

# HPLC 同时测定了哥王中 4 种香豆素的含量

卢雪飞<sup>1,2</sup>, 邓振雪<sup>1</sup>, 魏岚<sup>1</sup>, 佟立今<sup>1</sup>, 孙立新<sup>1\*</sup>

(1. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016)

**[摘要]** 目的: 建立 HPLC 同时测定了哥王中伞形花内酯、西瑞香素-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、triumbelletin、西瑞香素含量的方法。方法: 采用依利特 Hypersil-ODS 色谱柱(4.6 mm  $\times$  200 mm, 5  $\mu$ m), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱, 检测波长 345 nm, 流速 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 柱温 30  $^{\circ}$ C, 进样量 20  $\mu$ L。比较 9 个产地了哥王中 4 种香豆素含量的差异。结果: 伞形花内酯、西瑞香素-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、triumbelletin、西瑞香素线性范围分别为 0.070 ~ 0.770 ( $r = 0.999\ 9$ ), 0.190 ~ 2.09 ( $r = 0.999\ 9$ ), 0.765 ~ 8.42 ( $r = 0.999\ 8$ ), 4.08 ~ 44.9 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> ( $r = 0.999\ 9$ ), 平均回收率分别为 98.0% (RSD 1.9%), 96.6% (RSD 1.2%), 96.5% (RSD 1.7%), 101.3% (RSD 1.1%)。不同产地了哥王中 triumbelletin 和西瑞香素含量明显高于伞型花内酯和西瑞香素-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷, 伞形花内酯和西瑞香素含量差异较小, 西瑞香素-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷和 triumbelletin 含量差异较大, 其中云南产地 2 的西瑞香素-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷含量最高, 四川产地的含量最低; 江西产地的 triumbelletin 含量最高, 云南产地 1、广西产地 3 和贵州产地均未测到 triumbelletin。结论: 该方法简便、快速、准确, 可作为了哥王药材的质量控制方法。

**[关键词]** 了哥王; 高效液相色谱; 伞形花内酯; 西瑞香素-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷; triumbelletin; 西瑞香素; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)20-0042-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013200042

## Simultaneous Determination of Four Coumarins in *Wikstroemia indica* by HPLC

LU Xue-fei<sup>1,2</sup>, DENG Zhen-xue<sup>1</sup>, WEI Lan<sup>1</sup>, TONG Li-jin<sup>1</sup>, SUN Li-xin<sup>1\*</sup>

**[收稿日期]** 20130324(005)

**[基金项目]** 辽宁省科技厅项目(2011412004); 辽宁省高校创新团队支持计划项目(LT 2012018)

**[第一作者]** 卢雪飞, 在读硕士, 从事中药质量控制研究, Tel: 18040014983, E-mail: zylx2010@163.com

**[通讯作者]** \* 孙立新, 教授, 博士, 博士生导师, 从事药物分析研究, Tel: 024-23986365, E-mail: slx04@163.com

黄碱斑点清晰, 无干扰。白芍的定性鉴别虽然斑点大体分开, 但还有待进一步改善。麻黄为该制剂的君药之一, 因而选择盐酸麻黄碱含量作为该制剂的定量指标。通过对提取溶剂、提取时间、溶剂收集量的考察, 同时结合专属性验证, 最后建立了盐酸麻黄碱的定量方法, 并规定其最低含量限度。

### [参考文献]

- [1] 姚琳, 邓康颖, 罗佳波. 麻黄总生物碱与麻黄碱镇咳平喘作用比较研究[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(2): 18.
- [2] 虞金宝, 宋友昕, 陆萍, 等. 洗尔冻洗液薄层鉴别方法的研究[J]. 中国新药杂志, 2001, 10(9): 680.
- [3] 谢卫锋, 高玉珍, 陈莉琳. 感冒滴丸质量标准研究

[J]. 中成药, 2008, 30(8): 1171.

