

高效液相色谱法测定花蕾期茵陈中黄酮类成分的含量

林 生, 张启伟*, 张宁宁, 张永欣

(中国中医研究院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立花蕾期茵陈4个黄酮类成分的含量测定方法。方法: 样品用醋酸乙酯超声提取30 min, Kromasil ODS 柱, 流动相乙腈-四氢呋喃-1%醋酸水溶液(2.5:21.5:76), 检测波长347 nm。结果: 茵陈花蕾中的4个黄酮类成分5, 7, 4'-三羟基-6, 2', 5'-三甲氧基黄酮(arcapillin), 5, 3', 4'-三羟基-6, 7二甲氧基黄酮(cirsiliol), 蓟黄素(cirsimaritin)和3'-甲氧基蓟黄素(cirsilineol)在该色谱条件下获良好分离, 分别在0.035~0.056, 0.043~0.069, 0.040~0.065, 0.040~0.064 μg 线性关系良好($r=0.999\ 2, 0.999\ 9, 0.999\ 7, 0.999\ 7$), 加样回收率分别为96.8%, 97.3%, 96.8%, 98.5%, 重复性分别为2.5%, 3.0%, 1.5%, 3.2%。结论: 该方法分离度好, 为花蕾期茵陈及其制剂的质量控制提供。

[关键词] 花蕾期茵陈; 黄酮; 高效液相色谱法

[中图分类号] R 284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5302(2005)08-0591-04

茵陈, 性味苦, 辛, 微寒, 可清湿热, 退黄疸, 主要用于治疗黄疸及传染性黄疸型肝炎。1985年以前各版《中国药典》仅收载滨蒿 *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit. 和茵陈蒿 *A. capillaris* Thunb. 的幼苗。从1990年版《中国药典》一部又收载了上述2个品种秋季花蕾成长时的地上部分。虽然对茵陈有效成分含量测定的文献较多^[1-5], 但未见对黄酮类多成分含量测定的报道。作者从滨蒿花蕾期样品中分离得到了4个黄酮类化合物, 茵陈黄酮(arcapillin), 5, 3', 4'-三羟基-6, 7二甲氧基黄酮(cirsiliol), 蓟黄素(cirsimaritin)和3'-甲氧基蓟黄素(cirsilineol)。药理实验证明, 4个黄酮类成分除了对四氯化碳损伤的原代培养大鼠肝细胞具有增强活力的作用, 有的还具有降低谷丙转氨酶的作用。另有文献报道, 茵陈黄酮、蓟黄素和3'-甲氧基蓟黄素还具有抗肝毒素作用^[7]。此外, 蓟黄素在体外能抑制Hela细胞和艾氏腹水癌细胞的增殖^[8], 抑制致癌物苯并[α]芘的代谢^[9], 而3'-甲氧基蓟黄素在体外对恶性疟原虫呈抗疟活性, 对青蒿素有选择性增效作用^[10], 同时, 两者对小鼠骨髓性白血病细胞M1都有分化诱导活

性^[11], 还可以作为cAMP磷酸二酯酶抑制剂^[12]。因此, 本研究通过对高效液相色谱参数进行优化, 建立了茵陈中4个黄酮类化合物含量测定的方法。该方法分离度好, 准确可靠, 可为花蕾期茵陈及其制剂的质量控制提供可借鉴的分析方法。

1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱系统, 包括 G1311A 四元泵, G1313A 自动进样器, G1316A 柱温箱, D1315A 二极管矩阵检测器, HPCHEM 色谱工作站, Sartorius 2004MP6 半微量电子天平。

药材样品: 4份于2003年8月底至9月初采集于北京地区, 1份于2003年8月底至9月初采集于湖北地区, 经本所生药室冯学锋副研究员鉴定为滨蒿 *A. scoparia* 的干燥地上部分; 1份日本市售, 经冯学锋副研究员鉴定为 *A. capillaris* 的花及茎。

茵陈黄酮, 5, 3', 4'-三羟基-6, 7二甲氧基黄酮, 蓟黄素和3'-甲氧基蓟黄素从滨蒿花蕾中分离得到, 经UV, MS, ¹H-NMR 和¹³C-NMR 确定结构, 且与文献报道一致^[13]。经HPLC面积归一化测定, 上述4种成分的纯度均大于98%, 可作定量之用。

