

### 3 讨论

目前黄芪甲苷的测定主要采用薄层扫描法,如 2000 年版《中国药典》收载黄芪药材中黄芪甲苷的测定方法即为 TLCS 法,但其操作繁琐,重现性差。黄芪甲苷最大紫外吸收波长  $\lambda_{max} = 200.8 \text{ nm}$ , 为末端吸收,不适用于应用紫外吸收检测器测定。蒸发光散射检测器(ELSD)作为 HPLC 法的一种检测器,对无紫外吸收的物质较为适用,因此,参照高效液相色谱法(《中国药典》2000 年版一部附录 VI D),经对比文献报道的黄芪甲苷测定方法,并经过反复优化,建立了黄芪甲苷的高效液相-蒸发光散射法测定方法。经过对线性范围、精密度、供试品溶液稳定性、重现

性、回收率等方法学考察,证明本方法操作简便、准确可行。

### References:

[1] Editorial Board of China Herbal, State Administration of Traditional Chinese Medicine. China. *China Herbal* (中华本草) [M]. Shanghai, Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999.  
 [2] Luo Y M, Qin Z, Hong Z, et al. Astragaloside N protects against ischemic brain injury in a murine model of transient focal ischemia [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 363: 218-223.  
 [3] Zhang Y D, Wang Y L, Shen J P, et al. Anti-inflammation and decompression activity of astragaloside N [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1984, 19(5): 333-337.  
 [4] Zhang Y D, Wang Y L, Shen J P, et al. Analgesia and sedation activity of astragaloside N [J]. *J Nanjing Med Univ* (南京医学院学报), 1984, 4(4): 225-227.

## HPLC 法测定草木犀中香豆素

张兴福<sup>1</sup>, 薛艳<sup>2</sup>, 张铁军<sup>2</sup>, 袁丹<sup>1</sup>

(1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 天津药物研究院, 天津 300193)

草木犀为豆科(Leguminosae)草木犀属(*Melilotus* Mill.)一年或两年生草本植物,该属植物全世界约有 20 种,其中黄香草木犀 *M. officinalis* (L.) Desr. 主要分布于温带、亚热带、欧亚大陆及地中海地区,是家畜重要的优质牧草之一,同时民间以叶、花制成软膏,用作外伤药,或煎服用于治疗浮肿、腹痛、疟疾等症<sup>[1]</sup>。具有止咳平喘、清热解毒、解痉止痛、化湿和中的功效<sup>[2]</sup>。我国《部颁标准》、《藏药标准》和《上海市药材标准》有所收载。草木犀中主要有效成分为香豆素(coumarin),目前该成分的定量分析方法主要为紫外分光光度法,薄层扫描法和高效液相色谱法<sup>[3]</sup>。以高效液相色谱法最为简便、快速、准确。因此,本试验建立了一种快速、简便、准确的 HPLC 测定方法,并对不同产地、采收时期及草木犀不同部位中的香豆素进行了测定,对控制草木犀的质量、合理的采收期和资源利用具有理论意义和实用价值。

### 1 材料与仪器

1.1 材料:草木犀分别采自江苏(苗期、成熟期)、天津(军粮城、蓟县、汉沽)、南戴河、内蒙古、青海,经天津药物研究院张铁军研究员鉴定为黄香草木犀 *M. officinalis* (L.) Desr. 和白花草木犀 *M. albus* Desr.。香豆素对照品由 Sigma 公司提供,质量分数

为 99%。乙腈为色谱纯,购自天津市康科德科技有限公司,水为去离子水,用时均过微孔滤膜,其他试剂为分析纯。

1.2 仪器:高效液相色谱仪:DIONEX 液相系统,变色龙色谱工作站;分析柱:天河-C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm, 10 μm)。

### 2 方法及测定结果

2.1 色谱条件:色谱柱为天河-C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm, 10 μm);流动相:乙腈-水-冰醋酸(20:80:1);体积流量为 1.0 mL/min;检测波长为 273 nm,柱温为室温;进样量 20 μL。按外标法测定。色谱图见图 1。