- [4] 王宝琴, 苏健, 韩敏彩, 等. 麻黄及其制剂中麻黄类生物碱的含量测定方法研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 11(3): 274.
- [5] 陈玉祥. 育英颗粒剂的质量标准研究[J]. 中草药, 2001, 32(3): 208.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 553.
- [7] 洪巧瑜. 双龙颗粒药学研究和平喘作用研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
- [8] 郭东艳, 史亚军, 宋道. HPLC 测定复方麻黄止咳颗粒中盐酸麻黄碱的含量[J]. 陕西中医, 2005, 26(4): 373.

[责任编辑 全燕]

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**[ Abstract ] Objective:** To establish a reversed-phase high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of 4 coumarins (umbelliferone, daphnoretin-7-*O*- $\beta$ -*D*-glucoside, triumbelletin and daphnoretin) in *Wikstroemia indica*. **Method:** Chromatographic separation was performed on an Elite Hypersil-ODS column (4.6 mm  $\times$  200 mm, 5  $\mu$ m) with a gradient elution of acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution as mobile phase, UV detection wavelength was set at 345 nm, flow rate was 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, column temperature was maintained at 30  $^{\circ}$ C and injection volume was 20  $\mu$ L. Difference of four coumarins in *W. indica* from nine regions was compared. **Result:** All the standard compounds showed a good linearity in the range of 0.070-0.770 ( $r = 0.999\ 9$ ), 0.190-2.09 ( $r = 0.999\ 9$ ), 0.765-8.42 ( $r = 0.999\ 8$ ), 4.08-44.9 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> ( $r = 0.999\ 9$ ) for umbelliferone, daphnoretin-7-*O*- $\beta$ -*D*-glucoside, triumbelletin and daphnoretin, respectively. Under these conditions, the average recoveries of these four coumarins were 98.0%, 96.6%, 96.5%, 101.3%, respectively and RSD were 1.9%, 1.2%, 1.7%, 1.1%, respectively. Contents of triumbelletin and daphnoretin were significantly higher than umbelliferone and daphnoretin-7-*O*- $\beta$ -*D*-glucoside in *W. indica* from nine regions, difference between umbelliferone and daphnoretin was small, but difference between daphnoretin-7-*O*- $\beta$ -*D*-glucoside and triumbelletin was big, the content of daphnoretin-7-*O*- $\beta$ -*D*-glucoside was highest from Yunnan region2, Sichuan region was the lowest; The content of triumbelletin was highest from Jiangxi origin, but this ingredient was not detected from Yunnan region1, Guangxi origin3 and Guizhou origin. **Conclusion:** This developed method was accurate, sensitive and reproducible, it could be successfully applied to quality control of *W. indica*.

**[ Key words ]** *Wikstroemia indica*; HPLC; umbelliferone; daphnoretin-7-*O*- $\beta$ -*D*-glucoside; triumbelletin; daphnoretin; content determination

了哥王始载于《岭南采药录》,盛产于广东、浙江、广西等地,具有清热解毒、消肿散结、止痛等功效<sup>[1-2]</sup>。药理研究证实了哥王具有显著抗肿瘤活性<sup>[3-4]</sup>,其主要化学成分包括香豆素类、黄酮类、木脂素类等。目前,了哥王中西瑞香素<sup>[5]</sup>、伞形花内酯<sup>[6]</sup>、挥发油类成分<sup>[7]</sup>、微量元素<sup>[8]</sup>的含量测定已见发表,但尚未见对于了哥王中西瑞香素-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷和 triumbelletin 含量测定的报道。本实验拟建立 HPLC 同时测定了哥王中 4 种香豆素的含量,并比较不同产地了哥王中 4 种成分的含量差异,为其质量评价提供依据。

## 1 材料

LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津,包括 LC-20AT 二元泵,SPD-20A 型紫外-可见检测器,LC solution 工作站),QE100 型药材粉碎机(浙江省武义县屹立工具有限公司),TG332A 型分析天平(湖南长沙湘仪天平仪器厂)。伞形花内酯对照品(天津马克生物技术有限公司,批号 20120308,纯度 > 99%),西瑞香素-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、triumbelletin、西瑞香素对照品(自制,经波谱分析鉴定结构,HPLC

