

HPLC-双波长法同时测定苗药了哥王乙醇提取物中伞形花内酯和西瑞香素的含量^Δ

冯果^{1*}, 李玮¹, 何新², 吴增光², 郑传奇¹(1. 贵阳中医学院药学院, 贵阳 550025; 2. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193)

中图分类号 R917; R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)17-2369-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.17.15

摘要 目的: 建立同时测定苗药了哥王乙醇提取物中伞形花内酯和西瑞香素含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Diamonsil C₁₈, 流动相为乙腈-0.2% 磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 0~15 min, 324 nm, >15~45 min, 346 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 20 μL。结果: 伞形花内酯和西瑞香素的检测进样量线性范围分别为 0.33~6.60 μg($r=0.9997$)、0.21~4.20 μg($r=0.9992$); 检测限分别为 6.60、4.20 ng, 定量限分别为 18.90、12.60 ng; 精密性、稳定性(48 h)、重复性试验的 RSD < 2% ($n=6$ 或 $n=7$); 平均加样回收率分别为 98.27%、99.98%, RSD 分别为 1.96%、1.84% ($n=9$)。结论: 该方法操作简单、结果准确、稳定性和重复性好, 适用于苗药了哥王中伞形花内酯和西瑞香素含量的同时测定。

关键词 了哥王; 苗药; 高效液相色谱法; 伞形花内酯; 西瑞香素; 含量测定

Content Determination of Umbelliferone and Daphnoretin in Ethanol Extract of Miao Medicine *Wikstroemia indica* by HPLC Dual-wavelength Method Simultaneously

FENG Guo¹, LI Wei¹, HE Xin², WU Zengguang², ZHENG Chuanqi¹(1. College of Pharmacy, Guiyang College of TCM, Guiyang 550025, China; 2. College of Pharmacy, Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for content determination of umbelliferone and daphnoretin in ethanol extract of Miao medicine *Wikstroemia indica* simultaneously. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Diamonsil C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution (gradient elution) at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 324 nm during 0-15 min and 346 nm during >15-45 min. The column temperature was 30 ℃, and injection volume was 20 μL. RESULTS: The linear range was 0.33-6.60 μg for umbelliferone ($r=0.9997$) and 0.21-4.20 μg for daphnoretin ($r=0.9992$). The detection limits were 6.60 and 4.20 ng, and the limits of quantification were 18.90 and 12.60 ng, respectively; RSDs of precision, stability (48 h) and reproducibility tests were lower than 2% ($n=6$ or $n=7$). The average recoveries were 98.27% (RSD=1.96%, $n=9$) and 99.98% (RSD=1.84%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, stable and reproducible. It is suitable for content determination of umbelliferone and daphnoretin in Miao medicine *W. indica* simultaneously.

KEYWORDS *Wikstroemia indica*; Miao medicine; HPLC; Umbelliferone; Daphnoretin; Content determination

了哥王[*Wikstroemia indica* (L.) C. A. Mey.]为瑞香科堇花属植物^[1], 为南方常用苗药, 其性寒、味苦、辛、微温, 有大毒, 归肺、肝经, 具有清热解毒、消肿散结、止痛等功效。目前, 从了哥王中分离得到的 80 多种化合物可分为香豆素类、木脂素类、黄酮类、萜醌类、甾族类、皂苷类、萜类、酰胺类、多糖类和挥发油等 10 大类^[2-14]。此外, 了

哥王中还含有大量的酯类、酮类、烯类、醇类等化合物。了哥王具有抗菌、抗炎镇痛、抗病毒、抗肿瘤、抗疟、利尿、引产、镇咳祛痰、降低心肌耗氧量等药理作用^[15-20], 临床广泛用于呼吸系统、泌尿系统、皮肤等急性扁桃体炎、慢性支气管炎、急慢性感染性炎症、颈淋巴结肿大、乳腺炎、肝炎、肝硬化、肝腹水、肢体疼痛、带状疱疹、皮下剥离伤、坐骨神经痛和多种癌症如乳腺癌、恶性淋巴瘤、肺癌及各种体表癌等^[21]。伞形花内酯和西瑞香素为苗药了哥王香豆素类主要有效成分。本研究采用高效液相色谱(HPLC)-双波长法建立了同时测定苗药了哥王乙醇提取物中伞形花内酯和西瑞香素含量的方法, 以期为了哥王中伞形花内酯和西瑞香素的含量测定及完

^Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81760766); 贵州省科技计划项目(No.黔科合基础[2017]1007); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(No.QZYY-2016-073); 贵阳中医学院科研项目(No.贵中医科学院内[2016]40号); 贵阳中医学院博士启动基金项目(No.贵中医博士基金[2017]1号)

