

黄毛耳草不同部位香豆素、黄酮质量分数测定及抗氧化活性研究

孙宗森¹,许秀萍¹,金贤武²

(1. 潍坊市中医院,山东 潍坊 261041; 2. 上饶市检验检测认证院 药品检测分院,江西 上饶 334000)

摘要:基于高效液相色谱法和1,1-二苯基-2-三硝基苯肼、2,2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐、铁离子还原/抗氧化能力法,用于同时测定黄毛耳草不同部位中东茛菪内酯、芦丁、山奈酚-3-O-芸香糖苷及总香豆素、总黄酮质量分数,并评价不同部位的抗氧化活性。结果表明,黄毛耳草不同部位中东茛菪内酯、芦丁、山奈酚-3-O-芸香糖苷3个成分及总香豆素、总黄酮的质量分数在叶部最高,全草中次之,茎中最低;抗氧化能力为叶>全草>茎。方法简便易行,结果准确且重复性好,适用于黄毛耳草不同部位的成分定量分析及药理活性评价。

关键词:黄毛耳草;茎;叶;总香豆素;总黄酮;抗氧化

中图分类号:R284.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-8513(2025)02-0128-05

黄毛耳草是茜草科耳草属植物金毛耳草(*Hedyotis chrysotricha*(Palib.) Merr.)的全草,别名敷地两耳草、节节花等,在我国江西、浙江、江苏、广东、广西等地广泛分布^[1]。该药材通常采收于夏或秋季,洗净,鲜用或晒干后全草入药。毛耳草味辛、苦,性平,具有保肝利胆、清热利尿、抗炎解热等作用^[2],临床上常用于湿热黄疸、暑热泻痢、外伤出血、肾炎、肠炎、肿瘤的治疗^[3],也是肠炎宁片、伤湿丸等中成药的主要成分^[4-5]。研究^[6]显示,黄毛耳草具有抗衰老、抗炎、抗菌、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤等多种活性,含有黄酮、香豆素、三萜、生物碱、甾醇等类化合物^[7],其中芦丁、山奈酚-3-O-芸香糖苷等黄酮类化合物是发挥上述药理活性的功能成分^[8],东茛菪内酯香豆素类成分具有显著的抗肿瘤、抗氧化、抗炎等作用^[9-10]。

中药不同部位中的化学成分的种类和质量分数往往存在明显差异。黄毛耳草作为全草入药中药,具体主要药效部位研究还未见报道。因此,有必要对黄毛耳草不同部位的化学成分质量分数及药理活性进行研究。本文采用紫外分光光度法,对黄毛耳草不同部位进行总香豆素和总黄酮的质量分数进行测定;采用高效液相色谱法对其不同部位中东茛菪内酯、芦丁、山奈酚-3-O-芸香糖苷3个成分的质量分数进行测定和比较研究;采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、铁离子还原/抗氧化能力法(FRAP)研究其不同部位的抗氧化活性。通过上述研究初步阐明黄毛耳草不同部位之间的成分和药效差异,为黄毛耳草的资源利用和质量评价提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

高效液相色谱仪(Waters 2695,美国沃特斯公司);万分之一电子天平(AB204-N,瑞士梅特勒仪器有限公司产品);超纯水仪(ULUP-I-5/10/20T,四川优浦达科技有限公司);高频超声波仪(UC-8000,深圳市朗杰超声电器有限公司)。

收稿日期:2024-02-21。

基金项目:江西省卫健委中医药科技课题(SZYYB20225082)。

作者简介:孙宗森(1970-),男,硕士,副主任药师。主要从事中药质量控制方向研究。

通信作者:金贤武(1977-),男,硕士,副主任药师。主要从事食品药品质量控制研究。

1.2 试剂

DPPH、ABTS和2,4,6-三吡啶基-1,3,5-三嗪(TPTZ)购自成都普思生物科技股份有限公司,维生素C(VC)购自广东光华科技股份有限公司,磷酸、乙腈为色谱纯购自ThermoFisher公司。

1.3 分析样品

东莨菪内酯对照品(批号92-61-8,成都曼思特生物科技有限公司);芦丁(批号111081-201208,中国食品药品检定研究院);山奈酚-3-O-芸香糖苷(批号112007-201909,中国食品药品检定研究院)。黄毛耳草全草购自国济堂大药房,批号分别为220916(产地江西)、230518(产地浙江)、230625(产地安徽)。

