

RP-HPLC 同时测定石胆草中 4 种主要成分的含量

王彦志, 刘媛媛, 郑晓珂, 贾玉光, 冯志毅* (河南中医学院, 郑州 450008)

摘要: 目的 运用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)同时测定石胆草药材中一个苯乙醇苷成分(PGs)和3个黄酮碳苷成分(FC-Gs、FC-Gs、FC-Gs)的含量。方法 研究优化了石胆草药材中主要成分的检测波长和色谱分离条件等,采用 ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱,以乙腈-四氢呋喃(10:1)-0.02%磷酸为流动相,梯度洗脱,检测波长为 332 nm,石胆草中4个主要成分得到分离(R_s>1.5),历时45 min。结果 4种成分线性关系良好,r均大于0.999 0,线性范围分别为0.4~3.2 μg(PGs)、0.32~2.56 μg(FC-Gs)、0.4~3.2 μg(FC-Gs)、0.46~3.52 μg(FC-Gs),方法平均加样回收率>98.9%,相对标准偏差 RSD<2.08%(n=6)。结论 此方法简便、快速、准确,适用于石胆草药材的质量控制。

关键词: 反相高效液相色谱法; 石胆草; 苯乙醇苷; 黄酮碳苷; 含量测定

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)19-1517-04

A Reversed phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) Procedure for Determination of Four Main Components in *Boea hygrometrica* (Bunge) R. Brown

WANG Yan-zhi, LIU Yuan-yuan, ZHENG Xiao-ke, JIA Yu-guang, FENG Zhi-yi* (Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for simultaneous determination of one phenylethanoid glycosides (PGs) and three flavonoid C-glycosides (FC-Gs, FC-Gs and FC-Gs) in *Boea hygrometrica* (Bunge) R. Brown. **METHODS** The detection wavelength and chromatographic separation condition were optimized. ZORBAX SB-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used. The 4 main components were separated with acetonitrile: tetrahydrofuran (10:1)-0.02% phosphate in 45 min with good resolution (R_s>1.5). The components were detected at 332 nm. **RESULTS** All correlation coefficients were greater than 0.999 0, and the linear ranges were 0.4~3.2 μg (PGs), 0.32~2.56 μg (FC-Gs), 0.4~3.2 μg (FC-Gs) and 0.46~3.52 μg (FC-Gs), respectively. The average recoveries were greater than 98.9%, and the relative standard deviations (RSD) were less than 2.08% (n=6). **CONCLUSION** The method is rapid, convenient and accurate, which can be used as the quality control method for *Boea hygrometrica* (Bunge) R. Brown.

KEY WORDS: RP-HPLC; *Boea hygrometrica* (Bunge) R. Brown; phenylethanoid glycosides; flavonoid C-glycosides; content determination

石胆草为苦苣苔科旋蒴苣苔属植物猫耳朵 [*Boea hygrometrica* (Bunge) R. Brown] 的干燥全草。异名绵还阳草、牛耳草、石花子、崖青叶。在《云南中草药》和《昆明民间常用草药》中均有记载:“苦,辛,寒。活血解毒,消肿止痛。治疗月经不调,赤白带下,心悸,跌打损伤,刀伤疮痛,顽癣。”“清热解毒,除湿。治湿热痹症,腮腺炎,咽喉肿痛。”河南西部伏牛山区一带常用于感冒初期上呼吸道感染及治疗妇女月经不调,赤白带下等症。本实验室前期研究结果表明,该植物中含有苯乙醇苷类、黄酮类、醌类、萜类及小分子有机酸等成分,其中以苯乙醇苷

类和黄酮碳苷类成分为主^[14],这两类成分均具有较强而且广泛的药理活性^[5-6],具有很高的研究意义和潜在的开发价值。

随着中药现代化的不断深入,为了更好的把握中药及中药复方成分,就要求更加精确的检测和量化分析,以适应中药现代化的需求。理想的分析方法应当是在操作简单的同时又能检测到尽可能多的化合物,从而提供更多的信息。目前,有关苯乙醇苷和黄酮碳苷含量测定的报道并不少见^[7-10],且大多是测定其中一种或同时测定2种成分,同时测定2类多个成分的报道不多。本实验通过优化色谱条

