

HPLC 法测定全缘叶绿绒蒿根、茎、叶、花中总黄酮醇苷的含量

吴小可^{1,2}, 陈静华^{1,2}, 于瑞涛^{1*}¹中国科学院西北高原生物研究所 中国科学院藏药研究重点实验室/青海省藏药研究重点实验室, 西宁 810008;²中国科学院大学, 北京 100049

摘要:建立测定不同产地全缘叶绿绒蒿不同部位中总黄酮醇苷含量的方法。色谱条件为: Megres C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相采用甲醇-0.2% 甲酸溶液(48:52, V/V), 洗脱时间 40 min, 检测波长为 254 nm, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 40 °C, 进样量为 5 μL。结果显示, 槲皮素、山柰素和异鼠李素 3 种黄酮类化合物分别在 0.7~70、0.7~70、0.4~40 μg/mL 浓度范围内线性关系良好。本方法操作简便, 精密度、稳定性和重复性良好, 为进一步研究全缘叶绿绒蒿的质量检测和开发利用奠定了基础。

关键词:高效液相色谱法; 全缘叶绿绒蒿; 总黄酮醇苷

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023) Suppl-0061-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.S.009

Content determination of total flavonol glycosides in roots, stems, leaves and flowers of *Meconopsis integrifolia* by HPLC

WU Xiao-ke^{1,2}, CHEN Jing-hua^{1,2}, YU Rui-tao^{1*}

¹CAS Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Qinghai Provincial Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: This study was conducted to establish a method to determine the content of total flavonol glycosides in different parts of *Meconopsis integrifolia* from different habitats. The mobile phase consisted of methanol-0.2% formic acid buffer (48:52, V/V), with a flow rate of 1.0 mL/min, using Megres C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with run time 40 min and UV detection at 254 nm. The column temperature was 40 °C, and the injection volume was 5 μL. The results showed that the three flavonoids, quercetin, kaempferol and isorhamnetin, had good linear relationships in the concentration ranges of 0.7-70, 0.7-70, and 0.4-40 μg/mL, respectively. The method is easy to operate, has good precision, stability and repeatability, and lays a foundation for further research on quality detection, development and utilization of *M. integrifolia*.

Key words: HPLC; *Meconopsis integrifolia*; total flavonol glycosides

全缘叶绿绒蒿 (*Meconopsis integrifolia* (Maxim.) Franch.), 藏语称为“欧贝赛保”(藏文: ཉུཔ་ལ་ཤེ་པོ།, Utpala-ser-po), 为《晶珠本草》记载的藏药“吾巴拉”(藏文: ཉུཔ་ལ།, Utpala) 原植物之一^[1], 产于甘肃西南部(夏河、会川)、青海东部至南部、四川西部和西北部、云南西北部和东北部、西藏东部和缅甸东北部, 生于海拔 2 700~5 100 m 的草坡或林下。全草清

热止咳; 花前采叶入药, 治胃中反酸; 花退热催吐、消炎, 治跌打骨折^[2]。从绿绒蒿属植物中分离得到的化合物有生物碱、黄酮、挥发油等^[3-7]。绿绒蒿属植物具有保肝、抗心肌缺血、抗炎、镇痛等作用^[8-10]。黄酮类化合物是广泛存在于自然界中的一类化合物, 种类繁多, 其生理生化活性多种多样^[11], 具有抗氧化^[12-15]、抗炎^[16]、抗菌^[15,17]、抗肿瘤^[18]、抗类风湿关节炎^[19]、抗糖基化、乙酰胆碱酯酶和 α-葡萄糖苷酶抑制活性^[20], 对 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠具有保护作用^[21-23] 等药理活性。本研究采用 HPLC 法对来自两个产地的全缘叶绿绒蒿不同部位进行总黄酮醇苷的含量分析, 以期为进一步研究

收稿日期: 2022-07-29 接受日期: 2022-10-12

基金项目: 青海省科技项目(2021-HZ-806); 青海省自然基金面上项目(2022-ZJ-930); 青海省藏药研究重点实验室创新平台发展建设专项(2022-ZJ-Y03)

* 通信作者 E-mail: yuruitao@nwipb.cas.cn

开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

全缘叶绿绒蒿 (*Meconopsis integrifolia* (Maxim.) Franch.) 样品在 2021 年 6 月 10 日及 11 日分别采集于玛沁县大武镇羊场以及玛沁县黑土山。药材由中国科学院西北高原生物研究所梅丽娟研究员鉴定 (标本编号: 0360986, 中国科学院西北高原生物研究所植物标本馆)。