2 方法与结果

2.1 有效成分的质量分数测定

2.1.1 色谱条件

以Agilent TC-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)为色谱柱;以乙腈-体积分数为0.1%磷酸水溶液为流动相,梯度洗脱,洗脱程序为:0~8 min,体积分数为20%→25%乙腈;8~20 min,体积分数为25%→28%乙腈;流速1.0 mL/min,检测波长325 nm;进样量10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备

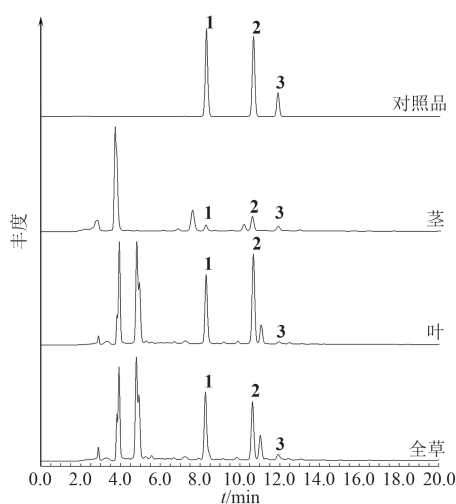
分别称取适量的东莨菪内酯、芦丁、山奈酚-3-O-芸香糖苷对照品,置于10.0 mL棕色量瓶中。加入体积分数为70%乙醇定容至刻度,摇匀,制得质量浓度分别为132.0、105.0和12.8 μg/mL的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备

取干燥粉碎后的黄毛耳草茎、叶及全草样品各1.0 g,置于100 mL锥形瓶中。加入50.0 mL的体积分数为70%乙醇溶液,称重。采用超声提取法提取45 min,冷却后再次称重,用该乙醇溶液补足减失的重量,过滤,得相应的供试品溶液。

2.1.4 专属性试验

取上述对照品和供试品溶液各10 μL,按照“2.1.1”项下的液相方法进行测定分析。结果发现,对照品和供试品溶液中3个被测成分与相邻峰能够完全分离,HPLC色谱见图1。



1. 东莨菪内酯;2. 芦丁;3. 山奈酚-3-O-芸香糖苷

图1 专属性高效液相色谱图

2.1.5 线性关系的考察

精密吸取“2.1.2”项下的对照品溶液0.20、0.50、1.00、2.50、5.00和10.00 mL,分别置于10 mL容量瓶中,加甲醇至刻度,滤过,取续滤液,进样分析测定峰面积。以峰面积Y对质量浓度X进行线性回归,得到回归方程、相关系数及线性范围,见表1。

表 1 3 个被测成分的线性关系考察结果

测定成分	回归方程	R^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
东莨菪内酯	$Y = 139.97X - 3515.5$	0.999 7	2.6 ~ 132.0
芦丁	$Y = 176.59X - 3295.6$	0.999 6	2.1 ~ 105.0
山奈酚-3-O-芸香糖苷	$Y = 147.55X - 585.2$	0.999 2	0.3 ~ 12.8

2.1.6 精密度试验

取“2.1.2”项下混合对照品溶液,连续进样6次测定,记录峰面积并计算相对标准偏差(RSD).结果发现,东莨菪内酯、芦丁、山奈酚-3-O-芸香糖苷的峰面积RSD分别为1.02%、0.76%和1.25%.

2.1.7 稳定性试验

取批号220916黄毛耳草茎样品,制备成供试品后分别于0、2、4、6、12和24 h进样分析,记录色谱图的峰面积.结果表明,东莨菪内酯、芦丁、山奈酚-3-O-芸香糖苷的峰面积RSD分别为0.87%、1.80%和1.61%.

2.1.8 重复性试验

取批号220916黄毛耳草茎样品,按“2.1.3”项下的方法平行制备6份供试品溶液,进样分析,记录色谱图的峰面积.结果表明,东莨菪内酯、芦丁和山奈酚-3-O-芸香糖苷的峰面积RSD分别为1.21%、1.95%和1.58%.