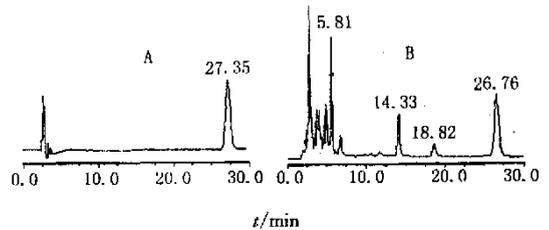


图 1 香豆素对照品(A)及样品(B)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of coumarin reference substance (A) and samples (B)

2.2 对照品溶液的制备:精密称取香豆素对照品 3.22 mg,于 100 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,作为储备液,精密吸取 2 mL,于 10 mL 量瓶中,加

甲醇至刻度。搖勻得對照品溶液,備用。

2.3 供試品溶液的製備:精密稱取生藥葉花和莖粉末(葉花過 40 目篩,莖過 16 目篩)各 1.0 g,加 70% 乙醇 50 mL,水浴加熱回流提取 1 h,放冷,濾過,共提取 2 次,合併濾液,濾液減壓濃縮,殘渣用乙醇溶解並轉移至 50 mL 量瓶中,加乙醇至刻度,搖勻。精密吸取 2 mL,於 10 mL 量瓶中,加乙醇至刻度。經 0.45  $\mu\text{m}$  微孔濾膜濾過,取續濾液即為供試品溶液。

2.4 標準曲線繪制:取香豆素儲備液,精密吸取 0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 於 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度。精密吸取上述各溶液 20  $\mu\text{L}$ ,按上述色譜條件進行分析,以樣品峰面積值為縱坐標(Y),進樣濃度為橫坐標(X)作圖,得回歸方程  $Y = 0.7805X + 0.0214$ ,  $r = 0.99995$ ,結果表明,香豆素在 0.322~16.1  $\mu\text{g/mL}$  呈良好的線性關係。

2.5 穩定性試驗:分別對同一樣品溶液在上述色譜條件下進行分析,分別在放置 0、2、4、8、12 h 時進樣 20  $\mu\text{L}$  測定,峰面積幾乎無變化,葉花的 RSD 值為 0.55% ( $n=5$ ),莖的 RSD 值為 0.97% ( $n=5$ )。結果表明,樣品溶液在 12 h 內穩定。

2.6 精密度試驗:取香豆素對照品溶液,用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔濾膜濾過,取續濾液連續進樣 6 次,RSD 為 1.44%。

2.7 重現性試驗:取南戴河黃香草木犀葉花、莖各 6 份,按 2.3 項下方法製備供試液,按上述色譜條件進行分析,結果表明重現性良好,葉花中香豆素平均質量分數為 0.1837%,RSD 為 1.73%,莖中香豆素平均質量分數為 0.1310%,RSD 為 1.63%。

2.8 回收率試驗:精密稱取已知香豆素量的南戴河黃香草木犀葉花、莖樣品各 9 份,分別精密加入一定量的香豆素對照品溶液,按 2.3 項下方法製備供試液,製成 3 個不同質量濃度的供試液,每個質量濃度分別製備 3 份,按上述色譜條件進行分析,結果表明回收率良好,葉花中平均回收率為 100.73%,RSD 為 1.77% ( $n=9$ ),莖中平均回收率為 99.16%,RSD 為 1.88% ( $n=9$ )。

2.9 樣品的測定:製備各地草木犀供試品溶液,按上述色譜條件進行分析,測得香豆素的量。結果見表 1。

### 3 討論

3.1 在供試品溶液製備過程中,先後採取了超聲提取法,醋酸乙酯提取法和甲醇加熱回流法,70% 乙醇水浴加熱回流提取法。以 70% 乙醇加熱回流提取得香豆素量最高,而且本溶劑無毒,提取條件簡單,易

