

HPLC-DAD 法测定苦碟子中木犀草素 7-O-β-D-葡萄糖苷、木犀草素 7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷和芹菜素 7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷

马思萌, 刘睿, 任晓亮*, 戚爱棣, 李遇伯

天津中医药大学 中药学院, 天津 300193

摘要: 目的 利用 HPLC-DAD 法建立苦碟子中木犀草素 7-O-β-D-葡萄糖苷 (LGCOP)、木犀草素 7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷 (LGCRP) 和芹菜素 7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷 (AGCRP) 的测定方法。方法 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 (0.05%甲酸-水) - (0.05%甲酸-乙腈); 二元梯度洗脱; 检测波长 340 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 °C; 进样量 10 μL。结果 在选定色谱条件下线性关系良好 ($r \geq 0.9999$)。平均回收率分别为 100.5%、100.1%、100.8%, RSD 值分别为 0.4%、0.3%、0.7%。结论 该分析方法能简便、快速地测定苦碟子中黄酮类成分, 可为评价不同产地、药用部位及采收期的药材提供科学依据。

关键词: 苦碟子; 黄酮类成分; 木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷; 木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷; 芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷; HPLC-DAD

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2014)03-0377-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2014.03.012

Determination of luteolin-7-O-β-D-glucopyranoside, luteolin-7-O-β-D-glucuronopyranoside, and apigenin-7-O-β-D-glucuronopyranoside in *Ixeris sonchifolia* by HPLC-DAD

MA Si-meng, LIU Rui, REN Xiao-liang, QI Ai-di, LI Yu-bo

College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish an analysis method for simultaneous determination of luteolin-7-O-β-D-glucopyranoside (LGCOP), luteolin-7-O-β-D-glucuronopyranoside (LGCRP) and apigenin-7-O-β-D-glucuronopyranoside (AGCRP) in *Ixeris sonchifolia* by HPLC-DAD. **Methods** HPLC was carried out on a Diamonsil C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with (0.05% formic acid- water) - (0.05% formic acid - acetonitrile) as mobile phase for two elements of gradient elution. The detection wavelength was set at 340 nm. The injection volume was 10 μL at the flow rate of 1.0 mL/min. The temperature of column was set at 35 °C. **Results** There were good linear relationship of LGCOP, LGCRP, and AGCRP ($r \geq 0.9999$). The average recoveries were 100.5%, 100.1%, and 100.8% with RSD values of 0.4%, 0.3%, and 0.7%, respectively. **Conclusion** The method is convenient, specific, and can be used for the quality control of flavonoids in *I. sonchifolia* from different areas, various medicinal parts, and different harvest.

Key words: *Ixeris sonchifolia* (Bge.) Hance; flavonoids; luteolin-7-O-β-D-glucopyranoside; luteolin-7-O-β-D-glucuronopyranoside; apigenin-7-O-β-D-glu-curonopyranoside; HPLC-DAD

苦碟子 *Ixeris sonchifolia* (Bge.) Hance 为菊科苦苣菜属植物, 具有清热解毒、排脓消肿的功效^[1-2], 临床常用于治疗冠心病、脑梗死等。苦碟子中主要活性成分为腺苷、有机酸和黄酮类物质^[3-5]。黄酮类成分尤以木犀草素 7-O-β-D-葡萄糖苷 (LGCOP)、木犀草素 7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷 (LGCRP) 和芹菜

素 7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷 (AGCRP) 在该植物中含量丰富, 且具有明显扩张冠脉、降低冠脉血管阻力的作用^[6]。随着对苦碟子研究的深入, 亟需建立其相应的质量标准。本实验采用 HPLC-DAD 法对苦碟子中 LGCOP、LGCRP 和 AGCRP 进行测定, 以期为该药材质量标准的建立以及更合理评价该药材

收稿日期: 2013-11-16

基金项目: 国家科技重大专项 (2011ZX09401-305-42); 国家自然科学基金青年基金项目 (81102732)

作者简介: 马思萌 (1988—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药质量控制研究。Tel: 18222706930 E-mail: xiaoanni@126.com

*通信作者 任晓亮 (1980—), 男, 博士, 讲师, 从事药物分析研究。Tel/Fax: (022)59596221 E-mail: xiaoliang_ren@sina.com

