

• 质量标准 •

HPLC 法同时测定新疆一枝蒿中木犀草素 和一枝蒿酮酸的含量

张洁¹, 顾政一^{2*}, 何承辉²

(1. 石河子大学药学院新疆特种植物药资源省部共建教育重点实验室, 新疆 石河子 832002;
2. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002)

[摘要] 目的: 建立新疆一枝蒿中的主要有效成分木犀草素与一枝蒿酮酸的高效液相含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法测定, Shim pack ODSC18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 甲醇-0.4% 磷酸(45: 55), 检测波长 350 nm, 该条件下测定木犀草素; 检测波长 241 nm, 该条件下测定一枝蒿酮酸。结果: 木犀草素在 12.80~ 51.20 μg·mL⁻¹ 范围内, 峰面积与进样浓度具有良好线性关系, $r = 0.9998$, 平均回收率为 99.92% ($n = 9$); 一枝蒿酮酸在 9.72~ 77.76 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系也良好, $r = 0.9993$, 平均回收率为 99.82% ($n = 9$)。结论: 本法专属性强, 操作简便, 结果准确。适用于检测新疆一枝蒿中木犀草素和一枝蒿酮酸的含量。

[关键词] 一枝蒿; 木犀草素; 一枝蒿酮酸; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)04-0001-04

Determination of Luteolin and Rupestonic Acid in *Artemisia rupestris* by High Performance Liquid Chromatography

ZHANG Jie¹, GU Zheng-yi^{2*}, HE Cheng-hui²

(1. The Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resource, pharmacy College of Shihezi University, Shihezi 832002, China; 2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830002, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for detecting luteolin and rupestonic acid, two key active constituents of *Artemisia rupestris* L. **Method:** A Shim-pack ODSC₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was methanol: 0.4% phosphoric acid (45: 55). The detection wavelengths were at 350 nm for luteolin, and 241 nm for rupestonic acid, respectively. **Result:** For luteolin, the linearity was obtained over the range of 12.80~ 51.20 μg·mL⁻¹ with $r = 0.9998$. The average recovery was 99.92% ($n = 9$); for rupestonic acid, the linearity was obtained over the range of 9.72~ 77.76 μg·mL⁻¹ with $r = 0.9993$. The average recovery was 99.82% ($n = 9$). **Conclusion:** The method was proved to be simple, rapid, and reliable to determine the contents of luteolin and rupestonic acid in *Artemisia rupestris*.

[Key words] *Artemisia rupestris* L.; luteolin; rupestonic acid; determination

[收稿日期] 2008-09-22

[基金项目] 新疆维吾尔自治区高技术研究发展计划项目
(200711105)

[通讯作者] * 顾政一, Tel: 13899857669; E-mail: zhengyi@xj.cninfo.net

新疆一枝蒿(*Artemisia rupestris* L.) 系菊科植物, 是维吾尔医常用药材, 维吾尔语称“一孜乎艾曼尼”。具有解毒、抗过敏、抗菌、抗病毒及保肝等功效, 临床上常用于感冒、荨麻疹、咽炎、扁桃体炎、肝炎等疾病的治疗, 其中对感冒和肝炎的疗效更为显著^[1-3]。

一枝蒿中主要化学成分为: 有机酸(一枝蒿酮酸)和黄酮(木犀草素及紫花牡荆素)。酮酸作为一枝蒿主要有效成分之一, 其药理作用与一枝蒿全草功能主治相关, 具有抗病毒、抗过敏等作用^[3]。新疆药物研究所已对一枝蒿酮酸进行了分离及结构鉴定。黄酮作为一枝蒿中另一主要有效成分, 其也具有抗菌、抗氧化、抗病毒的药理作用^[2,4]。为控制本品质量, 本文采用高效液相色谱法建立了新疆一枝蒿中木犀草素和一枝蒿酮酸的含量测定方法, 为进一步开发利用一枝蒿提供实验依据。