表 1 不同產地草木犀中的香豆素 ( $n=2$ )

Table 1 Coumarin in *M. officinalis* from various habitats ( $n=2$ )

產地	拉丁名	香豆素/%	
		莖	葉花
江蘇(苗期)	<i>Melilotus officinalis</i>	0.011 1	0.012 2
江蘇(成熟期)	<i>M. officinalis</i>	0.026 4	0.007 1
天津軍糧城	<i>M. officinalis</i>	0.002 3	0.007 2
南戴河	<i>M. officinalis</i>	0.131 0	0.183 7
天津薊縣	<i>M. officinalis</i>	0.143 8	0.066 7
天津漢沽	<i>M. officinalis</i>	0.003 2	0.013 0
內蒙古四子王旗	<i>M. officinalis</i>	0.131 8	0.214 8
青海省西寧市螞蟻溝水庫	<i>M. officinalis</i>	0.032 1	0.107 1
青海省西寧市城北區大卜子	<i>M. officinalis</i>	0.079 1	0.366 3
青海省西寧市 041109	<i>M. officinalis</i>	0.026 5	0.046 6
南戴河	<i>M. albus</i>	0.231 5	0.185 8
青海省互助縣甘溝口	<i>M. albus</i>	0.028 7	0.062 9
青海省西寧市螞蟻溝水庫	<i>M. albus</i>	0.049 4	0.124 3

操作。並進行了提取終點考察,結果表明,提取 2 次,每次 1 h,香豆素已經基本提取完全。第 3 次提取量約為前兩次提取量的 1%,第 4 次提取已無香豆素檢測出。所以提取 2 次,每次 1 h 作為提取終點。

3.2 本法與文獻[3]報道的用紫外分光光度法和薄層掃描法相比具有優越性,用紫外分光光度法測得的香豆素量會偏高,因為樣品提取液中含有其他成分,對紫外吸收有貢獻,最大吸收波長也極為接近,不經進一步分離處理直接測定,結果偏高,而分離中萃取液極易產生操作誤差。而薄層掃描法條件不易控制,操作繁瑣、費時,受儀器及顯色劑的限制,精密度和重現性不好。所以本研究建立的 HPLC 法測定草木犀中香豆素,方法簡便、快速、重現性好、靈敏度高,更適用於實際工作,對進一步開發和利用這一豐富的自然資源具有重要意義和實用價值。

3.3 不同產地和不同採收期草木犀中香豆素的測定結果表明,不同產地的樣品中均含有香豆素,但量差異較大,而且莖、葉花中量相差也較大。採收期對其量也有很大的影響。以 7 月青海省西寧市城北區大卜子黃花草木犀葉中香豆素最高,達 0.3663%,而天津薊縣黃花草木犀莖中香豆素量最高,達 0.1438%。江蘇苗期和成熟期黃花草木犀比較,其中香豆素量變化也較大。這說明香豆素的量受產地和採收季節的影響較大,特別是採收期的影響更大,以花期採收香豆素量最高。

### References:

- [1] Chen L G. Development and utilization of the *Melilotus officinalis* and extraction [J]. *Daily Chem Ind Beijing* (北京日

化), 1996(1): 20-23.

[2] The Chinese Crude Drugs Company. *Resource Introduction of Chinese Medicinal Materials in China* (中国中药资源志要) [M]. Beijing: Science Press, 1994.

[3] Huang J M. Compare the determination methods of coumarin in *Melilotus officinalis* extraction and xiaotouzhi [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 1997, 8(1): 36-38.

