同一块种植地采10株,自然晒干,作为样品,经广州中医药大学新药开发研究中心陈建南研究员鉴定为真品。以上凭证标本存放于广州中医药大学新药开发研究中心。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~25 min,25%→32%A;25~35 min,32%A);流速:0.8 ml/min;检测波长:334 nm;柱温:25℃;进样量:15 μl。在上述色谱条件下,理论板数均不少于5 000,分离度均大于2.0,各成分基线分离良好,详见图1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷对照品各适量,分别加入50%甲醇制成咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷质量浓度分别为1.820、2.485、3.630 mg/ml的单一对照品贮备液。分别取单一对照品贮备液各适量,以50%甲醇制成含咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷质量浓度分别为45.500、62.125、90.750 μg/ml的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品粉碎,过40目筛,精密称定样品粉末约0.5 g,置于50 ml具塞锥形瓶中,加20 ml 30%乙醇超声(功率:360 W,频率:250 kHz,下同)处理30 min,提取2次,滤过,合并滤液,以30%乙醇定容至50 ml,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 以流动相作为阴性对照溶液。

2.3 线性关系考察

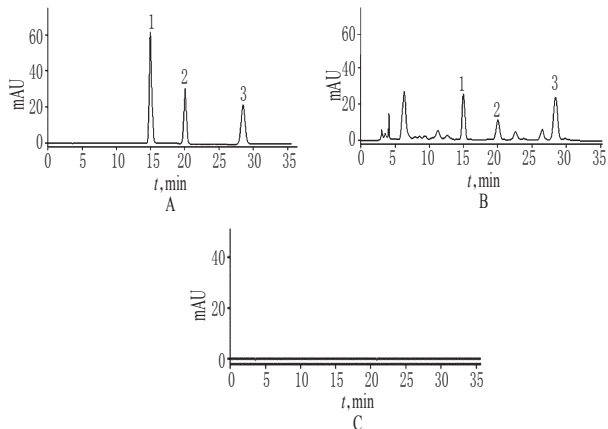


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.咖啡酸;2.新西兰牡荆苷2;3.异夏佛塔苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance;B.test sample;C.negative control;1.caffeic acid;2.vicenin-2;3.isoschfoside

精确量取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.05、0.25、0.50、0.75、1.00、1.25 ml,分别置于10 ml量瓶中,加流动相定容,制成系列混合对照品溶液。精密吸取上述系列溶液各15 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,得咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷的回归方程分别为 $y=2 \times 10^6 x - 29\ 008 (r=0.999\ 9)$ 、 $y=8.3 \times 10^5 x + 3\ 237.3 (r=0.999\ 8)$ 、 $y=8.9 \times 10^5 x + 3\ 411.9 (r=0.999\ 9)$ 。结果表明,咖啡酸、新西兰牡荆苷乙、异夏佛塔苷的检测质量浓度线性范围分别为0.23~5.68、0.31~7.76、0.45~11.30 μg/ml。

2.4 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次测定,记录峰面积。结果,咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷峰面积的RSD分别为0.95%、1.56%、1.40%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取同一供试品(采摘时间:2013年1月)溶液适量,分别于放置0、2、4、8、12、24 h时进样测定,记录峰面积。结果,咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷峰面积的RSD分别为1.61%、1.41%、0.63%(n=6),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.6 重复性试验

精密称取同一批样品(采摘时间:2013年1月),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷峰面积的RSD分别为0.43%、1.71%、0.36%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取样品适量,共6份,分别加入咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷对照品适量,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并计算加样回收率,结果见表1。

2.8 样品含量测定

取不同月份线纹香茶菜样品各适量,分别按“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并计算各成分含量,结果见表2、图2。结果表明,线纹香茶菜中咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷3种成分从幼苗期开始积

表1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	称样量, g	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %			
咖啡酸	0.251 2	50.24	50.96	98.79	95.3	96.7	1.8			
	0.250 5	50.10	50.96	98.61	95.1					
	0.251 5	50.30	50.96	98.95	95.4					
	0.250 7	50.14	50.96	100.55	98.9					
	0.251 1	50.22	50.96	100.38	98.4					
	0.250 9	50.18	50.96	99.68	97.1					
	新西兰牡荆苷2	0.251 2	97.97	99.40	197.76			100.4	99.4	1.7
		0.250 5	97.70	99.40	198.37			101.3		
		0.251 5	98.09	99.40	194.94			97.4		
0.250 7		97.77	99.40	194.82	97.6					
0.251 1		97.93	99.40	198.21	100.9					
0.250 9		97.85	99.40	196.37	99.1					
异夏佛塔苷		0.251 2	296.42	297.66	580.74	95.5	97.1	1.4		
		0.250 5	295.59	297.66	580.24	95.6				
		0.251 5	296.77	297.66	584.93	96.8				
	0.250 7	295.83	297.66	589.94	98.8					
	0.251 1	296.30	297.66	589.22	98.4					
	0.250 9	296.06	297.66	586.91	97.7					

表2 样品含量测定结果(n=3, mg/g)

Tab 2 Results of contents determination of samples(n=3, mg/g)