2.1.9 加样回收率试验

取批号220916黄毛耳草茎6份,每份约0.5 g.按质量比为1:1的比例加入各对照品,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下液相方法进样分析测定,计算各成分回收率及其RSD,结果见表2.

表 2 加样回收率试验结果

成分	取样量/g	已知量/mg	加入量/mg	测定量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
东莨菪内酯	0.503 2	0.065 4	0.065 2	0.129 5	98.31	98.49	2.01
	0.501 6	0.065 2	0.065 2	0.130 2	99.69		
	0.503 6	0.065 5	0.065 2	0.131 7	101.53		
	0.505 4	0.065 7	0.065 2	0.128 4	96.17		
	0.502 4	0.065 3	0.065 2	0.129 6	98.62		
	0.501 2	0.065 2	0.065 2	0.128 2	96.63		
芦丁	0.503 2	0.130 8	0.132 4	0.262 8	99.70	101.42	1.70
	0.501 6	0.130 4	0.132 4	0.265 2	101.81		
	0.503 6	0.130 9	0.132 4	0.267 1	102.87		
	0.505 4	0.131 4	0.132 4	0.262 6	99.09		
	0.502 4	0.130 6	0.132 4	0.267 6	103.47		
	0.501 2	0.130 3	0.132 4	0.264 8	101.59		
山奈酚-3-O-芸香糖苷	0.503 2	0.070 4	0.069 6	0.138 4	97.70	97.67	1.77
	0.501 6	0.070 2	0.069 6	0.136 6	95.40		
	0.503 6	0.070 5	0.069 6	0.139 4	98.99		
	0.505 4	0.070 8	0.069 6	0.137 8	96.26		
	0.502 4	0.070 3	0.069 6	0.138 2	97.56		
	0.501 2	0.070 2	0.069 6	0.139 9	100.14		

2.1.10 质量分数的测定

取不同批次黄毛耳草的茎、叶及全草各1.0 g,每个样品平行3份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液并测定质量分数,结果见表3.

表 3 黄毛耳草不同部位3个成分的质量分数测定结果

批号	部位	质量分数/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$				
		东莨菪内酯	芦丁	山奈酚-3-O-芸香糖苷	总香豆素	总黄酮
220916	茎	0.13	0.26	0.14	2.47	10.28
	叶	3.41	3.54	0.16	12.25	96.63

续表3

批号	部位	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
		东莨菪内酯	芦丁	山奈酚-3-O-芸香糖苷	总香豆素	总黄酮
230518	全草	1.72	1.15	0.15	9.76	65.94
	茎	0.24	0.41	0.21	4.02	16.38
	叶	4.39	3.05	0.24	17.49	125.81
230625	全草	2.36	1.42	0.23	11.83	81.52
	茎	0.19	0.28	0.16	2.75	18.51
	叶	5.82	2.39	0.19	14.82	106.83
	全草	2.83	0.96	0.17	10.16	74.93

2.2 总香豆素、总黄酮的质量分数测定

2.2.1 供试品溶液的制备

取干燥粉碎后的黄毛耳草茎、叶及全草样品各1.0 g,置于100 mL锥形瓶中,加入体积分数为70%的乙醇溶液50.0 mL,称重。超声提取45 min,冷却后称重,用该乙醇溶液补足减失量,过滤,得相应的供试品溶液。

2.2.2 总香豆素的质量分数测定

参照赵懿瑶等^[11]方法并改进,取10 mL的容量瓶6个,依次精密量取东莨菪内酯对照品溶液0.10、0.50、1.00、2.00、3.00和4.00 mL,加入体积分数70%的乙醇溶解,定容至刻度,摇匀。在348 nm波长处测定吸光度值,得到线性回归方程 $Y = 0.0059X - 0.0091$, $R^2 = 0.9986$,质量浓度范围为3.36~134.4 μg/mL。取不同产地和批次的黄毛耳草茎、叶及全草供试品溶液各2 mL,置于10 mL的容量瓶,用上述乙醇溶液定容至刻度后,在348 nm处测定吸光度,以体积分数为70%乙醇为空白对照,计算总香豆素质量分数,结果见表3。

