

HPLC 同时测定蒙药光叶苦蕒菜中 5 种有效成分的含量

萨仁格日乐¹, 照日格图², 邵文泉², 王青虎^{2*}

(1. 内蒙古民族大学附属医院蒙药制剂科, 内蒙古 通辽 028000;
2. 内蒙古民族大学蒙医学院, 内蒙古 通辽 028000)

[摘要] 目的: 建立一种 HPLC 同时测定蒙药光叶苦蕒菜中的 5 种有效成分。方法: 采用 HPLC, Hypersil ODS-2 色谱柱 (4.6 mm × 300 mm, 5 μm); 乙腈-水梯度洗脱; 检测波长切换, Ixeriside A 和 Ixerin M 238 nm, 木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷和木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷乙酸酯 326 nm; 柱温为 30 °C。结果: 在所用的实验操作条件下, 5 种对照品溶液分别在检测范围内具有良好的线性关系 ($r > 0.999 3$), 平均回收率分别为 97.08% (RSD 1.28%), 96.33% (RSD 1.64%), 96.50% (RSD 1.45%), 95.50% (RSD 1.38%), 96.00% (RSD 1.22%)。结论: 方法简便、快速、准确, 可为评价该药材质量提供依据。

[关键词] 高校液相色谱法; 同时测定; 光叶苦蕒菜; 5 种有效成分

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0100-04

Simultaneous Determination of Five Active Compounds in *Ixeris chinensis*

SA-ren-ge-ri-le¹, ZHAO-ri-ge-tu², TAI Wen-quan², WANG Qing-hu^{2*}

(1. Affiliated Hospital, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China; 2. College of Traditional Mongolian Medicine, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for simultaneous determining five active compounds from the whole plant of *I. chinensis* by HPLC. **Method:** The separation by gradient elution was performed on Hypersil ODS-2 column (4.6 mm × 300 mm, 5 μm) at 30 °C with acetonitrile and water as the mobile phase and detection at 238 nm and 326 nm. **Result:** Five active compounds were linear in the detection range ($r = 0.999 3$). The average recoveries of five active compounds were 97.08% (RSD 1.28%), 96.33% (RSD 1.64%), 96.50% (RSD 1.45%), 95.50% (RSD 1.38%), 96.00% (RSD 1.22%). **Conclusion:** The results indicated that the developed assay method was rapid, accurate, reliable and could be readily utilized as a quantitative analysis method for *I. chinensis*.

[Key words] HPLC; simultaneous determination; *Ixeris chinensis*; five active compounds

光叶苦蕒菜, 蒙古名苏斯乌布斯、萨日赫依、库日冲、陶来茵益达日、敖兰益达日、毛盖益达日, 系为菊科植物山苦蕒 *Ixeris chinensis* (Thunb.) Nakai 的干燥全草。春、夏花盛开时采收, 除去枯叶、残茎、洗净泥土, 通风处阴干^[1]。本品味苦, 性凉、涩、钝、

稀; 有抑希拉, 清热之功效。蒙医临床用于希拉性头痛, 高烧, 食欲不振, 目黄, 口苦, 与金腰草、五灵脂、伞梗虎耳草、船形乌头、木鳖子等配伍, 制成六味苦蕒散或八味当药散用, 与胡连、丹参等配伍, 制成七味胡连散用于血热病。苦蕒菜植物的主要化学成分有黄酮^[2,3]、倍半萜^[4-6]和三萜类^[7]等, 笔者在光叶苦蕒菜乙酸乙酯层的化学成分研究前期工作中分离得到了黄酮和倍半萜类化合物, 包括 ixeriside A, ixerin M, 木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷和木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷乙酸酯。现代医学研究表明, 中华苦蕒菜具有抗炎保肝、抗烟碱、抗氧化、抗病毒、抗白血病等作用。

[收稿日期] 20111112(010)

[第一作者] 萨仁格日乐, 副主任药师, 从事蒙药资源和质量研究, Tel: 13804753686, E-mail: srgri@126.com

[通讯作者] * 王青虎, 博士, 副教授, 从事蒙药有效成分提取分离鉴定及其质量标准研究, Tel: 15894890037, E-mail: wqh693@163.com

