

HPLC 波长切换技术同时测定板蓝根中 4 种活性成分含量

徐桂花^{1,2}, 张继环¹, 乔建卫^{1,2}, 苏瑞强^{1,2}, 赵志全^{1,2}, 孙宗喜^{1,2*}

(1. 鲁南制药集团股份有限公司, 山东 临沂 276006;

2. 中药制药共性技术国家重点实验室, 山东 临沂 276006)

[摘要] 目的: 建立反相高效液相色谱法同时测定板蓝根药材中尿苷、腺苷、鸟苷和表告依春 4 种活性成分含量的方法, 并比较不同时间采收的板蓝根中上述各成分的含量情况。方法: 采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸溶液, 梯度洗脱, 流速 0.7 mL·min⁻¹; 双波长切换时间序列采样: 0~30 min 为 254 nm, 30~45 min 为 245 nm; 柱温 25 °C。结果: 在上述色谱条件下, 测得尿苷、腺苷、鸟苷和表告依春分别在 14.80~1184 ng($r=0.9999$), 14.55~1164 ng($r=0.9999$), 13.75~1100 ng($r=0.9999$), 12.25~980 ng($r=0.9999$) 与峰面积呈良好的线性关系; 平均加样回收率: 尿苷 99.5% (RSD 1.2%), 腺苷 98.3% (RSD 1.4%), 鸟苷 98.1% (RSD 1.2%), 表告依春 99.0% (RSD 0.9%)。不同时间采收板蓝根中 4 种活性成分的含量是动态变化的。结论: 方法操作简便、准确, 重复性良好, 可用于板蓝根药材的质量控制。

[关键词] 板蓝根; 尿苷; 腺苷; 鸟苷; 表告依春; 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(2012)18-0070-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120711.1207.025.html>

[网络出版时间] 2012-7-11 12:07

Simultaneous Determination of Four Active Components in Radix Isatidis by HPLC with Double-wavelength Switch

XU Gui-hua^{1,2}, ZHANG Ji-huan¹, QIAO Jian-wei^{1,2}, SU Rui-qiang^{1,2}, ZHAO Zhi-quan^{1,2}, SUN Zong-xi^{1,2*}

(1. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276006, China; 2. State Key Laboratory of Generic Pharmaceutical Technology for Chinese Traditional Medicine, Linyi 276006, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for simultaneous determination of uridine, adenosine, guanosine and epigoitrin in Radix Isatidis, and compare the content variation of the four components of herbs harvested at different time. **Method:** Four components were separated by Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with gradient mobile phase of methanol-0.1% phosphoric acid at the flow rate of 0.7 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 254 nm (0-30 min) and 245 nm (30-45 min). The column temperature was maintained at 25 °C. **Result:** The calibration curves of uridine, adenosine, guanosine and epigoitrin were in good linearity over the range of 14.80-1184 ng ($r=0.9999$), 14.55-1164 ng ($r=0.9999$), 13.75-1100 ng ($r=0.9999$), 12.25-980 ng ($r=0.9999$), respectively. The average recoveries of the four components were 99.5% (RSD 1.2%), 98.3% (RSD 1.4%), 98.1% (RSD 1.2%), 99.0% (RSD 0.9%), respectively. The content of four components in Radix Isatidis varied with different harvest time. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible for quality control of Radix Isatidis.

[Key words] Radix Isatidis; uridine; adenosine; guanosine; epigoitrin; HPLC

[收稿日期] 20120216(003)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-400)

[第一作者] 徐桂花, 副高级工程师, 从事中药新药研究与开发, Tel:0539-8336639, E-mail: xghua0925@sina.com

[通讯作者] * 孙宗喜, 硕士, Tel:0539-8336639, E-mail: zongxisun@163.com

板蓝根为十字花科植物菘蓝的干燥根,性苦、寒,具有清热解毒、凉血利咽之功效^[1]。作为一味传统的大宗中药材,资源分布广泛,主产于安徽、河南、甘肃、内蒙古、黑龙江等省份。现代药理学研究表明,板蓝根具有抗菌^[2]、抗病毒^[3]、抗内毒素^[4]、抗癌^[5]和调节免疫^[6]等活性。板蓝根的化学成分复杂,主要含有生物碱类、有机酸类、多糖类、氨基酸类、核苷类等组分。随着研究的不断深入,发现板蓝根中以腺苷、尿苷等为代表成分的核苷类和以表告依春为代表成分的生物碱类均是其抗病毒的重要有效成分^[7-11]。本实验以不同采收时间的板蓝根为研究对象,采用 HPLC 双波长切换技术对尿苷、腺苷、鸟苷和表告依春4种活性成分同时进行定量分析,为建立全面可控的药材质量标准提供有效的方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司,配有 DAD 检测器、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、Chemstation 化学工作站)。甲醇为色谱纯,磷酸为分析纯,水为超纯水。