* 副教授, 博士。研究方向: 中药新制剂、新技术、药动学。电话: 0851-88233090。E-mail: 453989352@qq.com

善了哥王药材质量控制标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260 HPLC仪,包括 G1311B 四元泵、内置真空脱气机、G1329B 标准自动进样器、G1315D 二极管阵列检测器、G1316A 柱温箱、ChemStation 色谱工作站(美国 Agilent 公司);XL-10B 粉碎机(浙江大鹏机械有限公司);LT1002E 电子天平(常熟市天量仪器有限责任公司);SLG-1000 渗漉提取罐(北京仪器厂);RE52-99 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);FA2004 电子分析天平(上海衡平仪器仪表厂);HH-S4 恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司);DZF-6020 真空干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);KQ-3200DA 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

了哥王药材采购于广西各中药材市场,共 10 批,经贵阳中医学院药学院李玮教授鉴定为瑞香科堇花属植物了哥王[*Wikstroemia indica* (L.) C. A. Mey.],使用时取药材粉碎成粗粉(过 1 号筛),备用;了哥王药材来源详见表 1。伞形花内酯对照品(批号:BW5534,纯度: $>98\%$)购自北京坛墨质检科技有限公司;西瑞香素对照品(批号:111758,纯度: $>98\%$)购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯净水。

表 1 了哥王药材来源

Tab1 Resource of *W. indica*

批号	产地	采集时间	采集人
20160301	广西玉林市	2016年2月	冯果
20160302	广西桂林市	2016年2月	冯果
20160303	广西博白县	2016年2月	冯果
20160304	广西灵山县	2016年2月	冯果
20160305	广西南宁市	2016年2月	冯果
20160306	广西玉林市	2015年12月	冯果
20160307	广西百色市	2015年12月	冯果
20160308	广西梧州市	2015年12月	冯果
20160309	广西柳州市	2015年12月	冯果
20160310	广西灵山县	2015年12月	冯果

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);检测器:紫外检测器;波长:0~15 min, 324 nm, >15~45 min, 346 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:20 μL;流动相:乙腈(A相)-0.2%磷酸溶液(B相),梯度洗脱(0~5 min, 22%~25% A; 5~15 min, 25%~25% A; 15~20 min, 25%~30% A; 20~25 min, 30%~33% A; 25~30 min, 33~30% A; 30~35 min, 30%~28% A; 35~40 min, 28%~25% A; 40~45 min, 25%~22% A)。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取伞形花内酯、西瑞香素对照品 33.00、21.00 mg,分别置于 50 mL 的量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为 0.66、0.420 mg/mL 的对照品贮备液,4 ℃ 保存,备用。

分别精密吸取伞形花内酯、西瑞香素对照品贮备液 25.0 mL,置于同一 50 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为 0.330、0.210 mg/mL 的混合对照品溶液,4 ℃ 保存,备用。

2.2.2 供试品溶液 精密称取了哥王乙醇渗漉法提取物粉末(以下简称“乙醇提取物”)^[2]约 0.5 g,精密称定,置于具塞三角烧瓶中,加 80% 甲醇 30 mL 超声(功率:200 W,频率:40 kHz)提取 30 min,过滤,挥干滤液,残渣用甲醇溶解,溶液转移至 10 mL 的量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 空白溶液 取流动相作为空白溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、空白溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果,在该色谱条件下,伞形花内酯和西瑞香素之间及与其他成分达到较好的分离,分离度大于 1.5。供试品溶液和混合对照品溶液的伞形花内酯、西瑞香素分别在 9.0、35.5 min 左右出现,理论板数以伞形花内酯计不低于 3 000,详见图 1。

