

# 加速溶剂萃取-高效液相色谱双波长法同时测定民族药广防风中 3 种成分的含量

张荣林<sup>1</sup>, 薛亚馨<sup>1</sup>, 陆小康<sup>1</sup>, 马双成<sup>2</sup>, 咎珂<sup>2</sup>, 林雀跃<sup>3\*</sup>, 莫迎<sup>1\*</sup> (1. 广西-东盟食品药品安全检验检测中心, 南宁 530021; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 3. 广西壮族自治区食品药品检验所, 南宁 530021)

**摘要** 目的: 建立加速溶剂萃取-高效液相色谱双波长法同时测定广防风中毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和木犀草素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷 3 种活性成分的含量。方法: 通过优化加速溶剂萃取法的提取工艺, 采用 Ultimate XB-C18 色谱柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相为乙腈-0.1% 甲酸溶液梯度洗脱, 流速为 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 检测波长为 330 nm 和 348 nm, 柱温为 35  $^{\circ}$ C。结果: 优化得到的最佳萃取条件为以 50% 甲醇溶液 25 mL (v/v) 作为提取溶剂, 于 110  $^{\circ}$ C, 动态萃取 4 min。毛蕊花糖苷、木犀草素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷、异毛蕊花糖苷进样量分别在 0.02114 ~ 4.230  $\mu$ g、0.02008 ~ 1.004  $\mu$ g、0.01979 ~ 1.979  $\mu$ g 范围内线性关系良好 ( $r=1.0000$ ), 平均回收率分别为 103.4%、99.7%、101.6%。结论: 本研究对广防风的质量标准提高具有较好的参考价值, 为该药材的质量监管提供了先进的技术支持。

**关键词:** 广防风; 毛蕊花糖苷; 异毛蕊花糖苷; 木犀草素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷; 加速溶剂萃取; 高效液相色谱法

中图分类号: R917; R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2020)03-0335-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2020.03.014

## Determination of Three Compounds in *Epimeredi indica* (L.) Rothm. by An HPLC Dual Wavelength Method Combined with Accelerated Solvent Extraction

Zhang Ronglin<sup>1</sup>, Xue Yaxin<sup>1</sup>, Lu Xiaokang<sup>1</sup>, Ma Shuangcheng<sup>2</sup>, Zan Ke<sup>2</sup>, Lin Queyue<sup>3\*</sup>, Mo Ying<sup>1\*</sup> (1. Guangxi-Asean Center for Food and Drug Safety Control, Nanning 530021, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 3. Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China)

**Abstract Objective:** To establish an accelerated solvent extraction - high performance liquid chromatography (HPLC) dual wavelength method for the simultaneous determination of the three active components—acteoside, isoacteoside and luteolin-7-O- $\beta$ -D-glucuronide in *Epimeredi indica* (L.) Rothm. **Methods:** The primary parameters of accelerated solvent extraction, including extraction temperature, hold time and extraction solvent, were optimized. The separation was performed on an Ultimate XB-C18 column (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), and the

基金项目: 科技部国家科技重大专项 (民口) 课题重大新药创制“中药组分资源库及产业公共技术服务平台建设” (编号 2018ZX09735-006); 广西-东盟食品药品安全检验检测中心 2019 科研项目 (编号 KY201906)

作者简介: 张荣林, 主管中药师; 研究方向: 食品药品检验及研究; E-mail: zhronglin@sina.com

通信作者: 林雀跃, 副主任药师; 研究方向: 中药材及中成药质量评价; E-mail: linqueyue@163.com

莫迎, 副主任药师; 研究方向: 食品药品检验及研究; E-mail: 8123812@qq.com

mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% formic acid with gradient elution. The detection UV wavelengths were 330 nm and 348 nm. The flow rate was  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . The column temperature was  $35^\circ\text{C}$ . **Results:** The optimized conditions of accelerated solvent extraction were extraction solvent of 50% methanol 25 mL (v/v) with extraction temperature of  $110^\circ\text{C}$ , and hold time of 4 min. The calibration curves of acteoside, luteolin-7-O- $\beta$ -D-glucuronide and isoacteoside showed good linearity over 0.02114 - 4.230  $\mu\text{g}$  ( $r = 1.0000$ ), 0.02008 - 1.004  $\mu\text{g}$  ( $r = 1.0000$ ), and 0.01979 - 1.979  $\mu\text{g}$  ( $r = 1.0000$ ) respectively. The average recoveries were 99.7% - 103.4%.