尿苷对照品(批号 887-200001)、腺苷对照品(批号 879-200001)和表告依春对照品(批号 111753-200601)由中国药品生物制品检定所提供,鸟苷对照品(批号 119k15842V)由 Sigma 公司提供。板蓝根药材于 2011 年 8 月至 11 月采自安徽省阜阳市太和县种植基地,经本实验室苏瑞强高级工程师鉴定为十字花科菘蓝属植物菘蓝的干燥根。

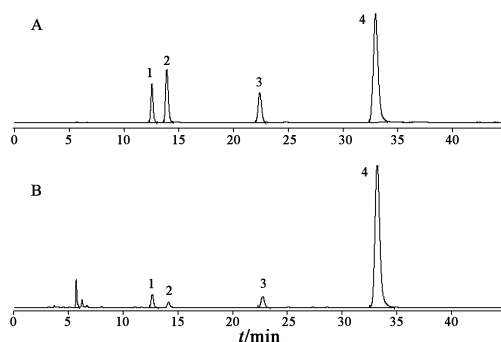
2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.1% 磷酸水(B),梯度洗脱(0~10 min, 3% A; 10~45 min, 3~8% A);流速 0.7 mL·min⁻¹;双波长切换时间序列采样 0~30 min 254 nm; 30~45 min, 245 nm;进样量 10 μL;柱温 25 ℃。在此色谱条件下,各相邻色谱峰之间的分离度均 > 1.5,理论塔板数均 > 6 000。见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取尿苷、腺苷、鸟苷和表告依春的对照品适量,加水溶解并制成每毫升分别含尿苷 29.6 μg、腺苷 29.1 μg、鸟苷 27.5 μg 和表告依春 24.5 μg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取板蓝根药材粉末(过四号筛)1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入水 40 mL,称定质量,超声处理(功率 160 W,频率 40 kHz)60 min,放冷,再次称定质量,用水补足损失的质量,摇匀,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶



1. 尿苷;2. 腺苷;3. 鸟苷;4. 表告依春

图 1 对照品(A)和板蓝根样品(B)的 HPLC

液 0.5, 1, 5, 10, 20, 40 μL,在上述色谱条件下进行测定,以进样量(ng)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线并进行回归计算,得4种成分的标准曲线回归方程,结果见表 1。

表 1 4种成分的回归方程、相关系数和线性范围

成分	回归方程	r	线性范围/ng
尿苷	$Y = 2.6047X - 0.9288$	0.9999	14.80 ~ 1184
腺苷	$Y = 4.1969X - 2.6366$	0.9999	14.55 ~ 1164
鸟苷	$Y = 3.1953X - 1.9208$	0.9999	13.75 ~ 1100
表告依春	$Y = 9.5534X - 24.552$	0.9999	12.25 ~ 980

2.5 精密度试验 取混合对照品溶液,在上述色谱条件下重复进样 6 次,计算尿苷、腺苷、鸟苷和表告依春峰面积的 RSD 分别为 0.4%, 0.3%, 0.4%, 0.5%。

2.6 重复性试验 称取同一批板蓝根药材 6 份,每份 1.0 g,精密称定,依 2.3 项下的方法操作,在上述色谱条件下进行分析测定,测得尿苷、腺苷、鸟苷和表告依春含量的 RSD 分别为 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.6%。

2.7 稳定性试验 取同一份供试品溶液,室温放置,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按上述色谱条件进样分析,计算尿苷、腺苷、鸟苷和表告依春峰面积的 RSD 分别为 1.0%, 0.6%, 0.8%, 0.5%。

