

3 讨论

在实验过程中,我们按照《中华人民共和国药典》方法对黄芪进行薄层鉴别,发现阴性有干扰。通过参考文献,发现黄芪药材和鸡血藤药材主斑点是一成分——芒柄花素^[4,5]。所以,我们对方法进行了改进,进行了双阴性的研究,发现双阴性无干扰,且重现性好。

在供试品溶液的制备中,为保证样品中葛根素提取充分,对提取时间进行了考察(时间 10, 20, 30 和 40 min),结果表明,时间 30 min 即能将样品中葛根素提取完全。

本文选定的方法能很好地鉴别该制剂中的粉葛、黄芪、鸡血藤和赤芍,且用于测定制剂中葛根素含量

的 HPLC 法操作简便、重复性好、精密度高,可作为该制剂的质量控制方法。

参考文献:

- [1] 刘宁, 盛蓉, 谈静, 等. 高效液相色谱法测定四川粉葛中葛根素的含量[J]. 中国医药导报, 2009, 6(18): 50-51.
- [2] 国家药典委员会. 《中华人民共和国药典》(1 部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 312-313.
- [3] 杜鹏, 乔建军, 来玉梅. 高效液相色谱法测定降脂减肥片中葛根素的含量[J]. 西北药学杂志, 2008, 23(2): 74-75.
- [4] 舒顺利, 应军, 刘军民, 等. 鸡血藤化学成分研究[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(2): 184-185.
- [5] 史婉璐, 王红秋. 黄芪化学成分及药理作用综述[J]. 黑龙江科技信息, 2012, (15): 52.

(编辑: 修春)

HPLC 法同时测定菟丝子中 5 种成分的含量

李怀国¹, 叶家宏², 李子鸿¹, 刘东文¹, 徐海燕¹ (1. 广东省佛山市中医院, 广东 佛山 528000; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 建立测定菟丝子中绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、山奈酚的含量方法。**方法** 采用高效液相色谱(HPLC)法。色谱柱为 Zorbax SB C₁₈; 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液, 梯度洗脱; 绿原酸的检测波长为 327 nm, 金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、山奈酚的检测波长为 360 nm; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 30 ℃。**结果** 5 种活性成分均达到基线分离, 线性关系良好($r \geq 0.9998$); 平均加样回收率为 96.8%~101.0%, RSD < 3.0% ($n=6$)。**结论** 该方法灵敏, 可靠, 可用于菟丝子药材的质量评价。

关键词: 菟丝子; 绿原酸; 金丝桃苷; 异槲皮苷; 紫云英苷; 山奈酚; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)01-0064-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.01.017

Content Determination of Five Constitutes of Semen Cuscutae by HPLC

LI Huaiguo¹, YE Jiahong², LI Zihong¹, LIU Dongwen¹, XU Haiyan¹ (1. Foshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Foshan 528000 Guangdong, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To establish a method for the content determination of chlorogenic acid, hyperoside, isoquercitrin, astragaloside and kaempferol in Semen Cuscutae by high performance liquid chromatography (HPLC).

Methods HPLC was performed on Zorbax SB C₁₈ column, the acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution) was employed as the mobile phase, and detection wavelength was 327 nm for chlorogenic acid and 360 nm for hyperoside, isoquercitrin, astragaloside and kaempferol. Column temperature was 30 ℃, and flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Results** Baseline separation were obtained and linear relationship were good ($r \geq 0.9998$) for the five main constituents. The average recoveries were 96.8%~101.0% and RSD < 3.0% ($n=6$). **Conclusion** The established

收稿日期: 2013-06-25

作者简介: 李怀国, 男, 副主任药师, 研究方向: 医院制剂生产与质量管理。Email: Fscolor@163.com。

method is sensitive, reliable and available for the quality control of Semen Cuscutae.

