

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。

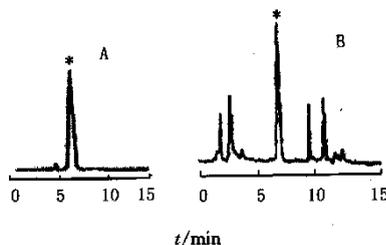


图 1 木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对照品(A)和垂柳醇提物(B)的 HPLC 图谱

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

至20 mL量瓶中,用甲醇-水(1:1)稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4 线性关系考察:分别精密吸取对照品溶液0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,于5 mL量瓶中加甲醇-水(1:1)稀释至刻度,各吸取10 μL进样,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程: $Y = 12\,621X - 14.557$ ,  $r = 0.9997$ ;结果表明:木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷在2~40 μg与峰面积成良好的线性关系。

2.5 精密度试验:精密称取同批垂柳叶粉末约2 g,按样品测定方法操作,连续进样6次,每次进样20 μL,以木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷面积积分值计算,RSD为0.88%。

2.6 稳定性试验:精密吸取同一供试品液,分别放置0.5、9、24、36、48 h进样,测定木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷,RSD为0.92%。

2.7 重现性试验:取同一批垂柳叶6份,分别按供试品溶液制备各项下操作制备供试品溶液,测定木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷,结果RSD为0.83% ( $n=6$ )。

2.8 回收率试验:采用加样回收率法。精密称定已知木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷量的垂柳叶粉末约2 g,精密加入1 mg/mL的木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对照品,按供试品溶液制备法制备,并按上述色谱条件测试,结果平均回收率为99.93%,RSD为1.2% ( $n=6$ )。

2.9 样品测定:每份供试品进样10 μL,按照上述色谱条件测定木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的量,结果见表1。

表1 不同时期垂柳中木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷测定结果( $n=3$ )

Table 1 Luteolin of 7-O-β-D-glucopyranoside in *S. babylonica* at different times ( $n=3$ )

采样日期	木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷/%		
	叶片	枝条	柳絮
05-12	0.721 4	0.321 2	0.083
05-27	0.364 2	0.135 3	—
06-12	0.146 8	0.058 1	—
06-27	0.130 9	0.065 2	—
07-12	0.132 2	0.075 3	—
07-27	0.123 8	0.052 1	—
08-12	0.282 0	0.142 1	—
08-27	0.262 3	0.122 4	—
09-12	0.208 5	0.102 1	—
09-27	0.172 5	0.095 2	—
10-12	0.168 7	0.084 6	—

3.1 试验中采用微波萃取技术对供试品进行前处理,对该提取方法的乙醇体积分数及萃取时间进行了正交考察,确定以70%乙醇为溶媒,萃取40 min时木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷测定值最高,此法效率高,简便易行。

3.2 检测波长的选择:取木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对照品适量,用甲醇-水(1:1)制成含木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷25 μg/mL的溶液,紫外分光光度计于200~400 nm扫描,在254 nm处有最大吸收,以254 nm作为检测波长,进行高效液相色谱分析时,其他组分对木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的测定无干扰,故选定检测波长为254 nm。

3.3 流动相的选择:曾对不同配比的甲醇-水,乙腈-水,甲醇-水-醋酸等流动相及体积流量进行考察,结果表明使用甲醇-水,乙腈-水色谱峰未达基线分离,加入0.5%醋酸后,体积流量0.8 mL/min,效果有很大改善,色谱峰基线分离较好。

3.4 研究发现5月12日垂柳叶中木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷量最高,单体量即可达到0.7214%,鉴于木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的丰富的药理活性,可对垂柳叶进行药用开发,也可考虑作为提取木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的一种植物材料进行大量栽培,最佳采收期在嫩叶时期。叶片中的木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷量均高于柳枝和柳絮,所以利用木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的最佳药用部位为柳叶。

References:

[1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1986.

[2] Li S Z. *Compendium of Herbal* (本草纲目) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982.

[3] Thapliyal R P, Ismaili H. Fatty acids and flavonoids of *Salix linleyana* [J]. *Pharmacol*, 1993, 31(2): 165-166.

[4] Sumio S, Wagner H, Harborne J B, et al. Studies of salireporide [J]. *Bull Inst Phys Chem Res*, 1993, 22: 867-871.

[5] Fukujiro F, Castledine R M. Structure of salireporide [J]. *Pharm Soc*, 1947, 67: 121-122.

[6] Khatoun F, Choppin J. Phenolic glycosides from *Salix babylonica* L. [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(9): 3010-3011.

[7] Toman R, Williams C A, Nesamelyi A. Polysaccharides from the bark of the white willow (*Salix alba* L.) structure of a galactan [J]. *Biol Chem*, 1972, 25(2): 371-378.

[8] Toman R, Chari V M, Markham K R, et al. Polysaccharides from the bark of the white willow (*Salix alba* L.) structure of a xyla I Cellul [J]. *Chem Technol*, 1973, 7(4): 351-357.