2.8 加样回收率试验 称取已知含量的同一批板蓝根药材 0.5 g,共 6 份,精密称定,分别加入已配制好的混合对照品溶液(含尿苷 10.2 mg·L⁻¹、腺苷 4.4 mg·L⁻¹、鸟苷 13.3 mg·L⁻¹和表告依春 39.1 mg·L⁻¹)40 mL,依 2.3 项下的方法操作,在上述色谱条件下进样测定,计算回收率,结果见表 2。

2.9 样品测定 取不同时间采收的板蓝根药材粉末 1.0 g,精密称定,依 2.3 项下的方法操作,在上述色谱条件下进样测定,计算样品中 4 种成分的含量,

表 2 板蓝根中各成分加样回收率试验

成分	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
尿苷	0.388	0.408	0.801	101.2	99.5	1.2
	0.396	0.408	0.801	99.3		
	0.386	0.408	0.794	100.0		
	0.394	0.408	0.792	97.5		
	0.391	0.408	0.798	99.8		
	0.387	0.408	0.792	99.3		
	鸟苷	0.166	0.176	0.339	98.3	98.3
0.170		0.176	0.344	98.9		
0.165		0.176	0.342	100.6		
0.169		0.176	0.339	96.6		
0.167		0.176	0.338	97.2		
0.166		0.176	0.339	98.3		
腺苷		0.504	0.532	1.021	97.2	98.1
	0.514	0.532	1.030	97.0		
	0.501	0.532	1.030	99.4		
	0.512	0.532	1.043	99.8		
	0.507	0.532	1.027	97.7		
	0.503	0.532	1.022	97.6		
	表告依春	1.639	1.564	3.187	99.0	99.0
1.671		1.564	3.232	99.8		
1.630		1.564	3.190	99.7		
1.663		1.564	3.222	99.7		
1.649		1.564	3.175	97.6		
1.634		1.564	3.174	98.5		

结果见表 3。

3 结果与讨论

3.1 检测波长的选择 采用 DAD 检测器在 190 ~ 380 nm 对样品进行全扫描,尿苷、腺苷、鸟苷在 254 nm 处均有较强吸收,而表告依春在 245 nm 处有最大吸收,故选择波长切换技术。这样既提高了检测灵敏度,又为测定结果的准确可靠提供保障。

3.2 流动相的选择 参照有关文献^[12-16],本实验分别考察了乙腈-水、乙腈-磷酸水、甲醇-水和甲醇-磷酸水溶液体系。从分离效果兼顾环保和检测成本综合分析,选择甲醇-0.1% 磷酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱时,样品中 4 种成分的色谱峰均能达到基线分离,保留时间合理,峰形良好。

3.3 供试品溶液制备方法的确定 在样品提取过程中,比较了不同提取方法(超声和回流)、提取溶

表 3 板蓝根不同采收时间 4 种成分的含量(n=3) mg·g⁻¹

采收时间 /月-日	尿苷	腺苷	鸟苷	表告依春
8-08	0.19	未检出	0.26	2.90
8-27	0.37	未检出	0.44	3.15
9-15	0.45	0.10	0.53	3.60
9-28	0.77	0.33	1.00	3.25
10-08	0.46	0.31	0.69	3.22
10-18	0.49	0.37	0.75	3.40
10-28	0.60	0.23	0.84	2.96
11-08	0.85	0.16	0.73	2.40

剂(甲醇、50% 甲醇和水)和提取时间(15, 30, 45, 60, 75 min)对提取率的影响。结果表明,以水为提取溶剂,超声 60 min 可将样品中的 4 种成分基本提取完全。