醋酸乙酯(GR), 乙腈(HPLC), 四氢呋喃(HPLC), 纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 实验部分

2.1 色谱条件

Kromasil ODS 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250

[收稿日期] 2004 11 20

[基金项目] 国家重点科技攻关项目(96 903-02 02)

[通讯作者] * 张启伟, Tel: (010)64014411-2848, Fax: (010)6401

mm, 5 μ m), 北京分析仪器厂填充, 柱温 35 $^{\circ}$ C, 流动相为乙腈-四氢呋喃-1% 醋酸水溶液(2.5:21.5:76), 54~64 min 为线性梯度变至(90:5:5), 等强洗脱 10 min 后, 74~90 min 回到初始条件后平衡 15 min。检测波长 347 nm, 流速 1 mL $\cdot$ min $^{-1}$; 进样量 10 μ L。在此条件下, 对照品和样品 HPLC 图谱见图 1。样品色谱图中 arcapillin, cirsiliol, cirsimaritin 和 cirsilineol 色谱峰纯度经过 DAD 检测器纯度检查均符合要求。

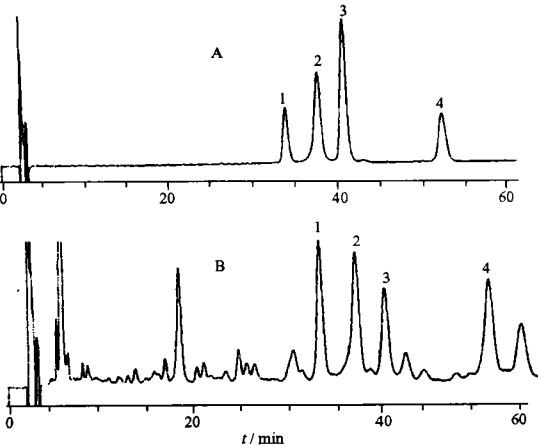


图 1 对照品和样品的 HPLC 图
A. 对照品; B. 样品

1. arcapillin; 2. cirsiliol; 3. cirsimaritin; 4. cirsilineol

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取 arcapillin, cirsiliol, cirsimaritin 和 cirsilineol 对照品 1.12, 1.37, 1.29, 1.27 mg 于 10 mL 量瓶中, 加 5 滴二甲基亚砷溶解, 然后用甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密量取 1 mL 上述溶液于 10 mL 量瓶中, 加 6 mL 甲醇稀释, 再用 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备 取样品粉末(40 目)约 0.2 g, 精密称定。精密加入醋酸乙酯 15 mL, 称重, 超声 30 min, 取出, 放至室温, 补至原重, 混匀, 滤过。精密取续滤液 5 mL 至蒸发皿中, 蒸干。残渣先用约 3 mL 甲醇溶解转移至 5 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.45 μ m 滤膜滤过, 即得。

2.4 样品测定 将对照品溶液和供试品溶液分别注入液相色谱仪, 采用外标一点法计算含量。测定了 6 批样品, 结果见表 1。

3 方法学考察

3.1 精密度试验 样品溶液连续进样 5 次, 分别测定其峰面积, 峰面积的 RSD 为 0.4%~1.2%, 说明精密度良好。

表 1 花蕾期茵陈中 arcapillin, cirsiliol, cirsimaritin, cirsilineol 含量(n= 2)

批号	成分名称	含量/ %
030903WJ	arcapillin	0.098
	cirsiliol	0.049
	cirsimaritin	0.038
	cirsilineol	0.079
030903YYT	arcapillin	0.095
	cirsiliol	0.062
	cirsimaritin	0.027
	cirsilineol	0.093
030901XL	arcapillin	0.027
	cirsiliol	0.034
	cirsimaritin	0.016
	cirsilineol	0.049
030831WKS	arcapillin	0.092
	cirsiliol	0.053
	cirsimaritin	0.025
	cirsilineol	0.105
湖北野生	arcapillin	0.059
	cirsiliol	微量
	cirsimaritin	0.019
	cirsilineol	0.580
日本	arcapillin	0.032
	cirsiliol	0.024
	cirsimaritin	0.010
	cirsilineol	0.072