# RP-HPLC 法测定不同时期垂柳中木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷

刘可越<sup>1</sup>, 高文远<sup>1\*</sup>, 张铁军<sup>2</sup>, 郑毅男<sup>3</sup>, 陈海霞<sup>1</sup>

(1. 天津大学药学院, 天津 300072; 2. 天津药物研究院 中药现代部, 天津 300193;

3. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118)

垂柳 *Salix babylonica* L. 为杨柳科柳属植物, 《中药大辞典》将垂柳的叶、枝和柳絮收载为中药<sup>[1]</sup>。《本草纲目》中有记载, 柳为本经下品, 其性寒、味微苦, 具有祛风、利尿、止痛、消肿的功能, 可用于治疗风湿痹痛、淋病、白浊、水肿等症<sup>[2]</sup>。现代临床上用于治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病、慢性气管炎、烧烫伤<sup>[1]</sup>。据报道, 柳叶中含有丰富的黄酮类化合物<sup>[3]</sup>, 其次是酚糖苷类化合物<sup>[4-6]</sup>, 还有多糖<sup>[7,8]</sup>、有机酸<sup>[9]</sup>等其他化合物, 其中大多数柳树中均含有木犀草素及其糖苷<sup>[3]</sup>, 其中木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷具有多种药理活性, 如抗生物氧化<sup>[10]</sup>、抗炎、止痉、抗组胺的作用<sup>[11]</sup>, 以及抗癌、抗辐射等诸多生物活性<sup>[12]</sup>。鉴于此, 笔者对垂柳中的木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷进行定量分析, 建立了 RP-HPLC 法测定其量, 并对比了其在不同采收期叶片、枝条及柳絮中的量, 以确定利用此化合物的最佳采收期及采收部位, 为进一步开发垂柳的药用资源提供理论依据。

## 1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪; G1314A (VWD 检测器); Agilent 1100 化学工作站。

木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对照品(中国药品生物制品检验所, 质量分数 99%); 经改造微波炉 (KJ25-B-A) 广州顺德美的微波炉制造; 离心机 (LC10-2.4A) 北京医用离心机厂; 垂柳(由吉林农业大学刘霞教授鉴定) 叶片、枝条(从 2003-5-12—2003-10-12, 每隔 15 d 采样一次, 5、10 月分别为东北地区垂柳刚发叶和落叶时期)、柳絮(2003-5-12) 采于吉林农业大学中草药苗圃 2 年生垂柳; 甲醇、醋酸均为色谱纯。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件: 流动相: 甲醇-水-醋酸 (57.5 : 42.5 : 0.5); 柱温: 30 °C; 体积流量 0.8 mL/min; Agilent C<sub>8</sub> 高效液相色谱分析柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测波长: 254 nm; 进样量 10 μL。色谱图见图 1。

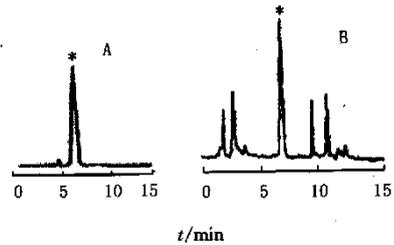


图 1 木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对照品(A)和垂柳醇提物(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of luteolin-7-O-β-D-glucopyranoside (A) and ethanol extract of *S. babylonica* (B)

2.2 供试品溶液的制备: 精密称取粉碎过 40 目筛的不同生长时期的垂柳叶片、枝条及柳絮各 2 g 左右, 用滤纸包成小包, 以 70% 乙醇为溶剂浸泡 10 min, 在改造后的微波炉(设定功率 2 000 W)中提取 40 min, 减压回收溶液, 挥干溶剂。用甲醇-水(1 : 1)溶解残渣, 离心, 沉淀洗涤 3 次, 合并上清液。取上清液于 50 mL 量瓶中, 加甲醇-水(1 : 1)至刻度, 分别取此液 2 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇-水(1 : 1)至刻度, 微孔滤膜滤过, 备用分析。

2.3 对照品溶液的制备: 精密称定木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对照品约 20 mg, 于 100 mL 量瓶中加甲醇-水(1 : 1)适量, 超声 10 min 使溶解, 放冷, 加甲醇-水(1 : 1)稀释至刻度, 精密量取 4 mL