1.2 试剂

槲皮素 (批号 117395) 对照品 (如吉生物科技, 含量 > 98%); 山柰素 (批号 1108612200606) 对照品 (中国药品生物制品检定所, 含量 > 98%); 异鼠李素 (批号 1108612200407) 对照品 (中国药品生物制品检定所, 含量 > 98%); 分析纯 36% ~ 38% 盐酸 (白银良友化学试剂有限公司); 分析纯甲醇、甲酸 (成都市科隆化学品有限公司); 色谱用超纯水 (优普超纯水机自制); 色谱甲醇 (ACMEC biochemical)。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱: Megres C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.2% 甲酸溶液 (48:52, V/V); 洗脱时间: 40 min; 检测波长: 254 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样量: 5 μL。对照品与样品的色谱图如图 1 所示。

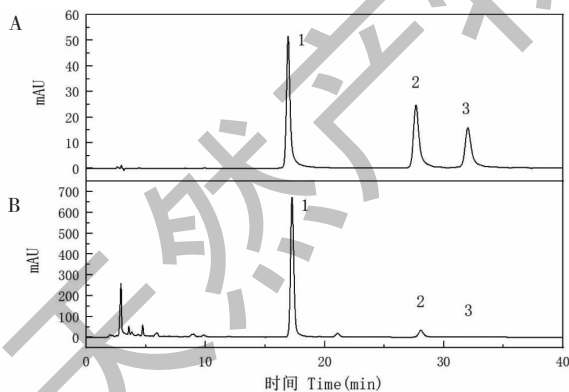


图 1 对照品与样品的 HPLC 分析色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of reference and sample

注: A: 对照品; B: 羊场全缘叶绿绒蒿花部位样品; 1: 槲皮素; 2: 山柰素; 3: 异鼠李素。Note: A: Reference substance; B: Flowers of *Meconopsis integrifolia* (Maxim.) Franch. from Yangchang; 1: Quercetin; 2: Kaempferol; 3: Isorhamnetin.

1.3.2 样品溶液制备

1.3.2.1 甲醇-盐酸混合溶液制备

以 7:3 的比例将分析纯 36% ~ 38% 盐酸与纯水混合, 配置成 25% 盐酸溶液。以 1:4 的比例将 25% 盐酸溶液与甲醇混合, 配置成甲醇-25% 盐酸溶液 (4:1, V/V) 混合溶液。

1.3.2.2 样品溶液制备

用粉碎机将不同产地不同部位的全缘叶绿绒蒿进行粉碎。电子天平称取粉碎后的植物粉末 1 g, 加入 250 mL 平底烧瓶中, 再加入量筒量取的 50 mL 甲醇-25% 盐酸溶液 (4:1, V/V) 混合溶液。平底烧瓶置于 80 °C 水浴锅中, 加热回流 1 h。1 h 后取出平底烧瓶, 静置其中液体至室温。用注射器吸取 1 mL 样品溶液, 通过 0.45 μm 微孔有机滤膜过滤至液相小瓶, 进行 HPLC 测定。

1.3.3 对照品溶液制备

1.3.3.1 槲皮素单标标准液制备

电子天平精确称取槲皮素 3.5 mg, 转移至烧杯, 用少量甲醇溶解。烧杯中液体用玻璃棒转移至 50 mL 容量瓶, 重复数次用少量甲醇洗涤烧杯并将转移洗涤液至容量瓶。甲醇定容至刻度, 配置成 70 μg/mL 槲皮素单标标准液, 于 4 °C 冰箱保存。

1.3.3.2 山柰素单标标准液制备

电子天平精确称取山柰素 3.5 mg, 转移至烧杯, 用少量甲醇溶解。存在少量未溶沉淀, 超声 5 min 使其溶解。烧杯中液体用玻璃棒转移至 50 mL 容量瓶, 重复数次用少量甲醇洗涤烧杯并将转移洗涤液至容量瓶。甲醇定容至刻度, 配置成 70 μg/mL 山柰素单标标准液, 于 4 °C 冰箱保存。

1.3.3.3 异鼠李素单标标准液制备

电子天平精确称取异鼠李素 2 mg, 转移至烧杯, 用少量甲醇溶解。存在少量未溶沉淀, 超声 5 min 使其溶解。烧杯中液体用玻璃棒转移至 50 mL 容量瓶, 重复数次用少量甲醇洗涤烧杯并将转移洗涤液至容量瓶。甲醇定容至刻度, 配置成 40 μg/mL 异鼠李素单标标准液, 于 4 °C 冰箱保存。

