

检测信号,使得褪黑素主峰与杂质峰清晰分开。

建立 RP-HPLC 的检测方法,可以简便、准确地测定贯叶连翘的褪黑素量,该法测定的贯叶连翘 YXu55 转基因株系的褪黑素量均显著高于 pZP122 转基因株系和未转基因的 CK 植株 (T -检测, $^*P < 0.05$),说明外源褪黑素合成酶基因 AANAT-HI-OMT 的导入和表达,提高了转化植株内源褪黑素的量,同时也为褪黑素功能的研究工作确定了实验材料。

参考文献:

- [1] 宋立人,洪 恂,丁绪亮,等. 现代中药学大辞典 [M]. 上册. 北京:人民卫生出版社,2001.
- [2] Chatterjee S S, Bhattacharya S K, Wonnemann M, et al. Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts [J]. *Life Sci*, 1998, 63(6): 499-503.
- [3] 李 宏,姜怀春,邹国林. 贯叶连翘活性成分研究新进展 [J]. 中草药, 2001, 32(7): 657-660.

- [4] Lerner A B, Takahashi Y, Lee T H, et al. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melatocytes [J]. *J Am Chem Soc*, 1958, 80: 2578-2579.
- [5] 程永炜. 褪黑素对手术病人免疫功能和睡眠质量的影响 [D]. 北京:中国医学科学院,2004.
- [6] Hattori A, Migita H, Ligo M, et al. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates [J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1995, 35: 627-634.
- [7] 刘伟华,张贵友,戴尧仁. HPLC 法测定黄芩叶、花、种子中褪黑激素的含量 [J]. 植物学通报, 2003, 20(1): 75-79.
- [8] 郑灿辉,谢继青,袁 成,等. 褪黑激素制剂含量测定方法概述 [J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(3): 153-155.
- [9] Jacek M, Ewa P, Marek T. On-line preconcentration techniques in determination of melatonin and its precursors/metabolites using micellar electrokinetic chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1104(1-2): 337-345.
- [10] Ayano E, Suzuki Y, Kanezawa M, et al. Analysis of melatonin using a pH- and temperature-responsive aqueous chromatography system [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1156(1-2): 213-219.

PR HPLC 法测定甘肃蚤缀中苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷

雷 宁¹,杜树山²,欧阳捷³,刘丽宏¹,王永炎^{2*}

(1. 中国人民解放军第二炮兵总医院 药剂科,北京 100088; 2. 北京师范大学 教育部资源药物工程研究中心,北京 100088; 3. 北京师范大学 分析测试中心,北京 100875)

摘要:目的 建立 HPLC 法对甘肃蚤缀中苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷同时定量的方法。方法 采用反相高效液相色谱法。色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.5%磷酸梯度洗脱;体积流量为 1.0 mL/min;柱温为 30℃;检测波长为 350 nm;进样量为 10 μL。结果 苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷 5 个化合物达到基线分离且线性关系良好,线性范围分别为 5.44~97.92 μg/mL ($r=0.9992$)、4.76~85.68 μg/mL ($r=0.9992$)、6.52~117.36 μg/mL ($r=0.9996$)、4.92~88.56 μg/mL ($r=0.9998$)、1.60~29.34 μg/mL ($r=0.9991$),平均加样回收率分别为 100.21% (RSD=1.94%)、97.50% (RSD=2.50%)、100.38% (RSD=2.46%)、98.54% (RSD=2.40%)、97.45% (RSD=3.14%)。结论 测定了 4 种来源的甘肃蚤缀样品中 5 个化合物的量,该方法分离度好、快速、简便,重现性佳。

关键词:甘肃蚤缀;苜蓿素;苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯;异牡荆素;异金雀花素;苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)10-1653-03

甘肃蚤缀为石竹科蚤缀属植物甘肃蚤缀 *Arernaria kansuensis* Maxim. 的干燥全草,系传统藏药,其味苦、性寒,具清热利肺、退热止咳之功效。藏医常用于治疗各种肺病、淋巴结核、黄疸、风湿、肾结石以及筋骨疼痛等^[1~3]。现代药理学研究表明,甘肃蚤缀具有抗炎、免疫调节、抗缺氧和肿瘤抑制等作用^[4,5]。早年有研究从甘肃蚤缀中分离得到甙类、

生物碱类和黄酮类化合物。为了寻找其活性成分,研究者曾经对甘肃蚤缀全草 70%乙醇提取物的大孔吸附树脂 50%乙醇洗脱物进行了系统的化学成分研究,发现其含有多种黄酮类化合物,其中苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯和异牡荆素为首次从该植物中得到,且苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯为首次从石竹科植物中分

