

### 3 讨论

3.1 测定波长的选择 曾采用 Agilent 紫外分光光度计对芦丁、金丝桃苷、槲皮素和山柰素对照品溶液分别进行扫描, 4 者在 254 nm 和 360 nm 下均有较大吸收, 但是用 DAD 检测器对供试品测定时发现, 供试品溶液在 254 nm 下基线不稳, 且干扰较多, 故选择 360 nm 作为测定波长<sup>[6]</sup>。

3.2 之前笔者曾采用等度洗脱系统对刺玫果中芦丁和金丝桃苷进行定量测定, 本试验在此基础上采用梯度洗脱系统对黄酮类成分进行测定, 为更好的评价刺玫果药材的质量。

3.3 文献报道, 刺玫果总黄酮能降低脑血管阻力, 增加冠脉血流量, 提高小鼠耐缺氧能力<sup>[7-8]</sup>, 且我国东北野生资源丰富, 本试验选择黄酮类成分进行测定, 为刺玫果资源的客观评价提供依据<sup>[9-10]</sup>。

3.4 中药化学成分多样且复杂, 在指标选择方面, 应开展质量标示性指标与内在质量性指标相结合的方法研究, 即应选择多指标质量控制的方法。实现对中药多指标成分的控制, 也有助于说明药物的药用物质基础, 使中药新药研究逐渐明确其所含化学成分并控制其量和稳定性。这与现阶段新法规<sup>[11-13]</sup>对中药新药研究的要求是一致的, 在中药质量标准中尤其是新药质量标准中, 应努力向建立多指标定量测定的方向发展, 尽可能实现对多种不同工艺、多种指标成分的定量测定控制, 多方面控制产品质量, 提高现代中药制剂的质量控制水平。

### 参考文献:

[1] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评”法中药质量评价模

式方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23):1925-1928.

[2] 王跃生. 中药质量标准现代化发展现状与思考[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(12):1108-1110.

[3] 俞作仁, 王文莉, 吕娟涛. 刺玫果化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2002, 33(2):188-190.

[4] 中国药典[S]. 一部. 2010:30.

[5] 李化, 杨滨. RP-HPLC 法测定山楂中黄酮类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(7):881-884.

[6] 卫星星, 王转花. 高效液相色谱法测定苦荞籽壳中芦丁和槲皮素的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(12):1909-1910.

[7] 张远. 刺玫果提取物对心血管系统的作用[J]. 中草药, 1985, 16(1):20-24.

[8] 韩慧民. 刺玫果总黄酮对心血管系统的药理作用[J]. 中草药, 1987, 18(1):23-25.

[9] 刘中申, 苑春升. 刺玫果的初步研究[J]. 中医药信息, 1995, (1):26-28.

[10] 陈英智, 李立新. 刺玫果[J]. 特种经济动植物, 2001, (9):26.

[11] 国家食品药品监督管理局. 关于实施《药品注册管理办法》有关事宜的通知. 国食药监注[2007]596号[S]. 2007-09-26.

[12] 国家食品药品监督管理局. 关于印发中药注册管理补充规定的通知. 国食药监注[2008]3号[S]. 2008-01-07.

[13] 国家食品药品监督管理局. 关于印发中药、天然药物注射剂基本技术要求的通知. 国食药监注[2007]743号[S]. 2007-12-06.

## RP-HPLC 法测定皱叶凤毛菊中 3 种有效成分

王 欢, 吉守祥, 贾丽红, 卢永昌\*

(青海民族大学化学与生命科学学院 青海 西宁 810007)

摘要:目的 建立 RP-HPLC 同时测定皱叶凤毛菊中芦丁、木犀草素、异鼠李素。方法 采用 Eclipse XOB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相以甲醇和水(含 0.04% 磷酸)梯度洗脱;检测波长为 360 nm;柱温 30 ℃。结果 芦丁、木犀草素、异鼠李素分别在 0.465 ~ 6.30 μg ( $r = 0.9999$ )、0.345 ~ 3.30 μg ( $r = 0.9997$ ) 和 0.315 ~ 3.75 μg ( $r = 0.9999$ ) 范围内呈良好线性关系;平均回收率分别为 102.39% (RSD 为 2.74%,  $n = 5$ )、100.95% (RSD 为 3.01%,  $n = 5$ ) 和 99.88% (RSD 为 2.22%,  $n = 5$ )。结论 方法测定快速、简便、结果准确、重复性好, 3 种有效成分可作为皱叶凤毛菊的质量控制标准。

