

HPLC 法测定紫菀中阿魏酸、槲皮素和山柰酚

田亚平, 景秀娟, 徐 磊, 周亚楠, 张兰桐*

(河北医科大学药学院 药物分析教研室, 河北 石家庄 050017)

摘要:目的 建立同时测定紫菀药材中阿魏酸、槲皮素和山柰酚的分析方法。方法 色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温为30℃, 检测波长分别为310、360、365 nm, 进样量20 μL, 流动相为乙腈-0.05%磷酸进行梯度洗脱。结果 阿魏酸、槲皮素和山柰酚分别在0.011~0.277、0.004~0.106、0.006~0.126 mg/mL 呈良好的线性关系。15批药材中阿魏酸、槲皮素和山柰酚质量分数分别为0.15~1.43、0.09~0.36、0.03~1.12 mg/g。结论 本方法操作简便、快速、准确, 适用于紫菀药材3种活性成分的定量测定。

关键词:紫菀; 阿魏酸; 槲皮素; 山柰酚; HPLC

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)06-0926-03

紫菀为双子叶菊科植物紫菀 *Aster tataricus* L. f. 的根及根茎, 为我国传统医药中常用中药材, 性味辛、苦、温, 归肺经, 具有润肺下气、消痰止咳的功效, 可用于痰多喘咳, 新久咳嗽, 劳嗽咳血等。一般认为, 紫菀中含有的三萜皂苷类成分(紫菀酮、木栓酮、表木栓醇)为发挥止咳化痰药效的主要物质^[1,2]。近年来人们又发现紫菀具有抗氧化、止痛、免疫调节等其他生物活性, 而这些生物活性则是由黄酮类成分起作用, 如山柰酚、槲皮素具有明显的抗氧化作用, 在抑止溶血、脂质过氧化物反应和免疫调节方面均有显著作用^[3]。紫菀指纹图谱分析中以槲皮素作为有效成分对色谱峰进行分离, 检出10个共有峰作为定性鉴别, 并对槲皮素进行测定^[4]。紫菀中阿魏酸的量较高, 阿魏酸具有医疗保健等功能如清除自由基、抗血栓、抗菌消炎、抑制肿瘤、防治高血压等^[5]。目前的研究表明, 紫菀抗肿瘤作用也与黄酮和有机酸成分有很大的相关性, 鉴于紫菀新的药用价值, 有必要对该药材的质量进行重新评价, 为此笔者首次采用HPLC法同时测定紫菀药材中3种有效成分的量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂: Waters 1525 高效液相色谱仪, Waters 2487 检测器 (UV), Empower 工作站; SCQ-200 超声波清洗器 (上海声谱超声波设备厂), SZ-93 自动双重纯水蒸馏器 (上海亚荣生化仪器厂)。乙腈为色谱纯 (美国迪马公司), 水为二次重蒸水, 其他试剂均为分析纯。阿魏酸对照品 (批号 111581-200302)、槲皮素对照品 (批号 100081-200406)、山柰酚对照品 (批号 11086-200405)、紫菀

对照药材 (批号 120956-200504) 均由中国药品生物制品检定所提供。

本研究收集了15个不同产地、不同采收期的紫菀药材样品, 晾干。所有采集药品经河北医科大学生药教研室赵丁教授鉴定, 均为合格药材。将样品切成小段, 置烘箱内, 于40℃烘干8h, 取出, 用粉碎机粉碎, 过3号筛, 置干燥器中, 备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件的选择: 采用C₁₈色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 对流动相的组成、配比、体积流量等因素进行分析, 对检测波长进行选择, 确定最佳色谱条件。

2.1.1 流动相系统的选择: 吸取供试品溶液20 μL 进样, 分别以甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.05%甲酸、乙腈-0.05%磷酸溶液等不同浓度、不同比例的流动相系统进行等度和梯度洗脱实验, 比较不同洗脱条件下的色谱图, 选择分离效果好, 时间尽可能短的最佳色谱条件, 最终确定以乙腈-0.05%磷酸溶液进行梯度洗脱, 见表1。

