

HPLC 同时分析山蜡梅叶中 4 种有效成分的含量

崔小弟, 李梦杰, 周斌*, 李洁, 程丹, 郑鹏武
(江西科技师范大学药学院, 南昌 330013)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 同时测定山蜡梅叶中 4 种有效成分的含量。方法: 采用依利特 hypersil ODS2 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 344 nm, 柱温 40 °C。结果: 东莨菪内酯在 5.665 ~ 56.65 mg·L⁻¹ 线性关系良好 ($r=0.9999$), 平均回收率为 97.06%, RSD 1.62% ($n=6$), 异嗪皮啶在 2.431 2 ~ 24.312 mg·L⁻¹ 线性关系良好 ($r=0.9999$), 平均回收率为 102.86%, RSD 0.93% ($n=6$), 滨蒿内酯在 2.444 ~ 24.44 mg·L⁻¹ 线性关系良好 ($r=0.9999$), 平均回收率为 102.18%, RSD 1.81% ($n=6$), 芦丁在 9.012 ~ 90.12 mg·L⁻¹ 线性关系良好 ($r=0.9992$), 平均回收率为 104.44%, RSD 4.2% ($n=6$)。结论: 方法操作简便, 结果准确, 重复性好, 可用来控制山蜡梅药材的质量。

[关键词] 山蜡梅; 东莨菪内酯; 异嗪皮啶; 芦丁; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0085-03

[doi] 10.11653/syfy2013160085

Simultaneous Determination of Four Active Compounds in *Chimonanthus nitens* by HPLC

CUI Xiao-di, LI Meng-jie, ZHOU Bin*, LI Jie, CHENG Dan, ZHENG Peng-wu
(School of Pharmacy, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China)

[Abstract] **Objective:** To set up the method for simultaneous determination of four active compounds in *Chimonanthus nitens* by HPLC. **Method:** The chromatography separation was performed on the Elite hypersil ODS2 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with gradient elution. The mixture of acetonitrile and water as the mobile phases at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ was used, the detective wavelength was set at 344 nm and the column temperature was kept at 40 °C. **Result:** The calibration curve was linear in the range of 5.665-56.65 mg·L⁻¹ for scopoletin ($r=0.9999$), the average recovery was 97.06% and RSD was 1.62%. The calibration curve was linear in the range of 2.431 2-24.312 mg·L⁻¹ for isofraxidin ($r=0.9999$), the average recovery was 102.86% and RSD was 0.93%. The standard curve presented a linear range from 2.444-24.44 mg·L⁻¹ for scoparone ($r=0.9999$), the average recovery was 102.18% and RSD was 1.81%. The standard curve presented a linear range from 9.012-90.12 mg·L⁻¹ for rutin ($r=0.9992$), the average recovery was 104.44% and RSD was 4.2%. **Conclusion:** The method is available with a good reproducibility, sensitive and simple and could be used to control the quality of *C. nitens*.

[Key words] *Chimonanthus nitens*; scopoletin; isofraxidin; rutin; HPLC

山蜡梅为我国特有的蜡梅科蜡梅属植物, 药用部位为其干燥的叶, 主要分布于江西德兴、婺源和安徽徽州一带山区, 又名香风茶、毛山茶、岩马桑等, 当

地民间习惯用其叶泡茶治疗感冒。药理研究表明, 山蜡梅叶具有清凉排毒、防抗感冒、防暑解暑、消脂降压、预防心脑血管等疾病的作用^[1], 其化学成分

[收稿日期] 20130119(004)

[基金项目] 江西省教育厅项目(12750); 江西科技师范大学校级科研项目(Ky2012zy17)

[第一作者] 崔小弟, 硕士研究生, 从事中药及天然药物活性成分研究, Tel:13657084206, E-mail:13657084206@163.com

[通讯作者] *周斌, 副教授, 博士, 从事天然药物活性成分研究, Tel:0791-83805385, E-mail:tju_zhoubin@163.com

主要有挥发油、生物碱、黄酮类^[2]、香豆素类等^[3]。目前对山蜡梅的质量控制研究报道很少^[4],为了更好的控制山蜡梅药材及其产品的质量,本文在前期研究的基础上^[5],建立 HPLC 同时测定山蜡梅叶中 4 种有效成分含量的方法。

1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪,在线脱气机(G-1332A),高压二元泵(G-1312A),二极管阵列检测器,Agilent 1100 series 色谱工作站(美国安捷伦科技公司),自动进样器(G-1313A),智能化柱温箱(G-1316A),KQ-200VDE 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司),XS205 型电子分析天平(Mettler Toledo 0.01mg)。

