

表1 不同产地药材中的猪苓酸 C、去氢土莫酸 (n=3)

Table 1 Polyporenic acid C and dehydrotumulosic acid in *P. cocos* from different habitats (n=3)

| 产地 | 猪苓酸 C<br>(mg·g <sup>-1</sup> ) | RSD<br>/ % | 去氢土莫酸<br>(mg·g <sup>-1</sup> ) | RSD<br>/ % |
|----|--------------------------------|------------|--------------------------------|------------|
| 云南 | 0.191 3 ± 0.001 5              | 0.81       | 0.096 5 ± 0.000 7              | 0.73       |
| 安徽 | 0.225 8 ± 0.001 2              | 0.55       | 0.114 0 ± 0.000 8              | 0.76       |
| 四川 | 0.319 8 ± 0.003 5              | 1.09       | 0.163 2 ± 0.001 3              | 0.77       |
| 浙江 | 0.575 6 ± 0.003 4              | 0.60       | 0.216 7 ± 0.001 7              | 0.77       |
| 河南 | 0.200 3 ± 0.005 6              | 2.84       | 0.114 5 ± 0.000 9              | 0.85       |
| 河北 | 0.188 6 ± 0.004 5              | 2.36       | 0.113 7 ± 0.001 7              | 1.50       |
| 湖南 | 0.283 3 ± 0.003 8              | 1.35       | 0.177 7 ± 0.001 8              | 1.02       |
| 湖北 | 0.263 7 ± 0.002 1              | 0.78       | 0.145 8 ± 0.001 0              | 0.65       |

之,其他几个产地的量相对较低。

3.2 本实验比较了甲醇-含酸水、乙腈-含酸水流动相系统的洗脱情况,结果表明乙腈-含酸水流动相系统明显优于甲醇-含酸水系统,因甲醇-含酸水系统不能实现较好的分离,故选择乙腈-含酸水流动相系统。以乙腈-含酸水为流动相系统,比较了流动相乙腈-0.5%磷酸水(70 30,75 25,80 20)及梯度洗脱的方法,结果表明流动相为70 30洗脱效果较好,故本实验流动相采取乙腈-0.5%磷酸水70 30。

3.3 在样品提取过程中,比较了5种不同提取溶媒

(甲醇、甲醇-5%乙酸、乙醇、乙醇-5%乙酸、5%乙酸水),结果表明甲醇-5%乙酸提取效率高于其他4种溶媒;以甲醇-5%乙酸为提取溶媒,比较了两种不同的提取方法,热回流提取法、超声提取法,结果超声提取法提取率明显高于热回流提取方法;采用超声提取法,分别考察了加入10、20、30 mL 甲醇-5%乙酸的提取效率。结果表明20、30 mL 提取率无明显差异,故提取溶剂量选择20 mL;采用超声提取法,加入20 mL 甲醇-5%乙酸,又分别考察了提取20、30、40 min的提取效率,结果表明提取30、40 min 提取率无明显差别,故提取时间选择30 min。

3.4 本实验测定了8省区主要产地的茯苓中猪苓酸 C 和去氢土莫酸的量,对进一步确定茯苓最佳产地,扩大药用资源具有一定的参考意义。

#### 参考文献:

- [1] 《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1998.
- [2] 金琦,曹静,王淑华. 大剂量茯苓的药理作用及临床应用概况[J]. 浙江中医杂志,2003,38(9):410-411.
- [3] 许津,吕丁,钟启平,等. 茯苓素对小鼠 L1210 细胞的抑制作用[J]. 中国医学科学院学报,1988,10(1):45-49.
- [4] 中国药典[S]. 一部. 2005

## HPLC 法测定青天葵中鼠李柠檬素和鼠李秦素

周燕园,甄汉深,袁叶飞,钟振国,梁臣艳\*

(广西中医学院,广西南宁 530001)

**摘要:**目的 建立青天葵中鼠李柠檬素与鼠李秦素的定量测定方法。方法 运用 HPLC 法测定,色谱柱为 Inertsil ODS-3 C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.4%磷酸水溶液(63 37),体积流量:1.0 mL/min,检测波长:368 nm,柱温:40℃。结果 鼠李柠檬素在 0.2~0.7 μg 线性关系良好( $r=0.999\ 9$ ),平均回收率为 100.04%,RSD 为 1.35% ( $n=6$ )。鼠李秦素在 2.8~9.8 μg 线性关系良好( $r=0.999\ 9$ ),平均回收率为 100.26%,RSD 为 0.78% ( $n=6$ )。结论 本方法简便、快速、准确,可作为青天葵药材的质量控制方法。