1.3.3.4 混标标准液制备

将三种单标标准液 50 mL 混合, 浓缩。浓缩液转移至 50 mL 容量瓶, 甲醇定容至刻度, 配置成混标标准液。混标标准液中槲皮素、山柰素、异鼠李素浓度分别为 70、70、40 μg/mL, 于 4 °C 冰箱保存。

1.3.4 线性关系考察

将槲皮素、山柰素、异鼠李素混标标准液分别稀释为 1、2.5、5、10、20、100 倍, 转移至液相小瓶进行 HPLC 测定。以标准品浓度为横坐标、峰面积为纵

坐标绘制标准曲线,得到回归方程。

1.3.5 精密度试验

平行6次,用移液枪吸取1 mL混标标准液至液相小瓶,HPLC测定。

1.3.6 稳定性试验

电子天平称取玛沁县黑土山全缘叶绿绒蒿茎粉末1 g,加入250 mL平底烧瓶中,再加入量筒量取的50 mL甲醇-25%盐酸溶液(4:1,V/V)混合溶液。平底烧瓶置于80℃水浴锅中,加热回流1 h。1 h后取出平底烧瓶,静置其中液体至室温。用注射器吸取1 mL样品溶液,通过0.45 μm微孔有机滤膜过滤至液相小瓶,分别于0、2、4、6、8、10、12 h时进行HPLC测定。

1.3.7 重复性试验

平行6次,电子天平称取玛沁县黑土山全缘叶绿绒蒿茎粉末1 g,加入250 mL平底烧瓶中,再加入量筒量取的50 mL甲醇-25%盐酸溶液(4:1,V/V)混合溶液。平底烧瓶置于80℃水浴锅中,加热回流1 h。1 h后取出平底烧瓶,静置其中液体至室温。用注射器吸取1 mL样品溶液,通过0.45 μm微孔有机滤膜过滤至液相小瓶,进行HPLC测定。

1.3.8 加样回收率试验

平行6次,电子天平称取玛沁县黑土山全缘叶

绿绒蒿茎粉末1 g,加入250 mL平底烧瓶中,再加入量筒量取的50 mL甲醇-25%盐酸溶液(4:1,V/V)混合溶液。平底烧瓶置于80℃水浴锅中,加热回流1 h。1 h后取出平底烧瓶,静置其中液体至室温。用注射器吸取1 mL样品溶液,通过0.45 μm微孔有机滤膜过滤至液相小瓶。过膜后液相小瓶中有0.96 mL样品溶液,再用移液枪加入0.32 mL混标标准液,进行HPLC测定。

1.3.9 样品含量测定

用粉碎机将不同产地不同部位的全缘叶绿绒蒿分为根、茎、叶和花四个部位分别进行粉碎。电子天平称取粉碎后的植物粉末1 g,加入250 mL平底烧瓶中,再加入量筒量取的50 mL甲醇-25%盐酸溶液(4:1,V/V)混合溶液。平底烧瓶置于80℃水浴锅中,加热回流1 h。1 h后取出平底烧瓶,静置其中液体至室温。用注射器吸取1 mL样品溶液,通过0.45 μm微孔有机滤膜过滤至液相小瓶,进行HPLC测定。

2 结果与分析

2.1 线性关系结果

如表1所示,槲皮素、山柰素和异鼠李素的浓度与峰面积呈良好的线性关系,线性范围分别在0.7~70、0.7~70和0.4~40 μg/mL之间。

表1 线性关系考察结果($n=6$)

Table 1 Results of linear relationship investigation ($n=6$)

对照品 Reference substance	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient(R)	线性范围 Linear range(μg/mL)
槲皮素 Quercetin	$y = 18.366x - 13.074$	0.998 8	0.7 ~ 70
山柰素 Kaempferol	$y = 12.25x - 5.990 6$	0.998 6	0.7 ~ 70
异鼠李素 Isorhamnetin	$y = 15.124x - 3.687 8$	0.998 9	0.4 ~ 40

2.2 精密度结果

如表2所示,槲皮素、山柰素和异鼠李素的峰面积RSD分别为2.62%、3.63%、3.62%,表明本方法精密度良好。

2.3 稳定性结果

如表3所示,玛沁县黑土山全缘叶绿绒蒿茎中槲皮素的峰面积RSD为3.34%,表明样品溶液在12 h内稳定性良好。

2.4 重复性结果

结果如表4,平行6次玛沁县黑土山全缘叶绿绒蒿茎中槲皮素峰面积的RSD为6.29%,表明本方法重复性良好。

表2 精密度试验测定结果($n=6$)

Table 2 Results of precision test ($n=6$)