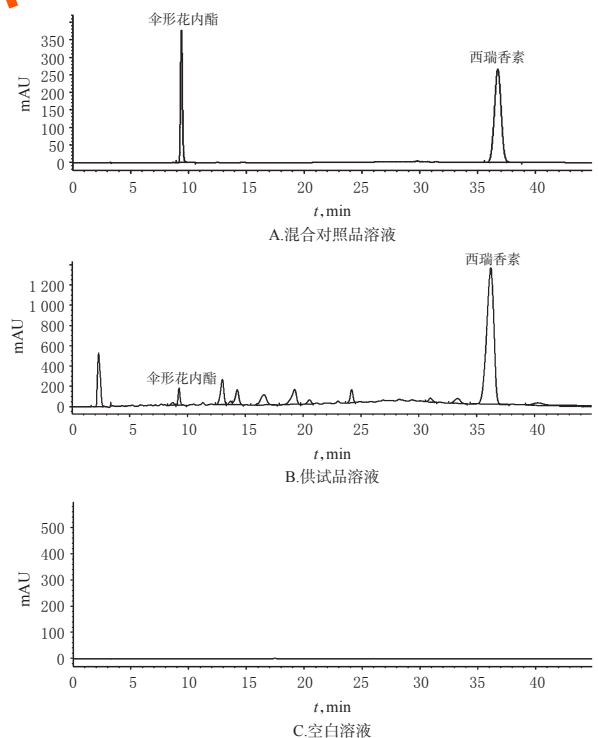


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、10.0 mL 分别至 10 mL 的量瓶中, 甲醇定容, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 收集续滤液, 即得。分别吸取 20 μL , 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以待测成分进样量为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归, 得伞形花内酯、西瑞香素回归方程分别为 $y=57.086x+37.736$ ($r=0.999\ 7$)、 $y=41.162x+2.962\ 8$ ($r=0.999\ 2$)。结果表明, 伞形花内酯、西瑞香素进样量分别在 0.33~6.60 μg 、0.21~4.20 μg 范围内线性关系良好。

2.5 检测限与定量限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量, 倍比稀释, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。当信噪比为 3:1 时, 得检测限; 当信噪比为 10:1 时, 得定量限。结果, 伞形花内酯和西瑞香素的检测限分别为 6.60、4.20 ng, 定量限分别为 18.90、12.60 ng。

2.6 精密度试验

取混合对照品溶液(伞形花内酯、西瑞香素对照品质量浓度分别为 0.330、0.210 mg/mL) 适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果, 伞形花内酯和西瑞香素峰面积的 RSD 分别为 1.73%、1.51% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取了哥王乙醇提取物粉末(批号: 20160304)供试品溶液适量, 分别于室温下放置 0、2、4、8、12、24、48 h, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录峰面积。结果, 伞形花内酯、西瑞香素峰面积的 RSD 分别为 1.30%、0.74% ($n=7$), 表明供试品溶液室温下放置 48 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验

精密称取了哥王乙醇提取物粉末(批号: 20160304) 0.5 g, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 共 6 份, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算样品含量。结果, 伞形花内酯、西瑞香素平均质量分数分别为 0.751、43.62 mg/g ($n=6$), RSD 分别为 1.25%、0.73% ($n=6$), 表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取已知含量的了哥王乙醇提取物粉末(批号: 20160304, 含伞形花内酯、西瑞香素平均质量分数分别为 0.751、43.62 mg/g) 约 0.10 g, 共 9 份, 分别加入相当于了哥王乙醇提取物原有含量的 80%、100% 和 120% 对照品溶液, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算加样回收率, 结果详见表 2。

2.10 样品含量测定

取 10 批样品各适量, 分别按“2.2.2”项下方法制备供

试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算样品含量, 结果详见表 3。

表 2 加样回收率试验结果

Tab 2 Results of recovery tests

待测成分	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
伞形花内酯	0.076 6	0.063	0.136 7	95.39	98.27	1.96
	0.075 3	0.063	0.135 9	96.15		
	0.076 2	0.063	0.136 8	96.27		
	0.076 8	0.084	0.161 1	100.32		
	0.075 6	0.084	0.159 1	99.40		
	0.075 8	0.084	0.159 3	99.43		
	0.075 9	0.105	0.178 9	98.14		
	0.076 0	0.105	0.179 6	98.67		
	0.075 1	0.105	0.180 8	100.67		
	西瑞香素	4.410 0	3.300	7.720 6		
	4.484 1	3.300	7.782 3	99.94		
	4.458 0	3.300	7.779 9	100.66		
	4.383 8	4.290	8.662 1	99.73		
	4.370 7	4.290	8.653 2	99.82		
	4.418 7	4.290	8.877 5	103.93		
	4.383 8	5.280	9.592 2	98.64		
	4.458 0	5.280	9.578 7	96.98		
	4.392 5	5.280	9.663 3	99.83		

表 3 样品含量测定结果 ($n=3$, mg/g)

Tab 3 Results of content determination of samples ($n=3$, mg/g)

批号	伞形花内酯	西瑞香素
20160301	0.836 3	39.065
20160302	0.829 5	43.852
20160303	0.703 7	42.354
20160304	0.751 0	43.620
20160305	0.715 7	43.565
20160306	0.675 8	41.027
20160307	0.719 7	43.052
20160308	0.723 7	43.730
20160309	0.705 7	43.547
20160310	0.725 7	43.943