质量提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters Alliance 高效液相色谱系统 (包括 2695 Separations Module 四元泵、在线真空脱气机、自动进样器、柱温箱、Waters 2998 Photodiode Array Detector, Empower 色谱工作站); Satorius BT 125D 型十万分之一电子分析天平 (北京赛多利斯公司); KH 2200B 型超声波清洗器 (昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 材料

苦碟子样品分别采于国内各产地, 经天津中医药大学李天祥副教授鉴定为菊科植物苦碟子 *Ixeris sonchifolia* (Bge.) Hance, 标本存放于天津中医药大学中药学院。LGC RP 对照品为本实验室从苦碟子药材中分离、鉴定, 经 HPLC 面积归一化法测定质量分数达 97.0% 以上; LGCOP (批号 20121176, 质量分数大于 98.0%) 购自天津一方科技有限公司; AGCRP (批号 120229, 质量分数大于 98.0%) 购自成都瑞芬思生物科技有限公司。甲醇 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司), 乙腈 (色谱纯, Sigma 公司), 水 (超纯水, 杭州娃哈哈集团公司), 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验

Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 (0.05% 甲酸 - 水) (A) - (0.05% 甲酸 - 乙腈) (B); 二元梯度洗脱: 0~10 min, 80.8% A; 10~15 min, 80.8%~80.3% A; 15~20 min, 66% A; 检测波长 340 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 °C; 进样量 10 μL。在上述色谱条件下对照品溶液和苦碟子药材供试溶液的色谱图见图 1, 各色谱峰与相邻色谱峰能达到基线分离。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取 LGCOP、LGCRP、AGCRP 对照品 7.0、8.0、6.0 mg, 分别置于 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并加至刻度, 作为单一成分的对照品溶液, 待用。分别精密吸取各单一对照品溶液适量, 置于同一 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释成质量浓度分别为 140.0、160.0、120.0 μg/mL 的混合溶液, 超声溶解, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取苦碟子粉末过 250 μm 筛, 精密称取 0.5 g,

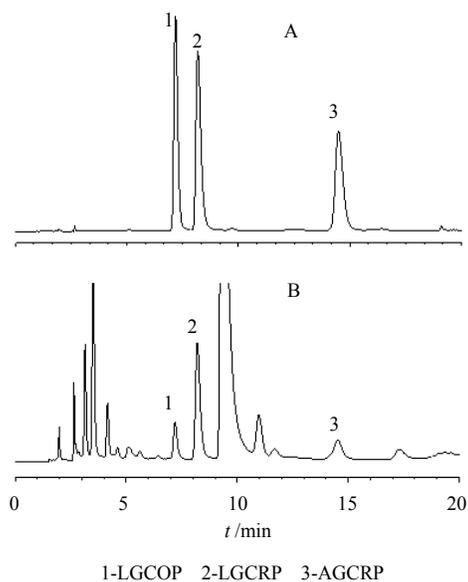


图 1 混合对照品 (A) 和苦碟子样品 (B) 的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substance (A) and *I. sonchifolia* sample (B)

置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 50 mL, 超声提取 30 min, 放冷, 用 70% 甲醇补足减少的质量, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液适量, 置 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 逐级减半稀释并摇匀, 即得系列对照品溶液, 按以上色谱条件进样分析, 并记录峰面积。以进样质量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 以最小二乘法求得回归方程。LGCOP: $Y = 2.185 \times 10^3 X + 9.962 \times 10^3$, $r = 0.9999$, 在 21.88~1400.00 ng 线性关系良好; LGCRP: $Y = 2.119 \times 10^3 X + 5.759 \times 10^3$, $r = 0.9999$, 在 25.00~1600.00 ng 线性关系良好; AGCRP: $Y = 2.322 \times 10^3 X + 4.754 \times 10^3$, $r = 0.9999$, 在 18.75~1200.00 ng 线性关系良好。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 10 μL, 在以上色谱条件下, 重复进样 6 次, 测定各成分的色谱峰面积, 结果表明 LGCOP、LGCRP、AGCRP 的 RSD 值分别为 0.3%、0.3%、0.4%。