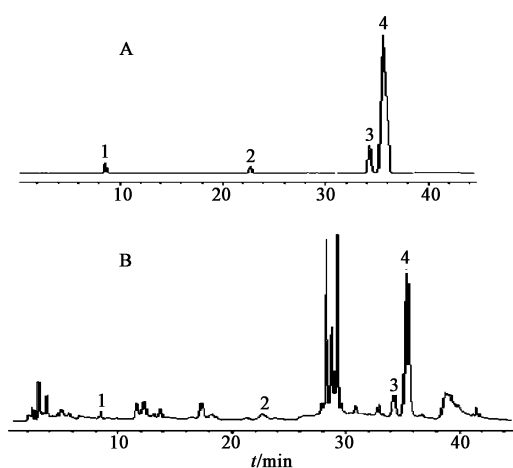
测得纯度 > 98.5%),甲醇、乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为市售分析纯。9 批了哥王药材分别购于云南、广西、四川等地,由沈阳药科大学孙启时教授鉴定为瑞香科茺花属植物了哥王 *Wikstroemia indica* (L.) C. A. Mey. 的干燥根。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件及系统适用性试验** 依利特 Hypersil-ODS 色谱柱(4.6 mm  $\times$  200 mm, 5  $\mu$ m),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 18% A; 6 ~ 20 min, 20% A; 23 ~ 33 min, 30% A; 34 ~ 39 min, 50% A; 41 ~ 45 min, 18% A),流速 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>,检测波长 345 nm,柱温 30  $^{\circ}$ C,进样量 20  $\mu$ L。在上述色谱条件下,伞形花内酯、西瑞香素-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、triumbelletin、西瑞香素的理论塔板数均 > 3 000,与相邻峰间的分离度均 > 1.5,色谱峰对称因子均在 0.95 ~ 1.05,见图 1。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液** 取伞型花内酯、西瑞香素-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、triumbelletin、西瑞香素对照品适量,精密称定,分别置于 25, 100, 25, 25 mL 量瓶中,



A. 对照品; B. 供试品; 1. 伞形花内酯;

2. 西瑞香素-7-O-β-D-葡萄糖苷; 3. triumbelletin; 4. 西瑞香素

图 1 了哥王 HPLC

用 80% 甲醇水溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成质量浓度分别为 70.00, 15.80, 85.0, 204.2 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品储备液。分别精密量取上述对照品储备液 0.50, 6.0, 4.5, 10 mL 置于 25 mL 量瓶中, 用 80% 甲醇水溶液稀释至刻度, 摇匀, 制成质量浓度分别为 1.400, 3.792, 15.30, 81.68 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品储备液。

**2.2.2 供试品溶液** 取了哥王干燥药材细粉(60 目筛)约 0.7 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇水溶液 30 mL, 密塞, 精密称定质量, 超声处理 45 min, 放冷, 称定质量, 用提取溶剂补足失重, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

**2.3 线性关系考察** 分别精密量取混合对照品储备液 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5 mL 于 10 mL 量瓶中, 用 80% 甲醇水溶液稀释至刻度, 摇匀, 得系列混合对照品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得伞形花内酯、西瑞香素-7-O-β-D-葡萄糖苷、triumbelletin、西瑞香素的回归方程分别为  $Y = 8.348 \times 10^4 X - 3.292 \times 10^2$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y = 7.291 \times 10^4 X - 2.776 \times 10^3$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y = 7.203 \times 10^4 X + 2.899 \times 10^2$  ( $r = 0.9998$ ),  $Y = 8.024 \times 10^4 X - 1.620 \times 10^4$  ( $r = 0.9999$ ), 线性范围分别为 0.070 ~ 0.770, 0.190 ~ 2.09, 0.765 ~ 8.42, 4.08 ~ 44.9 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.4 检测限与定量限的确定** 分别将伞形花内酯、西瑞香素-7-O-β-D-葡萄糖苷、triumbelletin、西瑞香素对照品溶液稀释成不同质量浓度进行 HPLC 分析, 测得检测限 ( $S/N = 3$ ) 分别为 3.5, 7.9, 8.5,