2.2.3 总黄酮的质量分数测定

参照王立抗等^[12]的方法并改进,精密吸取芦丁标准品溶液0.5、1.0、2.0、3.0、4.0和5.0 mL,分别置于10 mL容量瓶中。加入0.4 mL体积分数5%亚硝酸钠溶液,摇匀,静置6 min后再加入0.4 mL体积分数10%的硝酸铝溶液,摇匀,静置6 min。再加入4.0 mL体积分数1.0 mol/L氢氧化钠溶液,最后加入蒸馏水定容至刻度,放置10 min。以体积分数70%乙醇作为空白背景,于510 nm波长处测定其吸光度,得到线性回归方程 $Y = 0.0064X + 0.0037$, $R^2 = 0.9991$,质量浓度范围为12.6~126.0 μg/mL。分别精密吸取不同产地和批次的黄毛耳草茎供试品溶液5.0 mL,叶和全草供试品溶液0.5 mL,按前述方法进行操作测定,计算总黄酮质量分数,结果见表3。

2.3 抗氧化活性测定

2.3.1 对DPPH自由基清除能力的测定

参照文献[13]的方法,在96孔板中依次加入质量浓度为0.4 mg/mL的DPPH工作液100 μL和不同质量浓度(0.125、0.25、0.5、1.0、2.0和4.0 mg/mL)的待测液100 μL,混匀,室温静置30 min。空白组用体积分数为70%的乙醇代替待测液,对照组用体积分数为70%的乙醇代替DPPH溶液。均在517 nm波长处测定吸光度,分别对应记为 $A_{\text{样}}$ 、 $A_{\text{空}}$ 、 $A_{\text{对}}$ 。以VC为阳性对照。每个试验重复3组,DPPH自由基清除率(I_{DPPH})计算见公式(1)。

$$I_{\text{DPPH}} = (1 - (A_{\text{样}} - A_{\text{对}})/A_{\text{空}}) \times 100\% \quad (1)$$

2.3.2 对ABTS自由基清除能力的测定

参照文献[13]的方法配制ABTS工作液,在96孔板中依次加入ABTS工作液200 μL和质量浓度为0.125、0.25、0.5、1.0、2.0和4.0 mg/mL的待测液10 μL。空白组用体积分数70%的乙醇代替待测液,对照组用该乙醇溶液代替ABTS工作液。均在30℃下反应20 min,于734 nm波长处测定吸光度,分别对应记为 A_i 、 A_c 、 A_j 。以VC为阳性对照,每个试验重复3组,ABTS自由基清除率(I_{ABTS})计算见公式(2)。

$$I_{\text{ABTS}} = (1 - (A_i - A_j)/A_c) \times 100\% \quad (2)$$

2.3.3 FRAP法总抗氧化能力的测定

参照文献[14]的方法制备FRAP工作液,避光保存,备用。在96孔板中依次加入质量浓度为0.125、0.25、0.5、1.0、2.0和4.0 mg/mL的样品溶液20 μL与FRAP工作液180 μL,空白对照组为体积分数为70%的乙醇20 μL与FRAP工作液180 μL混合,于37℃静置10 min后,在593 nm波长处测定其吸光度,分别记为

A_m 和 A_n . 以VC为阳性对照,每个试验重复3组,总抗氧化能力(R)计算见公式(3).

$$R = (1 - A_n/A_m) \times 100\% \quad (3)$$

2.3.4 抗氧化试验结果

黄毛耳草不同部位提取物对DPPH自由基的清除率、ABTS自由基清除率及总抗氧化能力结果如图2所示. 结果显示,在质量浓度为0.125~4.0 mg/mL范围内,黄毛耳草不同部位提取物对DPPH自由基、ABTS自由基均有不同程度的清除效果,其清除能力和总抗氧化能力均随着质量浓度的升高而增加,不同部位提取物清除率依次为叶>全草>茎.