基金项目:教育部科学技术研究重点项目(DF2003078);河南省高校科技创新人才支持计划项目(2010HASTIT014)

作者简介:王彦志,女,博士,副教授 研究方向:中草药活性成分研究及新药开发 * 通讯作者:冯志毅,男,博士,讲师 研究方向:中药性效物质基础及作用机制研究 Tel: (0371) 65575963 E-mail: fengzy8@163.com

件,建立了同时测定石胆草药材中的苯乙醇苷和黄酮碳苷成分含量的方法,为更好的开发利用石胆草资源提供了参考。

1 仪器、药品和试剂

岛津 LC-10ATvp 高效液相色谱仪, SPD-10A 紫外检测器, N2000 双通道色谱工作站, 25 mL 可调进样器; AE240 十万分之一电子分析天平; SK6200H 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); DZKW-4 型恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司); SB-1000 型旋转蒸发仪(上海艾朗仪器有限公司); SHZ-95B 型水循环真空泵(河南省巩义市予华仪器有限公司); DFZ-3 型真空干燥箱(上海医用恒温设备有限公司)。

石胆草干燥全草, 采自河南省西峡县。经河南中医学院生药学科董诚明教授鉴定为苦苣苔科旋蒴苣苔属植物猫耳朵[*Boea hygrometrica* (Bunge) R. Brown] 的全草; 对照品: 1'-O-β-D-(3,4-二羟基苯乙基)-4'-O-咖啡酰基-β-D-芹糖(1→3')-β-D-葡萄糖-(1→6')葡萄糖苷(PGs), 5,7,4'-三羟基-6-甲氧基-8-C-β-D-木糖(1→2)-β-D-葡萄糖黄酮碳苷(FC-Gs), 5,3',4'-三羟基-7,8-二甲氧基-6-C-β-D-木糖(1→2)-β-D-葡萄糖黄酮碳苷(FC-Gs), 5,4'-二羟基-6,7-二甲氧基-8-C-β-D-木糖(1→2)-β-D-葡萄糖黄酮碳苷(FC-Gs), 以上对照品均为河南中医学院天然药物化学实验室制备, 纯度均达到 98% 以上; 试剂: 甲醇、乙腈、四氢呋喃等为色谱纯, 乙醇、磷酸等为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

取对照品 PGs 5.1 mg, FC-Gs 5.9 mg, FC-Gs 5.5 mg, FC-Gs 4.2 mg, 精密称定, 置同一 25 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解, 定容至刻度, 摇匀后备用。

2.2 样品溶液的制备

称取石胆草药材 40.0 g, 12 倍量体积分数 50% 乙醇置水浴 80 °C 加热回流提取 2.5 h, 提取 2 次, 合并滤液, 浓缩, 真空干燥后得干燥回流提取物。精密称取提取物 60.3 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.3 检测波长选择

以溶剂为空白, 将制备的 PGs、FC-Gs、FC-Gs、FC-Gs 溶液在 200~400 nm 内扫描, 各成分的最大吸收波长分别为 332, 328, 347, 332 nm。PGs 和

FC-Gs 的最大吸收波长相同, 均为 332 nm, FC-Gs、FC-Gs 在此波长处也有较强吸收, 检测的灵敏度能够满足分析要求, 可以实现在同一波长条件下同时检测 4 种成分, 故选取 332 nm 作为 4 种成分含量测定的检测波长。

2.4 HPLC 色谱条件分析

石胆草药材中的苯乙醇苷与黄酮碳苷也为酚性成分, 且结构极为相近, 易出现叠加和拖尾现象, 增加了分离的难度, 因此在流动相中加入少量磷酸改善了峰形。并且通过不断变化流动相的组成比例, 使各个成分得到较好的分离效果($R_s > 1.5$), 最终确定 HPLC 最佳色谱条件为: 采用 ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-四氢呋喃(10:1) (A) 0.02% 磷酸 (B) 为流动相。梯度洗脱: 0→10 min, 10%→15% A; 10→20 min, 15% A; 20→40 min 15%→20% A; 45.0 min 停止。流速: 1.0 mL·min⁻¹。柱温: 40 °C。检测波长: 332 nm。进样量: 10 μL。将“2.1”和“2.2”项下制备的溶液分别进样, 得色谱图(图 1), 各个峰的分离度均 > 1.5, 理论塔板数 > 3 000。