东莨菪内酯对照品(批号 20110801)、异嗪皮啶对照品(批号 20111024)购自上海源叶生物科技公司,滨蒿内酯对照品(批号 11511-201102)购自中国食品药品检定研究院,芦丁对照品(批号 100080-200707)购自中国药品生物制品检定所,山蜡梅采自江西婺源地区,经江西中医药大学药学院邓可众副教授鉴定为山蜡梅 *Chimonanthus nitens* Oliv.,乙腈和甲醇为色谱纯,购自天津市大茂化学试剂厂,水为超纯水,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

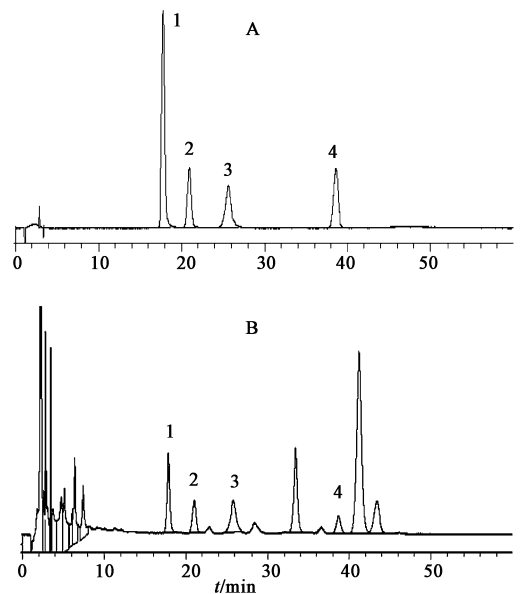
2.1 色谱条件 Elite hypersil ODS2 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0 ~ 26 min, 12% A; 26 ~ 28 min, 12% ~ 13.5% A; 28 ~ 40 min, 13.5% A; 40 ~ 45 min, 13.5% ~ 12% A; 45 ~ 60 min, 12% A),柱温 40 °C,检测波长 344 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹。对照品和样品的色谱图见图 1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取东莨菪内酯、异嗪皮啶、滨蒿内酯和芦丁各 11.33, 10.13, 12.22, 15.02 mg 分别置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为高浓度贮备液。依次量取以上贮备液 2.5, 1.2, 1.3 mL 置 50 mL 同一量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀即得低浓度混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取山蜡梅样品粉末(过 40 目筛)约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25.00 mL,称定质量,超声(100 W, 45 kHz)提取 1 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的量,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 线性关系考察 精密量取低浓度混合对照品



1. 东莨菪内酯; 2. 异嗪皮啶; 3. 芦丁; 4. 滨蒿内酯

图 1 对照品(A)和山蜡梅叶样品(B)的 HPLC

溶液 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 10.0 mL 分别置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解,定容至刻度,摇匀,作为标准系列溶液。取上述溶液各 10 μL 注入色谱仪,以对照品浓度 $X(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ 为横坐标,色谱峰面积(Y)为纵坐标,求得回归方程, $Y_{\text{东莨菪内酯}} = 21.111X - 5.20$ ($r = 0.9999$), $Y_{\text{异嗪皮啶}} = 16.375X - 0.4160$ ($r = 0.9999$), $Y_{\text{滨蒿内酯}} = 20.218X - 0.3280$ ($r = 0.9999$), $Y_{\text{芦丁}} = 3.2261X - 14.052$ ($r = 0.9992$),表明东莨菪内酯、异嗪皮啶、滨蒿内酯、芦丁的进样浓度分别在 5.665 ~ 56.65, 2.4312 ~ 24.312, 2.444 ~ 24.44, 9.012 ~ 90.12 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.4 精密度试验 精密量取混合对照品溶液 10 μL,注入液相色谱仪,连续进样 6 次,东莨菪内酯、异嗪皮啶、滨蒿内酯和芦丁的峰面积 RSD 分别为 0.26%, 0.64%, 0.33%, 1.48%,表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 h 时进样 10 μL,东莨菪内酯、异嗪皮啶、滨蒿内酯和芦丁的峰面积 RSD 分别为 2.60%, 1.88%, 1.65%, 2.66%,表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6 重复性试验 称取同一山蜡梅样品粉末 6 份,按 2.2.2 项下制备样品溶液,测定 4 种物质的含量,东莨菪内酯、异嗪皮啶、滨蒿内酯和芦丁的 RSD 分别为 0.86%, 0.88%, 2.21%, 1.53%,表明本方法重复性良好。

2.7 回收率试验 称取已知含量的山蜡梅样品粉

末6份,每份约0.5 g,精密称定,分别加入东莨菪内酯、异嗪皮啶、滨蒿内酯和芦丁对照品适量,按2.2.2项下方法操作,进样10 μL 进行分析,计算4种化合物的回收率,结果见表1。

表1 4种化合物的回收率试验($n=6$)

