

HPLC 法测定北刘寄奴中木犀草素和芹菜素的含量*

林宗涛¹ 梁毅² 刘淑娟¹ 陈世忠¹ 王弘^{1**}

(1. 北京大学药学院, 北京 100191; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

摘要 目的: 建立同时测定北刘寄奴中木犀草素和芹菜素含量的 HPLC 方法。方法: 采用 Inertsil ODS-3 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.5% 磷酸 (28:72) 为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 340 nm, 柱温 35 °C。结果: 木犀草素和芹菜素进样量分别在 0.2168 ~ 1.951 μg 和 0.0684 ~ 0.615 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.9999$); 木犀草素和芹菜素平均加样回收率 ($n=5$) 分别为 99.7% 和 99.1%, RSD 分别为 0.99% 和 1.5%。结论: 该方法简便、准确、可靠, 可用于中药北刘寄奴中木犀草素和芹菜素含量的测定。

关键词: 北刘寄奴; 阴行草; 木犀草素; 芹菜素; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)09-1689-04

HPLC determination of luteolin and apigenin in *Siphonostegia chinensis**

LIN Zong-tao¹, LIANG Yi², LIU Shu-juan¹, CHEN Shi-zhong¹, WANG Hong^{1**}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China;

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract Objective: To develop an HPLC method for content determination of luteolin and apigenin in *Siphonostegia chinensis*. **Methods:** The separation was carried out on a Inertsil ODS-3 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column with acetonitrile-0.5% phosphoric acid (28:72) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 340 nm and the column temperature was maintained at 35 °C. **Results:** There were good linear relationships between the masses and the peak areas of luteolin and apigenin in the ranges of 0.2168-1.951 μg ($r=0.9999$) and 0.0684-0.615 μg ($r=0.9999$), respectively. The average recoveries ($n=5$) were 99.7% and 99.1%, and RSDs were 0.99% and 1.5%, respectively. **Conclusion:** This method is simple, precise and reliable for the determination of luteolin and apigenin in *Siphonostegia chinensis*.

Key words: *Siphonostegiae Herba*; *Siphonostegia chinensis*; luteolin; apigenin; assay; HPLC

北刘寄奴为玄参科植物阴行草 *Siphonostegia chinensis* Benth. 的干燥全草, 主产于东北、河北、河南、山东等地, 具有活血祛瘀、通经止痛、凉血止血、清热利湿等功效, 用于跌打损伤、外伤出血、瘀血经闭、月经不调、湿热黄疸等病症^[1]。北刘寄奴药材中含有木犀草素 (luteolin)、芹菜素 (apigenin) 等黄酮类化合物^[2], 为其抗炎^[3]、抗肿瘤^[4,5]、抗菌^[6]等方面的有效成分。在北刘寄奴的质量评价方面, 汪凤山等^[7]对北刘寄奴总黄酮进行了含量测定, 张宏武等^[8]采用高效液相色谱法对北刘寄奴中的木犀草素进行了含量测定, 尚未见对北刘寄奴中多个黄酮类成分的含量测定。本文建立了北刘寄奴药材中

木犀草素和芹菜素的 HPLC 含量测定方法, 为其提供较为全面的质量评价标准。

1 仪器及试剂

仪器: 岛津 LC-20A 液相色谱仪 (LC-20AD 泵, CTO-20AC 柱温箱, SPD-M20A 二极管阵列检测器, SIL-10AC 自动进样器, CBM-20A 控制器, LCsolution 工作站); 超声波提取器 (KQ-250DE, 昆山市超声仪器有限公司); 电子天平 (Sartorius, 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司)。

对照品: 木犀草素 (上海同田生物技术有限公司, 批号 08060731, 纯度 ≥ 98.0%), 芹菜素 (北京宝曼生物科技有限公司, 纯度 ≥ 98.0%)。

* 国家 973 项目—道地药材的药性特征研究。课题编号: 2006CB504707

** 通讯作者 Tel: (010) 82801559; E-mail: hw9505@bjmu.edu.cn

试剂:乙腈(色谱纯,天津赛孚瑞科技有限公司),甲醇(分析纯,北京化工厂),无水乙醇(分析纯,北京化工厂),超纯水。

样品:购自全国各地药店的北刘寄奴饮片,经北京大学药学院天然药物系王弘副教授鉴定为玄参科阴行草 *Siphonostegia chinensis* Benth. 的干燥全草。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品木犀草素、芹菜素适量,分别加 80% 甲醇溶解制成每 1 mL 含木犀草素约为 100 μg ,含芹菜素约为 35 μg 的单一对照品溶液,即得。