Keywords: Semen Cuscutae; Chlorogenic acid; Hyperoside; Isoquercitrin; Astragalin; Kaempferol; High performance liquid chromatography

菟丝子为旋花科植物南方菟丝子 *Cuscuta australis* R. Br.或菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam.的干燥成熟种子,功效补益肝肾、固精缩尿、安胎、明目、止泻,用于肝肾不足、腰膝酸软、阳痿遗精、遗尿尿频、肾虚胎漏、胎动不安、目昏耳鸣、脾肾虚泻^[1]。菟丝子主要含有黄酮类、有机酸、甾醇类、多糖、生物碱类、微量元素和氨基酸等多种成分,其中黄酮类化合物包括金丝桃苷、紫云英苷、山奈酚、槲皮素、槲皮素-3-O-β-D-半乳糖(2→1)β-D-芹糖苷等^[2-3]。菟丝子具有免疫调节、抗衰老、抗氧化、保肝、促性腺激素样等多种药理作用^[2,4],黄酮类化合物是主要药效成分。有关菟丝子黄酮类及酚酸类成分的含量测定研究已有文献^[5-6]报道,本研究在文献基础上,进一步优化色谱条件,采用 HPLC 法测定菟丝子中绿原酸和 4 种代表性强的黄酮类成分(金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷及山奈酚)的含量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪(四元泵、柱温箱、DAD 检测器和 Agilent 1200 色谱工作站),美国 Agilent 公司; Sartorius BP 211D 分析天平,北京塞多利斯天平有限公司。

1.2 试剂 7 批菟丝子(盐炙)来源见表 1,经广东省佛山市中医院刘东文副主任药师鉴定,菟丝子药材均为菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam.的干燥成熟种子的盐炙品;绿原酸对照品,中国药品生物制品检定所,批号:110753-200413;金丝桃苷对照品、异槲皮苷对照品、紫云英苷对照品、山奈酚对照品,成都曼思特生物科技有限公司,批号分别为: MUST-12092001、

表 1 菟丝子来源

Table 1 The sources of Semen Cuscutae

编号	供货单位	批号
S1	广东杏林药业有限公司	20120205
S2	广东紫和堂大药房有限公司	20121201
S3	广州市岭南中药饮片有限公司	121201
S4	广州至信药业有限公司	1511180
S5	广东康美药业有限公司	120101101
S6	广东省药材公司中药饮片厂	75713111
S7	广东省药材公司中药饮片厂	75713211

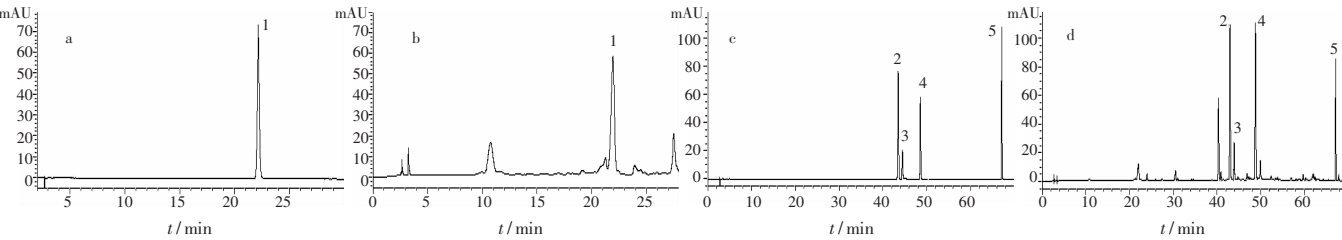
MUST-11121801、MUST-12092001、MUST-12102503; 乙腈,色谱纯, Merk 公司;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Zorbax SB C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)色谱柱;流动相为乙腈(A)-0.1 %磷酸溶液(B),梯度洗脱: 0~15 min, A 为 5 %→10 %, 15~35 min, A 为 10 %→18 %, 35~50 min, A 为 18 %→25 %, 50~60 min, A 为 25 %→35 %, 60~70 min, A 为 35 %→70 %;绿原酸的检测波长为 327 nm, 金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷及山奈酚的检测波长为 360 nm;流速 1 mL·min⁻¹;柱温 30℃。结果样品的 5 种成分的色谱峰分离度符合要求。对照品及样品色谱图见图 1。