样品	样品中量 / μg	加入量 / μg	实测量 / μg	回收率 / $\%$	平均回 收率/ $\%$	RSD / $\%$
东莨菪内酯	144.07	147.09	291.33	100.12	97.06	1.62
	144.07	147.09	285.34	96.04		
	144.07	147.09	285.11	95.82		
	144.07	147.09	286.06	96.53		
	144.07	147.09	286.48	96.82		
	144.07	147.09	287.03	97.06		
异嗪皮啶	123.92	121.56	249.08	102.97	102.86	0.93
	123.92	121.56	247.20	101.42		
	123.92	121.56	248.37	102.38		
	123.92	121.56	250.25	103.93		
	123.92	121.56	248.58	102.55		
	123.92	121.56	250.20	103.89		
滨蒿内酯	44.12	48.88	92.75	99.50	102.18	1.81
	44.12	48.88	93.73	101.50		
	44.12	48.88	94.68	103.39		
	44.12	48.88	93.15	100.32		
	44.12	48.88	95.15	104.42		
	44.12	48.88	94.92	103.93		
芦丁	535.60	300.40	838.47	100.82	104.44	4.2
	535.60	300.40	843.54	102.51		
	535.60	300.40	861.78	108.58		
	535.60	300.40	861.91	108.62		
	535.60	300.40	831.57	98.52		
	535.60	300.40	858.74	107.57		

2.8 样品测定 称取同一山蜡梅样品粉末5份,按2.2.2项下方法操作,进样10 μL 进行分析,东莨菪内酯、异嗪皮啶、滨蒿内酯和芦丁含量见表2。

表2 山蜡梅中东莨菪内酯、异嗪皮啶、滨蒿内酯和芦丁的含量 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

样品	东莨菪内酯	异嗪皮啶	滨蒿内酯	芦丁
1	264.83	162.95	88.49	849.88
2	263.79	161.42	87.29	855.80
3	267.12	162.97	87.45	864.13
4	262.42	163.06	91.35	837.23
5	261.68	160.23	88.75	838.85

3 讨论

在试验在色谱方法优化时,曾参考有关文献[6-11],分别比较了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1%冰醋酸、甲醇-0.1%冰醋酸等,结果以乙腈-水系统梯度洗脱为最佳,样品中4种物质的分离效果较好,且与其他物质可达到基线分离。

在考察样品提取方法时,发现超声提取方法要优于冷浸法;在考察超声提取0.5,1,1.5 h,结果表

明超声提取1.0,1.5 h时各物质的含量相近,故选择超声提取时间为1.0 h,同时又考察了加10,15,25倍量的提取体积,结果表明加25倍量的甲醇提取效果较好。

黄酮和香豆素都是天然植物中具有明确药理作用的化合物^[12-13],对其进行定性和定量分析具有重要意义。本试验建立的方法可以同时分析3个香豆素和1个黄酮化合物,重复性好,操作简单,结果准确,可以作为控制山蜡梅药材质量的方法。

[参考文献]

- [1] 张尊敬,刘忠达.山蜡梅的成分及药理作用研究近况[J].浙江中医杂志,2009,44(11):849.
- [2] 胡文杰,杨书斌.山蜡梅化学成分及其药用研究进展[J].江西林业科技,2008(6):60.
- [3] 潘心禾,史小娟,张新风,等.柳叶蜡梅化学成分及其抗氧化活性研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(1):99.
- [4] 刘洪涛,曹明盼,张新风,等.醋梅属植物化学成分HPLC指纹图谱的构建[J].中国中药杂志,2013,38(10):1560.
- [5] Zhou Bin, Tan Miao, Lu Jing-feng, et al. Simultaneous determination of five active compounds in *chimonanthus nitens* by double-development HPTLC and scanning densitometry[J]. Chem Central J, 2012, 6:46.
- [6] 韩莹,李遇伯,崔兰冲,等. HPLC法同时测定无梗五加果中东莨菪内酯和异嗪皮啶的含量[J].沈阳药科大学学报,2006,23(9):573.
- [7] 孙卓然,李晓云,刘圆,等. RP-HPLC法测定不同品种石斛中滨蒿内酯的含量[J].西南民族大学学报:自然科学版,2008,34(6):1189.
- [8] 耿旦,马雯芳,甄汉深,等. RP-HPLC测定桑椹中芦丁的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(14):63.
- [9] 刘伟,郭蕾,崔永霞,等. HPLC测定不同产地野生与栽培地骨皮中总东莨菪内酯[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(11):73.
- [10] 饶伟源,李茂,兰保强,等. 白银宫血灵胶囊中东莨菪内酯的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(1):28.
- [11] 田振坤,顾媛媛,宋成贵,等. HPLC测定凤仙透骨草中的芦丁、槲皮素和山奈酚的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(18):106.
- [12] 易文实. 黄酮类化合物的生物活性研究进展[J].广州化工,2012,40(2):47.
- [13] 孔令雷,胡金凤,陈乃宏. 香豆素类化合物药理和毒理作用的研究进展[J].中国药理学通报,2012,28(2):165.

[责任编辑 顾雪竹]