**Conclusion:** This study provided a good reference for the improvement of quality standards of *Epimeredi indica* (L.) Rothm. and advanced technical support for the quality supervision of the medicinal substances.

**Keywords:** *Epimeredi indica* (L.) Rothm.; acteoside; isoacteoside; luteolin-7-O- $\beta$ -D-glucuronide; accelerated solvent extraction; high performance liquid chromatography

广防风为唇形科植物广防风*Epimeredi indica* (L.) Rothm. 的干燥地上部分, 收录于《广西中药材标准》1990年版中, 味辛、苦, 性平, 祛风湿, 消疮毒, 主治感冒发烧, 风湿痹痛, 痈肿疮毒, 皮肤湿疹, 虫蛇咬伤<sup>[1]</sup>。广防风主要分布于西南及浙江南部、福建、江西南部、湖南南部、广东、广西及台湾地区<sup>[2]</sup>, 壮药称广防风为白紫苏、牙坏, 瑶药称之为假藿香, 主要用于百日咳、感冒、鼻衄、风湿、皮肤疮、骨髓炎、上吐下泻。含广防风的京族药浴在防城港市民间长期使用, 是京族民众传统的新生儿退黄措施<sup>[3]</sup>。现代药理研究表明, 广防风具有抗菌抗病毒<sup>[4]</sup>、抗炎镇痛<sup>[5-6]</sup>、清除自由基<sup>[7]</sup>、抗癌<sup>[8-9]</sup>等药理活性。广防风中的主要活性成分为毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木犀草素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷等苯丙素苷和黄酮苷类化合物。

目前对广防风的质量控制研究较少, 有关文献报道主要在广防风的生药学<sup>[10-11]</sup>、薄层色谱鉴别、分子生物学<sup>[12]</sup>、化学成分及药理作用方面的研究, 王玉兰等<sup>[13]</sup>建立了以广防风根制成的广防风颗粒中广防风苷A的含量测定方法。广防风地上部分的含量测定未见报道。

加速溶剂萃取技术作为一种高效、精确、自动化的前处理技术, 已广泛应用于环境监测<sup>[14-15]</sup>、食品分析<sup>[16]</sup>和药品监管<sup>[17-19]</sup>等领域, 该方法具有有机溶剂用量少、快速、基质影响小、回收率高和重现性好等优点。由于广防风中毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷均在330 nm有最大吸收, 木犀草素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷在348 nm有最大吸收, 单一波长测定存在一定的误差, 为了更好地评价广防风的质量, 本文采用加速溶剂萃取-高效液相色谱

双波长法, 建立广防风中毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷及木犀草素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷含量测定方法, 为合理评价民族药广防风的质量提供科学依据。

## 1 仪器与试剂

Agilent1260高效液相色谱仪, DAD紫外检测器(美国Agilent公司), Millipore纯水仪(美国密理博公司), EDGE全自动快速溶剂萃取仪(美国CEM公司), XS205DU电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)。

提取用甲醇为分析纯(国药集团化学试剂有限公司), 流动相体系中所用甲酸、乙腈为色谱纯(德国Merck公司), 水为超纯水。

毛蕊花糖苷对照品(批号: 111968-201301, 纯度97.0%)、木犀草素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷对照品(批号: 111968-201301, 纯度93.0%)均由中国食品药品检定研究院提供, 异毛蕊花糖苷(批号: PF170111-11, 纯度99.53%)由Stanford Analytical Chemicals 公司提供。