序号 No.	峰面积 Peak area(mAU * min)		
	槲皮素 Quercetin	山柰素 Kaempferol	异鼠李素 Isorhamnetin
1	1 267.6	846.2	597.2
2	1 248.3	892.3	641.3
3	1 263.5	887	608.5
4	1 255	885.3	657.4
5	1 272.4	889	640.5
6	1 183.9	947.4	639
平均值 Average	1 248.5	891.2	630.7
RSD(%)	2.62	3.63	3.62

表3 稳定性试验测定结果 ($n=7$)Table 3 Results of stability test ($n=7$)

时间 Time(h)	峰面积 Peak area(mAU * min)		
	槲皮素 Quercetin	山柰素 Kaempferol	异鼠李素 Isorhamnetin
0	729.2	0	0
2	724.7	0	0
4	709.4	0	0
6	722.2	0	0
8	701.6	0	0
10	683.9	0	0
12	665.3	0	0
平均值 Average	705.2	0	0
RSD(%)	3.34	-	-

表4 重复性试验测定结果 ($n=6$)Table 4 Results of repeatability test ($n=6$)

序号 No.	峰面积 Peak area(mAU * min)		
	槲皮素 Quercetin	山柰素 Kaempferol	异鼠李素 Isorhamnetin
1	623.5	0	0
2	615.2	0	0
3	669.1	0	0
4	640	0	0
5	670.8	0	0
6	728.2	0	0
平均值 Average	657.8	0	0
RSD(%)	6.29	-	-

表6 样品总黄酮醇苷含量测定结果

Table 6 Results of total flavone alcohol glycosides in samples

产地 Habitat	部位 Part	槲皮素含量 Quercetin content (mg/g)	山柰素含量 Kaempferol content (mg/g)	异鼠李素含量 Isorhamnetin content (mg/g)	总黄酮醇苷含量 Total flavonol glycosides content(mg/g)
玛沁县黑土山 Maqin County, Heitu Mountain	根 Roots	0.466	0	0	1.166
	茎 Stems	2.021	0	0	5.053
	叶 Leaves	5.815	0	0	14.508
	花 Flowers	40.123	4.819	0	111.976
玛沁县大武镇羊场 Maqin County, Dawu Town, Yangchang	根 Roots	0.331	0	0	0.830
	茎 Stems	1.258	0	0	3.153
	叶 Leaves	4.643	0	0	11.631
	花 Flowers	36.813	4.197	0.188	103.076

3 讨论与结论

通过对不同流动相及不同洗脱时间条件下的出峰效果进行比较,发现采用以下条件时各峰峰形完

2.5 加样回收率结果

如表5所示,平行6次玛沁县黑土山全缘叶绿绒蒿茎中总黄酮醇苷回收率的RSD为7.74%。通过公式:总黄酮醇苷含量 = (槲皮素含量 + 山柰素含量 + 异鼠李素含量) × 2.51,计算加入标准品前后样品中总黄酮醇苷的含量。

表5 加样回收率试验测定结果 ($n=6$)Table 5 Results of recovery test ($n=6$)

序号 No.	样品含量 Sample content (μg)	加入量 Adding content (μg)	测得量 Measured content (μg)	回收率 Recovery rate (%)
1	83.52	144.58	198.97	87.23
2	82.43	144.58	166.25	73.24
3	89.50	144.58	210.75	90.04
4	85.68	144.58	195.13	84.74
5	89.72	144.58	211.89	90.44
6	97.25	144.58	218.73	90.45
平均值 Average	-	-	-	86.02
RSD(%)	-	-	-	7.74

2.6 样品含量结果

不同产地不同部位全缘叶绿绒蒿中总黄酮醇苷的含量测定结果如表6所示。通过公式:总黄酮醇苷含量 = (槲皮素含量 + 山柰素含量 + 异鼠李素含量) × 2.51,计算加入标准品前后样品中总黄酮醇苷的含量。

整无拖尾、分离效果好;流动相甲醇-0.2%甲酸溶液(48:52,V/V);洗脱时间40 min。通过比较3种黄酮醇苷在紫外254 nm和285 nm处的吸收峰峰面

积,发现在 254 nm 下有较强紫外吸收,因此确定 HPLC 检测波长 254 nm。供试品中的黄酮类化合物能在甲醇-25% 盐酸溶液(4:1, V/V)混合溶液作用下被充分水解为黄酮苷元^[24]。为有效提高黄酮醇苷的提取率,选取水浴加热 80 ℃、回流 1 h 的方法,回流时间过长则会导致部分黄酮苷元分解从而降低提取率^[25,26]。综合考虑,最终确定提取方法如下:加入甲醇-25% 盐酸溶液(4:1, V/V)混合溶液使样品水解;80 ℃ 水浴加热回流 1 h。检测条件如下:HPLC 检测波长 254 nm;流动相甲醇-0.2% 甲酸溶液(48:52, V/V);洗脱时间 40 min。