1 仪器与试剂

ACS-30A 电子分析天平(34073556, 上海友声衡器有限公司); 电子分析天平(北京赛多利斯天平有限公司 BS110S); SPD-10AVP 型高效液相色谱仪(日本岛津制造所), 包括 LC-10ATVP 二元高压泵, SPD-10AVP 紫外检测器, CTO-10ASVP 柱温箱, SCL-10AVP 系统控制器; LibrorAEG-200 电子天平(日本岛津制造所); Millipore simplicity-185 超纯水器(美国密理博公司)。

一枝蒿药材产地为新疆, 经新疆维吾尔自治区药物研究所张彦福研究员鉴定为菊科植物一枝蒿 *Artemisia rupestris* L. 的全草, 生产批号 20070108; 木犀草素对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 111520-200504); 一枝蒿酮酸对照品(中国科学院新疆理化技术研究所, 批号: 030401); 甲醇为美国 Fisher 公司产色谱纯; 水为双蒸水; 其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[5-6] 采用 Shimpack ODSC₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.4% 磷酸(45:55), 检测波长 λ₁ = 350 nm, 该条件下测定木犀草素; 检测波长 λ₂ = 241 nm, 该条件下测定一枝蒿酮酸; 柱温: 35 °C; 流速: 1.0 mL·min⁻¹。进样量为 10 μL。木犀草素、一枝蒿酮酸的保留时间分别为 33 min 左右和 14 min 左右。按上述条件获得的对照品、样品核对应色谱图见图 1~ 4。

2.2 对照品溶液的制备^[5-6] 木犀草素对照品溶液的制备方法用减重法精密称取木犀草素对照品 3.2 mg, 加甲醇制成每 1 mL 含木犀草素 0.064 mg 的溶液, 摇匀, 作为木犀草素对照品贮备溶液(64 μg·mL⁻¹)。吸取 25 mL 木犀草素对照品贮备溶液至 50 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即制

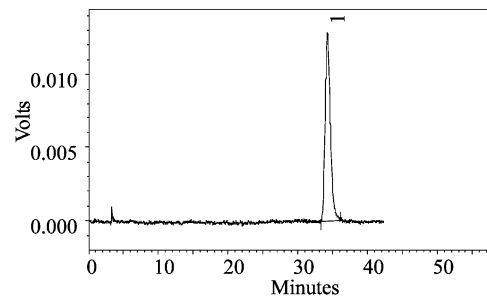


图 1 木犀草素对照

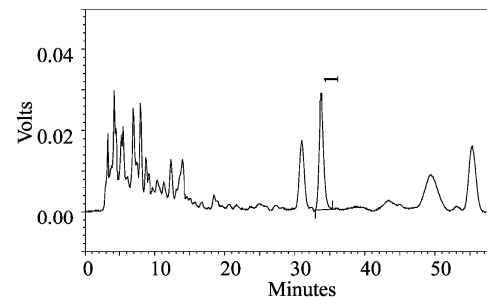


图 2 一枝蒿中木犀草素含量测定

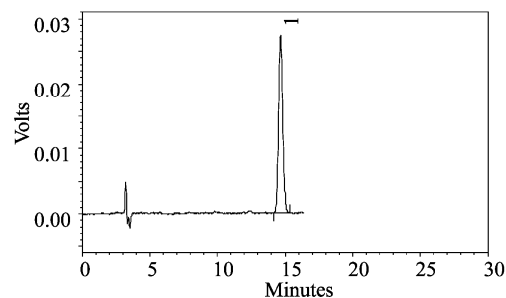


图 3 酮酸对照图

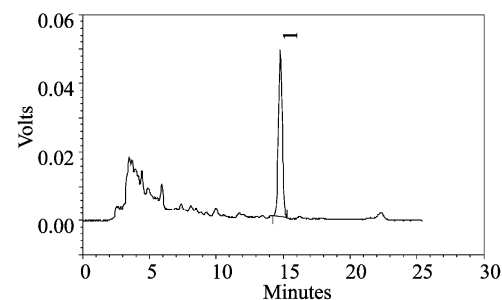


图 4 一枝蒿中酮酸含量测定

得木犀草素对照品溶液(32 μg·mL⁻¹)。

一枝蒿酮酸对照品溶液的制备方法用减重法精密称取一枝蒿酮酸对照品 4.86 mg, 置 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即制得一枝蒿酮酸对照品贮备溶液(194.4 μg·mL⁻¹)。再吸取 1 mL 一枝蒿酮酸对照品贮备溶液至 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即制得一枝蒿酮酸对照品溶液(19.44 μg·mL⁻¹)。

