

不同采收期灯盏细辛中灯盏花乙素含量动态积累研究

李俊雅¹, 李君¹, 梁晓² (1.湘潭卫职职业技术学院, 湖南湘潭 411102; 2.南方医科大学, 广东广州 510515)

摘要 [目的]研究灯盏细辛中有效成分灯盏花乙素的积累动态。[方法]采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定灯盏细辛中灯盏花乙素的含量, 色谱柱: 菲罗门 ODS(150 mm×4.6 mm, 4 μm), 流动相: 甲醇-0.1%磷酸水溶液(40:60), 检测波长 335 nm。[结果]样品平均加样回收率为 95.68%, RSD 为 1.55%(n=6)。灯盏细辛药材中灯盏花乙素的含量在不同采收期有明显的变化规律, 而同一采收期不同的药用部位则无明显差异。[结论]该研究为灯盏细辛的规范化种植研究提供科学依据。

关键词 灯盏细辛; 灯盏花乙素; 采收期; 反相高效液相色谱法; 动态积累

中图分类号 S567.23 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)10-0150-02

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.10.046

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Dynamic Accumulation of Scutellarin in Different Harvesting Periods of *Erigeron breviscapus*

LI Jun-ya¹, LI Jun¹, LIANG Xiao² (1.Xiangtan Medicine and Health Vocational College, Xiangtan, Hunan 411102; 2.Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515)

Abstract [Objective] The research aimed to study the dynamic accumulation of scutellarin in different harvest periods of *Erigeron breviscapus*. [Method] RP-HPLC was used to measure the content of scutellarin, chromatographic column ODS(150 mm×4.6 mm, 4 μm), mobile phase methanol-0.1% phosphoric acid solution(40:60), the detection wave-length was 335 nm. [Result] The average recoveries were 95.68%, RSD was 1.55%. The content of scutellarin in *Erigeron breviscapus* varied obviously in different harvesting periods, but there was no significant difference in different parts during the same harvesting period. [Conclusion] This study provides a scientific basis for the standardized planting research of *Erigeron breviscapus*.

Key words *Erigeron breviscapus*; Scutellarin; Harvest periods; RP-HPLC; HPLC; Dynamic accumulation

灯盏细辛, 又名灯盏花, 为菊科植物短葶飞蓬(*Erigeron breviscapus*)的干燥全草, 主要分布于云南、广西、贵州、四川、湖南等省区^[1]。现代医学研究表明灯盏花乙素是灯盏细辛中主要的有效成分, 药理学试验研究也证实灯盏花乙素具有扩张毛细血管的作用, 可改善血液微循环、增加组织血流量、提高机体耐缺氧能力等。临床上常用来治疗缺血性脑血管疾病, 如短暂性脑缺血发作(TIA)、脑血栓、脑栓塞以及中风后遗症等^[2-7]。

随着国家最近3年的“精准扶贫”政策, 广大的西南部山区和农村开展常用中药材种植业已成为不少农民脱贫致富的好途径, 为了更好地开发利用灯盏细辛药材资源, 笔者对不同采收期、不同产地及不同药用部位的灯盏细辛药材中灯盏花乙素动态积累的规律进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器。高效液相色谱仪(Waters600, 美国 Waters 公司); 紫外检测器(Waters468, 美国 Waters 公司); Waters PC800 色谱工作站; 超声波清洗器(YQ-520C, 上海易净超声波仪器有限公司); 电子天平(BS224S, 北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.1.2 试剂。灯盏花乙素(中国食品药品检验研究院, 批号 113530-201809); 甲醇、乙醇、异丙醇、乙腈为色谱纯, 天津四友精细化学品有限公司; 试验研究用其他试剂均为分析纯。

1.1.3 试材。研究用灯盏细辛样品分别采集于云南省开

远市(灯盏细辛 GMP 基地)、广西省全州县、贵州省钟山区等地, 经湖南中医药大学张云飞教授鉴定, 所有样品均为菊科植物灯盏细辛(*Erigeron breviscapus*)的全草。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液的制备。精密称取灯盏花乙素对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液, 摇匀, 即得。

1.2.2 供试品溶液的制备。取本品灯盏细辛干燥粗粉约 0.5 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加氯仿适量, 加热回流至提取液无绿色, 弃去氯仿液, 药渣挥去溶剂, 连同滤纸筒一并移入具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 放置 1 h, 水浴中加热回流 1 h 后放冷, 再次称定其重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 25 mL, 回收溶剂至干, 残渣用甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

1.2.3 色谱条件。色谱柱为菲罗门 ODS(150 mm×4.6 mm, 4 μm); 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(40:60); 流速 1 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 335 nm。