3.2 样品溶液的稳定性试验 样品溶液在制备后 0, 2, 4, 6, 8, 24 h 测定, 测得的峰面积变化趋势不明显, 说明样品溶液在 24 h 内稳定。

3.3 线性范围考察 精密称取适量对照品, 配成系列不同含量的对照品溶液, 分别进样 10 μ L, 以进样量为自变量(X), 以峰面积为因变量(Y), 求得回归方程。结果表明, arcapillin 在 0.035~0.56 μ g, cirsiliol 在 0.043~0.69 μ g, cirsimaritin 在 0.040~0.65 μ g, cirsilineol 在 0.040~0.64 μ g 线性关系良好, 见表 2。

表 2 arcapillin, cirsiliol, cirsimaritin, cirsilineol 回归方程

对照品名称	回归方程	r	线性范围/ μ g
arcapillin	$Y = 203.2.6X + 6.0$	0.999 2	0.035~0.56
cirsiliol	$Y = 388.7.6X + 5.6$	0.999 9	0.043~0.69
cirsimaritin	$Y = 242.8.6X + 6.8$	0.999 7	0.040~0.65
cirsilineol	$Y = 568.1.5X + 31.1$	0.999 7	0.040~0.64

3.4 重复性试验 取同一批样品称重 5 份, 分别依样品溶液制备方法操作, 测得 arcapillin, cirsiliol, cirsimaritin, cirsilineol 的平均含量分别为 0.102%, 0.182%, 0.056%, 0.159%。RSD 分别为 2.5%, 3.0%, 1.5%, 3.2%。

3.5 加样回收试验 称取已知含量样品 5 份, 分别加入上述对照品, 依样品溶液制备方法操作。结果表明, 方法的回收率良好, 见表 3。

4 结果与讨论

表 3 arcapillin, cirsiliol, cirsimaritin, cirsilineol 加样回收试验

成分	样品称量/mg	样品中含量/mg	测定量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
arcapillin	101.6	0.103 6	0.205 1	94.9	96.8	3.1
	100.0	0.102 0	0.204 0	95.3		
	100.2	0.102 2	0.203 8	95.0		
	100.4	0.102 4	0.206 1	96.9		
cirsiliol	100.1	0.102 1	0.211 2	102.0	97.3	2.5
	101.6	0.184 9	0.379 7	97.9		
	100.0	0.182 0	0.376 0	97.5		
	100.2	0.182 4	0.383 2	100.9		
cirsimaritin	100.4	0.182 7	0.371 6	94.9	96.8	2.1
	100.1	0.182 2	0.371 8	95.3		
	104.9	0.058 74	0.144 9	99.1		
	101.8	0.057 01	0.140 6	96.1		
cirsilineol	100.2	0.056 11	0.138 5	94.7	98.5	2.4
	101.2	0.056 67	0.142 7	98.9		
	103.2	0.057 79	0.140 9	95.5		
	101.6	0.161 5	0.276 5	101.8		
	100.0	0.159 0	0.268 8	97.2		
	100.2	0.159 3	0.271 9	99.6		
	100.4	0.159 6	0.270 3	98.0		
	100.1	0.159 2	0.267 3	95.7		

注: 样品中各成分含量分别为 0.102%, 0.182%, 0.056%, 0.159%; 加入量分别为 0.107 0, 0.199 0, 0.087 0, 0.113 0 mg

4.1 色谱条件的选择 有文献报道^[14] 差 1 个甲氧基的黄酮极难分离。最初, 本研究选择了甲醇-1% 醋酸水(50: 50) 为流动相, 4 个对照品彼此不能分离, 因此, 根据文献[15], 对流动相的选择性进行了优化。根据“PRISMA”模型和优化步骤, 对甲醇-乙腈-四氢呋喃-酸水四元体系进行了系统的筛选。从筛选的结果发现甲醇在该系统对上述成分的分离影响较小, 故除去甲醇改为三元系统, 而四氢呋喃主要影响茵陈黄酮和 5, 3', 4'-三羟基-6, 7-二甲氧基黄酮的分离, 乙腈主要影响蓟黄素和 3'-甲氧基蓟黄素的分离, 同时又根据样品其他成分的干扰情况, 对比例进行了适当的调整, 最终确立了文中使用的色谱条件, 见图 2。

