

RP-HPLC 测定不同产地不同采集期天山雪莲中绿原酸和芦丁

苏来曼·哈力克, 凯赛尔·阿不拉, 敏 德

(新疆维吾尔自治区药品检验所, 新疆 乌鲁木齐 830002)

天山雪莲为菊科植物雪莲 *Saussurea involucreata* (Kar. et Kir.) Sch.-Bip. 的干燥地上部分, 系维吾尔族习用药材。维吾尔语名称为“塔格来丽斯”, 汉语名称为雪莲或雪莲花, 在我国仅分布于新疆维吾尔自治区天山、阿尔泰山, 海拔2 100~4 100 m 雪先富金石滩石缝中, 国外俄罗斯、蒙古、哈萨克斯坦及吉尔吉斯斯坦也有分布^[1-3]。由于雪莲采挖严重, 数量日益稀少, 已列入国家三级保护植物目录^[4]。天山雪莲能补肾活血, 强筋骨, 温肾助阳, 祛风胜湿, 用于风湿性关节炎、肺寒咳嗽、月经不调、小腹冷痛等病症的治疗^[3-6]。天山雪莲主要含芦丁等黄酮类、紫丁香苷等木脂素类、大苞雪莲内酯等内酯类、大苞雪莲碱等生物碱类、多糖类等化学成分^[7-9]。在薄层色谱实验过程中, 新发现天山雪莲药材含绿原酸, 采用液相-质谱联用仪进一步做了确证试验, 为有效控制新疆不同产地和不同采集期天山雪莲药材质量, 采用反相高效液相色谱法同时测定了绿原酸及芦丁的量。

1 仪器与试剂

岛津 LC-10ATVP 高效液相色谱仪, SPD-M10AVP 二极管阵列检测器, CLASS-VP5.032 色谱工作站。

绿原酸、芦丁对照品(中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110753-200212、0880-9705, 供定量测定用); 甲醇为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

天山雪莲药材: 从产地分别为新疆阜康、巩留、和静、库车、巩乃斯、巴里坤、青河、可可托海、特克斯、尼勒克、乌鲁木齐南山山水西沟(野生和栽培)、奇台(栽培)、塔士库尔干共收集 16 批样品, 经苏来曼·哈力克主任药师与中国科学院新疆生态地理研究所沈观冕研究员鉴定均为菊科植物雪莲 *Saussurea involucreata* Kar. et Kin. Sch.-Bip. (其中产地为塔士库尔干的雪莲经鉴定为绵头雪莲 *S. laniceps* Hand.-Mazz.)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性: 色谱柱为 Inertsil ODS-3 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.4%磷酸(38:62); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 340 nm; 柱温: 40 ℃。在此色谱条件下, 雪莲药材中绿原酸及芦丁的保留时间为 4.9 和 17.0 min, 理论塔板数依次为 5 000、8 000。色谱峰达到完全分离, 绿原酸及芦丁与相邻峰的分度均大于 2 且峰形对称, 绿原酸及芦丁的对称因子分别为 1.11 和 1.06, 见图 1。

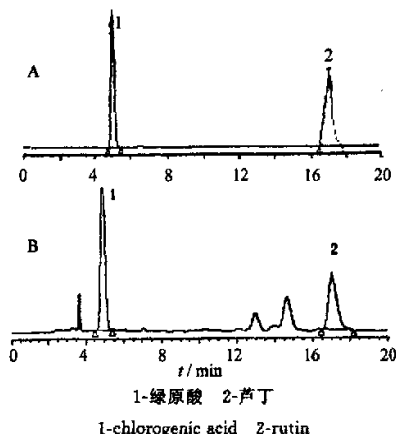


图1 绿原酸及芦丁对照品(A)和雪莲药材色谱图(B)

Fig. 1 HPLC Chromatograms of chlorogenic acid, rutin reference substance (A) and Herba *Saussureae Cum Flore* (B)