1.2.4 标准曲线的绘制。分别从 0.106 mg/mL 的标准溶液中吸取 5、10、15、20、25 μL 做 HPLC 分析。以峰面积(X)为横坐标、灯盏花乙素对照品含量(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.2.5 精密度考察。取灯盏花乙素对照品溶液, 连续进样 6 次, 测得各次峰面积, 以峰面积计算 RSD 值, 要求 RSD 小于 3%。

1.2.6 稳定性考察。取同一灯盏细辛样品溶液, 分别在 0、1、2、4、6、8、12 h 依次注入高效液相色谱仪进行分析, 测得每个时间点灯盏花乙素的峰面积并计算其 RSD 值, 要求 RSD 小于 3%。

1.2.7 重复性考察。平行称取 5 份灯盏细辛全草粉末各 0.1 g, 按“1.2.2”方法制备供试品溶液, 进行 HPLC 分析, 计算

基金项目 国家中医药公共卫生专项项目(财社[2014]76号)。

作者简介 李俊雅(1983—), 女, 河南许昌人, 讲师, 硕士, 从事中药规范化种植及质量标准研究。

收稿日期 2018-12-27

RSD 值,要求 RSD 值小于 3%。

1.2.8 加样回收率考察。精密称取灯盏细辛全草干燥粉末 5 份,分别加入一定量的灯盏花乙素对照品,按“1.2.2”方法制备供试品溶液,进行 HPLC 分析,测得灯盏花乙素的含量,计算加样回收率和 RSD 值。

1.2.9 样品的含量测定。取不同产地、不同采收期、不同用药部位的灯盏细辛药材,按“1.2.2”方法制备供试品溶液,按照“1.2.4”方法测定其含量。

2 结果与分析

2.1 色谱条件及适应性试验 在“1.2.3”色谱条件下,分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μ L(进样前样品用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤),注入液相色谱仪,测定,即得,分析结果见图 1 和图 2。结果发现,灯盏花乙素与其他成分分离良好,理论板数以灯盏花乙素峰计算不低于 5 000,分离度大于 1.5,符合《中国药典》要求。

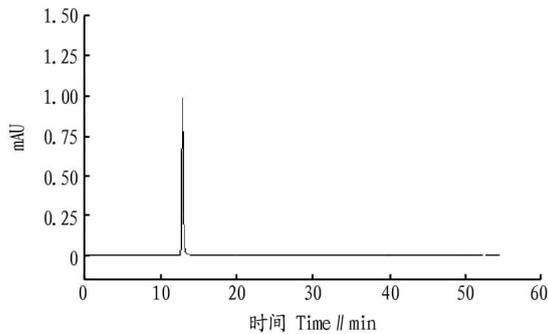


图 1 灯盏花乙素对照品色谱图

Fig.1 Chromatogram of scutellarin reference substance

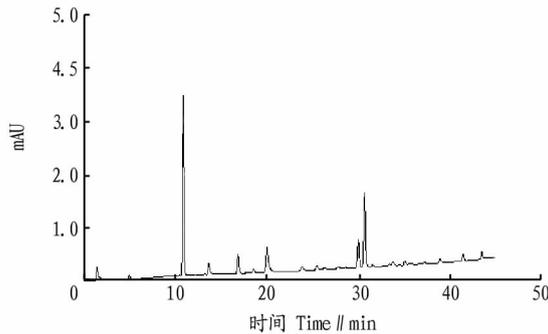


图 2 灯盏细辛样品中灯盏花乙素色谱图

Fig.2 Chromatogram of scutellarin in the sample of *Erigeron breviscapus*

2.2 标准曲线的建立 通过上述色谱方法定量测定灯盏花乙素对照品,以峰面积(X)为横坐标、灯盏花乙素对照品含量(Y)为纵坐标绘制标准曲线,数据经回归处理,得灯盏花乙素的回归方程为 $y = 384\ 310x + 25\ 509$ ($r = 0.999\ 7$),说明灯盏花乙素在 5.01~24.60 μ g 线性良好。

2.3 精密度试验 按照“1.2.5”方法,重复进样 5 次,定量测定含量,计算 RSD 值为 1.51%,表明精密度良好,符合含量测定的要求。

2.4 稳定性试验 按照“1.2.6”方法,测定灯盏花乙素的峰面积,计算供试品的 RSD 值为 2.04%,表明供试品溶液在

12 h 内稳定性良好。

2.5 重复性试验 按照“1.2.7”方法,平行样 6 份,定量测定含量,测得供试品 RSD 值为 2.24%,表明供试品的重现性良好。

2.6 加样回收率试验 由表 1 可知,灯盏细辛药材的加样平均回收率为 95.86%,RSD 为 1.55%,表明该方法回收率较好,方法可行。

2.7 不同产地、不同采收期、不同药用部位灯盏细辛中灯盏花乙素的含量测定 取各地所产灯盏细辛干燥全草样品,按照“1.2.2”方法制备供试品溶液,进行 HPLC 分析,测定含量,结果表明(表 2),不同产地灯盏细辛药材中灯盏花乙素的含量存在一定的差异,云南省开远市的灯盏细辛药材无论是茎、叶还是花中的灯盏花乙素含量都比同一采收期的广西省全州县和贵州省钟山区要高一些;人工种植的灯盏细辛药材中灯盏花乙素的含量明显高于野生品种;不同产地灯盏花乙素的含量呈规律性变化,其中在 6 月中旬—6 月下旬含量较高,随后逐渐下降。