2.6 重复性试验

取天津蓟县产苦碟子药材, 平行 6 份, 制备供试品溶液, 进样分析, 每次 10 μL, 测定各成分色谱峰面积, 计算平均质量分数。结果 LGCOP、LGCRP、AGCRP 的平均质量分数分别为 2.042、

10.33、2.681 mg/g, RSD 值分别为 1.1%、1.2%、1.4%。

2.7 稳定性试验

取天津蓟县产苦碟子药材, 制备供试品溶液, 于 0、2、4、6、8、12 h 进样, 按以上色谱条件进样分析, 记录峰面积值, 结果 LGCOP、LGCRP、AGCRP 峰面积的 RSD 值分别为 1.3%、0.7%、1.2%, 结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验

取天津蓟县产苦碟子药材 6 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 700 μg/mL LGCOP 对照品溶液 720 μL, 800 μg/mL LGCRP 对照品溶液 3 200 μL, 600 μg/mL AGCRP 对照品溶液 1 080 μL, 混合均匀并挥干溶剂, 制备供试品溶液, 按以上色谱条件进样分析, 记录 LGCOP、LGCRP、AGCRP 峰面积, 计算回收率, 结果平均加样回收率分别为 100.5%、100.1%、100.8%, RSD 值分别为 0.4%、0.3%、0.7%。

2.9 样品测定

精密称取来源于不同产地的苦碟子药材, 制备供试品溶液, 每个样品平行做 3 份, 进样 10 μL, 在上述色谱条件下测定, 记录峰面积, 按外标法计算各成分的质量分数。不同产地苦碟子药材的相同采收期、相同药用部位(地上部分)的测定结果见表 1。相同采收期采收的苦碟子药材不同药用部位的测定结果见表 2。不同采收期苦碟子药材样品的相同药用部位(地上部分)的测定结果见表 3。

表 1 不同产地苦碟子药材中 LGCOP、LGCRP 和 AGCRP 的测定结果 (n=3)

Table 1 Determination of LGCOP, LGCRP, and AGCRP in *I. sonchifolia* samples from different areas (n=3)

产地	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	LGCOP	LGCRP	AGCRP	总和
天津蓟县	2.042	10.33	2.681	15.05
陕西咸阳	1.871	8.443	3.934	14.25
辽宁海城	1.584	10.40	1.750	13.73
河南信阳	1.321	8.805	2.492	12.62
陕西榆林	1.336	7.802	3.025	12.16
山西永济	1.177	6.546	2.010	9.733
河北保定	0.818	6.799	1.910	9.527
山西长治	0.619	5.700	2.328	8.647
河南安阳	1.356	5.454	1.514	8.324
河南南阳	0.908	3.675	1.225	5.808

表 2 苦碟子药材不同药用部位中 LGCOP、LGCRP、AGCRP 的测定结果 (n=3)

Table 2 Determination of LGCOP, LGCRP, and AGCRP in *I. sonchifolia* samples of various medicinal parts (n=3)

药用部位	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	LGCOP	LGCRP	AGCRP	总和
地上部(天津蓟县)	2.042	10.330	2.681	15.050
地上部(辽宁海城)	1.584	10.400	1.750	13.730
根部(辽宁海城)	未检测到	1.137	0.219	1.357
根部(天津蓟县)	未检测到	0.766	0.234	1.000

表 3 不同采收期苦碟子药材中 LGCOP、LGCRP、AGCRP 的测定结果 (n=3)

Table 3 Determination of LGCOP, LGCRP, and AGCRP in *I. sonchifolia* samples from different harvest (n=3)

采收期	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	LGCOP	LGCRP	AGCRP	总和
天津蓟县(盛花期)	2.042	10.33	2.681	15.05
天津蓟县(末花期)	1.620	8.626	1.895	12.14

为更合理有效地评价苦碟子质量, 本研究比较了来源于 10 个不同产地(在相同采收期, 地上部分)的药材中 LGCOP、LGCRP、AGCRP 的差异, 结果表明不同产地的药材中黄酮差别较大, 其中天津蓟县, 陕西咸阳以及辽宁海城产药材中 3 种黄酮总量较高, 可能与产地的气候差异有关; 选取天津蓟县和辽宁海城在相同采收期的药材来考察不同药用部位黄酮的差别, 结果表明地上部分黄酮的含量远高于根部; 比较了天津蓟县产药材不同采收期的黄酮的差异, 结果表明盛花期黄酮的含量大于末花期。