4.1 μg·L<sup>-1</sup>, 定量限 ( $S/N = 10$ ) 分别为 7.0, 15.8, 21.3, 10.2 μg·L<sup>-1</sup>。

**2.5 精密度试验** 精密吸取同一混合对照品溶液 20 μL, 按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算伞型花内酯、西瑞香素-7-O-β-D-葡萄糖苷、triumbelletin、西瑞香素峰面积的 RSD 分别为 0.88%, 0.56%, 1.1%, 0.31%, 表明仪器精密度良好。

**2.6 稳定性试验** 取供试品溶液, 室温下放置, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 进样测定, 结果伞型花内酯、西瑞香素-7-O-β-D-葡萄糖苷、triumbelletin、西瑞香素峰面积的 RSD 分别为 1.9%, 2.3%, 1.9%, 1.8%, 表明供试品溶液于室温 24 h 内稳定。

**2.7 重复性试验** 取同一批次的了哥王细粉适量, 按 2.2.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按 2.1 项下色谱条件测定, 测得伞型花内酯、西瑞香素-7-O-β-D-葡萄糖苷、triumbelletin、西瑞香素的平均质量分数分别为 0.011, 0.044, 0.272, 1.26 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 分别为 1.3%, 1.5%, 1.2%, 1.3%, 表明该方法重复性良好。

**2.8 加样回收率试验** 取已知含量的同批次了哥王细粉约 0.35 g (伞型花内酯、西瑞香素-7-O-β-D-葡萄糖苷、triumbelletin、西瑞香素平均质量分数分别为 0.011, 0.044, 0.272, 1.26 mg·g<sup>-1</sup>), 共 9 份, 精密称定, 分别加入低、中、高 3 个质量浓度的对照品溶液 (分别相当于药材原有含量的 80%, 100%, 120%), 每一质量浓度取 3 份, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 测定, 记录色谱图, 计算回收率, 结果平均回收率分别为 98.0%, 96.6%, 96.5%, 101.3%, RSD 分别为 1.9%, 1.2%, 1.7%, 1.1%, 表明该方法准确度良好。

**2.9 样品测定** 取 9 个产地的了哥王干燥细粉约 0.7 g, 精密称定, 分别按 2.2.2 项下方法平行制备供试品溶液 3 份, 测定, 计算伞型花内酯、西瑞香素-7-O-β-D-葡萄糖苷、triumbelletin、西瑞香素含量, 结果见表 1。表明了哥王中 triumbelletin 和西瑞香素含量明显高于伞型花内酯和西瑞香素-7-O-β-D-葡萄糖苷; 不同产地的了哥王中伞形花内酯和西瑞香素含量差异较小, 而西瑞香素-7-O-β-D-葡萄糖苷和 triumbelletin 含量差异较大, 其中云南产地 2 的西瑞香素-7-O-β-D-葡萄糖苷含量最高, 四川产地的含量最低; 江西产地的 triumbelletin 含量最高, 而云南产地 1、广西产地 3 和贵州产地均未测到 triumbelletin。

表1 不同产地了哥王中4种香豆素的含量测定( $n=3$ )