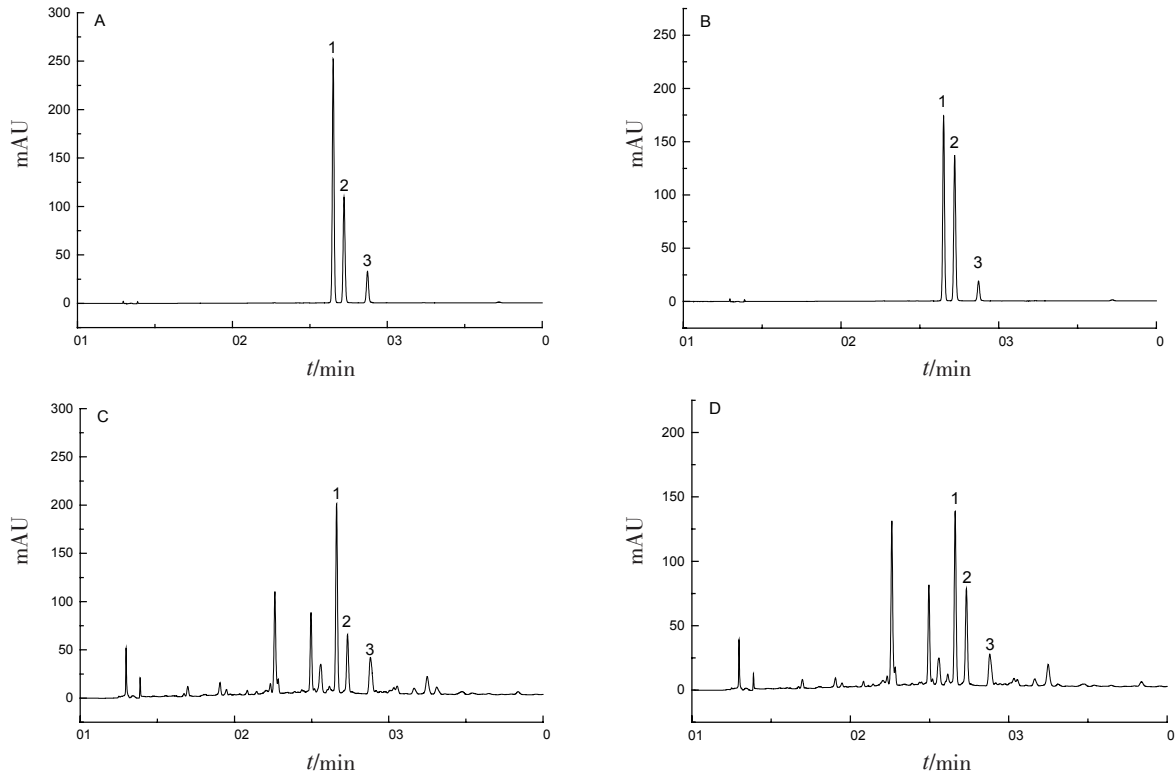
所有样品均为野外采集, 经广西壮族自治区食品药品检验所林雀跃副主任药师鉴定为唇形科广防风属植物广防风*Epimeredi indica* (L.) Rothm. 的全草。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Ultimate XB-C18 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~10 min, A: 10% $\rightarrow$ 20%; 10~30 min, A: 20% $\rightarrow$ 25%); 流速:  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 检测波长: 330 nm和348 nm; 柱温:  $35^\circ\text{C}$ ; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ 。理论塔板数按毛蕊

花糖苷计算应不低于5000; 各峰分离度应不低于 1.5, 色谱图见图1。



A. 混合对照品 (330 nm); B. 混合对照品 (348 nm); C. 供试品 (330 nm); D. 供试品 (348 nm);  
1. 毛蕊花糖苷; 2. 木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸; 3. 异毛蕊花糖苷。