2.3 供试品溶液的制备 取一枝蒿粉碎(过 60 目筛), 精密称取 2.0 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入纯甲醇 25 mL, 称定重量, 加热回流提取 1 h, 放置至室

温,再称定重量,用甲醇补足减失的重量。摇匀,滤过,取续滤液,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.4 线性关系的考察 精密吸取上述木犀草素对照品贮备液(0.064 mg·mL⁻¹) 2.0, 3.3, 5.0, 6.5, 8.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成含木犀草素为 12.80, 21.12, 32.00, 41.60, 51.20 μg·mL⁻¹的对照品溶液。从中分别精密吸取 10 μL,注入液相色谱仪,记录峰面积,以进样浓度 C(μg·mL⁻¹)为横坐标,峰面积为纵坐标进行回归,得标准曲线方程为: $A = 392.87C + 5183.1$, $r = 0.9998$ 。结果表明,在 12.80~51.20 μg·mL⁻¹ 范围内,木犀草素峰面积与进样量具有良好的线性关系。

再精密吸取上述一枝蒿酮酸对照品贮备液(0.1944 mg·mL⁻¹) 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成含一枝蒿酮酸为 9.72, 19.44, 29.16, 38.88, 77.76 μg·mL⁻¹的对照品溶液。从中分别精密吸取 10 μL,注入液相色谱仪,记录峰面积,以进样浓度 C(μg·mL⁻¹)为横坐标,峰面积为纵坐标进行回归,得标准曲线方程为: $A = 30125C + 28541$, $r = 0.9993$ 。结果表明,在 9.72~77.76 μg·mL⁻¹ 范围内,一枝蒿酮酸峰面积与进样量具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验 照“2.3”项下方法制得供试品溶液 1 份,在上述色谱条件下连续进样 5 次,每次 10 μL,测定其峰面积,计算木犀草素的平均值为 1388043, RSD= 0.50% (n= 5); 一枝蒿酮酸的平均值为 1189176, RSD= 2.56% (n= 5)。

2.6 稳定性试验 取同一批供试品溶液,每隔 1 h 进样 1 次,在上述色谱条件下记录木犀草素、一枝蒿酮酸的峰面积,结果表明木犀草素、一枝蒿酮酸在 12 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一批一枝蒿药材,照“2.3”项下方法平行制备供试品溶液 5 份,在上述色谱条件下连续进样 5 次,每次 10 μL,测定其峰面积,计算木犀草素的平均值为 1410225, RSD= 1.23% (n= 5); 一枝蒿酮酸的平均值为 1201443, RSD= 2.52% (n= 5)。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的一枝蒿样品粉末 9 份,精密加入一定量木犀草素、一枝蒿酮酸对照品,按 2.3 下方法操作制备供试品溶液,照上述高效液相色谱条件测定,结果木犀草素的平均加样回收率为 99.92%, RSD 为 0.07% (n= 9); 一枝蒿酮酸

的平均加样回收率为 99.82%, RSD 为 0.41% (n= 9)。结果见表 3 和表 4。

表 3 木犀草素的加样回收率

n	取样量 (g)	加入量 (mg)	测定量 (mg)	回收量 (mg)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
0	1.0026	—	0.4327	—	—			
1	0.9998	0.192	0.6238	0.1923	100.15			
2	1.0028	0.192	0.6250	0.1922	100.08	99.99		
3	1.0014	0.192	0.6237	0.1915	99.73			
4	1.0077	0.448	0.8860	0.4511	100.69			
5	1.0053	0.448	0.8819	0.4480	99.99	99.94	99.92	0.07
6	0.9991	0.448	0.8753	0.4441	99.14			
7	1.0023	0.576	1.0066	0.5740	99.65			
8	1.0029	0.576	1.0087	0.5758	99.97	99.85		
9	1.0002	0.576	1.0072	0.5755	99.91			