2.2 对照品溶液的制备: 分别精密称取 120 ℃减压干燥至恒重的芦丁和绿原酸对照品适量, 加 50% 甲醇制成芦丁 80 μg/mL、绿原酸 60 μg/mL 的混合溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备: 取药材粉末(过 3 号筛)1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 10 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察: 精密称取绿原酸对照品 10.13

收稿日期: 2006-12-17

作者简介: 苏来曼·哈力克(1960—), 维吾尔族, 主任药师, 主要从事中药、维吾尔药材及制剂质量研究。 Tel: (0991)2305956 Fax: (0991)2815314 E-mail: sulayman_hl@hotmail.com

mg 及 120 ℃ 干燥至恒重的芦丁对照品 10.10 mg 置 10 mL 棕色容量瓶中,加 50% 甲醇适量溶解并定容至刻度,摇匀,制成绿原酸 1.013 mg/mL 及芦丁 1.010 mg/mL 的混合储备液,精密吸取此储备液 0.2、0.4、0.6、1.0、1.6、2.0 mL,置 10 mL 棕色量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,摇匀,分别吸取 10 μ L,注入液相色谱仪,记录峰面积,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线。得绿原酸标准曲线回归方程为: $Y = 2\,528\,121.2 X + 18\,457.5$, $r = 0.9997$; 芦丁标准曲线回归方程为: $Y = 1\,601\,126.7 X - 55\,314$, $r = 0.9997$; 结果表明,绿原酸在 0.202 6~2.026 μ g 有良好的线性关系,芦丁在 0.202~2.02 μ g 有良好的线性关系。

2.5 精密度试验:精密吸取芦丁 0.078 8 mg/mL 和绿原酸 0.059 2 mg/mL 的混合对照品溶液,重复进样 5 次,每次 10 μ L,分别测定芦丁和绿原酸的峰面积值,结果绿原酸的 RSD = 1.70%,芦丁的 RSD = 1.22%,显示仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验:取同一样品(产地为巩留)适量,照前述方法制备供试品溶液,室温下放置,每隔 1 h 进样 10 μ L,连续进样 5 次依法测定芦丁和绿原酸的峰面积值,结果芦丁和绿原酸的日内 RSD 分别为 1.41% 和 0.60%; 取同一样品在上述色谱条件下测定,每隔 1 d 测一次峰面积值,连续测定 5 d,结果芦丁和绿原酸的日间 RSD 分别为 1.28% 和 0.30%。表明供试品溶液室温下 5 d 内稳定。

2.7 重现性试验:取上述样品适量,照前述方法分别制备供试品溶液 5 份,照测定法进行测定,结果芦丁平均质量分数为 0.322%, RSD = 1.56%; 绿原酸为 0.476%, RSD = 1.59%, 结果表明本测定方法的重现性良好。

2.8 回收率试验:取供试品适量,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入低、中、高质量浓度的绿原酸对照品溶液 5.0、6.5、7.5 mL (0.502 4 mg/mL),再分别精密加入芦丁对照品溶液 6.0、7.0、8.5 mL (0.336 0 mg/mL),再精密加入 50% 甲醇 39.0、36.5、34.0 mL (均用已标化的 50.0 mL 滴定管),按供试品制备方法制备,上述色谱条件测定,结果绿原酸和芦丁平均回收率分别为 99.80%、98.98%, RSD 分别为 0.91%、2.11%。

2.9 样品测定:分别精密称取 16 批不同产地天山雪莲药材粉末各 1 g,按上述方法测定。测定结果芦丁量为 0.143%~1.448%, 平均 0.466% ($n=16$); 绿原酸质量分数为 0.076%~0.821%, 平均为

0.423% ($n=16$)。乌鲁木齐南山水西沟人工栽培品雪莲叶比较茂盛,芦丁质量分数高达 1.488%, 可能与此有关,因目前雪莲人工栽培品开花成功的较少,还需进一步深入研究。测定结果见表 1。