4.2 供试品溶液的制备 根据所测成分的溶解性质, 选择比较了甲醇、乙醇和醋酸乙酯 3 种提取溶剂, 发现甲醇对黄酮的提取率较高, 但干扰成分复杂, 而醋酸乙酯对黄酮的提取率与甲醇相当, 干扰成分也相对较少, 同时考察了回流提取和超声提取时间, 最终确立用醋酸乙酯超声提取 30 min 的提取条件。为了延长色谱柱寿命, 排除其他成分对所测成分的干扰, 曾分别采用聚酰胺柱和硅胶柱对样品进行净化处理, 分别采用不同比例的石油醚-氯仿或氯仿进行洗脱, 发现所测成分与干扰成分并不能很好

分离。为此, 采取在 HPLC 等强洗脱分离定量的基础上增加了梯度洗脱, 以除去柱上保留较强的物质。

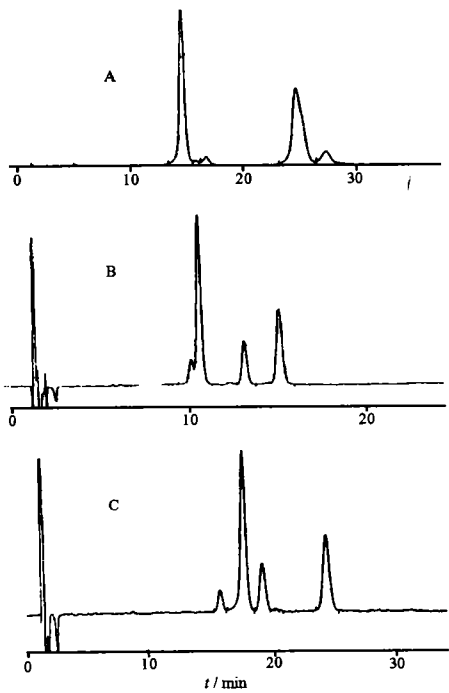


图 2 不同流动相 4 个成分分离的 HPLC 图
A. 甲醇-1% 醋酸水(50: 50);
B. 甲醇-乙腈-四氢呋喃-1% 醋酸水(5: 4: 23: 68);
C. 乙腈-四氢呋喃-1% 醋酸水(3: 5: 21: 5: 74)

4.3 本研究同时对 2 个样品 030903WJ 和 030903YYT 的茎进行含量测定, 两者的 arcapillin, cirsiliol, cirsimaritin, cirsilineol 含量分别为 0.003 8%, 0.0028%, 0.0013%, 0.0055% 和 0.011%, 0.004 8%, 0.009%, 0.018%, 以上结果表明 4 个成分在茎中的含量远远低于在花蕾中的含量。

[参考文献]

[1] 张启伟, 章育中. 滨蒿中利胆成分的含量测定. 药学报, 1986, 21(12): 922.
[2] 张启伟, 章育中. 滨蒿中利胆成分的薄层光密度法测定. 药学报, 1989, 24(1): 43.
[3] 王喜军, 孙 晖, 刘中申. 茵陈蒿及其复方制剂中 6, 7-二甲氧基香豆素和茵陈色原酮的定量研究. 中国中药杂志, 1994, 19(11): 667.
[4] Sheu S J, Tan Y W. Determination of phenolic compounds in *Artemisia capillaris*. *J High Resolut Chromatogr*, 1999, 22(4): 222.
[5] Sheu S J, Chieh C L, Weng W C. Capillary electrophoretic determination of the constituents of *Artemisia Capollaris* Herba. *J Chromatogr A*, 2001, 911(2): 285.
[6] 张启伟, 张永欣, 张 颖, 等. 高效液相色谱法测定花蕾期茵陈中 3'-甲氧基蓟黄素的含量. 中国中药杂志, 2002, 27(1): 23.

[7] Kiso Y, Ogasawara S, Hirota K, *et al.* Antihepatotoxic principles of *Artemisia apillaris* buds. *Planta Med*, 1984, 46(1): 81.