表 4 一枝蒿酮酸的加样回收率

n	取样量 (g)	加入量 (mg)	测定量 (mg)	回收量 (mg)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
0	1.0026	—	0.4094	—	—			
1	0.9998	0.194	0.6226	0.1936	99.61			
2	1.0028	0.194	0.6165	0.1955	100.56	99.51		
3	1.0014	0.194	0.6108	0.1912	98.35			
4	1.0077	0.583	0.9984	0.5807	99.57			
5	1.0053	0.583	1.0065	0.5815	99.71	99.66	99.82	0.41
6	0.9991	0.583	0.9984	0.5814	99.69			
7	1.0023	0.972	1.3966	0.9730	100.10			
8	1.0029	0.972	1.3902	0.9772	100.54	100.30		
9	1.0002	0.972	1.4096	0.9740	100.21			

2.9 药材含量测定 分别精密吸取供试品溶液和对照品溶液各 10 μL,按上述色谱条件,以外标一点法计算样品中木犀草素、一枝蒿酮酸的含量,3 批样品测定结果,木犀草素含量分别为 0.4358, 0.4340, 0.4315 mg·g⁻¹ (n= 3); 一枝蒿酮酸含量分别为 6.3474, 6.3348, 6.3517 mg·g⁻¹ (n= 3)。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择 由于新疆一枝蒿的药材含量测定方法在《中国药典》及《维吾尔药分册》中均无记载,因此含量测定方法由我们自己建立,并进行了方法学考察。本实验比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸、乙腈-磷酸、甲醇-甲酸、乙腈-甲醇-磷酸系统及梯度洗脱条件下对一枝蒿药材中木犀草素、一枝蒿酮酸分离度及含量高低的影响^[4-6],结果发现采用甲醇-0.4% 磷酸(45:55)作流动相时,双波长法测定

药材中的木犀草素和一枝蒿酮酸,二者的保留时间适中,考虑到色谱峰的分度、理论板数及对称性等色谱参数均符合要求,最终确定的流动相为:甲醇-0.4%磷酸(45:55)。

3.2 提取溶剂的选择 参阅相关文献,比较了一枝蒿药材在不同提取溶媒中的提取效果,实验中分别采用水提取、30%甲醇提取、50%甲醇提取、70%甲醇提取、纯甲醇回流提取1 h,结果发现一枝蒿药材在用纯甲醇回流提取1 h后,所测得的木犀草素和一枝蒿酮酸含量较高。

3.3 提取时间的选择 本文药材处理比较了超声、回流两种提取方法对木犀草素、一枝蒿酮酸含量高低的影响,选定提取时间条件分别为30 min,45 min,1 h,2 h,结果表明以纯甲醇回流提取1 h为宜。

本实验探索了采用反相高效液相法、双波长法同时测定一枝蒿药材中木犀草素和一枝蒿酮酸的含

量,方法简便、可行,可以作为该药材质量控制的方法。

[参考文献]

- [1] 阿丽艳,古力米热.维吾尔药一枝蒿的应用简介[J].中国民族医药杂志,2004,10(4):19.
- [2] 王燕,吐尔洪,阿西木,堵年生.新疆一枝蒿化学成分的研究[J].新疆医科大学学报,2004,27(4):361-363.
- [3] 梁永红,谭英,孙颖.一枝蒿的药理研究进展[J].新疆中医药,2005,23(2):67-68.
- [4] 马雁鸣,赵芸,吴韬.高效液相制备色谱制备一枝蒿酮酸对照品[J].中草药,2005,36(7):1002-1004.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部,北京:化学工业出版社,2005:184.
- [6] 邸多隆,王帅,马潇,等.HPLC测定独一味叶中木犀草素的含量[J].中成药,2005,27(5):581.