Zheng^[8]等人对其抗炎保肝作用进行了进一步研究,发现从中华苦苣菜中分离的单体木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷的活性高于粗提物,表明木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷是其抗炎保肝作用的活性成分之一。Zhang等^[9]报道从中华苦苣菜中提取的chinensiolides E对VA-13恶性肺肿瘤细胞生长有显著的抑制作用。Ahn EM等^[10]第1次从*Ixeris dentata form a albiflora*的根中提取分离出的中美菊素,9α-羟基愈创木-4(15),10(14),11(13)-三烯-6,12-内酯,还阳参属苷对人体结肠癌细胞和肺癌细胞有相对较高的细胞毒活性,此外化合物ixerin M,还阳参属苷对酰基辅酶A:胆固醇酰基转移酶具有抑制活性。黄酮和倍半萜类化合物是光叶苦苣菜的主要活性成分,国内外学者对该植物的研究主要集中在化学成分和药理作用上,未见光叶苦苣菜中同时测定黄酮苷和倍半萜苷的报道。为了快速、简便的测定光叶苦苣菜中活性成分,本实验建立了高效液相色谱法同时测定该药材中ixeriside A,ixerin M,木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷和木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷乙酸酯的方法。

1 仪器与试剂

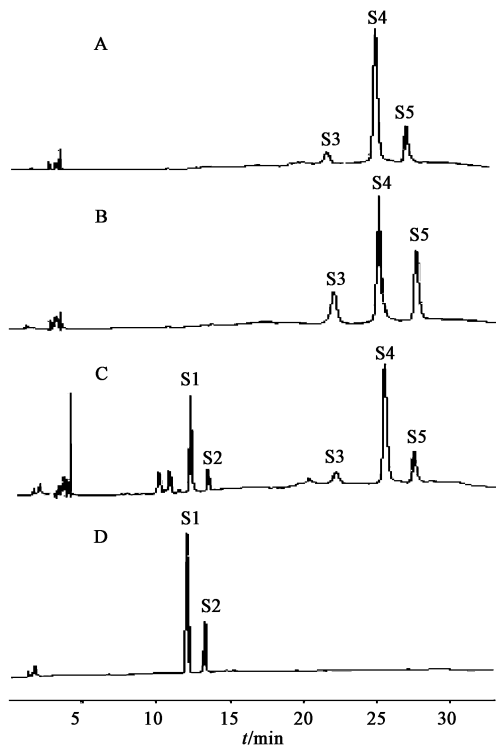
AUW220D型电子天平(日本岛津),HH-S26S型水浴锅(金坛市大地自动化仪器厂),RE52-2型旋转蒸发器(上海沪西分析仪器厂),KQ-100型系列超声波冲洗器(昆山市超声仪器有限公司),UV-2501PC型分光光度计(日本岛津),高效液相色谱仪(LC10-Atvp输液泵,SPD-M10Avp检测器,SCL-10Avp工作站, DGU-12A脱气机)。

光叶苦苣菜采集于内蒙古通辽市,并经内蒙古民族大学蒙医药学院蒙药生药教研室主任布和巴特尔教授鉴定为菊科植物山苦苣*ixeris chinensis*(Thunb.) Nakai的干燥全草;ixeriside A(S1),ixerin M(S2),芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷(S3)、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷(S4)和木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷乙酸酯(S5)均自制并用高效液相色谱仪分别测定其纯度均>98.0%,可作为对照品使用;甲醇为色谱纯(天津市光复精细化工研究所);水为超纯水;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果^[11-14]

2.1 色谱条件 大连依利特hypersil ODS2柱(4.6 mm×300 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-水(B),梯度洗脱,(0~5 min,18% A,5~10 min,18%~45% A,10~20 min,45%~65% A,20~32 min,65% A),柱

温30℃,检测波长,ixeriside A和ixerin M 238 nm,木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷和木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷乙酸酯 326 nm;流速1.0 mL·min⁻¹。在上述色谱条件下,ixeriside A(S1),ixerin M(S2),芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷(S3)、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷(S4)和木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷乙酸酯(S5)达到基线分离(R>>1.0),理论塔板数均不低于3500,分离色谱图见图1。