2.5 线性范围与定量限确定

依次吸取“2.1”项下的对照品混合溶液 2、4、6、8、10、12、16 μL, 注入高效液相色谱仪, 检测 4 种成分的峰面积。以各个成分峰面积对相应的进样量(μg) 回归制备标准曲线。PGs、FC-Gs、FC-Gs、FC-Gs 的回归方程分别为: $Y = 382\,284\rho + 92\,653$ ($r = 0.999\,6$); $Y = 649\,045\rho + 6\,895$ ($r = 0.999\,5$); $Y = 787\,633\rho - 12\,648$ ($r = 0.999\,4$); $Y = 838\,140\rho + 5\,606$ ($r = 0.999\,1$); 并根据标准偏差(σ) 和标准曲线的斜率(S) 确定检测限及定量限。各相关系数 r 、线性范围、检测限及定量限的结果见表 1。结果表

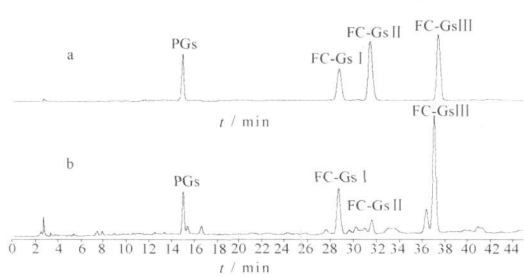


图 1 对照品 (a) 及石胆草提取物中 4 种成分 (b) 在 332 nm 处的 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC Chromatograms of the standard substances of the four components and *Boea hygrometrica* (Bunge) R. Brown extract at the wavelength of 332 nm

明,4 种成分的峰面积与进样量呈良好的线性关系,线性范围宽,且灵敏度高。

2.6 精密度实验

精密吸取“2.1”项下的对照品混合溶液 10 μL,按“2.4”项下色谱条件重复进样 6 次,检测 4 种成分的峰面积,测定结果见表 1,表明仪器精密度良好。

2.7 重复性实验

称取同一样品 6 份,按照“2.2”项下制备样品溶液,并按“2.4”项下色谱条件进样,检测 4 种成分的含量。测定结果见表 1。

2.8 稳定性考察

精密吸取制备的样品溶液室温下放置,分别于放置 0、2、4、6、8、12、16 h 时取样 10 μL 进行检测,观察峰面积的变化。室温下 4 种成分峰面积的 RSD 均 < 2.0%,表明这 4 种成分在 16 h 内有较好的稳定性。

2.9 加样回收率实验

精密称取石胆草药材 9 份,各约 1.0 g,分为 3 组后,第一组精密加入 PGs、FC-Gs_I、FC-Gs_{II}、FC-Gs_{III} 4.4、4.1、1.6、8.2 mg,第二组精密加入 PGs、FC-Gs_I、FC-Gs_{II}、FC-Gs_{III} 5.6、5.1、2.0、10.4 mg,第三组精密加入 PGs、FC-Gs_I、FC-Gs_{II}、FC-Gs_{III} 6.7、6.1、2.3、12.3 mg。将加有对照品的药材按“2.2”项

下方法制备样品溶液,进样 10 μL 测定各成分的含量,计算加样回收率。各个成分的回收率见表 1。

2.10 石胆草各部位中苯乙醇苷和黄酮碳苷成分的含量测定

称取同一批石胆草药材的全草及根、茎、叶各 3 份(每份 40.0 g),分别按“2.2”项下方法制备溶液,并按“2.4”项下色谱条件进样,根据峰面积计算各成分的百分含量。石胆草各部位中苯乙醇苷与黄酮碳苷成分的分布及百分含量见图 2 及表 2。苯乙醇苷与黄酮碳苷主要集中于石胆草药材的叶中,虽然根、茎、叶不同部位中这两类成分的含量存在很大差异,但每个部位均有分布。这一结果与传统的以全草入药的用药方法相符,更验证了传统用药习惯的科学性。