表 1 加样回收率试验结果

Table 1 Sample recovery rate test results

样品含量 Sample content mg	标品加入量 Standard addition amount // mg	测得量 Measured amount mg	回收率 Recovery rate // %	平均回收率 Average recovery rate // %	RSD %
1.258 3	1.2	2.457 9	98.32	95.86	1.55
1.215 7	1.2	2.396 0	95.19		
1.198 9	1.2	2.351 1	96.82		
1.281 5	1.2	2.419 9	94.08		
1.174 3	1.2	2.347 0	95.34		
1.241 8	1.2	2.386 5	95.39		

表 2 不同产地、不同采收期、不同药用部位灯盏细辛中灯盏花乙素的含量测定结果

Table 2 Determination of scutellarin content in different origins, different harvesting periods, and different medicinal parts

产地 Origin	采收时间 Harvesting time	灯盏花乙素含量 Scutellarin content // %		
		茎 Stem	叶 Leaf	花 Flower
云南省开	2018-04-30	1.98	2.04	2.01
远市(种植)	2018-05-15	2.11	2.16	2.13
Kaiyuan City of	2018-05-30	2.13	2.24	2.28
Yunnan Province	2018-06-15	2.21	2.37	2.45
(planting)	2018-06-30	2.07	2.22	2.34
	2018-07-15	1.89	1.92	2.06
广西省全	2018-05-15	0.86	0.93	1.05
州县(野生)	2018-05-30	1.22	1.28	1.34
Quanzhou County	2018-06-15	1.26	1.32	1.37
of Guangxi Prov-	2018-06-30	1.17	1.24	1.31
ince(wild)	2018-07-15	0.92	1.01	1.04
贵州省钟	2018-04-30	1.76	1.78	1.85
山区(种植)	2018-05-15	1.89	1.94	2.01
Zhongshan District	2018-05-30	1.97	2.04	2.11
of Guizhou Prov-	2018-06-15	2.09	2.24	2.28
ince(planting)	2018-06-30	2.01	2.13	2.17
	2018-07-15	1.77	1.84	1.90

温度的变化呈现微弱的波动趋势,吸收率变化的绝对量相差不大,其中在不同的温度条件下乙基麦芽酚和丙二醇吸收率较大,柔扁枝衣酸乙酯次之;薄荷醇的吸收率最低,且远低于前3种特征物质;随着相对湿度的增加,乙基麦芽酚和丙二醇吸收存在一个低吸收拐点,柔扁枝衣酸乙酯的变化情况不一,而薄荷醇存在明显的高吸收拐点,其中不同的相对湿度条件下4种特征物质的吸收率大小顺序类似于不同温度条件下的吸收率。相对湿度对吸收率的影响效果大于温度产生的影响;不同负压条件下的吸收率都大于常压下的吸收率,并存在1个高吸收拐点,其中不同的负压条件下特征物质吸收率大小的排序类似于温湿度下吸收率的大小排序。

参考文献

- [1] SAMEJIMA T, NISHIKATA Y, YANO T. Sorption and desorption phenomena in tobacco. Part III. Moisture permeability of cured tobacco epidermis [J]. *Agricultural and biological chemistry*, 1984, 48(2): 439-443.
- [2] 张大波, 王兵, 孔臻, 等. 一种测定卷烟加料工序料液施加均匀性的方法: CN200910227567.1 [P]. 2010-06-02.
- [3] 刘泽, 何邦华, 邱昌桂, 等. 一种测定片烟料液吸收速率及有效吸收率的方法: CN201210464514.3 [P]. 2013-04-24.