3.4 样品测定结果分析 板蓝根的采收期为秋季^[1]。本结果表明,在此不同的采收时间内 4 种活性成分的含量是动态变化的,其中核苷类成分的总量在 9 月底达到峰值,而表告依春的含量则在 9 月中旬达到相对高点。这对确定板蓝根的最佳采收期具有一定的参考价值。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010:191.
- [2] 汤杰,施春阳,徐哈,等.板蓝根抑菌抗炎活性部位的评价[J].中国医院药学杂志,2003,23(6):327.
- [3] 程妍,李祥,陈建伟,等.板蓝根有效部位的抗病毒药效研究[J].南京中医药大学学报,2011,27(2):155.
- [4] 刘云海,李敬,谢委,等.板蓝根中邻氨基苯甲酸的抗内毒素作用[J].中南药学,2005,3(3):138.
- [5] 梁永红,侯华新,黎丹戎,等.板蓝根二酮 B 体外抗癌活性研究[J].中草药,2000,31(7):531.
- [6] 金明哲,任东鲜,孟繁平,等.板蓝根对机体免疫功能及流感病毒 FM₁ 的作用[J].时珍国医国药,2007,18(2):394.
- [7] 方建国,汤杰,杨占秋,等.板蓝根体外抗单纯疱疹病毒 I 型作用[J].中草药,2005,36(2):242.
- [8] 孙广莲,胡志力,孟红庆,等.MTT 法检测板蓝根抗巨细胞毒效应[J].山东中医药大学学报,2000,24(2):137.
- [9] 徐丽华,黄芳,陈婷,等.板蓝根中的抗病毒活性成分[J].中国天然药物,2005,3(6):359.
- [10] 黄芳,熊雅婷,徐丽华,等.板蓝根不同提取物中抗病毒成分表告依春在大鼠体内的药代动力学[J].中国药科大学学报,2006,37(6):519.

HPLC 对市售瓜蒌中 5-羟甲基糠醛的含量测定

孙文,巢志茂*,王淳,吴晓毅,谭志高
(中国中医科学院中药研究所,北京 100700)

[摘要] 目的:建立常用中药瓜蒌中 5-羟甲基糠醛(5-HMF)的高效液相色谱(HPLC)测定方法。方法:采用 HPLC 法, ODS 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),甲醇-水(15:85)为流动相,流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 284 nm,柱温 30 ℃。结果:建立了瓜蒌饮片中 5-HMF 的 HPLC 测定方法,18 批市售瓜蒌样品中 5-HMF 的含量范围为 11.10~193.6 μg·g⁻¹。结论:各地的商品瓜蒌中 5-HMF 的含量差异较大,该方法可作为评价瓜蒌饮片质量的指标之一。

[关键词] 瓜蒌; 5-羟甲基糠醛; 高效液相色谱; 含量测定; 麦拉德反应

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0073-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120711.1204.017.html>

[网络出版时间] 2012-7-11 12:04

Determination of 5-Hydroxymethylfurfural in Commercial Trichosanthis Fructus by HPLC

SUN Wen, CHAO Zhi-mao*, WANG Chun, WU Xiao-yi, TAN Zhi-gao

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for content determination of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) in commercial Trichosanthis Fructus, a commonly used Chinese material medica. **Method:** The HPLC analysis was performed on an ODS column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) and the mobile phase consisted of methanol-water (15:85) at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The detective wavelength was set at 284 nm and the column temperature was maintained at 30 ℃. **Result:** The HPLC method for content determination of 5-HMF in Trichosanthis Fructus was established. 5-HMF was detected in 18 batches of commercial Trichosanthis Fructus, the content of which were in the range of 11.10-193.6 μg·g⁻¹. **Conclusion:** The content of 5-HMF in commercial

[收稿日期] 20120205(004)

[基金项目] 2011 年中医药行业科研专项(201107009)

[第一作者] 孙文,硕士研究生,从事中药化学和分析研究,Tel:010-64014411-2869

[通讯作者] *巢志茂,研究员,博士生导师,从事中药化学和分析研究,Tel:010-64014411-2869,E-mail:chaozhimao@yahoo.com.cn

[11] 陈凯,窦月,陈智,等. 板蓝根抗病毒与抗内毒素等清热解药药效作用及化学基础研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18):275.

[12] 张慧晔,罗杰,黄亦南,等. HPLC 法同时测定复方板蓝根颗粒中的尿苷、腺苷和表告依春的含量[J]. 今日药学, 2011, 21(6):337.

[13] 肖珊珊,金郁,郭怀中,等. RP-HPLC 法测定板蓝根药材中核苷类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(1):48.

[14] 辛敏通,傅欣彤,陈有根,等. 快速液相色谱法同时

测定板蓝根颗粒中 4 种核苷类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(8):1571.

[15] 张元杰,钱正明,陈肖家,等. HPLC 法同时测定补益中药中尿苷、腺嘌呤、鸟苷和腺苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(1):33.

[16] 石燕红,谢志勇,吴迎春,等. RP-HPLC 测定板蓝根制剂中 R, S-告依春 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8):128.

[责任编辑 顾雪竹]