2.2 供试品溶液的制备 取北刘寄奴样品粉末(过 40 目筛) 0.6 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇 25 mL,称定质量,超声(功率 250 W 40 kHz)提取 40 min,放冷,称定质量,用 80% 甲醇补足减失质量,摇匀,过滤,取续滤液并经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 色谱条件与系统适用性试验 采用 Inertsil ODS-3(4.6 mm \times 150 mm 5 μm) 色谱柱,流动相为乙腈-0.5% 磷酸(28:72),流速 1.0 mL \cdot min⁻¹,检测波长 340 nm,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,进样量 10 μL 。理论塔板数以木犀草素计大于 7000,木犀草素、芹菜素与相邻色谱峰均基线分离,拖尾因子符合要求,见图 1。

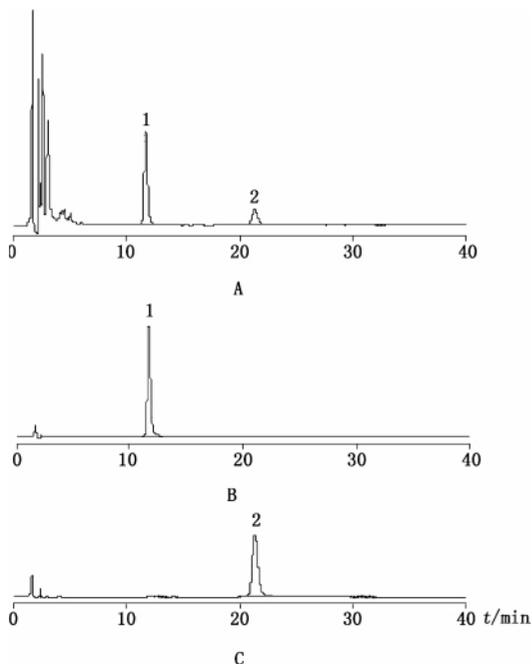


图 1 16 号样品(A)及对照品木犀草素(B)、芹菜素(C)的 HPLC 谱图
Fig 1 HPLC chromatograms of *Siphonostegia chinensis* sample of No. 16 (A) and reference substances of luteolin(B) and apigenin(C)

1. 木犀草素(luteolin) 2. 芹菜素(apigenin)

2.4 线性关系的考察 取上述 2 个对照品溶液,分别以 2, 6, 10, 14, 18 μL 进样测定,记录峰面积。以进样量 X (μg) 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,绘制标准曲线并进行回归计算,得木犀草素和芹菜素标准曲线回归方程分别为:

$$Y = 3.884 \times 10^6 X - 3.911 \times 10^4 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 4.085 \times 10^6 X - 1.983 \times 10^4 \quad r = 0.9999$$

木犀草素和芹菜素进样量分别在 0.2168 ~ 1.951 μg 和 0.0684 ~ 0.615 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取同一供试品溶液,连续进样 6 次,测定峰面积。结果木犀草素、芹菜素峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 0.35% 和 0.78%,精密度实验符合要求。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 h 进样测定。结果木犀草素、芹菜素峰面积的 RSD ($n = 8$) 分别为 0.47% 和 0.88%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.7 重复性试验 分别称取同一批样品 5 份,依法测定含量。结果木犀草素、芹菜素的含量分别为 2.48 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 0.68 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 分别为 1.7% 和 1.1%。表明方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

2.8.1 木犀草素 精密称取木犀草素含量为 0.41% 的样品 5 份,每份约 0.2 g,置具塞锥形瓶中,各精密加入浓度为 542.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的木犀草素对照品溶液 1 mL,混匀,挥干溶剂,再精密加入 80% 甲醇 25 mL,按“2.2”项方法制备供试溶液,在上述色谱条件下进行测定并计算加样回收率。结果木犀草素平均回收率 ($n = 5$) 为 99.7%,RSD 为 0.99%。

2.8.2 芹菜素 精密称取芹菜素含量为 0.11% 的样品 5 份,每份约 0.2 g,置具塞锥形瓶中,各精密加入 116.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芹菜素对照品溶液 2 mL,混合均匀,挥干溶剂,再精密加入 80% 甲醇 25 mL,按“2.2”项方法制备供试溶液,在上述色谱条件下进行测定并计算加样回收率。结果芹菜素平均回收率 ($n = 5$) 为 99.1%,RSD 为 1.5%。