关键词:反相高效液相色谱;皱叶凤毛菊;芦丁;木犀草素;异鼠李素

中图分类号:R 284.1

文献标志码:B

文章编号:1001-4528(2011)04-0712-03

收稿日期:2010-08-02

基金项目:青海省科技厅项目(2008-5-28)

作者简介:王 欢(1982-),女,硕士生,研究方向:药物分析。Tel:(0971)8802646

\* 通信作者:卢永昌(1965-),男,教授。Tel:(0971)8800379

皱叶凤毛菊 *Saussurea malitiosa* Maxim. 为菊科植物,生于灌丛中、砂质山坡,海拔 3 000~4 300 m<sup>[1]</sup>,为藏医常用草药。皱叶凤毛菊味苦,性凉,无毒,具有止血清热等功效<sup>[2]</sup>,治疗疮伤流血、解肉食中毒、清脉热、血热。全草入药治中毒性热症及骨折、风湿性筋骨痛<sup>[3]</sup>。芦丁能维持毛细血管抵抗力、降低其通透性及脆性,还有抗炎、利尿、抗过敏、降血脂等作用,是医药工业中制备羟乙芦丁、芦丁片、曲克芦丁等药的主要原料<sup>[4]</sup>;木犀草素具有清热、解毒、消炎的作用,是用于治疗炎症疾病的有效成分<sup>[5-6]</sup>,国内外主要集中在对人体黑素瘤细胞的保护作用、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肝细胞生长因子等方面<sup>[7-9]</sup>进行开发研究。异鼠李素具有抗癌、抗心肌缺血缺氧、抗心律失常、降胆固醇、止咳祛痰、消食化滞、活血散瘀、抑制心肌细胞凋亡<sup>[10-12]</sup>等作用,主要治疗咳嗽痰多、消化不良、食积腹痛、瘀血经闭等疾病。本试验利用 HPLC 测定了皱叶凤毛菊中 3 种有效成分,旨在为合理利用和开发这一植物的药理活性提供科学的理论依据。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

Agilent1200 高效液相色谱系统 (Agilent 公司)、Eclipse XOB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm 5 μm) 色谱柱、KQ3200 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)、电子天平 (赛多利斯 ME215S)。

芦丁 (10080-200306)、木犀草素 (111520-200201)、异鼠李素 (110860-200406) 均购自中国药品生物制品检定所;甲醇 (色谱纯,山东禹王实业有限公司禹城化工厂);水 (娃哈哈纯净水,杭州娃哈哈百立食品有限公司);磷酸为 AR 级 (北京红星化工厂)。

皱叶凤毛菊于 2008 年 8 月采于青海省互助北山林场,由中国科学院西北高原生物研究所孙洪发研究员鉴定,样品阴干后,冷藏保存。

### 1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件 色谱柱: Eclipse XOB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm 5 μm); 流动相: 甲醇和水 (含 0.04% 磷酸) 以 0~12 min 44%~44% 甲醇, 体积流量为 1 mL/min; 20~25 min, 56%~66% 甲醇, 体积流量 0.5 mL/min 的梯度洗脱; 检测波长为 360 nm; 柱温: 30 ℃。该色谱条件下芦丁、木犀草素、异鼠李素 3 种成分均被洗脱且达到基线分离, 见图 1。

1.2.2 对照品溶液的配制 分别精密称取适量的芦丁、木犀草素、异鼠李素对照品, 用甲醇溶解, 于 5 mL 的量瓶中定容, 摇匀作对照品溶液备用。

1.2.3 供试品溶液 精密称取皱叶凤毛菊样品 2.0 g, 加入甲醇 10 mL, 超声提取 35 min, 过滤, 用滤渣重复上述操作 2 次, 将 3 次提取的滤液合并, 定容于 50 mL 量瓶中。过 0.45 μm 滤膜, 将滤液作为供试品溶液备用。

1.2.4 线性关系考察 分别精密量取适量 3 种对照品贮备液混合, 得混合对照品标液。并吸取 10 μL 进样, 按上述色谱条件进行测定, 各组分进样量 (μg) 与峰面积 A 进行线性回归, 结果见表 1。