**关键词:**青天葵;鼠李柠檬素;鼠李秦素;定量测定;高效液相色谱法

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)07-1152-03

青天葵来源于兰科植物毛唇芋兰 *Nervilia foaidii* (Hance) Schltr.<sup>[1]</sup>,为广西特产药材,具有清肺止咳、健脾消积、镇痛止痛、散瘀消肿、清热解毒之功效,主治肺癆、咳嗽咳血、中毒、跌打损伤、小儿疳积、精神病、口腔炎、急性咽喉炎等症。近年来还

用含有青天葵复方制剂治疗鼻咽癌以缓解症状<sup>[2]</sup>,在目前对青天葵化学成分的研究中<sup>[3~5]</sup>,已分离鉴定出有三萜、氨基酸、甾体、黄酮类化学成分,并显示出有皂苷、有机酸类成分的反应。其中鼠李柠檬素与鼠李秦素是2种重要黄酮类成分,经本课题组

\* 收稿日期:2008-10-20

基金项目:国家自然科学基金地区联合项目(30160095);国家人事部留学回国人员资助项目(人发[2002]99号);广西“新世纪十百千人才工程”资助项目(2001209);广西高校人才小高地建设创新团队资助计划

作者简介:周燕园(1978—),女(回族),湖南祁阳人,讲师,硕士,主要从事中药、药学方面的教学与科研工作,研究方向为天然药物、中药及民族药的质量与成分分析研究。Tel:13217811600 或(0771)2219867(办) E-mail:zhou\_yanyuan@163.com

实验研究表明鼠李柠檬素有抗肿瘤作用<sup>[6]</sup>,且有报道其为治疗慢性气管炎的有效成分<sup>[7]</sup>,具有抗氧化活性<sup>[8,9]</sup>,细胞毒素作用,杀锥虫活性<sup>[10]</sup>;对 PEP(脯氨酰基辅酶)有显著的抑制活性<sup>[8]</sup>。鼠李秦素具有抗氧化活性<sup>[11,12]</sup>,且研究中发现鼠李秦素在青天葵中也有较高的量,可作为控制青天葵质量的一个重要指标。目前,在特征成分的定量测定方面,未收载 HPLC 的测定方法。由于黄酮是青天葵的主要有效成分,且鼠李柠檬素与鼠李秦素在青天葵中的量均较高,因此建立同时测定 2 种黄酮类成分的 HPLC 测定方法,对青天葵药材或制剂的质量标准研究具有很重要的意义。本实验在确定了测定方法后,对不同产地 10 批青天葵药材中的鼠李柠檬素与鼠李秦素进行了定量测定。

## 1 仪器与药材

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)(包括在线脱气、四元泵、柱温箱、自动进样器、二极管阵列检测器、Hp—Chemstation), Agilent 8453 紫外-可见分光光度计(美国安捷伦公司), BP211D 电子分析天平(德国赛多利斯), Simplicity185 超纯水系统(美国 MILLIPORE 公司), SB3200—T 超声清洗器(上海必能信有限公司), LG16—W 离心机(北京医用离心机厂)。青天葵药材经广西中医学院中药研究所刘寿养副教授鉴定为 *Nervilia fordii* (Hance) Schltr. 的全草,干燥、粉碎,过 20 目筛。鼠李柠檬素对照品、鼠李秦素对照品(自制,经 UV、IR、MS、NMR 确证结构,其质量分数均为 98% 以上)。水为超纯水,甲醇(中国医药集团上海化学试剂公司)、乙腈(天津市四友生物医学技术有限公司)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: Inertsil ODS-3  $C_{18}$  (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m) (GL Science Co. Ltd); 流动相: 甲醇-0.4% 磷酸水溶液 (63:37), 体积流量: 1.0 mL/min, 检测波长: 368 nm, 柱温: 40℃。进样量: 10  $\mu$ L。对照品与样品的色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称定鼠李柠檬素对照品 0.40 mg 于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并加至刻度, 使成 40  $\mu$ g/mL 溶液, 得到鼠李柠檬素对照品溶液。精密称定鼠李秦素对照品 5.60 mg 于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并加至刻度, 使成 560  $\mu$ g/mL 溶液, 得到鼠李秦素对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 精密称取青天葵药材粉末 1 g 于 50 mL 具塞三角瓶中, 精密加入 20 mL 75%