表 1 天山雪莲药材中芦丁与绿原酸测定结果 ($n=2$)

Table 1 Determination of rutin and chlorogenic acid in *Herba Saussureae Cum Flore*

产 地	采集日期	芦丁/%	绿原酸/%
阜康	2000-08	0.623	0.333
巩留	2001-08	0.351	0.459
库车	2002-07	0.305	0.206
和静	2001-08	0.470	0.300
巩乃斯	2002-07	0.655	0.597
巴里坤	2002-08	0.407	0.582
青河	2002-08	0.172	0.188
可可托海	2002-08	0.187	0.226
特克斯	2003-07	0.408	0.302
尼勒克	2003-08	0.285	0.253
和静	2002-08	0.470	0.300
巩留	2002-08	0.493	0.352
乌市南山	2003-08	0.672	0.492
乌市南山(栽培)	2003-08	1.448	0.613
塔士库尔干(棉头雪莲)	2004-08	0.143	0.076
奇台(栽培)	2004-08	0.355	0.821

3 讨论

3.1 流动相的优化:比较了不同系统和流动相比比例^[10,11],如甲醇-水-乙腈-冰醋酸(30:57.5:10:2.5)、乙腈-[水:磷酸(100:1)](40:60)、甲醇-水-磷酸(50:50:0.2)等,效果不理想,不能同时满足芦丁和绿原酸的很好分离。甲醇-0.4%磷酸溶液的比例经调试,结果 38:62 比例芦丁和绿原酸峰得到较好分离,且保留时间合适。

3.2 检测波长的选择:分别取样品、芦丁及绿原酸对照品,用 SPD-M10A 二极管阵列检测器从 190~370 nm 扫描,结果绿原酸在 327 nm 处有最大吸收,芦丁在 359 nm 处有最大吸收,根据上述检测波长的比较,在 340 nm 处芦丁和绿原酸的峰面积值较理想,故选择 340 nm 为两个成分的同一检测波长。

3.3 供试品提取条件的选择:取供试品适量,分别采用了甲醇、50% 甲醇及 70% 乙醇为提取溶剂进行超声处理,药材中绿原酸和芦丁的量分别为 2.99、4.83、4.50 mg/g 和 2.16、3.12、3.10 mg/g。结果表明用 50% 甲醇作溶剂,绿原酸和芦丁的提取率最高。以 50% 甲醇作为提取溶剂,并按 10、20、30 min 不同时间超声处理,药材中绿原酸和芦丁的量分别为 4.72、4.68、4.74 mg/g 和 3.21、3.12、3.10 mg/g,结果表明 10 min 即能提取完全。

致谢:天山雪莲药材中绿原酸成分的确证试验,在中国药品生物制品检定所中药室完成。

References:

- [1] The Health Bureau of Xinjiang Uighur Autonomous Region. *Xinjiang Herbal Medicine* (新疆中草药) [M]. Urumchi: Xinjiang People's Publishing House, 1975.
- [2] Xinjiang Institute of Biology, Soil and Desert. *Xinjiang Medicinal Plants* (新疆药用植物志) [M]. Urumchi: Xinjiang People's Publishing House, 1977.
- [3] Xinjiang Flora Editing Committee. *Flora of Xinjiang* (新疆植物志) [M]. Vol. 5 Urumchi: Xinjiang Science and Technology Publishing House, 1999.
- [4] Qi K B, Chang H, Ru H. *Dictionary of Endangered and Threatened Animal and Plants in China* (中国珍稀濒危动植物辞典) [M]. Guangzhou: People's Publishing House, 2001.
- [5] Rukiye Sadik. *Materia Medica of Uighur Medicine* (维吾尔医常用药材学) [M]. Kashgar: Xinjiang Health and Science Publishing House, 1993.
- [6] *Drug Standards of Chinese Materia Medica* (卫生部药品标准中药材第一册) [S]. Vol 1. 1991.
- [7] Jia Z J, Li Y, Du M, et al. Studies on chemical constituents of *Saussurea involucreata* (1) [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 1983, 4(5): 581-583.
- [8] Li Y, Jia Z J, Zhu Z Q. Studies on chemical constituents of *Saussurea involucreata* (V) [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 1989, 10(9): 909-912.
- [9] Li J S, Zhu Z Y, Cai S Q. Research progress in chemical and pharmacology studies of *Saussurea involucreata* [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1998, 33(8): 449-452.
- [10] Yu M Q, Chen J M. HPLC Determination of syringin and rutin in 11 different *Saussurea* species [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2001, 19(3): 243-244.
- [11] Chen F K. *Active Constituents Determination of Common Chinese Traditional Herbal Drugs* (常用中草药有效成分含量测定) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1997.