A. 样品供试液(326 nm);B. S3、S4和S5混合对照液(326nm);
C. 样品供试液(238 nm);D. S1和S2混合对照液(238 nm)

图1 样品供试液和混合对照液的HPLC图谱

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取ixeriside A和ixerin M对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,分别配成1.6,1.2 g·L⁻¹的储备液;另取芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷和木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷乙酸酯对照品适量,加60%乙醇溶解,分别配成1.0,2.0,1.2 g·L⁻¹的储备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 光叶山苦苣研细,称取粗粉1.0 g,精密称定,加入氯仿20 mL,称定质量,超声20 min,滤过,药渣挥去氯仿后,精密加甲醇10 mL,称定质量,超声30 min,放冷,用甲醇补充失重的量,过滤,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 检测波长的选择 分别取 ixerisoside A、ixerin M、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷和木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷乙酸盐的对照液,在 200 ~ 400 nm 进行扫描,结果确定 S1 和 S2 的检测波长为 238 nm, S3、S4 和 S5 的检测波长为 326 nm。

2.3.2 线性关系考察 精密吸取 ixerisoside A 和 ixerlin M 对照品储备液适量,加甲醇配制成 6 个不同浓度的系列混合对照溶液;另吸取芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷和木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷乙酸盐的储备液加 60% 乙醇配制成 6 个不同浓度的系列混合对照溶液。分别取上述溶液 20 μL,注入液相色谱仪,记录峰面积。以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程和线性范围,结果见表 1。

表 1 5 种有效成分的回归方程式和最低检测限

化合物	回归方程式	r	线性范围 /g·L ⁻¹	LOQ /g·L ⁻¹
S1	$Y = 1.19 \times 10^6 X - 27\ 928$	0.999 5	0.040 ~ 0.16	0.020
S2	$Y = 1.00 \times 10^6 X - 20\ 194$	0.999 3	0.030 ~ 0.12	0.012
S3	$Y = 1.30 \times 10^6 X - 8\ 059$	0.999 7	0.012 ~ 0.10	0.007
S4	$Y = 1.02 \times 10^6 X - 23\ 297$	0.999 8	0.025 ~ 0.80	0.010
S5	$Y = 1.28 \times 10^6 X - 10\ 314$	0.999 7	0.015 ~ 0.12	0.008

注: Y = 峰面积, X = 浓度/g·L⁻¹。

2.3.3 最低检测限(LOQ) 取 ixerisoside A、ixerin M、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷和木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷乙酸盐对照品溶液以不同比例稀释后测定,以信噪比 2 ~ 3 为最低检出,结果见表 1。

表 3 光叶山苦荚中 S1, S2, S3, S4, S5 的测定 (n = 5)

采集时间	S1	S2	S3	S4	S5
2009-05-02	1.021 ± 0.015	0.615 ± 0.009	0.327 ± 0.005	2.010 ± 0.019	0.541 ± 0.010
2010-04-29	1.108 ± 0.013	0.634 ± 0.011	0.358 ± 0.007	2.028 ± 0.021	0.505 ± 0.010
2010-05-26	1.010 ± 0.013	0.611 ± 0.012	0.307 ± 0.006	2.081 ± 0.027	0.488 ± 0.006

3 讨论

在流动相选择中,曾采用甲醇-水、乙腈-水的不同梯度洗脱系统,结果乙腈-水梯度洗脱(0 ~ 5 min, 乙腈比例为 18%, 5 ~ 10 min, 由乙腈比例 18% 递升至 45%, 10 ~ 20 min, 乙腈比例由 45% 递升至 65%, 20 ~ 32 min, 乙腈比例为 65%),分离效果好,重复性强,可同时检测到 ixerisoside A、ixerin M、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖

2.3.4 精密度试验 分别取同一 S1 和 S2 的混合对照品液和 S3、S4 和 S5 混合对照品液,在上述色谱条件下,连续进样 6 次,测定峰面积。计算 S1, S2, S3, S4, S5 的峰面积 RSD 分别为 1.02%, 1.25%, 1.04%, 1.11%, 1.32%。

2.3.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于制备后 0, 4, 6, 8, 12 h 依法测定,以峰面积值计算, S1, S2, S3, S4, S5 的峰面积 RSD 分别为 1.35%, 1.64%, 1.38%, 1.73%, 1.26%, 表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.3.6 重复性试验 取同一采集时间的样品 6 份,制备供试品溶液,进行测定,计算 S1, S2, S3, S4, S5 的质量分数,其 RSD 分别 1.58%, 1.43%, 1.84%, 1.79%, 1.68%。