对来自两个产地的全缘叶绿绒蒿植株进行不同部位分别测定,实验结果显示同批植物中花部位的总黄酮醇苷含量明显高于根、茎和叶部位。异鼠李素在全缘叶绿绒蒿花部位中没有检出或检出量极少。山柰素和异鼠李素均未在全缘叶绿绒蒿的根、茎、叶部位检出。由此可初步判断全缘叶绿绒蒿中的总黄酮醇苷主要位于花部位,根、茎和叶部位的总黄酮醇苷含量较少。且对比发现不同产地全缘叶绿绒蒿同部位的 HPLC 谱图形状相近,化学成分相似性高。今后对于全缘叶绿绒蒿花部位入药、其他部位单独入药以及全草入药的治疗效果可做更深入的讨论和研究。该方法操作简便,精密度和稳定性良好,为进一步研究全缘叶绿绒蒿的质量检测和开发利用奠定了基础。

参考文献

- Northwest Institute of Plateau Biology. Tibetan Medicine(藏药志)[M]. Xining: Qinghai People's Press, 1991:466-467.
- Editorial Committee of flora of China, Chinese Academy of Sciences. Flora of China; Vol 32(中国植物志第 32 卷)[M]. Beijing: Science Press, 1999:20.
- Zeng QY, Liu XC, Bai X, et al. Composition of *Meconopsis horridula* Hook. F. & Thomson in SCF-CO₂ extraction[J]. J Guangxi Norm Univ: Nat Sci(广西师范大学学报: 自然科学版), 2015, 33:98-103.
- Ma MF, Ding KY, Ding LS, et al. Chemical constituents of *Meconopsis horridula* Hook. f. et Thoms[J]. West China J Pharm Sci(华西药学期刊), 2009, 24:227-229.
- Wu HM, Yuan RY, Xiao NMDZ, et al. Chemical constituents of *Meconopsis horridula* Hook. f. et Thoms[J]. Pharm Clin Res(药学与临床研究), 2012, 20:314-316.
- Wu HF, Shen JW, Song ZJ, et al. Chemical constituents from *Meconopsis integrifolia*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2009, 21:430-432.
- Wu HF, Song ZJ, Zhu HJ, et al. Chemical constituents from *Meconopsis punicea*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2011, 23:202-207.
- Wang ZW, Wang RQ, Guo M, et al. Study on liver protection of total flavones of *Meconopsis quintuplinervia* from Gansu province in mice[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19:206-209.
- Yuan M, Ren YM, Zhao XH, et al. The protective effect of different fractions extracted from Tibetan medicinal herb *Meconopsis integrifolia* on acute liver injury in mice[J]. J Qinghai Med Coll(青海医学院学报), 2012, 33:160-163.
- Wang ZW, Guo M, Ma J, et al. Study for antiinflammatory and analgesia on effective parts of *Meconopsis quintuplinervia* Regel[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2010, 17:21-22.
- Guo M, Zhang Q, Yan LP, et al. Flavonoids as the main active ingredients of single herbs and compound Chinese medicines and their pharmacological activity[J]. J Shenyang Med Coll(沈阳医学院学报), 2018, 20:558-561.
- Wang YB, Shi Y, Yuan YJ. Ultrasonic assisted extraction of polyphenols and flavonoids from Maijishan wild *Acanthopanax* and their antioxidant activities *in vitro*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31:2153-2162.
- Zhang ML, Peng MJ, Yang QL, et al. Antioxidant properties and correlation with major chemical components in *Ampelopsis grossedentata*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31:387-394.
- Xie Y, Li P, Sui X, et al. Study on optimization of extraction conditions of *Ledum palustre* L. by response surface methodology and its antioxidant activities[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31:475-481.
- Li H, Zhang P, Xing MY, et al. Antioxidant and antibacterial activities of *Aapparis zeylanica* leaf extract[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29:1910-1919.
- Ma P, Guo ZW, Zhang LY, et al. Ultrasonic-microwave synergistic extraction and anti-inflammatory activity of total flavones from Millet bran[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29:1966-1975.
- Zhang YL, Yan Y, Tian XL. The effects of Ca²⁺ and Mg²⁺ on the extraction and antibacterial activity of total flavonoids from sweet potato leaves[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31:2039-2045.
- Zhao B, Xiang XL, Wang W, et al. Preparation of flavonoids from sea buckthorn and its inhibitory effect on human prostate cancer PC-3 cells *in vitro*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30:27-32.