表1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution process of mobile phase

时间/min	体积流量/(mL·min ⁻¹)	乙腈/%	0.05%磷酸/%
0	1	23	77
15	1	50	50
22	1	65	35
25	1	100	0
26	2.5	100	0
30	1	100	0
31	1	23	77

2.1.2 检测波长的选择: 吸取对照品溶液20 μL, 注

收稿日期: 2007-11-12

作者简介: 田亚平 (1983-), 河北保定人, 女, 硕士研究生, 从事中药质量控制与药代动力学研究。

* 通讯作者 张兰桐 Tel: (0311) 86266419 E-mail: zhanglantong@263.net

入 HPLC-PDA 色谱仪,按选定的色谱条件进行分析,得到不同波长下的三维色谱图,对图谱进行比较分析,使各个成分均在最大波长处测定,最终确定波长梯度为 5 min→310 nm、14.9 min→360 nm 和 16 min→365 nm。

2.1.3 柱温的选择:取紫菀粉末适量制备供试品溶液,吸取 20 μ L 注入液相色谱仪,分别于 25、30、35、40 $^{\circ}$ C 条件下按上述色谱条件进行色谱分析,记录色谱图,比较图谱,选择合适的柱温为 30 $^{\circ}$ C。

2.2 供试品溶液制备:本实验比较了水浴回流、索氏提取、超声提取的提取效果,发现超声的提取率和另外两种提取方法相近,但鉴于超声提取简单方便,最终选定超声提取方法。同时还通过正交设计考察了不同提取时间、提取溶剂及溶剂倍数的提取效果差异。结果表明,以 80% 甲醇为提取溶剂,加入 20 倍量溶剂,超声提取 20 min 时,提取率可达最优效果,且方法稳定,重现性好。

取 8 号样品粉末(过 3 号筛)约 1.0 g,精密称定,精密加入 80% 甲醇 20 mL,摇匀,称定质量,超声提取 20 min,取出,放冷,用 80% 甲醇补足质量,摇匀,滤过后高速离心,即得供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备:取阿魏酸、槲皮素和山奈酚对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并稀释成每 1 mL 中含 0.055、0.021、0.032 mg 的溶液,作为对照品溶液。

2.4 系统适用性试验:吸取供试品溶液 20 μ L,注入 HPLC 色谱仪,记录色谱图,在选定色谱条件下阿魏酸、槲皮素和山奈酚的理论板数分别为 4 176、33 367 和 67 548,与其他色谱峰的分离度均大于 1.5。见图 1。

2.5 线性及线性范围:精密称取阿魏酸、槲皮素和

山奈酚对照品适量,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配制成质量浓度分别为 0.277、0.106、0.126 mg/mL 的溶液,作为对照品储备液;分别精密吸取 0.4、1、2、5、10 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。吸取上述系列溶液及储备液各 20 μ L 注入液相色谱仪,测定,记录峰面积。以峰面积为纵坐标质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,经回归处理得回归方程:阿魏酸 $Y=8 \times 10^7 X+206\ 281$, $r=0.999\ 7$,在 0.011~0.277 mg/mL 呈良好的线性关系。槲皮素 $Y=8 \times 10^7 X-36\ 188$, $r=0.999\ 9$,在 0.004~0.106 mg/mL 呈良好的线性关系。山奈酚 $Y=6 \times 10^7 X+22\ 901$, $r=0.999\ 9$,在 0.006~0.126 mg/mL 呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验:取紫菀药材 8 号样品,粉碎,过 3 号筛,取约 1.0 g 精密称定,制备供试品溶液,吸取供试品溶液 20 μ L,注入液相色谱仪,重复进样 6 次,记录峰面积,阿魏酸、槲皮素和山奈酚质量分数的 RSD 分别为 0.27%、0.08% 和 0.11% ($n=6$),表示该方法精密度良好。