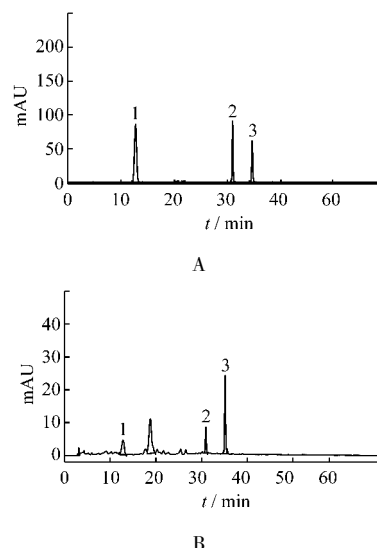


图 1 3 种对照品 (A) 和 皱叶凤毛菊提取物 (B) 色谱图

1. 芦丁 2. 木犀草素 3. 异鼠李素

表 1 3 种主要成分的线性方程及线性范围

| 活性成分 | 线性回归方程                | 线性范围/μg      | 相关系数    |
|------|-----------------------|--------------|---------|
| 芦丁   | $Y = 92.26X - 8.532$  | 0.465 ~ 6.30 | 0.999 9 |
| 木犀草素 | $Y = 698.1X - 76.834$ | 0.345 ~ 3.30 | 0.999 7 |
| 异鼠李素 | $Y = 352.04X - 1.08$  | 0.315 ~ 3.75 | 0.999 9 |

1.2.5 检测限 在以上色谱条件下, 当信噪比  $S/N = 3$  时, 测定各组分, 测得芦丁、木犀草素、异鼠李素的最低检测限分别为 0.23、0.36 和 0.32 ng。

1.2.6 精密度试验 取上述混合对照品溶液 10 μL 进样, 重复进样 5 次, 记录色谱峰的峰面积, 得 3 种活性成分的峰面积 RSD 分别为 0.92%、0.86% 和 1.1% ( $n = 5$ ), 表明仪器精密度良好。

1.2.7 稳定性试验 取上述的供试品溶液, 在选定的色谱条件下, 连续 3 d 进样, 记录芦丁、木犀草素、异鼠李素的峰面积, 得峰面积 RSD 分别为 1.5%、1.1% 和 1.8% ( $n = 3$ ), 表明供试品溶液在 3 d 内稳定。

1.2.8 重复性试验 精密称取测试样品粉末 5 份, 按 1.2.3 项下的方法, 制备成供试品溶液。按 1.2.1 项下的色谱条件, 进样并记录峰面积, 计算各组分的量, 得芦丁、木犀草素、异鼠李素的质量分数 RSD 分别为 0.98%、0.95% 和 1.56% ( $n = 5$ )。

1.2.9 回收率试验 称取已知量的皱叶凤毛菊 5 份, 各约 2.0 g, 分别加入一定量的混合对照品溶液, 制备成供试品溶液 (同 1.2.3 项), 按上述的色谱条件进行测定, 芦丁、木犀草素、异鼠李素的平均回收率, 见表 2。

1.2.10 样品测定 精密称取测试样品约 2.0 g, 制备样品溶液 (同 1.2.3 项), 在选定的色谱条件下进样, 经 DAD 检测器检测上述 3 种待测组分的峰纯度且其紫外光谱与对照品一致后, 按外标法以峰面积积分值计算, 结果见表 3。

## 2 讨论

2.1 检测波长的确定 将芦丁、木犀草素和异鼠李素对

照品溶液经 DAD 检测器在紫外区域进行检测,结果发现在 254 nm、274 nm、320 nm 及 360 nm 均有吸收。而在 360 nm 处其他组分吸收较少,3 种成分紫外吸收良好,有利于测定,故选择 360 nm 作为其检测波长。

2.2 提取方法确定 通过试验,分别测试了甲醇、乙醇回流提取和甲醇、乙醇超声提取等条件下的提取率,结果证明用甲醇超声提取时提取率较高。

2.3 流动相的选择 在筛选黄酮苷类活性成分测定的色

谱条件过程中,由于 3 种成分很难达到基线分离,曾尝试过用不同比例的甲醇和水及乙腈和水作为的流动相,由于乙腈成本较高,故选用甲醇和水作为流动相,最终发现甲醇-水(0.04% 磷酸)为 0~12 min 44%~44% 甲醇,体积流量为 1 mL/min;20~25 min 56%~66% 甲醇,体积流量 0.5 mL/min 的梯度时,3 种活性成分均被洗脱且达到基线分离。在色谱图中出现了前面峰宽,后面峰窄的现象,可能是由于流动相中溶剂的比例不同而导致。