2.2 供试品溶液的制备 取本品粉末(过四号筛)约 1.0 g,精密称定,精密加入 80 %甲醇 50 mL,称定质量,超声处理 1 h,用 80 %甲醇补足减失的质量,滤过,取续滤液,即得。

2.3 对照品溶液的制备 取金丝桃苷对照品、异槲皮



1. 绿原酸; 2. 金丝桃苷; 3. 异槲皮苷; 4. 紫云英苷; 5. 山奈酚
a. 绿原酸对照品(327 nm); b. 样品(327 nm); c. 混合对照品(360 nm); d. 样品(360 nm)

图 1 对照品与样品 HPLC 色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of reference substances and sample

苷对照品、紫云英苷对照品、山奈酚对照品适量，精密称定，加甲醇分别制成每 1 mL 含金丝桃苷 0.556 mg、异槲皮苷 0.116 mg、紫云英苷 0.564 mg、山奈酚 0.276 mg 的溶液；分别精密吸取上述对照品溶液各 1 mL，转移至 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，混匀，即得黄酮混合对照品溶液（每 1 mL 中含金丝桃苷 55.6 μg、异槲皮苷 11.6 μg、紫云英苷 56.4 μg、山奈酚 27.6 μg）。另取绿原酸对照品适量，精密称定，加 80 % 甲醇制成每 1 mL 含 70.0 μg 的溶液，即得。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取绿原酸对照品溶液（1 mL 含 35.0 μg）及黄酮混合对照品溶液（每 1 mL 中含金丝桃苷 111.2 μg、异槲皮苷 23.2 μg、紫云英苷 112.8 μg、山奈酚 55.2 μg）各 1，2，5，10，20 μL，按 2.1 项下色谱条件进样分析，测定峰面积。以进样量（μg）为横坐标 X ，色谱峰面积（A）为纵坐标 Y ，进行线性回归。结果绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、山奈酚的回归方程及相关系数（ r ）分别为： $Y=3104.24X-12.73$ （ $r=0.9999$ ）、 $Y=1858.04X+31.09$ （ $r=0.9998$ ）、 $Y=3080.12X-4.69$ （ $r=0.9999$ ）、 $Y=1195.86X-10.59$ （ $r=0.9999$ ）、 $Y=3080.12X-15.38$ （ $r=0.9999$ ），进样量分别在 0.035~0.700，0.111~2.224，0.023~0.464，0.113~2.256，0.055~1.104 μg 范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL 连续进样 6 次，结果绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、山奈酚峰面积的 RSD 分别为 0.73 %、0.17 %、0.53 %、0.43 %、0.26 %，表明该方法的精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL，分别于 0，5，10，15，20，25 h 进样分析，结果绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、山奈酚峰面积的 RSD 分别为 0.92 %、0.43 %、0.85 %、0.59 %、0.42 %，表明供试品溶液在 25 h 稳定。

2.7 重复性试验 取同一批样（S1）6 份，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，并进样分析，计算含量，结果绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、山奈酚的平均含量分别为 2.324，3.839，0.842，6.174，1.242 mg·g⁻¹，RSD 分别为 1.02 %、0.34 %、0.63 %、0.11 %、0.62 %。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的同批样品（S1）粉末 6 份，约 0.5 g，精密称定，分别精密加入绿原酸对照品溶液（每 1 mL 含 232.2 μg）、金丝桃苷对照品溶液（每 1 mL 含 384.0 μg）、异槲皮苷对照品溶液

（每 1 mL 含 81.8 μg）、紫云英苷对照品溶液（每 1 mL 含 616.4 μg）、山奈酚对照品溶液（每 1 mL 含 125.2 μg）各 5 mL，再精密加入 80 % 甲醇 25 mL，按照“2.2”项下方法制备供试品溶液，并进样分析，计算加样回收率，结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果（ $n=6$ ）
Table 2 Recovery of five content of Semen Cuscutae