[8] 蒋洁云, 徐 强, 王 蓉, 等. 茵陈抗肿瘤活性成分的研究. 中国药科大学学报, 1992, 23(5): 283

[9] LIU Y L, Ho D K, Cassady J M. Isolation of potential cancer chemopreventive agents from eridictyon californicum. *Nat Prod*, 1992, 55(3): 357.

[10] 陈惠芳. 植物活性成分辞典. 第二册. 北京: 中国医药科技出版社, 2001. 102.

[11] sugiyama S, Umenara K, Kuroyanagi M, *et al.* Studies on the differentiation inducers of myeloid leukemic cells from citrus species. *Chem Pharm Bull*, 1992, 41(4): 714.

[12] Nikaido T, Qumoto T, Sankawa V, *et al.* Inhibition of adenosine 3, 5 cyclic monophosphate phosphodiesterase by flavonoids. II. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(2): 654

[13] 张启伟, 张永欣, 张 颖, 等. 滨蒿化学成分的研究. 中国中药杂志, 2002, 27(3): 202.

[14] Castele K V, Geiger H, Van Sumere C F. Separation of flavonoids by reversed phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1982, 240(1): 81.

[15] Nyiredy Sz, Meier B, Erdelmeier C A J, *et al.* “Prisma”: a geometrical design for solvent optimization in HPLC. *J High Resolut Chromatogr Chromatogr Commun*, 1985, 8(4): 186.

Determination of flavonoids in buds of Herba Artemisiae Scopariae by HPLC

LIN Sheng, ZHANG Qiwei, ZHANG Ning ning, ZHANG Yongxin
(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a quantitative method for the determination of four flavonoids in buds of Herba Artemisiae Scopariae. **Method:** The sample was extracted by ultrasonic with ethyl acetate for 30 minutes and separated on kromasil ODS column with mobile phase of acetonitrile:tetrahydrofuran:1% acetic acid solution(2.5:21.5:76) and detection wavelength was 347 nm. **Result:** The arcapillin, cirsilinol, cirsimaritin and cirsilinoleol in bud extract were well separated by this method. Linearities of arcapillin, cirsilinol, cirsimaritin and cirsilinoleol were good($r=0.999\,2, 0.999\,9, 0.999\,7, 0.999\,7$) in ranges of 0.035~0.56, 0.043~0.69, 0.040~0.64 and 0.040~0.64 μg , respectively. The average recoveries were 96.8%, 97.3%, 96.8%, 98.5% and RSD the values of repeatability were 2.5%, 3.0%, 1.5%, 3.2%, respectively. **Conclusion:** The method validation data indicated that the method is reliable and it can be used for quality control of Herba Artemisiae Scopariae and its preparations.

[Key words] Herba Artemisiae Scopariae collected in autumn; flavonoids; HPLC

[责任编辑 李 禾]

龙蒿挥发油成分研究

张 燕², 张 继^{1*}, 姚 健¹, 杨永利¹, 王 莱¹, 董丽娜¹

(1. 喀什师范学院生化系, 新疆喀什 844007; 2. 西北师范大学生命科学院, 甘肃兰州 730070)

[摘要] 目的: 分析龙蒿的化学成分。方法: 采用水蒸气蒸馏法提取, 运用毛细管气相色谱-质谱联用法对龙蒿挥发性化学成分进行了分析, 用气相色谱面积归一化法测定了各成分的相对百分含量。结果: 经毛细管色谱分离出 36 个峰, 并鉴定出峰所对应的化合物。其主要化学成分为 3, 7-二甲基-1, 3, 7-辛三烯(38.43%), 1S- α -蒎烯(36.96%), 1-甲氧基-4-(2-丙烯基)-苯(8.57%), 柠檬烯(6.33%), 1R- α -蒎烯(3.40%) 等。结论: 为进一步开发利用龙蒿提供了科学依据。

[关键词] 龙蒿; 挥发油; 气质联用

[中图分类号] R 284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5302(2005)08-0594-03

[收稿日期] 2003-09-10
[通讯作者] * 张继, Tel: (0931) 7971663, E-mail: zjltt66@21cn.com