3 结 论

本实验采用 RP-HPLC 建立了同时测定石胆草中苯乙醇苷类与黄酮碳苷类 4 种成分含量的方法,并进行方法学验证。该方法优化了色谱条件使待测成分互相不受干扰,测定结果能准确反映石胆草药材的特性。利用该方法分析石胆草根、茎、叶不同部位中成分的分布情况,明确了药用部位,为临床合理用药提供一定的指导作用。本实验方法简便、稳定、可行,可用于石胆草药材的质量控制,并对同类药材及其他中药材、中药复方成分的深入研究提供一定的参考。

表 1 石胆草提取物中 4 种成分检测的考察参数, n = 6

No.	Retention time /min	Recovery rate/%	Precision RSD /%	Repeatability RSD/%	LOD /μg	LOQ /μg	r	Linear range /μg
1	15.3	99.2	0.52	2.41	0.13	0.38	0.999 6	0.40 ~ 3.20
2	29.5	99.9	1.34	3.13	0.07	0.21	0.999 5	0.32 ~ 2.56
3	32.7	98.9	1.75	3.94	0.12	0.35	0.999 4	0.40 ~ 3.20
4	38.2	100.3	2.08	2.67	0.15	0.46	0.999 1	0.46 ~ 3.52

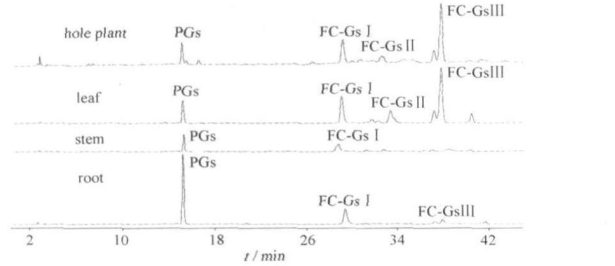


图 2 石胆草各部位中 4 种成分在 332 nm 处的 HPLC 图谱
Fig.2 HPLC Chromatogram of the four components in different part of *Boea hygrometrica* (Bunge) R. Brown at the wave length of 332 nm Peaks

表 2 4 种成分在石胆草药材中的分布及百分含量, n = 3, x ± s

Components	Hole plant /%	Leaf /%	Stem /%	Root /%
PGs	0.56 ± 0.11	0.42 ± 0.10	0.14 ± 0.06	1.10 ± 0.09
FC-Gs	0.51 ± 0.06	0.58 ± 0.05	0.13 ± 0.01	0.37 ± 0.04
FC-Gs	0.17 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.03 ± 0.02	-
FC-Gs	1.05 ± 0.13	0.76 ± 0.08	0.02 ± 0.01	0.19 ± 0.07

REFERENCES

- [1] ZHENG X K, LI J. Advances in study of Gesneriaceae [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2003, 12(4): 261-263.
- [2] ZHENG X K, LI J, FENG W S, *et al.* Studies on phenylethanoid glycosides from *Corallodiscus flabellata* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(10): 881-883.
- [3] ZHENG X K, LIU Y B, LI J, *et al.* One new phenylethanoid glycoside from *Corallodiscus flabellata* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 39(9): 716-718.
- [4] FENG W S, ZHENG X K, LIU Y B, *et al.* Isolation and structural identification of C-glycosylflavones from *Corallodiscus flabellata* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2004, 39(2): 110-115.
- [5] JING H, ZUO J F, LI J S. Pharmacological research development of phenylethanoid glycosides [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2006, 17(3): 440-441.
- [6] WU X A, ZHAO Y M. Development of natural c-flavonoids glucoside and its active research [J]. *Pharm J PLA* (解放军药学报), 2005, 21(2): 135-138.
- [7] GAO H M, WANG Z M, QUN L, *et al.* Determination of calceolarioside B in *Caulis Akebiae* by RP-HPLC [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2007, 32(6): 476-478.
- [8] ZHANG F, SUN L N, CHUN W S. Content determination and quality evaluation of phenylethanoid glycosides in different origin *Lamioopholis rotata* (Benth.) Kudo [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2008, 33(11): 1346-1347.
- [9] QU C H, YAN J, TIAN J M, *et al.* Determination of three kinds of flavonoid glycosides in *Trollius chinensis* Bunge. by HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2010, 32(3): 500-502.
- [10] LI H Y, DAI S W, SHOU D, *et al.* Study of puerarin in radix puerariae by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. *China Pract Med* (中国实用医药), 2008, 3(7): 7-8.