表 2 回收率试验结果 (n=5)

| 化合物  | 称样量/g   | 原有量/mg   | 加标量/mg | 测得总量/mg  | 回收率/%  | 平均回收率/% | RSD/% |
|------|---------|----------|--------|----------|--------|---------|-------|
| 芦丁   | 2.000 8 | 15.806 3 | 8.36   | 24.035 6 | 98.44  | 102.39  | 2.74  |
|      | 2.007 8 | 15.861 6 | 8.45   | 24.564 7 | 103.00 |         |       |
|      | 2.005 6 | 15.844 2 | 8.21   | 24.461 2 | 104.96 |         |       |
|      | 2.008 9 | 15.870 3 | 8.09   | 24.352 3 | 104.85 |         |       |
|      | 2.002 1 | 15.816 6 | 8.32   | 24.196 3 | 100.72 |         |       |
| 木犀草素 | 2.000 8 | 3.801 5  | 2.04   | 5.890 4  | 102.40 | 100.95  | 3.01  |
|      | 2.007 8 | 3.814 8  | 2.56   | 6.340 7  | 98.67  |         |       |
|      | 2.005 6 | 3.810 6  | 2.37   | 6.104 9  | 96.80  |         |       |
|      | 2.008 9 | 3.816 9  | 2.48   | 6.385 3  | 103.56 |         |       |
|      | 2.002 1 | 3.804 0  | 2.12   | 6.004 5  | 103.33 |         |       |
| 异鼠李素 | 2.000 8 | 7.403 0  | 4.05   | 11.408 5 | 98.90  | 99.88   | 2.22  |
|      | 2.007 8 | 7.428 9  | 4.21   | 11.710 6 | 101.70 |         |       |
|      | 2.005 6 | 7.420 7  | 4.15   | 11.683 4 | 102.72 |         |       |
|      | 2.008 9 | 7.432 9  | 4.18   | 11.506 7 | 97.46  |         |       |
|      | 2.002 1 | 7.407 8  | 4.57   | 11.914 3 | 98.61  |         |       |

表 3 皱叶凤毛菊 3 种主要成分测定结果 (n=5)

| 样品    | 芦丁<br>/% | RSD<br>/% | 木犀草素<br>/% | RSD<br>/% | 异鼠李素<br>/% | RSD<br>/% |
|-------|----------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|
| 皱叶凤毛菊 | 0.79     | 2.05      | 0.19       | 1.12      | 0.37       | 0.98      |

2.4 从测定结果看 皱叶凤毛菊中 3 种黄酮成分的质量分数较高,可作为皱叶凤毛菊药材质量控制检测的成分。

参考文献:

[1] 中国科学院西北高原生物研究所. 青海植物志(第 3 卷)[M]. 西宁:青海人民出版社,1996.  
[2] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社,1996:198.  
[3] 中国科学院西北高原生物研究所. 青海经济植物志[M]. 西宁:青海人民出版社,1987:646.  
[4] 尹礼国,魏琴,吴同,等. 苦丁茶叶中生物类黄酮及芦丁含量的测定[J]. 食品研究与开发,2009,30(1):109-111.  
[5] 王丹. 药用植物野菊花的研究现状及发展前景[J]. 现代中

药研究与实践,2007,21(4):59.  
[6] 张健,李友宾,钱大玮,等. 菊花化学成分及药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药,2006,17(10):1941.  
[7] 任鹏. 木犀草素抑制肝癌 SMMC7721 细胞增殖的研究[J]. 生物技术通讯,2007,18(5):798-799.  
[8] 闫庆峰,杨达宽,黄云超,等. 木犀草素对高脂血症大鼠血脂的影响[J]. 昆明医学院学报,2007,(1):23-26.  
[9] 张芳芳,沈汉明,朱心强,等. 木犀草素抗肿瘤作用的研究进展[J]. 浙江大学学报,2006,35(5):573-578.  
[10] 朱玲,王正荣,周黎明. 异鼠李素对肺癌的作用及其抗肿瘤机制的初步探讨[J]. 航天医学与医学工程,2005,18(5):381-383.  
[11] 王正荣,王玲,尹华虎,等. 沙棘总黄酮对牵张所致心肌细胞的收缩力学和钙离子转运的影响[J]. 航天医学与医学工程,2000,13(1):6-9.  
[12] 陈芬,杨超,蔡哲,等. 异鼠李素对缺血再灌注损伤大鼠心室肌细胞凋亡的抑制作用[J]. 四川生理科学杂志,2010,32(2):56-59.