图1 广防风HPLC色谱图

### 2.2 对照品储备液的制备

精密称取毛蕊花糖苷、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸和异毛蕊花糖苷对照品各约10 mg, 分别置10、20、10 mL量瓶中, 加50%甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。分别精密吸取上述3种对照品储备液各2.50、1.00、0.50 mL置同一25 mL容量瓶中, 50%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

取广防风药材粉末(过三号筛)0.5 g, 精密称定, 置加速溶剂萃取杯中, 放入加速溶剂萃取架, 以25 mL体积分数50%甲醇溶液为提取溶剂, 110℃

动态萃取4 min, 收集萃取液至40 mL收集瓶中, 萃取液滤过, 取续滤液, 即得。

### 2.4 线性关系考察

分别精密吸取毛蕊花糖苷、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷和异毛蕊花糖苷对照品储备液适量, 制成一系列浓度的混合对照品溶液, 按上述色谱条件测定, 以对照品的进样量 $X$  ( $\mu\text{g}$ )为横坐标, 峰面积 $Y$ 为纵坐标, 绘制标准曲线, 并进行线性回归, 各成分回归方程和线性范围见表1。结果表明, 3个被测成分在测定范围内均呈良好的线性关系。

表1 各被测成分的标准曲线方程、线性范围和相关系数

成分	回归方程	线性范围/ $\mu\text{g}$	$r$
毛蕊花糖苷	$Y=37.371X+5.6026$	0.02114 ~ 4.230	1.0000
木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷	$Y=121.02X-41.422$	0.02008 ~ 1.004	1.0000
异毛蕊花糖苷	$Y=15.668X+2.3565$	0.01979 ~ 1.979	1.0000

## 2.5 精密度试验

取同一混合对照品溶液,连续进样6次,测定峰面积,以峰面积考察精密度,结果毛蕊花糖苷、木犀草素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷、异毛蕊花糖苷峰面积的RSD分别为0.68%、0.81%、1.83%,表明仪器精密度良好。

## 2.6 重复性试验

取样品粉末(批号:110103)6份,按“2.3”节下方法制备供试品溶液,按“2.1”节下色谱条件进行测定,结果毛蕊花糖苷、木犀草素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷、异毛蕊花糖苷的含量分别为2.08、0.32、1.71 mg·g<sup>-1</sup>,其RSD分别为1.62%、2.48%、2.45%,表明本试验重复性良好。

## 2.7 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(批号:110103),分别于制备后0、2、8、14、20、24 h,按“2.1”

节下色谱条件进行测定,毛蕊花糖苷、木犀草素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷、异毛蕊花糖苷的平均峰面积分别为1536.215、725.212、522.695,其RSD分别为1.35%、0.96%、1.81%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

## 2.8 加样回收试验

精密称取已知含量的同一样品(批号:110103)约0.25 g,共9份,分别置具塞锥形瓶中,按重复性结果计算出来的3个被测成分的含量分别加入3个水平的对照品量各3份,按“2.3”节下方法制成供试品溶液,按“2.1”节下色谱条件进行测定,分别计算回收率,结果见表2~表4。

## 2.9 样品测定

取本品7批,按“2.3”节下方法制备供试品溶液,按“2.1”节下色谱条件进行含量测定,结果见表5。

表2 毛蕊花糖苷加样回收率试验结果(n=9)

组分	取样量/g	含有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
毛蕊花糖苷	0.2511	0.5217	0.2235	0.7459	100.3	103.4	1.37
	0.2512	0.5219	0.2235	0.7530	103.4		
	0.2503	0.5200	0.2235	0.7498	102.8		
	0.2583	0.5366	0.4270	0.9841	104.8		
	0.2561	0.5320	0.4270	0.9789	104.7		
	0.2594	0.5389	0.4270	0.9761	102.4		
	0.2582	0.5364	0.6405	1.2032	104.1		
	0.2573	0.5345	0.6405	1.2014	104.1		
	0.2583	0.5366	0.6405	1.2029	104.0		

表3 木犀草素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷加样回收率试验结果(n=9)