| No. | 药材产地 | 伞形花内酯                                    |           | 西瑞香素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷                |           | triumbelletin                            |           | 西瑞香素                                     |           |
|-----|------|--|-----------|--|-----------|--|-----------|--|-----------|
|     |      | 平均含量<br>$/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ | RSD<br>/% | 平均含量<br>$/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ | RSD<br>/% | 平均含量<br>$/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ | RSD<br>/% | 平均含量<br>$/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ | RSD<br>/% |
| 1   | 云南1  | 5.843                                    | 1.8       | 23.37                                    | 1.8       | -  | 1.7       | 889.0                                    | 1.5       |
| 2   | 云南2  | 15.55                                    | 1.9       | 235.3                                    | 1.7       | 169.3                                    | 1.6       | 1516                                     | 1.5       |
| 3   | 广西1  | 10.80                                    | 1.6       | 44.00                                    | 2.0       | 272.0                                    | 0.6       | 1260                                     | 1.4       |
| 4   | 广西2  | 6.197                                    | 2.0       | 67.79                                    | 1.7       | 351.7                                    | 1.2       | 1572                                     | 0.7       |
| 5   | 广西3  | 10.28                                    | 1.2       | 183.8                                    | 1.7       | -  | 2.2       | 1462                                     | 1.7       |
| 6   | 四川   | 6.528                                    | 0.7       | 22.40                                    | 1.1       | 170.8                                    | 2.1       | 744.4                                    | 1.9       |
| 7   | 江西   | 9.547                                    | 0.8       | 38.60                                    | 1.0       | 426.7                                    | 0.8       | 1058                                     | 0.9       |
| 8   | 湖南   | 11.26                                    | 2.0       | 25.60                                    | 1.7       | 234.6                                    | 1.3       | 1476                                     | 1.6       |
| 9   | 贵州   | 16.85                                    | 2.0       | 35.50                                    | 1.2       | -  | 1.8       | 1729                                     | 1.9       |

注:“-”表示未检出。

### 3 讨论

分别取适宜质量浓度的4种香豆素对照品溶液在200~400 nm处进行紫外扫描,结果在345 nm处4种香豆素均存在较大紫外吸收,进行HPLC检测时,该波长下干扰小,待测组分达到基线分离,重复性良好,故选择检测波长345 nm。

预试验考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%冰醋酸水溶液等流动相系统,结果显示以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相时分离度及峰形均能达到较好效果,同时在流动相中加入四氢呋喃并未明显改善分离效果,故确定以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相系统进行梯度洗脱。

分别选择无水乙醇及体积分数为25%,50%,75%,80%,90%,100%的甲醇为提取溶剂,采用超声法提取了哥王中4种香豆素成分,结果表明乙醇提取物的色谱峰干扰较严重,故不予采用;80%甲醇提取物中待测成分的含量均较高。以80%甲醇为提取溶剂比较加热回流法和超声法,结果超声法的提取率较高。以80%甲醇为提取溶剂,超声处理30,45,60 min,结果表明超声45 min时样品中待测成分已基本提取完全。

与参考文献中数据进行对比<sup>[6,9]</sup>,了哥王中伞形花内酯和西瑞香素平均质量分数分别约降低了10.3倍,原因可能与药材的产地、生长环境等因素

有关。

### [参考文献]

- [1] 张庆荣,夏光成.有毒中草药彩色图鉴[M].天津:天津科技翻译出版公司,2006:131.
- [2] 谢宗万.全国中草药汇编.上册[M].2版.北京:人民卫生出版社,1996:10.
- [3] 陈扬,李艳春,马恩龙,等.了哥王抗肿瘤活性部位筛选[J].中华中医药学刊,2008,26(11):2520.
- [4] 陈扬,孙立新.中药了哥王研究进展[J].沈阳药科大学学报,2009,26(7):587.
- [5] 李艳敏,姜建国,曾治平.了哥王中西瑞香素含量的HPLC法测定[J].现代食品科技,2009,25(5):563.
- [6] 刘丽霞,赵挺,孙立新.HPLC法测定中药了哥王中伞形花内酯的含量[J].沈阳药科大学学报,2010,27(7):563.
- [7] 梁勇,林德球,郭宝江,等.了哥王挥发油的化学成分分析[J].精细化工,2005,22(5):357.
- [8] 熊友香,尤志勉,卢智玲,等.不同产地了哥王药材中微量元素含量测定[J].江西中医药,2009,40(3):54.
- [9] 熊友香,王显武,尤志勉,等.HPLC测定不同产地了哥王药材中西瑞香素含量[J].中成药,2009,31(8):附18.

[责任编辑 仝燕]