2.3.7 回收率试验 精密称取样品(采集时间为 20100526)0.50g, 6 份,精密加入 1 S1, S2, S3, S4, S5 适量,制备供试品溶液,测定,计算加样回收率和 RSD,结果见表 2。

表 2 回收率测定 (n = 6)

对照品	取样量 /g	原有量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%
S1	0.500 0	0.505 0	0.48	0.971	97.08	1.28
S2	0.5000	0.3055	0.30	0.595	96.33	1.64
S3	0.500 0	0.153 5	0.20	0.346	96.50	1.45
S4	0.500 0	1.041	1.00	2.015	97.50	1.38
S5	0.500 0	0.244 0	0.20	0.436	96.00	1.22

2.4 样品测定 精密吸取 3 个不同采集时间的样品供试品溶液 3 份,每份 20 μL,进样测定,计算样品中 S1, S2, S3, S4, S5 的质量分数,结果见表 3。

苷和木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷乙酸盐,且各成分均达到基线分离。

据光叶山苦荚的化学成分前期研究结果, ixerisoside A、ixerin M、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷和木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷乙酸盐均分离于乙酸乙酯层,故先用氯仿提取后,药渣回去氯仿加甲醇超声提取,制备供试液。

经紫外光谱扫描可知,ixeriside A 和 ixerin M 在 238 nm 处有最大吸收,而芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷、木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷和木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷乙酸酯分别在 261,326 nm 处有两个吸收。故选择 238 nm 为 ixeriside A 和 ixerin M 的检测波长,326 nm 为芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷、木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷和木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷乙酸酯的检测波长。

[参考文献]

[1] 布和巴特尔,额尔敦宝力高.蒙药手册[M].沈阳:辽宁民族出版社,1995:203.

[2] 周宏雷,袁久荣.中华苦苣菜化学成分的研究[J].中草药,1996,27(5):267.

[3] 王晓飞,王晓静.中华苦苣菜化学成分研究[J].中草药,2007,38(8):1151.

[4] Zhang S, Zhao M, Bai L, et al. Bioactive guaianolides from *Siyekucui* (*Ixeris chinensis*) [J]. J Nat Prod, 2006, 69: 1425.

[5] He W F, Xu B B, Pan J C, et al. A new sesquiterpene lactone glucosidewith inhibitory effect on K562 cells from *Ixeris sonchifolia* (Bge) Hance [J]. J Asian Nat Prod Res, 2006, 8 (6):481.

[6] Ye G, Fang J J, Fan M S, et al. Structure elucidation and complete NMR spectral assignments of a novel sesquiterpene glycoside from *Ixeris sonchifolia* [J]. Mag Resn Chem, 2007, 45 (4):362.

[7] Zhang S J, Wang J L, Deng Q G, et al. New triterpenes from *Ixeris chinensis* [J]. Chin Chem Let, 2006, 17(2):195.

[8] Zheng Q S. Protective effects of uteolin-7-O- β -D-glucoside against liver injury caused by carbon tetrachloride [J]. Pharmazie, 2004, 59 (4):286.

[9] Zhang S, Zhao M, Bai L, et al. Bioactive guaianolides from *Siyekucui* (*Ixeris chinensis*) [J]. J Nat Prod, 2006, 69: 1425.

[10] Ahn E M, Bang M H, Song M C, et al. Cytotoxic and ACAT-inhibitory sesquiterpenelactones from the root of *Ixeris dentata* forma *albiflora* [J]. Archives of Pharmacal Research, 2006, 29 (11): 937.

[11] 宋睿,金传山,周亚伟,等.香青兰中总黄酮和单体的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(12):71.

[12] 辛华,丰杰,程诺敏,等. HPLC 测定不同产地金银花中绿原酸和木犀草苷[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(2):60.

[13] 黄志勤,程齐来,李洪亮. RP-HPLC 测定细梗胡枝子中3种黄酮类有效成分[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):70.

[14] 张金莲,何敏,谢一军,等.高效液相色谱法测定枳壳饮片中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(6):68.

[责任编辑 顾雪竹]

欢迎订阅 2013 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、“中国中文核心期刊”;“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于1995年10月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、综述、学术交流、信息等栏目,交流方剂的药理学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊的读者对象是从事中医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16开本,320页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价35元,全年840元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:SM4655。欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街16号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfjx_2010@188.com,网址:www.syfjxzz.com。