2.7 稳定性试验:制备供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 吸取供试品溶液 20 μ L,进样分析并记录峰面积,阿魏酸、槲皮素和山奈酚的峰面积 RSD 分别为 0.35%、0.07% 和 0.17%,表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 重现性试验:平行操作制备供试品溶液 6 份,吸取供试品溶液各 20 μ L,注入液相色谱仪,记录峰面积,阿魏酸、槲皮素和山奈酚质量分数的 RSD 分别为 2.28%、0.88% 和 1.00%,表示该方法重现性良好。

2.9 回收率试验:取紫菀药材 8 号样品约 0.5 g,共 6 份,精密称定,分别精密量取阿魏酸、槲皮素和山奈酚对照品 0.405、0.059、0.143 mg (约相当于 1.00 g 紫菀药材含阿魏酸、槲皮素和山奈酚的 50%),依次加入上述 6 份药材中,制备供试品溶液,吸取上述溶液各 20 μ L,注入液相色谱仪进行分析并记录峰面积,阿魏酸、槲皮素和山奈酚的平均回收率分别为 104.0%、104.5%、100.1%,RSD 分别为 2.17%、1.69%、1.80% ($n=6$)。

2.10 样品测定:取不同来源紫菀药材粉末(过三号筛)各约 1.0 g,精密称定,制备供试品溶液,吸取各溶液 20 μ L,注入液相色谱仪进行分析记录峰面积并计算质量分数,结果见表 2 ($n=3$)。

不同来源的紫菀药材中有效成分的量差别较大,从总体结果看所测 3 种有效成分中山奈酚的量较高,平均质量分数为 1.18 mg/g,为阿魏酸平均量

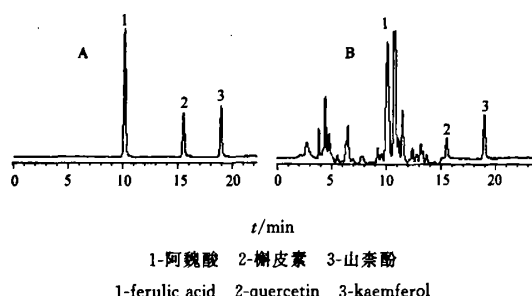


图 1 对照品混合物(A)和紫菀药材提取物(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms reference mixture of reference mixture (A) and *Radix Asteris* extract (B)

表2 15批紫菀药材中3种活性成分的量
Table 2 Contents of three active ingredients
in 15 batches of *Radix Asteris*

样品号	产地	阿魏酸/ (mg · g ⁻¹)	槲皮素/ (mg · g ⁻¹)	山柰酚/ (mg · g ⁻¹)
1	安国张庄	0.44	0.12	0.73
2	安国霸庄	0.53	0.18	0.75
3	安国姬庄(春)	0.47	0.35	1.03
4	安国姬庄(秋)	0.51	0.36	1.10
5	安国姬庄(秋)	0.52	0.32	1.42
6	安国东山基地	0.29	0.27	0.76
7	安国观音堂	0.47	0.09	0.70
8	河北乐仁堂	0.70	0.10	0.29
9	安国城南	0.28	0.28	0.87
10	安国(春)西固	0.21	0.24	1.44
11	中国药品生物制品检定所	0.35	0.32	0.71
12	安徽	0.54	0.31	0.93
13	江西	0.19	0.20	0.64
14	四川	0.70	0.11	0.03
15	广东	1.43	0.23	1.12

的2.5倍、槲皮素平均量的5倍,但具体到不同来源的紫菀药材,也并非全部与总体一致,如河北乐仁堂的紫菀药材中则是阿魏酸的量偏高,山柰酚次之,槲皮素的量最低;另一方面,不同产地紫菀药材中各有效成分的量变化差异较大,阿魏酸、槲皮素和山柰酚的平均质量分数分别为0.15~1.43、0.09~0.36、0.03~1.12 mg/g,尤其是山柰酚的量变化差异最为显著,同一产地的药材因采收时间不同,药材中的成分也会发生变化,但变化不大,因此地域性对于紫菀药材的影响更大一些,如河北安国药材因地域差别不大各成分的量仅略有差别,江西、四川省的紫菀药材中各成分的量差异显著,对药材质量会有一定的影响,因此同时测定以上3种活性成分可以更好地控制紫菀药材质量。