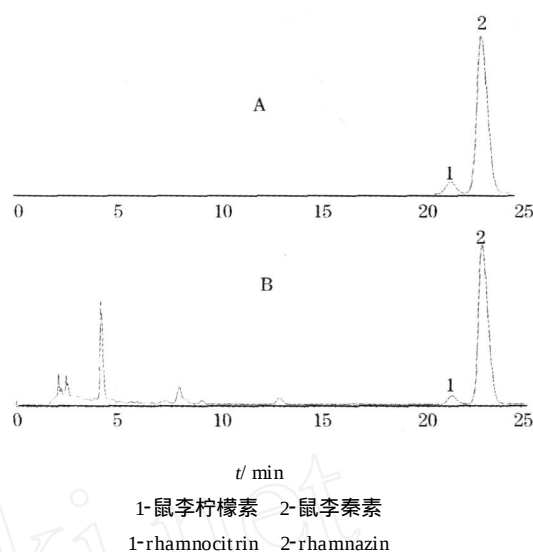


图 1 对照品 (A) 与样品 (B) HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC Chromatograms of reference substance

(A) and *N. fordii* sample (B)

甲醇, 称定质量, 超声提取 1 h, 取出, 冷却后补回原质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 离心, 即得。

2.4 线性关系的考察: 取鼠李柠檬素对照品溶液 5、7.5、10、12.5、15、17.5  $\mu$ L 进样分析, 以峰面积对进样质量作线性回归, 所得回归方程为  $Y = 1979.61456X - 10.230767$ ,  $r = 0.99991$ 。结果表明鼠李柠檬素在 0.2~0.7  $\mu$ g 与峰面积呈良好的线性关系。取鼠李秦素对照品溶液 5、7.5、10、12.5、15、17.5  $\mu$ L 进样分析, 以峰面积对进样质量作线性回归, 所得回归方程为  $Y = 1913.65365X + 32.167478$ ,  $r = 0.99992$ 。结果表明鼠李秦素在 2.8~9.8  $\mu$ g 与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验: 取鼠李柠檬素和鼠李秦素对照品溶液各 10  $\mu$ L 进样, 平行测定 5 次, 计算, 结果鼠李柠檬素和鼠李秦素峰面积的 RSD 值分别为 0.31% 和 0.05%。

2.6 重现性试验: 精密称取同一批青天葵药材(样品 1)粉末 5 份, 每份 1 g, 制备供试品溶液, 分别进样 10  $\mu$ L, 外标法分别计算鼠李柠檬素和鼠李秦素的量, 结果鼠李柠檬素的 RSD 为 0.27%, 鼠李秦素的 RSD 为 0.32%。

2.7 稳定性试验: 精密称定青天葵药材粉末 1 g, 制备供试品溶液, 于 0、6、12、18、24 h 分别进样 10  $\mu$ L, 外标法分别计算鼠李柠檬素和鼠李秦素的量, 结果鼠李柠檬素的 RSD 为 0.31%, 鼠李秦素的 RSD 为 0.33%。结果表明, 供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验: 精密称取同一批青天葵药材粉末 6 份, 每份 0.5 g, 分别精密加入 40  $\mu$ g/mL 鼠

李柠檬素对照品溶液和 560 μg/mL 鼠李秦素对照品溶液各 1 mL,制备供试品溶液,分别进样 10 μL 进行分析,外标法分别计算鼠李柠檬素和鼠李秦素的量。结果鼠李柠檬素的平均加样回收率为 100.04%,RSD 为 1.35%;鼠李秦素的平均加样回收率为 100.26%,RSD 为 0.78%。

2.9 样品测定结果:对采集到的 10 批青天葵药材按供试品溶液制备项下方法制备样品溶液,分别进样 10 μL 测定,外标法计算鼠李柠檬素和鼠李秦素的量。结果见表 1。

表 1 不同产地青天葵中鼠李柠檬素和鼠李秦素的量 (n=3)