组分	取样量/g	含有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
木犀草素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷	0.2511	0.0803	0.0402	0.1200	98.8	99.7	2.42
	0.2512	0.0803	0.0402	0.1201	99.0		
	0.2503	0.0800	0.0402	0.1198	99.0		
	0.2583	0.0826	0.0804	0.1667	104.6		
	0.2561	0.0819	0.0804	0.1638	101.9		
	0.2594	0.0829	0.0804	0.1637	100.5		
	0.2582	0.0825	0.1206	0.1996	97.1		
	0.2573	0.0823	0.1206	0.1991	96.8		
	0.2583	0.0826	0.1206	0.2024	99.3		

表4 异毛蕊花糖苷加样回收率试验结果 (n=9)

组分	取样量 /g	含有量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
异毛蕊花糖苷	0.2511	0.4285	0.1982	0.6320	102.7	101.6	1.72
	0.2512	0.4286	0.1982	0.6335	103.4		
	0.2503	0.4271	0.1982	0.6333	104.0		
	0.2583	0.4408	0.3964	0.8362	99.7		
	0.2561	0.4370	0.3964	0.8324	99.7		
	0.2594	0.4426	0.3964	0.8485	102.4		
	0.2582	0.4406	0.5946	1.0313	99.3		
	0.2573	0.4391	0.5946	1.0393	100.9		
	0.2583	0.4408	0.5946	1.0495	102.4		

表5 广防风样品测定结果

批号	产地	毛蕊花糖苷含量 / (mg · g <sup>-1</sup> )	木犀草素 -7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷含量 / (mg · g <sup>-1</sup> )	异毛蕊花糖苷 / (mg · g <sup>-1</sup> )
1	防城港 1	7.14	0.99	3.86
2	防城港 2	0.54	0.44	0.99
3	东兴 1	1.62	0.26	1.38
4	防城港 3	1.33	0.17	0.84
5	东兴 2	0.58	0.42	0.83
6	东兴 3	4.71	0.22	2.52
7	防城港 4	2.08	0.32	1.71

### 3 讨论

#### 3.1 流动相的选择

分别对比了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸水、乙腈-磷酸水及乙腈-甲酸水系统, 结果发现非酸水系统不能使3种成分达到基线分离, 且峰型拖尾; 酸水系统中, 以乙腈-酸水系统的分离效果较佳, 研究显示, 酸度越强, 色谱峰的峰型及分离度越好, 但酸度越高对色谱柱损伤越大, 综合考虑两种因素, 最终选择乙腈-0.1%甲酸水溶液系统对供试品进行梯度洗脱。

#### 3.2 加速溶剂萃取仪提取条件优化

本文采用萃取液中3种化合物的含量作为指标, 通过单因素试验分别考察加速溶剂萃取过程中

各提取条件对广防风中3个目标组分的影响, 优化最佳提取工艺条件。

##### 3.2.1 提取溶剂

选定甲醇为提取溶剂, 并考察甲醇体积分数对提取效果的影响(图2)。结果表明, 甲醇体积分数在50%时提取率最高, 当甲醇体积分数达到60%以上时, 提取率下降, 因此, 确定甲醇体积分数50%最佳。

##### 3.2.2 提取温度

选定50%甲醇为提取溶剂, 并考察提取温度对提取效果的影响(图3)。结果表明, 提取温度达到110℃后, 3种目标成分的含量变化不大, 因此, 选择110℃作为提取温度。