采摘时间	咖啡酸	新西兰牡荆苷2	异夏佛塔苷	总和
20130115	0.11	0.11	0.37	0.69
20130215	0.04	0.03	0.09	0.16
20130314	0.08	0.14	0.54	0.76
20130415	0.20	0.39	1.18	1.77
20130515	0.05	0.14	0.52	0.71
20130616	0.03	0.14	0.43	0.60
20130714	0.04	0.34	0.92	1.30
20130815	0.08	0.28	0.88	1.24
20130915	0.06	0.07	0.27	0.40
20131015	0.09	0.29	0.41	0.79
20131114	0.12	0.17	0.52	0.81
20131215	0.13	0.16	0.32	0.61

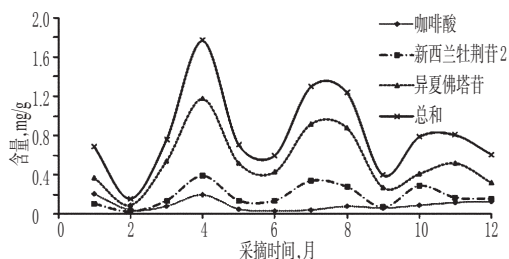


图2 不同采摘时间线纹香茶菜中咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷的含量变化

Fig 2 Dynamic changes of caffeic acid, vicenin-2 and isochaftoside of *R. lophanthoides* in different harvest time

累,均在4月达到最高值;而后开始逐渐减少,后又逐渐增加;新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷含量在7月达较高值,随后又开始呈逐渐减少-逐渐增加-逐渐减少的趋势。上述3种成分含量之和在一年中出现2个较高的时期,分别是4-5月、7-8月可见线纹香茶菜在全年的生长过程中上述3种成分的积累有一定的变化规律,且有2个生长周期。以上述3种成分的含量为指

标,线纹香茶菜的最佳采摘期为4月、7-8月。

3 讨论

笔者前期对水、甲醇、乙醇、50%乙醇等溶剂进行了考察,发现水、50%乙醇能提取较多咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷成分;对热回流、冷浸、微波、超声提取方法进行考察,发现超声提取法的提取效率较高,且杂质较少。在此基础上,笔者又对不同体积分数乙醇与提取时间进行了优选。结果发现,40倍30%乙醇超声提取2次,每次30 min,可以使上述3种成分达到较高提取率。

咖啡酸最大紫外吸收波长为323 nm;新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷均为水溶性芹菜素黄酮碳苷类,分别在271、334 nm波长处有较大紫外吸收,但271 nm波长处峰形较尖,334 nm波长处峰形较宽。因此,本试验选择334 nm为检测波长。另外,对乙腈-水、甲醇-水、甲醇-磷酸溶液、甲醇-甲酸溶液等多个溶剂系统进行考察,发现用含有乙腈的洗脱系统时,异夏佛塔苷与旁边的峰完全不能分离;经过多次试验,最终确定了以甲醇-0.1%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱,可使待测组分得到很好的基线分离,且能有效防止色谱峰拖尾。

线纹香茶菜为多年生草本植物,在一年的生长过程中咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷的含量出现多个峰谷和峰顶,体现了其在一年里具有多个生长周期。上述3种成分从幼苗时开始逐渐积累,积累到最大值后又下降,说明线纹香茶菜中上述3种成分在生长过程中会转化成其他成分,具体过程有待进一步研究。11月到次年1月为冬季,天气寒冷,线纹香茶菜生长缓慢,有效成分总量积累很少;2月天气开始回暖,线纹香茶菜进入第一个生长周期,生长快速,有效成分也快速积累;当植株生长到最茂盛时,接着就会出现老叶、枯叶,如果不按期采摘,将会落叶枯萎;雨季过后又会长出新芽进入下一个生长期。如果在第一个生长周期达最茂盛时进行采摘,植株会很快长出新芽进入下一个生长周期,有效成分可再一次逐步积累,体现了线纹香茶菜中有效成分含量的动态变化。

本研究首次对线纹香茶菜多个水溶性成分同时进行测定,并考察了水溶性成分的含量动态变化。该方法简便、准确、重复性好,可用于同时测定线纹香茶菜中咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷的含量。因此,为保证线纹香茶菜中各有效成分都较多,同时考虑药材产量的因素,应在4-5月进行第1次采摘,7-8月进行第2次采摘。

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: 附录Ⅲ 26.
- [2] 张翹, 潘超美, 溪黄草、线纹香茶菜及其变种的资源分布与利用调查[J]. 海峡药学, 2011, 23(11): 38.
- [3] 广东植物志编委会. 广东植物志[M]. 广州: 广东科技出版社, 2007: 463.
- [4] 邹盛勤, 姜琼. RP-HPLC法同时测定线纹香茶菜不同生长部位中三萜酸成分[J]. 中成药, 2015, 37(3): 570.
- [5] 桂蜀华, 常金荣, 梁远园, 等. 狭基线纹香茶菜水提部位对免疫肝损伤小鼠NF- κ B蛋白表达水平及核转位的影响[J]. 中国药房, 2011, 22(11): 980.
- [6] 邹盛勤, 姜琼. RP-HPLC法同时测定线纹香茶菜不同生长部位中三萜酸成分[J]. 中成药, 2015, 37(3): 570.

(收稿日期: 2015-06-01 修回日期: 2015-07-29)

(编辑: 张 静)