测定成分	取样量/g	样品量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
绿原酸	0.4938	1.148	1.161	2.280	97.50	96.8	1.45
	0.4786	1.112	1.161	2.244	97.50		
	0.4742	1.102	1.161	2.217	96.04		
	0.4690	1.090	1.161	2.201	95.69		
	0.4715	1.096	1.161	2.245	98.97		
	0.4651	1.081	1.161	2.187	95.26		
金丝桃苷	0.4938	1.896	1.920	3.872	102.92	99.0	2.98
	0.4786	1.837	1.920	3.702	97.14		
	0.4742	1.820	1.920	3.777	101.93		
	0.4690	1.800	1.920	3.693	98.59		
	0.4715	1.810	1.920	3.635	95.05		
	0.4651	1.786	1.920	3.674	98.33		
异槲皮苷	0.4938	0.416	0.409	0.819	98.53	101.0	2.89
	0.4786	0.403	0.409	0.801	97.31		
	0.4742	0.399	0.409	0.806	99.51		
	0.4690	0.395	0.409	0.818	103.42		
	0.4715	0.397	0.409	0.823	104.16		
	0.4651	0.392	0.409	0.814	103.18		
紫云英苷	0.4938	3.049	3.082	6.104	99.12	99.8	2.33
	0.4786	2.955	3.082	6.010	99.12		
	0.4742	2.928	3.082	6.105	103.08		
	0.4690	2.896	3.082	5.969	99.71		
	0.4715	2.911	3.082	5.876	96.20		
	0.4651	2.872	3.082	5.995	101.33		
山奈酚	0.4938	0.611	0.626	1.243	100.96	98.08	2.42
	0.4786	0.593	0.626	1.190	95.37		
	0.4742	0.587	0.626	1.210	99.52		
	0.4690	0.581	0.626	1.201	99.04		
	0.4715	0.584	0.626	1.179	95.05		
	0.4651	0.576	0.626	1.193	98.56		

2.9 样品含量测定 分别精密吸取绿原酸对照品溶液 5 μL、黄酮混合对照品溶液及供试品溶液各 10 μL，注入液相色谱仪中，测定峰面积，按外标法计算样品含量（mg·g⁻¹），结果见表 3。

3 讨论

本实验分别对 60 % 甲醇、80 % 甲醇、甲醇进行了提取溶媒的考察，结果 80 % 甲醇的提取效果最好，因此确定采用 80 % 甲醇作为提取溶媒。通过对

表 3 菟丝子 5 种成分含量测定结果($\bar{x} \pm s$, mg·g⁻¹, n=2)

Table 3 Content of five content of Semen Cuscutae

编号	绿原酸	金丝桃苷	异槲皮苷	紫云英苷	山奈酚
S1	2.324 ± 0.016	3.839 ± 0.019	0.842 ± 0.029	6.174 ± 0.012	1.238 ± 0.002
S2	1.269 ± 0.008	2.466 ± 0.028	0.485 ± 0.017	2.177 ± 0.017	0.631 ± 0.007
S3	0.955 ± 0.006	1.724 ± 0.021	0.306 ± 0.005	1.698 ± 0.031	2.044 ± 0.014
S4	0.529 ± 0.004	1.798 ± 0.027	0.198 ± 0.003	1.321 ± 0.026	0.757 ± 0.012
S5	0.768 ± 0.007	1.608 ± 0.013	0.315 ± 0.018	1.972 ± 0.045	2.853 ± 0.024
S6	1.414 ± 0.041	2.898 ± 0.021	0.458 ± 0.012	1.154 ± 0.085	0.611 ± 0.028
S7	0.949 ± 0.029	1.854 ± 0.015	0.360 ± 0.005	1.411 ± 0.054	0.664 ± 0.016

40, 50, 60, 80 min 等不同超声处理时间进行了筛选,发现超声 60 min 后提取较完全,确定采用 80 % 甲醇超声处理 60 min 的提取方法。