2.9 样品测定 精密称取 19 批北刘寄奴饮片粉末,每批 2 份,依法制备供试品溶液,每份进样测定 3 次,根据回归方程计算含量,结果见表 1。

表1 市售19批样品中木犀草素和芹菜素含量测定结果($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab 1 Determination results of luteolin and apigenin contents in 19 *Siphonostegia chinensis* samples

编号 (No.)	来源 (source)	木犀草素 (luteolin)	芹菜素 (apigenin)
1	宁夏银川 (Yinchuan, Ningxia)	1.15	0.24
2	河南信阳 (Xinyang, Henan)	2.75	0.63
3	辽宁沈阳 (Shenyang, Liaoning)	2.02	0.52
4	河南郑州 (Zhengzhou, Henan)	1.23	0.38
5	福建三明 (Sanming, Fujian)	2.51	0.48
6	河北安国 (Anguo, Hebei)	1.32	0.38
7	江苏沐阳县 (Muyang, Jiangsu)	3.32	0.72
8	河北石家庄 (Shijiazhuang, Hebei)	1.50	0.48
9	河北廊坊 (Langfang, Hebei)	2.78	0.71
10	河北唐山 (Tangshan, Hebei)	0.61	0.35
11	陕西宝鸡 (Baoji, Shaanxi)	3.85	0.98
12	黑龙江大庆 (Daqing, Heilongjiang)	0.42	0.15
13	北京朝阳区 (Chaoyang, Beijing)	0.98	0.28
14	北京石景山 (Shijingshan, Beijing)	1.82	0.45
15	北京丰台区 (Fengtai, Beijing)	2.24	0.56
16	北京通州区 (Tongzhou, Beijing)	2.48	0.68
17	北京海淀区 (Haidian, Beijing)	3.30	0.82
18	吉林通化 (Tonghua, Jilin)	2.16	0.64
19	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)	0.85	0.47

3 讨论

3.1 木犀草素和芹菜素紫外光谱最大吸收波长分别为 349 nm 和 337 nm,本研究兼顾到样品中 2 种成分的含量和消除其他杂质峰的影响,选择 340 nm 作为检测波长。

3.2 分别对乙腈-水、乙腈-磷酸溶液等多个流动相进行了比较研究,流动相中加入磷酸溶液对改善峰形具有明显的效果,故选择乙腈-0.5%磷酸溶液作为流动相;确定流动相为乙腈-0.5%磷酸(28:72)。将柱温分别控制在 25℃、35℃、45℃进行试验,结果表明 35℃时基线平稳且分离度较好,本文选择 35℃作为分析温度。

3.3 本文考察了无水乙醇、甲醇、80%甲醇和 60%甲醇等不同提取溶剂对样品提取率的影响。结果显示无水乙醇提取率为 25.2%,80%甲醇提取效果最高,为 96.9%;对超声提取法、浸提法、加热回流法的提取效果进行了比较,结果显示超声提取法和回流提取法对木犀草素的提取效果均较好且明显优于浸提法,但超声提取法对芹菜素的提取效果远超过其他 2 种方法,且超声提取法操作简便,经济性好。此外比较了超声时间、质量体积(25倍、50倍、75倍)和提取次数对样品的提取效果,最终确定了本文提取方法。

3.4 对 19 批北刘寄奴样品中木犀草素、芹菜素含量测定的结果表明:不同样品间木犀草素含量最高的达 $3.85 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,含量最低的仅 $0.42 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,相差 9.17 倍,含量最低的未达到中国药典 2010 年版刘寄奴项下木犀草素含量的规定;芹菜素含量最高的为 $0.98 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,含量最低的仅 $0.15 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,含量相差 6.53 倍。说明市售北刘寄奴质量参差不齐,本研究为北刘寄奴药材的质量评价提供了科学数据。