* 收稿日期:2008-12-14

作者简介:雷 宁(1978—),女,陕西人,博士,主要从事天然药物药效物质基础与质量控制研究工作。

Tel: (010) 66343257 E-mail: lilyzebra@163.com

得^[6-8]。为进一步比较不同来源甘肃蚤缀中的黄酮类化合物,也为今后有效的控制其质量,本实验建立 RP-HPLC 法同时测定 4 种来源的甘肃蚤缀中苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷的方法,有助于甘肃蚤缀这一传统藏药的深入研究和质量控制。

1 仪器与试剂

LC-20A 高效液相色谱仪、SIL-20A 自动进样器、CTO-20A 柱温箱、SPD-20A 紫外检测器、LC Solution 色谱工作站(日本岛津公司);KQ-500V 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);CP225D 型电子天平(德国 Sartorius)。

苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷对照品均为自制,质量分数均大于 98%。乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司),蒸馏水为自制双重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。甘肃蚤缀药材样品共有 4 个来源,其中 3 个分别于 2002 年、2004 年、2005 年购自青海省西宁药市,第 4 个于 2006 年采集自青海巴颜喀拉山口,均由中国科学院西北高原生物研究所卢学峰博士鉴定为石竹科蚤缀属植物甘肃蚤缀 *A. kansuensis* Maxim. 的全草。样品粉碎过 40 目筛,置广口瓶中,于阴凉干燥处密闭保存。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:迪马公司 Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);乙腈-0.5%磷酸为流动相,梯度洗脱:0~40 min, 10%~63%乙腈,40~45 min, 63%~90%乙腈;体积流量为 1.0 mL/min;柱温为 30℃;检测波长为 350 nm。

2.2 对照品溶液的制备:分别精密称取苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷对照品适量,用 80%乙腈溶解并稀释成质量浓度分别为 272.0、238.0、326.0、246.0、320.0 μg/mL 的溶液。

2.3 供试品溶液的制备:取甘肃蚤缀药材粉末 0.5 g,精密称定,置 100 mL 锥形瓶中,加入 80%乙腈 50 mL 称质量,超声提取 60 min,取出放冷,再称定质量,用 80%乙腈补足减失的质量,摇匀,滤过,将滤液回收溶剂至小体积后转移至 25 mL 量瓶中,再加 80%乙腈定容至刻度,即得。

2.4 线性关系考察:分别精密吸取苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素和异金雀花素对照品溶液 2.0 mL、苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷对照品溶液 0.5 mL 置同一 100 mL 量瓶中,加乙腈至刻

度,摇匀,即得苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷质量浓度分别为 5.44、4.76、6.52、4.92、1.60 μg/mL 的对照品混合溶液。精密吸取上述对照品混合溶液 1、3、7、10、13、15、18 μL 进样,测定其峰面积。分别以进样量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准工作曲线并进行回归分析,苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷分别在 5.44~97.92、4.76~85.68、6.52~117.36、4.92~88.56、1.60~29.34 μg/mL 呈良好线性关系。所得回归方程为苜蓿素: $Y = 3.636 \times 10^6 X + 2.862 \times 10^3$, $r = 0.9992$;苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯: $Y = 9.029 \times 10^5 X - 1.183 \times 10^3$, $r = 0.9992$;异牡荆素: $Y = 1.343 \times 10^6 X - 1.505 \times 10^3$, $r = 0.9996$;异金雀花素: $Y = 1.973 \times 10^6 X + 0.561 \times 10^3$, $r = 0.9998$;苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷: $Y = 2.062 \times 10^6 X + 0.297 \times 10^3$, $r = 0.9991$ 。

2.5 精密度试验:精密吸取上述对照品混合溶液 10 μL,在上述色谱条件下重复进样 6 次,以苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷的峰面积计算, RSD 分别为 0.36%、1.79%、0.40%、0.54%、0.61%。

2.6 稳定性试验:分别于 0、2、4、6、8、12 h 取同一供试品溶液进样 10 μL,以苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷的峰面积计算, RSD 分别为 0.48%、2.47%、1.02%、1.08%、1.32%。结果表明该供试品溶液中苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷在 12 h 内稳定。

2.7 重现性试验:取同一来源药材 6 份,按 2.3 项下制备,在上述色谱条件下分析,计算苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷质量分数的 RSD 分别为 1.04%、1.31%、1.17%、0.93%、2.52%。

2.8 回收率试验:分别称取已知质量分数的同一来源甘肃蚤缀药材约 0.25 g,共 6 份,每份分别加入苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷质量浓度分别为 5.44、4.76、6.52、4.92、1.60 μg/mL 的混合对照品溶液 10 mL 制备供试品溶液,进样测定,计算回收率,结果苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘

油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷的平均回收率分别为 100.21%、97.50%、100.38%、98.54%、97.45%，RSD 分别为 1.94%、2.50%、2.46%、2.40%、2.94%。

2.9 样品测定：取所收集的不同来源的甘肃蚤缀干燥药材粉末，按 2.3 项下操作，在上述色谱条件下进

行分析，用外标法计算甘肃蚤缀中苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷的质量分数。测定结果见表 1 (样品 1~3 为西宁药市市售药材，样品 4 为实地采集药材，* 表示超出线性范围)，液相色谱图见图 1。