根据绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷及黄酮苷元山奈酚等 5 种成分的极性差异,流动相选择了乙腈-0.1 % 磷酸的梯度洗脱系统,色谱分离度符合方法学要求。绿原酸检测波长采用 327 nm^[1],4 种黄酮类成分的检测波长采用 360 nm^[1]。

2010 版《中华人民共和国药典》规定了菟丝子的金丝桃苷含量测定方法;胡丽萍等^[9]建立了菟丝子中 5 种成分(绿原酸、金丝桃苷、槲皮苷、山奈酚及异鼠李素)的含量测定方法;肖岚等^[10]也建立 5 种成分(绿原酸、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚及异鼠李素)的含量测定方法。本实验通过对多种流动相系统条件下的对照品保留时间定位、样品加对照品保留时间定位、光谱分析等试验方法,未在菟丝子色谱图中发现槲皮苷的峰,而保留时间相近的位置则为紫云英苷

峰,紫云英苷含量较高,此结果与化学成分研究文献^[2-3]报道菟丝子中紫云英苷含量较高的结果相一致。异槲皮苷是紫云英苷的同分异构体^[7],研究还发现菟丝子中含一定量的异槲皮苷。此外,本研究也对黄酮苷元(槲皮素及异鼠李素)进行了含量考察,结果槲皮素及异鼠李素的含量明显低于山奈酚的含量。因此,本研究确定了绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、山奈酚含量测定作为菟丝子质量控制指标。

通过 7 批样品含量发现,金丝桃苷、紫云英苷的含量相对较高,紫云英苷、山奈酚的含量差异较大。本研究建立的 HPLC 方法重复性较好,为菟丝子的质量控制提供一定依据。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(1 部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 290-291, 205-206.
[2] 李建平, 王静, 张跃文, 等. 菟丝子的研究进展[J]. 中国医药导报, 2009, 6(23): 5-6.
[3] 高佃华. 菟丝子化学成分的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2009.
[4] 王焕江, 赵金娟, 刘金贤, 等. 菟丝子的药理作用及其开发前景[J]. 中医药学报, 2012, 40(6): 123-125.
[5] 胡丽萍, 王跃飞, 宋殿荣, 等. HPLC-UV-MS 法同时测定菟丝子中 5 种成分的含量[J]. 中药材, 2010, 33(8): 1277-1279.
[6] 肖岚, 杨梓懿, 石继连. HPLC 同时测定菟丝子不同炮制品中 5 种主要活性成分含量[J]. 湖南中医药大学学报, 2012, 32(7): 50-53.
[7] 王燕, 王先荣, 马凤余, 等. 金丝桃苷在植物中的分布及其含量测定[J]. 安徽医药, 2009, 13(11): 1312-1315.

(编辑: 修春)

广东英德引种广佛手与道地产地广佛手质量的比较研究

祁龙凯¹, 林 励¹, 汪金玉¹, 蔡丹燕¹, 周智勇², 廖伟星²(1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 广东祥丰农林科技有限公司, 广东 英德 513000)

摘要: 目的 评价广东英德引种广佛手的质量。方法 选取广东英德与传统道地产地的广佛手样品, 采用高效液相色谱(HPLC)法测定其橙皮苷和 5, 7-二甲氧基香豆素的含量, 色谱柱为 Thermo BDS HYPERSIL C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相分别为甲醇-水-冰醋酸(33: 63: 2)和甲醇-水(65: 35), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长分别为 284 nm 和 326 nm。结果 英德产广佛手符合《中国药典》标准, 且橙皮苷和 5, 7-二甲氧基香豆素的平均含量均高于广佛手道地产区。结论 广东英德产广佛手橙皮苷含量符合 2010 版《中国

收稿日期: 2013-07-15

作者简介: 祁龙凯, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药资源开发与新药研究。Email: 371605700@qq.com。通讯作者: 林励, 男, 研究员, 主要从事中药资源开发与新药研究。Email: LL76611@126.com。