HPLC 法测定高乌头药材中高乌甲素

周军辉, 李 静, 王新莉, 王答祺, 李思峰

(陕西省西安植物园, 陕西省植物研究所, 陕西 西安 710061)

高乌甲素是从毛茛科植物高乌头 *Aconitum sinomontanum* Nakai 根中提取的一种二萜类单体生物碱拉巴乌头碱(lappacontine)。高乌头又名九连环、麻布七、统天袋, 分布于我国西部和中部, 民间用于治疗跌打损伤、风湿、急慢性细胞性痢疾、急慢性肠炎等; 具有镇痛作用^[1-3]、抗心律失常作用^[2]、抗炎作用^[3], 临床上适合癌痛和各种手术后疼痛等中度以上疼痛的治疗, 能够代替阿片类药物控制癌症病人的疼痛, 并可减少阿片类药物所带来的呼吸抑制和成瘾症。关于高乌头药材的质量控制报道极少, 未见应用 HPLC 法测定其中的高乌甲素的报道。通过实验研究, 建立了 HPLC 法测定高乌头药材中有效成分高乌甲素的方法, 结果令人满意, 可以较好地用于高乌头药材的质量控制, 为相关的复方制剂及生药的内在质量控制提供可靠依据。

1 仪器、药材与试剂

1.1 仪器: Waters 515 高效液相色谱仪(包括 Waters 515 泵, Waters 2487 检测器等), N2000 色谱工作站; 天津东康 DS6150 超声波清洗机(频率为 40 kHz, 功率为 150 W)。

1.2 药材与试剂: 高乌头药材由陕西大河药业有限

责任公司提供(为甘肃永登、皋兰等地产商品药材), 均由陕西省植物研究所王答祺副研究员鉴定为毛茛科植物高乌头 *Aconitum sinomontanum* Nakai 的根, 样本保存于陕西省植物研究所。所用高乌甲素对照品(自制)由陕西大河药业有限责任公司提供, 经红外光谱、紫外光谱、¹³C-NMR 和 ¹H-NMR 等方法确定结构, 熔点为 221~223 °C; TLC 检查为单一斑点; 面积归一化法计算质量分数在 99.0% 以上; 高乌头药材粉碎后过 40 目筛, 60 °C 干燥 3 h, 密封保存, 待用。甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为江苏汉邦 Lichrospher C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-0.05 mol/L NaH₂PO₄ 溶液(10:20:70), 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长 252 nm; 柱温 25 °C; 进样量: 10 μL; 理论塔板数按高乌甲素峰计算应不低于 2 000。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取高乌甲素对照品 16.2 mg 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备: 精密称取高乌头粉末 0.500 g, 与 0.1 g 生石灰混合均匀, 置具塞锥形瓶

收稿日期: 2006-12-14

作者简介: 周军辉(1978—), 男, 河南鄢陵人, 硕士, 助理研究员, 主要从事植物化学分离分析与新药开发。 Tel: (029) 85251515

E-mail: zhoujunhui@sohu.com