3.5 木犀草素和芹菜素的含量常作为评价药材质量的依据^[9~13],中国药典 2010 年版中以测定木犀草素的含量来控制北刘寄奴的质量^[1],但以木犀草素和芹菜素评价北刘寄奴质量的研究未见报道。本实验建立了高效液相色谱同时测定北刘寄奴中木犀草素和芹菜素的分析方法,与以往针对北刘寄奴中的单一成分的测定方法相比,更具有科学性。该方法简便、准确、可靠,为北刘寄奴的质量标准控制和确定其合适采收期提供科学依据。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2010. Vol I (一部): 91
- 2 WANG Feng-shan(汪凤山), LIU Juan(刘娟). Study progress on chemical component and pharmacological action of *Siphonostegia chinensis*(阴行草化学成分及药理作用研究进展). *Heilongjiang Med Pharm*(黑龙江医药科学) 2008, 31(6): 61
- 3 Hougee S, Sanders A, Faber J, et al. Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages. *Biochem Pharmacol*, 2005, 69(2): 241
- 4 Shi RX, Ong CN, Shen HM. Protein kinase C inhibition and X-linked inhibitor of apoptosis protein degradation contribute to the sensitization effect of luteolin on tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Res* 2005, 65(17): 7815
- 5 Golkar L, Salabat MR, Ujiki MB, et al. Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation via down-regulation of hypoxia inducible factor-1A(HIF-1A) and the glucose transporter(GLUT-1). *J Surg Res* 2007, 137(2): 191
- 6 Sousa A, Ferreira IC, Calhella R, et al. Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives 'alcaparra'. *Bioorg Med Chem* 2006, 14(24): 8533
- 7 WANG Feng-shan(汪凤山), LIU Juan(刘娟), ZHAO Xu-wei(赵旭伟). Content determination of total flavonoids in *Siphonostegia chinensis* from different source(不同产地北刘寄奴中总黄酮的含量测定). *Heilongjiang Med Pharm*(黑龙江医药科学), 2009, 32(5): 21
- 8 ZHANG Hong-wu(张宏武), ZOU Zhong-mei(邹忠梅), XU Li-zhen(徐丽珍). Evaluating method for the quality of Bei Liu-Ji-Nu(北刘寄奴药材质量的评价方法). *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药) 2007, 18(10): 2366
- 9 DUAN Kun-feng(段坤峰), LU Shu-jie(卢树杰), CHEN Zhong(陈钟), et al. RP-HPLC simultaneous determination of luteolin, apigenin and kaempferol in *Verbena officinalis* L. (RP-HPLC法同时测定马鞭草中木犀草素、芹菜素和山柰酚). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2010, 30(6): 995
- 10 LUO Mi-na(罗米娜), ZHAO Liang(赵亮), LIU Xia(刘霞), et al. HPLC determination of quercetin, luteolin and apigenin in *Lamio-phlomis rotata* (Benth.) Kudo and its capsules(藏药独一味中槲皮素、木犀草素和芹菜素的HPLC测定). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2006, 26(12): 1773
- 11 SHEN Hai-jin(申海进), GUO Qiao-sheng(郭巧生), FANG Hai-ling(房海灵), et al. Determination of quercetin, luteolin, apigenin and acacetin in *Flos Chrysanthemi Indici* by RP-HPLC(RP-HPLC测定野菊花中槲皮素、木犀草素、芹菜素和刺槐素). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志) 2010, 35(2): 191
- 12 ZHANG Ling(张凌), ZHANG Dao-ying(张道英), LIU Ya-li(刘亚丽), et al. Determination of total flavonoids and luteolin in traditional Tibetan drug *Pyrethrum tatsienense* (Bur. et Franch.) Ling(藏药打箭菊中总黄酮及木犀草素的含量测定). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2008, 28(5): 755
- 13 BI Yue-feng(毕跃峰), FU Ling(符玲), PEI Shan-shan(裴姗姗), et al. Content determination of linarin and luteolin from different extractions of *Flos Chrysanthemi Indici*(不同野菊花提取物中蒙花苷和木犀草素的含量测定比较). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2008, 28(11): 1797

(本文于2010年9月25日收到)

《药物分析杂志》继续被评为2011年度中国科协精品科技期刊示范项目

按照《中国科协精品科技期刊工程项目管理办法(试行)》的有关规定,《药物分析杂志》参与了2010年度精品科技期刊示范项目和英文版期刊国际推广项目总结验收及2011年度精品科技期刊新增示范项目评审工作。根据中国科协的评审结果,《药物分析杂志》继续成为2011年度精品科技期刊示范项目C类项目。评选分A、B、C三类,各类项目资助额度分别为每项25万、15万、5万元/年。中国科协从2006年开始评选精品期刊项目至今,《药物分析杂志》已连续6年被评为中国科协精品科技期刊示范项目(C类)。