[9] Becker H, Choppin J, Bouillant M, et al. Comparative studies of flavonoids and phenylcarboxylic acid of mistletoes from different host trees [J]. *Phytochemistry*, 1980, 97(5): 417-428.

[10] Lu Y R, Wang Q L, Liu X Y, et al. Antioxidant activities of

3 讨论

polyphenols from sage [J]. *Food Chem*, 2001, 75(2): 197-202.  
 [11] Khimiya R, Kafuku K, Hata C. Investigation of chemical composition of *Alchemilla vulgaris* [J]. *Biol Chem*, 2000, 66

(2): 79-85.  
 [12] Richard F, Collins F W, Nagase M. Studies on pharmacological activities of luteolin glucoside [J]. *J Nat Prod*, 1992, 55 (7): 970-973.

## 反相离子对色谱法测定黄杨木中环维黄杨星 D

谢 昀<sup>1</sup>, 于治国<sup>1\*</sup>, 徐新盛<sup>2</sup>, 文艳秋<sup>2</sup>

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 北京中丰天恒医药技术开发有限公司, 北京 100012)

黄杨木是黄杨科植物小叶黄杨 *Buxus microphylla* Sieb. et Zucc. var. *sinica* Rehd. et Wils. 的茎枝, 明代《本草纲目》中已有记载。黄杨木粉是治疗心血管病的有效药物, 其主要活性成分为甙体生物碱环维黄杨星 D (cyclovirobuxium D), 具有行气活血、通络止痛之功效。目前, 环维黄杨星 D 已从黄杨木及其同属植物中提取分离<sup>[1]</sup>, 并与其制剂黄杨宁片一起收载于《中国药典》(2005 年版)。黄杨木中环维黄杨星 D 的测定, 目前尚无文献报道。本实验建立了一种反相离子对液相色谱法, 测定了黄杨木中环维黄杨星 D 的量。

### 1 仪器、试剂与材料

岛津 LC-10ATvp 液相色谱仪, 岛津 SPD-10Avp 紫外检测器, Anastar 色谱工作站, DT-100 光电天平。环维黄杨星 D 对照品(质量分数 99.0%, HPLC-MS 归一化法标定, 北京中丰天恒医药技术开发有限公司提供); 黄杨木(购自浙江, 经沈阳药科大学生药鉴定教研室孙启时教授鉴定); 十二烷基硫酸钠 (Acros Organics, Belgium 公司); 磷酸、三乙胺、氨水、氯仿均为分析纯(北京化工厂); 甲醇、乙腈均为色谱纯(Merk 公司), 水(为二次蒸馏水)。

### 2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Apollo C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 美国奥泰公司); 流动相: 0.005 mol/L 十二烷基硫酸钠溶液(内含 0.15% 三乙胺, 磷酸调节 pH 值至 3.10)-乙腈(54:46); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 203 nm; 柱温: 45 °C; 进样量: 20 μL。在此色谱条件下, 对照品与样品的色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备: 取环维黄杨星 D 对照品约 60 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 用流动相溶

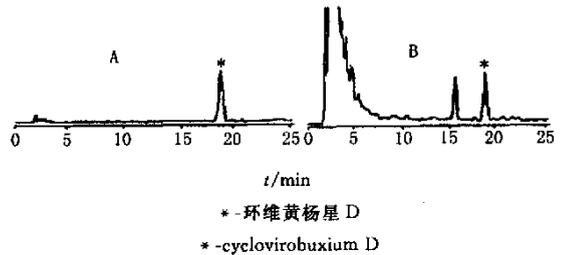


图 1 环维黄杨星 D 对照品(A)和黄杨木(B)的 HPLC 图谱  
 Fig. 1 HPLC chromatograms of cyclovirobuxium D (A) and branch of *B. microphylla*

解并稀释至刻度, 摇匀, 得 1.2 mg/mL 的对照品储备液。精密吸取对照品储备液 2.0 mL, 于 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得 0.24 mg/mL 对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 取黄杨木粗粉约 5.0 g, 精密称定, 置 250 mL 圆底烧瓶中, 加浓氨水 5 mL, 拌匀, 静置 30 min。精密加入氯仿 100 mL, 精密称定, 水浴加热回流 3 h, 放冷, 精密称定, 用氯仿补足质量。滤过, 精密吸取续滤液 50 mL, 水浴蒸干, 残渣用 0.5% 醋酸溶液 10 mL 溶解后, 稀氨水调节 pH 值至 7.0, 分别用氯仿 10 mL、醋酸乙酯 8 mL 萃取, 分离收集水相, 水浴蒸干, 残渣用流动相溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 流动相稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 线性范围考察: 分别精密吸取对照品储备液 (1.2 mg/mL) 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀; 进样 20 μL, 以峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度 (mg/mL) 为横坐标 (X), 用最小二乘法计算, 得线性方程为:  $Y = 9.09 \times 10^5 X + 8.29 \times 10^3$  ( $r = 0.9993$ ), 环维黄杨星 D 在 0.062~0.62 mg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。