(上接第151页)

3 结论与讨论

经查阅大量文献发现,灯盏花乙素易溶于甲醇,在乙醇或水中微溶。根据这一特性,在样品溶液制备中以甲醇为提取溶剂^[7-10]。试验中曾选用甲醇-水(60:40)、乙腈-水(45:55)、甲醇-醋酸-水(60:1:39)等作为流动相,结果发现分离效果较差,分离度和理论塔板数达不到要求。经过反复多次摸索试验条件,发现采用甲醇-0.1%磷酸水溶液(40:60)为流动相,灯盏花乙素可以与相邻成分达到基线分离,且出峰时间、峰形均良好^[11]。

分别对不同产地、不同采收期、不同药用部位灯盏细辛中灯盏花乙素的含量进行了测定,结果表明,不同产地灯盏细辛药材中灯盏花乙素的含量存在一定的差异,人工种植的灯盏细辛药材中灯盏花乙素的含量明显高于野生品种;同一采收期不同产地的灯盏细辛药材茎、叶、花的含量差别很小,地上部分灯盏花乙素的含量均符合《中华人民共和国药典》之标准^[1];不同产地灯盏花乙素的含量呈规律性变化,其中在6月中旬—6月下旬含量较高,随后逐渐下降,故建议每年

- [4] 郭俊成, 吴达, 程晓蕾, 等. 保润剂对烟草吸湿特性的影响研究[J]. *中国烟草学报*, 2013, 19(4): 22-27.
- [5] 胡永华, 聂基兰, 刘鑫. 柠檬酸在烟草上的吸附性能研究[J]. *南昌大学学报(理科版)*, 2002, 26(2): 121-123.
- [6] 刘鑫, 聂基兰. 烟草对甘油的吸附[J]. *南昌大学学报(理科版)*, 2003, 27(2): 153-155.
- [7] 颜爱国, 聂基兰. 钾离子在烟草叶片上的吸附性能[J]. *南昌大学学报(理科版)*, 2003, 27(1): 73-77.
- [8] 吴长英, 杨志宏, 韩松, 等. 钴在烟草上的吸附性能[J]. *江西科学*, 2005, 23(3): 221-223, 228.
- [9] 张友玉, 陈良碧. 烟草叶片组织结构的扫描电镜观察方法[J]. *电子显微学报*, 2000, 19(2): 154-157.
- [10] 蔡刘体, 蒋光华, 郑少清, 等. 烟草叶片表面腺毛形态的扫描电镜观察[J]. *中国农学通报*, 2008, 24(8): 110-113.
- [11] 过伟民, 张艳玲, 蔡宪杰, 等. 典型烤烟产区初烤烟叶片烟表面细胞形态特征分析[J]. *烟草科技*, 2012(11): 64-68.
- [12] 朱银凤, 郑唐春, 赵学彩, 等. 烟草组织的环境扫描电镜观察[J]. *安徽农业大学学报*, 2012, 39(4): 576-579.
- [13] 韩迎迎, 袁庆钊, 杨飞, 等. 造纸法烟草薄片与天然烟叶片烟表面润湿特性的研究[J]. *林产化学与工业*, 2013, 33(4): 79-82.
- [14] 钱强, 陈洪. 利用真空负压技术设计的加料设备[J]. *云南烟草*, 2004(3): 37-39.
- [15] 胡有持, 牟定荣, 李炎强, 等. 云南烤烟复烤片烟自然陈化时间与质量关系的研究[J]. *中国烟草学报*, 2004, 10(4): 1-7.

6月份为灯盏细辛药材的最佳采收期。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 147-148.
- [2] 朱发彦, 杨芳, 王建军, 等. 灯盏花中黄酮类化合物的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(10): 5853-5857.
- [3] 党翠芝, 黄小燕, 杨庆雄, 等. 灯盏细辛的抗氧化活性研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(17): 100-103.
- [4] 周莉. 灯盏花素的心脑血管药理及临床研究进展[J]. *中医药信息*, 2013, 30(6): 134-136.
- [5] 蔡松泉, 蔡加楼. 灯盏花素、川芎嗪、血塞通联合治疗急性脑梗死的临床效果[J]. *中外医学研究*, 2016, 14(8): 138-140.
- [6] 杨胜利, 杨毅. 灯盏花素氯化钠联合用药治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重临床观察[J]. *湖北中医杂志*, 2018, 40(5): 11-13.
- [7] 张玥, 朱晓冉, 蔡玥, 等. 灯盏花素对动脉粥样硬化大鼠氧化应激和炎症反应的影响[J]. *贵州医科大学学报*, 2017, 42(1): 71-75.
- [8] 侯佳, 邹欣, 李勇军, 等. 超高效液相色谱-三重四级杆质谱同时测定灯盏细辛中10种指标成分的含量[J]. *天然产物研究与开发*, 2016, 28(9): 1397-1401, 1371.
- [9] 孙佳, 郑林, 王爱民, 等. 超高效液相色谱法测定贵州产灯盏细辛中的6种成分[J]. *中国医药工业杂志*, 2013, 44(7): 673-676.
- [10] 梅艳, 冯春, 李俊, 等. HPLC同时测定灯盏细辛合剂中4种有效成分的含量[J]. *中药材*, 2013, 36(4): 665-667.
- [11] 熊魏, 彭红, 廖夫生. HPLC法测定灯盏花素胶囊中野黄芩苷的含量[J]. *广州化工*, 2013, 41(4): 138-139.