3 讨论

3.1 本实验采用HPLC法同时测定紫菀药材中的阿魏酸、槲皮素和山柰酚,可以更好地控制药材质量,如四川紫菀中阿魏酸的量较高,但另外2种活性

成分的量却很低,如果单一由一种活性物质难以保证药材质量,3种活性成分同时测定则可以更好地对紫菀药材进行质量控制,且实验方法准确可靠,灵敏度高、重现性好。实验所测紫菀药材中3种活性成分阿魏酸、槲皮素和山柰酚均为紫菀中的活性成分,量较高,适于对紫菀药材极性成分进行质量控制;而紫菀中弱极性部分如紫菀酮、表木栓醇、木栓酮等,因不能提取完全,需另选提取方法以达完全提取才能进行测定。

3.2 选用多种提取方法对紫菀药材进行提取,验证了不同酸(盐酸、硫酸及甲酸)及其不同质量浓度对实验结果的影响,实验中发现紫菀药材中芦丁的量微小,故加酸并不能使芦丁水解得到更多的槲皮素;本实验还比较了不同时间对各物质的影响,发现阿魏酸和槲皮素发生降解,提取时间过长会使两者的量降低。

3.3 通过对各对照品储备液在200~400 nm进行紫外扫描,得出各自的紫外吸收曲线,根据相应的出峰时间确定波长梯度,使3种活性成分均在最大吸收波长处测定,使测定结果更加灵敏、准确。

3.4 比较紫菀供试品溶液和对照品储备液的HPLC-PDA图谱,3种活性成分出峰时间一致,且紫外扫描图谱相同,由此可以判断紫菀药材和对照品的HPLC图谱上各个对应的峰为同一物质,而不是单一的由出峰时间进行判断。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 卢艳花,戴岳,王峰涛,等. 紫菀祛痰镇咳作用及其有效部位和有效成分[J]. 中草药, 1999, 30(5): 360-362.
- [3] Ng T B, Liu F, Lu Y H, et al. Antioxidant activity of compounds from the medicinal herb *Aster tataricus* [J]. *Comp Biochem Phys Part C: Toxicol Pharmacol*, 2003, 136(2): 109-115.
- [4] 周军辉,伍蔚萍,谢子民,等. 紫菀药材的高效液相色谱指纹图谱与定量分析[J]. 中药材, 2004, 27(8): 562-565.
- [5] 欧仕益. 阿魏酸的功能和应用[J]. 广州食品工业科技, 2002, 18(4): 50-53.

HPLC法测定紫菀中阿魏酸、槲皮素和山柰酚

作者: [田亚平](#), [景秀娟](#), [徐磊](#), [周亚楠](#), [张兰桐](#)
作者单位: [河北医科大学药学院, 药物分析教研室, 河北, 石家庄, 050017](#)
刊名: [中草药](#) [ISTIC](#) [PKU](#)
英文刊名: [CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年, 卷(期): 2008, 39(6)
被引用次数: 2次

参考文献(5条)

1. [中华人民共和国药典\(一部\)](#) 2005
2. [卢艳花](#); [戴岳](#); [王峥涛](#) [紫菀祛痰镇咳作用及其有效部位和有效成分](#) [期刊论文] - [中草药](#) 1999(05)
3. [Ng T B](#); [Liu F](#); [Lu Y H](#) [Antioxidant activity of compounds from the medicinal herb Aster tataricus](#) [外文期刊] 2003(02)
4. [周军辉](#); [伍蔚萍](#); [谢子民](#) [紫菀药材的高效液相色谱指纹图谱与定量分析](#) [期刊论文] - [中药材](#) 2004(08)
5. [欧仕益](#) [阿魏酸的功能和应用](#) [期刊论文] - [广州食品工业科技](#) 2002(04)