表 1 4 批不同来源甘肃蚤缀中的苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷测定结果 (n=4)

Table 1 Contents of tricetin, tricetin 4'-O-β-guaiacylglyceryl ether, isovitexin, isoscaparin, tricetin-7-O-β-D-glucopyranoside in samples of *A. kansuensis* from four different habitats (n=4)

编号	来源	异牡荆素/ (mg·g ⁻¹)	异金雀花素/ (mg·g ⁻¹)	苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖 苷/(mg·g ⁻¹)	苜蓿素-4'-O-β-愈创木基 甘油基酯/(mg·g ⁻¹)	苜蓿素/ (mg·g ⁻¹)
1	青海西宁	0.337 2	0.235 3	0.108 4	0.154 3	0.232 4
2	青海西宁	0.208 0	0.187 3	0.065 4	0.182 9	0.212 7
3	青海西宁	0.097 2	0.162 0	0.065 8	0.051 9	0.122 8
4	青海巴颜喀拉山口	0.016 6 *	0.033 3	0.007 5 *	0.033 2	0.065 3

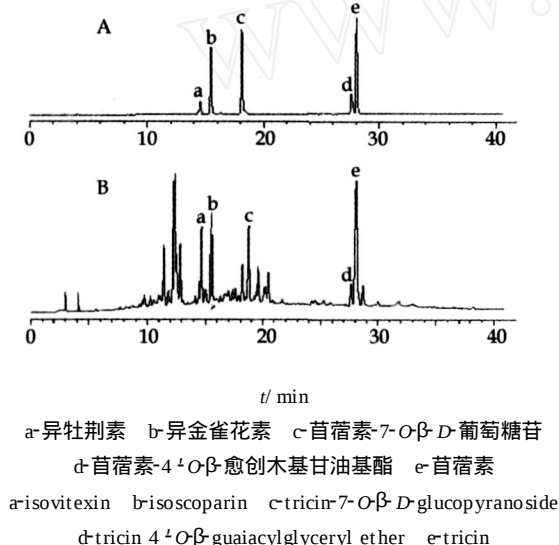


图 1 混合对照品 (A) 和样品 (B) 色谱图

Fig 1 Chromatograms of mixed reference substances (A) and sample (B)

3 讨论

本实验采用 RP-HPLC 法对 4 个甘肃蚤缀样品中的苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷这 5 个化学成分进行测定。结果表明，5 种黄酮类成分中苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷的量普遍较苜蓿素、异牡荆素、异金雀花素的量低；与 3 批市售药材相比较，巴颜喀拉山口实地采集的药材样品中 5 种黄酮类成分的量最低，并且苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷和异金雀花素的量超出线性范围，原因可能与采收季节和采集地点有关；3 批市售药材之间这 5 个化学成分的量差异亦

较大，因此对其进行同时测定很有必要。

根据文献，黄酮类成分在室温下超声的提取效果较佳^[9]。故本研究以苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷为测定指标，采用超声提取法考察了不同体积分数含水的甲醇和乙醇溶液对以上 5 种化学成分的提取效率，结果表明，80%乙醇的提取效果最佳。在固定提取溶剂后，实验考察了提取时间的影响，结果显示上述 5 种化学成分在 60 min 内已经提取完全。因此，本实验确定的最佳提取条件为 80%乙醇溶液超声提取 60 min。

参考文献：

- [1] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志 [M]. 西宁：青海人民出版社，1991.
- [2] 青海省药品检验所，青海省藏医药研究所. 中国藏药 [M]. 第 1 卷. 上海：上海科学技术出版社，1996.
- [3] 肖培根. 新编中药志 [M]. 第 1 卷. 北京：化学工业出版社，2002.
- [4] 彭宝珠，冯利伟，王利彦，等. 藏药雪灵芝对炎症和免疫功能的影响 [J]. 青海医学院学报，1990，2：68-75.
- [5] 苏红卫，徐维光，刘军祥，等. 雪灵芝的抗缺氧作用 [J]. 泸州医学院学报，2002，25(5)：371-374.
- [6] 雷宁，张文生，杜树山. 蚤缀属植物的种群分布、化学及药理研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志，2004，11(10)：929-931.
- [7] 雷宁，杜树山，李林，等. 藏药甘肃蚤缀的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志，2007，32(10)：918-920.
- [8] 雷宁，杜树山，欧阳捷，等. 藏药甘肃蚤缀的化学成分研究 [J]. 北京师范大学学报，2008，44(3)：263-265.
- [9] Escarpa A, Gonzalez M C. Evaluation of high-performance liquid chromatography for determination of phenolic compounds in pear horticultural cultivars [J]. Chromatographia, 2000，51(1/2)：37-43.