3 讨论

本研究以苦碟子中 LGCOP、LGCRP 和 AGCRP 的提取总量为指标, 对不同提取方法(冷浸法、超声提取法、回流提取法)、不同比例的甲醇-水和乙醇-水作提取溶剂的提取效果(提取率比较: 70% 甲醇 > 70% 乙醇 > 50% 乙醇 > 50% 甲醇 > 90% 甲

醇>甲醇>90%乙醇>水>乙醇);不同提取时间、提取温度、提取次数进行考察,确定提取方法为:精密称取样品 0.5 g,加入 70%甲醇 50 mL,60 °C 下超声提取 30 min,提取 1 次。

经 DAD 200~400 nm 全波长扫描,分析待测成分的紫外光谱,发现当检测波长为 340 nm 时,待测成分均有较大吸收,检测灵敏度良好,选择 340 nm 为检测波长;分别对甲醇-水、乙腈-水流动相系统以及加入不同浓度甲酸的分离效果进行考察,确定以 0.05%甲酸-水(A)和 0.05%甲酸-乙腈(B)为流动相。分别比较体积流量大小和柱温高低对峰形和分离度的影响,结果显示以体积流量为 1 mL/min、柱温为 35 °C 的条件为宜。

《国家中成药标准汇编》以总黄酮作为苦碟子注射液质量控制的指标,并规定以芦丁为对照,采用分光光度法测定^[7]。由于该法专属性不强,且芦丁并非该植物所含有,测定结果不能准确反映真实的黄酮类成分含量^[8-9]。本实验中,LGCOP、LGCRP 和 AGCOP 既是药材中含量较高的成分,也是活血化瘀、改善微循环的主要活性成分,因此建议将 LGCOP、LGCRP 和 AGCRP 同时作为苦碟子测定的指标成分,并采用 HPLC-DAD 法测定,比紫外分光光度法测定有更高的专属性。

苦碟子开花时(花期 5~7 月),基部叶不枯死,其黄酮类成分的含量随着生长期不同而呈规律性变化。结果表明苦碟子以地上部分 LGCOP、LGCRP、AGCRP 的含量较高,尤以 7 月盛花期最高。与文献报道^[7]该药材常以地上部分入药相一致。由于苦

碟子为多年生草本植物,进入冬季后次生代谢逐渐停止,因此药材来源应以 7 月上中旬的盛花期地上部分为主。生长发育过程是次生代谢产物累积变化的过程,而气候对次生代谢产物的累积有着重要影响,不同地域应该依据不同气候条件,结合物候期化学成分变化规律,制定相应的采收标准。

参考文献

- [1] 高春燕,台立稳.苦碟子的临床应用进展[J].中国误诊学杂志,2008,8(22):5304-5305.
- [2] 陈春光,贾洪丽,吕首旭,等.苦碟子注射液对大鼠急性脑缺血-再灌注损伤的保护作用[J].中国临床药理学杂志,2012,28(3):196-199.
- [3] 高 晟,周 静.苦碟子注射液临床应用研究进展[J].现代药物与临床,2012,27(2):180-184.
- [4] 王彩霞,何晓静,刘玉兰.注射用苦碟子的抗凝与纤溶活性[J].沈阳药科大学学报,2005,22(6):441-443.
- [5] 刘 睿,马思萌,孙 璐,等.HPLC-DAD 法同时测定苦碟子注射液中 10 种核苷类成分[J].中草药,2013,44(18):2542-2546.
- [6] 赵凯鑫,苏 丹,赵雪梅,等.HPLC 法测定苦碟子中木犀草素 7-O-β-D-吡喃葡萄糖醛酸苷的含量[J].药物分析杂志,2010,30(6):1019-1021.
- [7] 国家中成药标准汇编:内科心系分册[S].2002:492.
- [8] 戴锦娜,尹 然,陈晓辉,等.苦碟子化学成分和药理作用研究进展[J].西北药学杂志,2006,21(2):94-96.
- [9] 陈英红,张晓荧,罗浩铭,等.苦碟子提取物中总黄酮含量测定方法的探讨[J].时珍国医国药,2012,23(2):313-314.