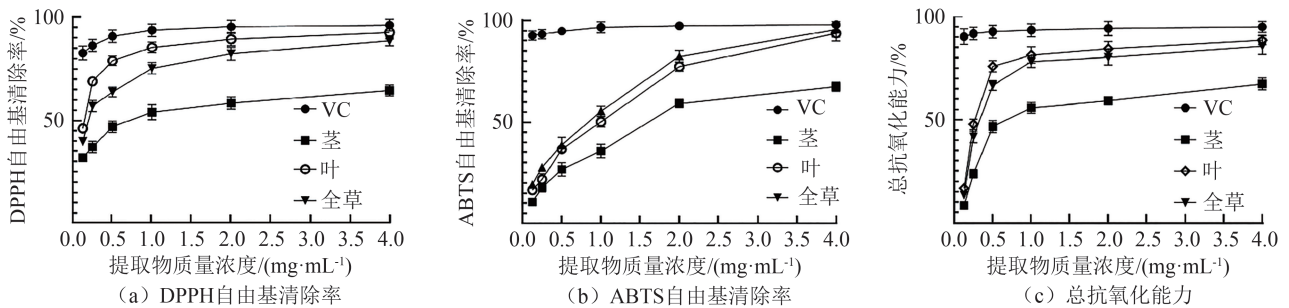


图2 黄毛耳草不同部位提取液的抗氧化能力结果

3 结语

基于UV和HPLC技术,对黄毛耳草茎、叶和全草提取物有效成分的质量分数进行分析研究. 结果显示,黄毛耳草茎、叶和全草提取物中总香豆素、总黄酮及东莨菪内酯、芦丁、山奈酚-3-O-芸香糖苷质量分数存在差异,其中叶部最高,茎部最低,表明黄毛耳草发挥药效的主要成分可能主要来源于叶部. 通过ABTS法、DPPH法和FRAP法对其抗氧化活性进行了研究,结果显示黄毛耳草茎、叶及全草均有显著的抗氧化活性,其抗氧化能力为叶>全草>茎,与总香豆素、总黄酮质量分数及东莨菪内酯、芦丁、山奈酚-3-O-芸香糖苷质量分数呈正相关. 因此,后续应对黄毛耳草不同部位的有效成分和药效机制进行深入研究,为黄毛耳草的资源开发和评价提供依据.

参考文献:

- [1] 袁青梅,张发广,王兴,等. 我国耳草属植物的种类与分布[J]. 云南大学学报(自然科学版),2004,26(S1):166-170.
- [2] 马明娟,罗永明,杨美华. 黄毛耳草的研究进展[J]. 中国药业,2011,20(24):21-24.
- [3] 尹智军. 黄毛耳草中三萜的提取纯化及其活性的研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2017.
- [4] 金辉辉,钱正,姚建标,等. 基于多成分测定及特征图谱评价不同批次肠炎宁片质量[J]. 药物分析杂志,2020,40(12):2174-2185.
- [5] 高敏,杨明芳. 伤湿丸质量标准的研究[J]. 海峡药学,2014,26(6):27-29.
- [6] 南京中医药大学. 中药大辞典(下册):第2版[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:2870.
- [7] 杨希楠,马培舰. 金毛耳草的化学成分研究[J]. 中药材,2020,43(9):2176-2180.
- [8] 杨务彬,等. 兔儿伞总黄酮提取工艺的优化及体外活性研究[J]. 云南民族大学学报(自然科学版),2024,33(6):692-698.
- [9] 褚子璇,卢敏,熊山,等. 东莨菪内酯的药理活性及药代动力学研究进展[J]. 化学研究,2019,30(4):434-440.
- [10] 刘宏浩,杨世高,汪维云. 黄毛耳草总黄酮提取与纯化工艺的研究[J]. 安徽农业大学学报,2009,36(2):326-329.
- [11] 赵懿瑶,林圣喜,孙琦,等. 万年蒿活性部位中总香豆素和3种化合物的含量测定[J]. 延边大学医学学报,2021,44(1):22-25.
- [12] 林继辉,陈琳榕,冯庆玲,等. 沙棘果总黄酮提取工艺及抗氧化性研究[J]. 云南民族大学学报(自然科学版),2024,33(2):178-185.
- [13] XU Y Q, ZOU C, GAO Y, et al. Effect of the type of brewing water on the chemical composition, sensory quality and antioxidant capacity of Chinese teas[J]. Food Chemistry,2017,236:142-151.
- [14] 马海会,邢嘉倩,吴永娜,等. 连翘绿茶不同加工阶段提取物的抑菌及抗氧化活性分析[J]. 山西农业科学,2023,51(11):1339-1346.