Table 1 Determination of rhamnocitrin and rhamnazin in *N. fordii* from various habitats (n=3)

| 编号 | 产地   | 鼠李柠檬素/ % | 鼠李秦素/ % |
|----|------|----------|---------|
| 1  | 广西南宁 | 0.078 70 | 1.119 8 |
| 2  | 广西靖西 | 0.076 82 | 1.235 6 |
| 3  | 广西陆川 | 0.086 12 | 1.352 1 |
| 4  | 广西天等 | 0.077 54 | 1.285 7 |
| 5  | 广西昭平 | 0.066 89 | 1.178 5 |
| 6  | 云南思茅 | 0.041 53 | 2.012 1 |
| 7  | 云南红河 | 0.057 86 | 1.923 1 |
| 8  | 广东   | 0.065 87 | 2.314 5 |
| 9  | 海南   | 0.075 42 | 1.835 2 |
| 10 | 四川   | 0.071 46 | 1.078 5 |

3 讨论

3.1 以鼠李柠檬素和鼠李秦素的峰面积作为考察指标,筛选并确定最佳的提取方式,实验选择了超声提取方式。目前,超声技术广泛应用于中草药有效成分的提取,超声波产生强烈振动、空化效应、搅拌作用等,都可以加速药物有效成分进入溶剂,从而提高提取效率,缩短提取时间,并且免去了高温对提取成分的影响。

3.2 以鼠李柠檬素和鼠李秦素的峰面积作为考察指标,筛选并确定最佳的提取方法,实验考察了甲醇不同体积分数(50%、75%、100%)、甲醇不同体积(10、20、30 mL)和超声不同提取时间(30、60、90 min)对两指标成分的量的影响,以两成分权重 15 1 计算,比较最佳提取条件,结果表明甲醇体积分数

对试验结果影响较大。用 75%甲醇 20 mL 超声提取 60 min,可以获得最佳提取效果。

3.3 鼠李柠檬素和鼠李秦素最大吸收波长分别为 366 和 370 nm,且 368 nm 波长处两物质吸收都很强,为提高检测灵敏度,在同一波长下把两种物质的量同时测出,试验选择 368 nm 作为检测波长。

3.4 不同批药材因产地、采收时间、贮存时间长短等因素不同,量存在差异,须建立统一的药材质量标准。本实验建立了青天葵药材中鼠李柠檬素和鼠李秦素的定量测定方法,为青天葵药材的质量控制规范化、标准化提供了依据。

参考文献:

[1] 广西壮族自治区卫生局. 广西本草选编(下册)[M]. 南宁:广西人民出版社,1974.

[2] 邱志楠,潘俊辉. 青天葵临床新用[J]. 广州医学院学报, 1995,23(2):96.

[3] 黄红兵,朱品业,何丽青. 青天葵的薄层色谱鉴别与总氨基酸含量测定[J]. 中国野生植物资源,2000,18(4):40.

[4] 甄汉深,周燕园,袁叶飞,等. 青天葵乙酸乙酯部位化学成分的研究[J]. 中药材,2007,30(8):942.

[5] 甄汉深,莫绥恒,周燕园,等. 青天葵化学成分定性鉴别的试验研究[J]. 广西中医学院学报,2007,10(1):53.

[6] 甄汉深,周燕园,袁叶飞,等. 青天葵中黄酮类化合物的体外抗肿瘤实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(3):36.

[7] 李富银,梅静如,严青,等. 镰形棘豆总黄酮甙元生产工艺的研究[J]. 中草药,1978,9(11):16.

[8] 沈健,张虎翼,徐波,等. 高良姜中的抗氧化有效成分[J]. 天然产物研究与开发,1998,10(2):33-36.

[9] Nurgul S, Talat M, Amsha Y, et al. Isotamarixen a new antioxidant and prolyl endopeptidase-inhibiting triterpenoid from *Tamarix hispida* [J]. *Planta Med*, 2004, 70(1): 65-67.

[10] Elita S, Antonia R, Tania M A A, et al. Diterpenes from *Alomia myriadenia* (Asteraceae) with cytotoxic and trypanocidal activity [J]. *Phytochemistry*, 2003, 64(6): 1125-1131.

[11] Lee F K, Yun B-S, Kim J-P, et al. Antioxidative compounds isolated from the stem bark of *Eucalyptus globulus* [J]. *Saengyak Hakhoechi*, 1998, 29(3): 163-168.

[12] Yun B-S, Lee F K, Kim J-P, et al. Lipid peroxidation inhibitory activity of some constituents isolated from the stem bark of *Eucalyptus globules* [J]. *Arch Pharm Res*, 2000, 23(2): 147-150.