本文读者也读过(10条)

1. [程存归](#), [成则丰](#), [刘幸海](#), [CHENG Cun-gui](#), [CHENG Ze-feng](#), [LIU Xing-hai](#) [紫菀中紫菀酮的微波辅助加压溶剂提取研究](#) [期刊论文] - [中国药学杂志](#) 2006, 41(7)
2. [吴弢](#), [王国艳](#), [俞桂新](#), [谷丽华](#), [王峥涛](#), [胡之璧](#) [HPLC法测定紫菀中紫菀酮的含量](#) [期刊论文] - [中国中药杂志](#) 2003, 28(8)
3. [修彦凤](#), [程雪梅](#), [刘蕾](#), [吴弢](#), [王峥涛](#), [XIU Yan-feng](#), [CHENG Xue-mei](#), [LIU Lei](#), [WU Tao](#), [WANG Zheng-tao](#) [不同紫菀饮片中紫菀酮的含量比较](#) [期刊论文] - [上海中医药大学学报](#) 2006, 20(2)
4. [高文远](#), [张蓉](#), [贾伟](#), [潘力佳](#), [卢宾](#), [郑宗玉](#), [段宏泉](#) [HPLC法测定紫菀中紫菀酮的含量](#) [期刊论文] - [中草药](#) 2003, 34(10)
5. [周军辉](#), [王答祺](#), [孙文基](#) [HPLC法测定不同产地紫菀中槲皮素的含量](#) [期刊论文] - [西北药学杂志](#) 2006, 21(1)
6. [侯海燕](#), [陈立](#), [董俊兴](#), [HOU Hai-yan](#), [CHEN Li](#), [DONG Jun-xing](#) [紫菀化学成分及药理活性研究进展](#) [期刊论文] - [中国药学杂志](#) 2006, 41(3)
7. [杨滨](#), [肖永庆](#), [梁日欣](#), [王若菁](#), [李文](#), [张村](#), [曹莹](#), [王谦鹏](#), [王岚](#), [王永炎](#), [YANG Bin](#), [XIAO Yong-qing](#), [LIANG Ri-xin](#), [WANG Ruo-jing](#), [LI Wen](#), [ZHANG Cun](#), [CAO Ying](#), [WANG Qian-peng](#), [Wang Lan](#), [WANG Yong-yan](#) [紫菀挥发油中祛痰活性化学成分研究](#) [期刊论文] - [中国中药杂志](#) 2008, 33(3)
8. [王国艳](#), [吴弢](#), [林平川](#), [俞桂新](#), [王峥涛](#) [紫菀三萜类化学成分的研究](#) [期刊论文] - [中草药](#) 2003, 34(10)
9. [黄珊珊](#), [高英](#), [李卫民](#), [关红晖](#), [HUANG Shan-shan](#), [GAO Ying](#), [LI Wei-min](#), [GUAN Hong-hui](#) [分光光度法测定紫菀中总三萜类成分的含量](#) [期刊论文] - [时珍国医国药](#) 2008, 19(6)
10. [周军辉](#), [伍蔚萍](#), [谢子民](#), [孙文基](#) [紫菀药材的高效液相色谱指纹图谱与定量分析](#) [期刊论文] - [中药材](#) 2004, 27(8)

引证文献(2条)

1. [白林](#), [徐哲](#), [任犇](#) [HPLC法测定箭羽糖康片中山柰酚的含量](#) [期刊论文] - [中国药物应用与监测](#) 2011(3)
2. [郭伟娜](#), [程磊](#), [牛倩](#) [中药紫菀的本草沿革及现代资源研究现状](#) [期刊论文] - [安徽农业科学](#) 2013(24)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200806042.aspx