(收稿日期: 2011-02-25)

重组复制型溶瘤单纯疱疹病毒人细胞巨噬细胞集落刺激因子的质量研究

高凯, 付志浩, 李永红, 王兰, 陶磊, 毕华, 饶春明* (中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: **目的** 研究建立重组复制型溶瘤单纯疱疹病毒人细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF, HSV1/GM-CSF)的质控方法与质量标准。 **方法** 采用限制性内切酶酶切与 PCR 法, 对 GM-CSF 基因、单纯疱疹病毒载体 ICP 3415、ICP6、ICP47 等改造结构进行鉴定。采用 A_{260} 紫外吸收法检测病毒颗粒数; pfu 法测定 HSV1/GM-CSF 感染活性。HSV1/GM-CSF 体外感染 Vero 细胞后, 分别测定感染上清中 GM-CSF 表达量以及表达产物的生物学活性; 测定 HSV1/GM-CSF 对肿瘤细胞 MCF7 的体外杀伤活性; HSV1/GM-CSF 分别以相同 MOI 感染 MCF7 与二倍体人胚肺成纤维细胞 MRC5 后, 分别测定细胞裂解上清中子代病毒的感染活性, 并以子代病毒的感染活性比值来分析该制品在肿瘤细胞中的增殖复制能力。采用 PCR 法控制野生型单纯疱疹病毒等外源因子的残留。 **结果** 对重组 HSV1/GM-CSF 基因组的酶切, 以及对所携带的 GM-CSF 基因、ICP 3415、ICP6、ICP47 基因改造区的 PCR 鉴定结果与理论值相符。病毒载体颗粒数为 4.15×10^{10} VP# mL^{-1} , 感染活性为 4.13×10^7 pfu# mL^{-1} 。HSV1/GM-CSF 以 MOI 0.101 感染 Vero 细胞 72 h 后, ELISA 检测上清中 GM-CSF 表达量为 $228 \text{ ng} \# \text{mL}^{-1}$, 表达产物的生物学活性为 4.13×10^3 U# mL^{-1} 。该基因治疗制剂对人乳腺癌肿瘤细胞 MCF7 体外杀伤的 $\text{MOI}_{\text{IC}_{50}}$ 为 0.108。以相同 MOI 感染并经 pfu 法检测, HSV1/GM-CSF 在人乳腺癌肿瘤细胞 MCF7 与人胚肺成纤维二倍体细胞 MRC5 的增殖比值为 308。未检出野生型单纯疱疹病毒。其他各项指标均符合《人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》及 2005 年版《中国药典》(三部) 要求。 **结论** 初步建立了 HSV1/GM-CSF 的质控方法和质量标准, 并已用于该制品的质量控制。

关键词: 重组单纯疱疹病毒载体; 肿瘤溶瘤基因治疗; GM-CSF; 质量控制

中图分类号: R915, R927 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011) 19-1520-06

Quality Control Research on Recombinant Oncolytic Herpes Simplex Virus Serotype 1 Encoding Human GM-CSF Gene

GAO Kai, FU Zhi Hao, LI Yong Hong, WANG Lan, TAO Lei, BI Hua, RAO Chun Ming* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish quality control methods and specifications for oncolytic herpes simplex virus serotype 1 encoding human GM-CSF gene (HSV1/GM-CSF). **METHODS** GM-CSF gene and modified DNA region in ICP 3415, ICP6 and

作者简介: 高凯, 男, 博士, 副研究员 研究方向: 生物技术药物质量控制 * 通讯作者: 饶春明, 男, 研究员 研究方向: 生物技术药物质量控制 Tel: (010) 67075830 E-mail: raocm@nifdc.org.cn