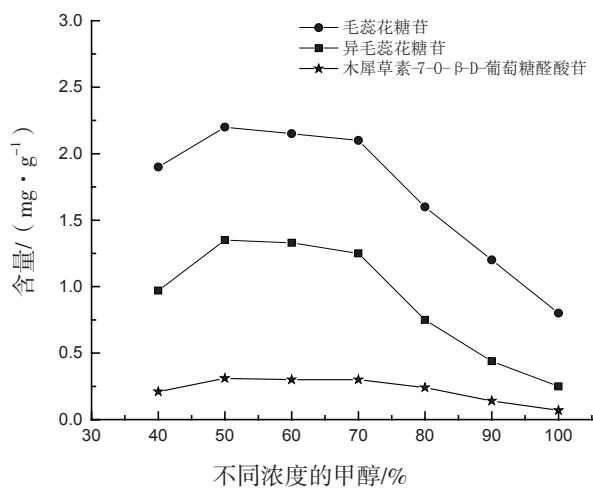


图2 提取溶剂的考察

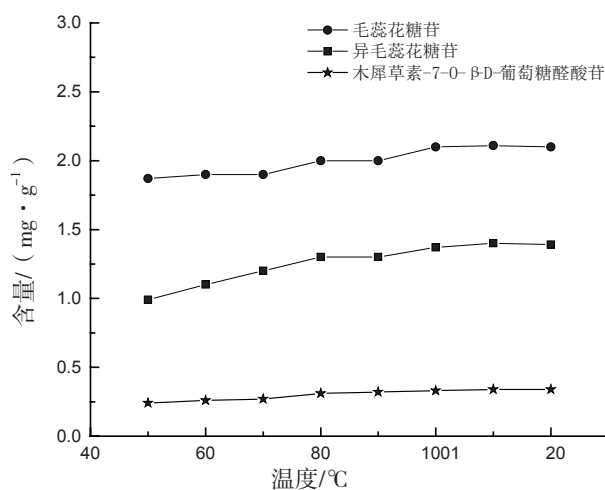


图3 温度的考察

### 3.2.3 动态提取保持时间

考察动态提取保持时间对提取效果的影响 (图4)。结果表明,各成分的含量随着保持时间

的延长而增大,当保持时间超过4 min后基本保持不变,因此,选择4 min作为保持时间。

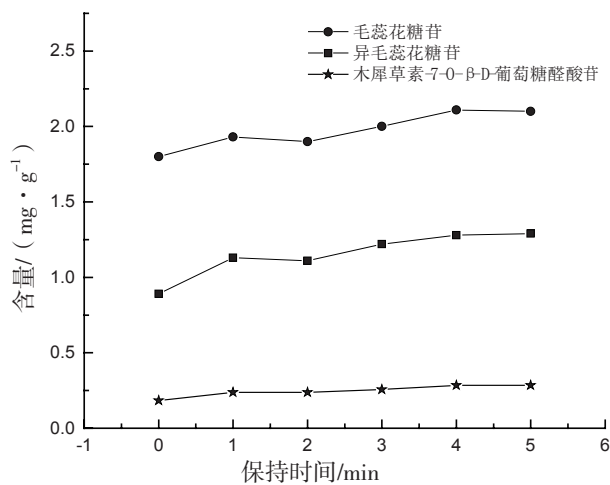


图4 动态提取保持时间

### 3.3 结果分析

广防风中含有毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、广防风苷A、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷等活性成分。试验中尝试通过HPLC分析广防风中的广防风苷A,但样品中几乎检测不到广防风苷A的色谱峰,可能存在以下原因:广防风苷A主要存在于地下部分,采集的药材所含地下部分较少;中药的化学成分受到产地、气候、环境、采收季节的影响,不同产地的广防风的化学成分含量存在差异。后期有必要对不同产地、不同采收期广防风药材的化学成分含量差异进行深入研究。

本研究建立了加速溶剂萃取-高效液相双波长法同时测定广防风中3种活性成分的方法,结果表明,本方法操作简便、分析快速,可用于广防风中毛蕊花糖苷、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷和异毛蕊花糖苷3种活性成分的同时分析,对提高该民族药材的质量控制水平具有较好的参考价值,为该药材的质量监管提供了较为先进的技术支持。

#### 参考文献:

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海科学技术出版社, 1999: 6051-6052.

[2] 南京中医药大学. 中药大辞典(下) [M]. 第2版. 上海科学技术出版社, 2014: 2796-2798.

[3] 周丽, 许文波, 张传凯, 等. W1602877-京族药液对家兔的皮肤刺激性及急性毒性的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, (2): 123-126.

[4] Rao Y K, Lien H M, Lin Y H, et al. Antibacterial Activities of Anisomelesindica Constituents and Their Inhibition Effect on Helicobacter Pylori-induced Inflammation in Human Gastric Epithelial Cells[J]. Food Chem, 2012, 132 (2): 780-787.

[5] Dharmasiri M G, Ratnasooriya W D, Thabrew M I. Anti-inflammatory Activity of Decoctions of Leaves and Stems of Anisomelesindica at Preflowering and Flowering Stages[J]. PharmBiol, 2002, 40 (6): 433-439.

[6] Dharmasiri M G, Ratnasooriya W D, Thabrew M I. Water Extract of Leaves and Stems of Preflowering but not Flowering Plants of Anisomelesindica Possesses Analgesic and Antihyperalgesic Activities in Rats[J]. Pharm Biol, 2003, 41 (1): 37-44.

[7] Syed J, DlieepN, Rakesh KN, et al. Contents of Total

Phenolics and Flavonoids, Radical Scavenging and Anticaries Activity of Leaf and Seed Extract of Anisomelesindica Linn[J]. International Journal of Drug Development and Research, 2013, 5 (4): 286-292.

[8] Arisawa M, Nimura M, Ikeda A, et al. Biologically Active Macrocyclic Diterpenoids from Chinese Drug “F á ngF é ngC á o” I. Isolation and Structure 1[J]. Planta Med, 1986, 52 (1): 38-41.

[9] Momose Y, Nimura M, Arisawa M, et al. Hypotensive Activity of Ovatodioides Isolated from a Chinese Crude Drug ‘F á ngF é ngC á o’ [J]. Phytother Res, 1994, 8 (8): 482-484.

[10] 薛漓. 广藿香及其混淆品广防风的鉴别[J]. 中草药, 2001, 32 (5): 460-461.

[11] 刘文啟, 严华, 董亚娟, 等. 广防风基原与鉴别[J]. 药物分析杂志, 2015, (2): 370-376.

[12] 黄洁燕, 卢慧娟, 谢晖, 等. 基于psbA-trnH序列对广藿香与藿香、广防风的分子鉴定[J]. 广东药科大学学报, 2014, (6): 683-687.

[13] 王玉兰, 施华卫, 栾欣. HPLC测定广防风颗粒中广防风苷A的含量[J]. 中成药, 2004, (5): 428-429.

[14] 田丙正, 张付海, 张敏, 等. 加速溶剂萃取和净化-气相色谱/三重四极杆串联质谱法测定水体沉积物中多氯联苯[J]. 分析试验室, 2017, (7): 47-51.

[15] 甘志永, 于佩, 徐蕾. 加速溶剂萃取-GPC净化-GC-MS/MS测定土壤中的16种多环芳烃[J]. 环境科技, 2018, 31 (2): 60-64.

[16] 欧小群, 马丽艳, 潘赛超, 等. 加速溶剂萃取技术在食品安全检测中的应用[J]. 中国食品学报, 2018, 18 (5): 227-236.

[17] 吴晓民, 王艳红, 陈颖, 等. 加速溶剂萃取-高效液相色谱法同时测定全叶千里光中3种成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2016, (9): 1555-1562.

[18] 姜秀娟, 刘文杰, 万英, 等. 加速溶剂提取-高效液相色谱法测定甘草中甘草酸的含量[J]. 分析试验室, 2008, 27 (2): 76-79.

[19] 廖强, 王丽丽, 韦日伟. 快速溶剂萃取-电雾式检测器结合柱后补偿液相色谱在4种中成药黄芪甲苷测定中的应用[J]. 中国药学杂志, 2018, 53 (6): 456-459.

(收稿日期 2019年7月25日 编辑 邹宇玲)