3 讨论

3.1 提取条件的选择

笔者在前期试验中考察了回流提取法和超声提取法对样品中伞形花内酯和西瑞香素的提取量的影响。结果表明, 回流提取法伞形花内酯和西瑞香素的提取量分别为 0.750 2、43.587 5 mg/g, 超声提取法伞形花内酯和西瑞香素的提取量分别为 0.751 0、43.620 0 mg/g, 两者间没有显著差异, 且超声提取法简单、方便, 故确定超声提取法为样品提取方法。在前期试验中, 笔者还对水、乙醇、甲醇和 80% 的甲醇等不同溶剂进行了考察, 结果表明, 采用 80% 甲醇为溶剂效果更好。

3.2 检测波长的选择

通过对伞形花内酯和西瑞香素进行紫外扫描, 结果表明伞形花内酯和西瑞香素分别在 324、346 nm 波长处有最大吸收。在分析过程中笔者还发现, 伞形花内酯的

出峰时间要早于西瑞香素。为了既能同时检测这2个香豆素类成分,又不影响这2个成分的吸收强度,笔者选择在不同时间段内切换检测波长以同时检测这2个成分,即在0~15 min,检测波长为324 nm;15~45 min,检测波长为346 nm。

3.3 检测方法的选择

在研究过程中,笔者对检测方法的流动相也进行了优选,包括对不同比例的甲醇-水、甲醇-磷酸、乙腈-水、乙腈-磷酸等流动相进行了考察。结果表明,当选用乙腈-0.2%磷酸为流动相时,峰和分离度较好。在该流动相条件下笔者还进行了等度和不同梯度洗脱试验,考察了流速为0.8、1.0 mL/min时对伞形花内酯和西瑞香素的出峰时间和分离效果的影响。结果表明,选择梯度洗脱、流速为1.0 mL/min时,伞形花内酯和西瑞香素的出峰时间和分离效果较好。

综上所述,HPLC-双波长法操作简单、结果准确、稳定性和重复性好,适用于苗药了哥王中伞形花内酯和西瑞香素含量的同时测定。

参考文献

[1] 张庆荣,夏光成.有毒中草药彩色图鉴[M].天津:天津科技翻译出版公司,2006:131.

[2] 王建科,李玮,郭建民,等.不同炮制方法对了哥王中总黄酮含量的影响[J].贵阳中医学院学报,2011,33(1):17-19.

[3] 易文燕,刘明,陈敏,等.了哥王化学成分研究[J].时珍国医国药,2012,23(12):3001-3003.

[4] 国光梅,汪治,李玮,等.了哥王石油醚提取部位化学成分研究[J].科学技术与工程,2014,14(21):187-190.

[5] 刘艳,李玮,周汉华,等.了哥王药材HPLC指纹图谱研究[J].中国民族民间医药,2011,20(1):57-59.

[6] 王建科,李玮,张永萍,等.了哥王饮片包装材料研究[J].中成药,2013,35(8):1801-1804.

[7] 国光梅,李玮,汪治.了哥王甾醇化合物的研究[J].山地农业生物学报,2012,31(1):77-79.

[8] 刘明,李玮,徐丹,等.了哥王脂溶性成分的气相色谱-质谱联用分析[J].时珍国医国药,2011,22(5):1102-1103.

[9] 国光梅,李玮,汪治,等.了哥王中木脂素成分及生物活性研究[J].山地农业生物学报,2012,31(5):457-459.

[10] LEE KH, TAGAHARA K, SUZUKI H, et al. Antitumor agents. 49. tricin, kaempferol-3-O-beta-D-glucopyranoside and (+)-nortrachelogenin, antileukemic principles from *Wikstroemia indica*[J]. *J Nat Prod*, 1981, 44(5): 530-535.

[11] KATO A, HASHIMOTO Y, KIDOKOR M. (+)-nortrache-

logenin, a new pharmacologically active lignan from *Wikstroemia indica*[J]. *J Nat Prod*, 1979, 42(2):159-162.

[12] HO WS, XUE JY, SUN SS, et al. Antiviral activity of daphnoretin isolated from *Wikstroemia indica*[J]. *Phytother Res*, 2010, 24(5):657-661.

[13] WANG LY, UNEHARA N, KITANAKA S. Ligands from the roots of *Wikstroemia indica* and their DPPH radical scavenging and nitric oxide inhibitory activities[J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(10):1348-1351.

[14] LU CL, ZHU L, PIAO JH, et al. Chemical compositions extracted from *Wikstroemia indica* and their multiple activities[J]. *Pharm Biol*, 2012, 50(2):225-231.

[15] WANG LY, UNEHARA T, KITANAKA S. Anti-inflammatory activity of new guaiane type sesquiterpene from *Wikstroemia indica*[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2005, 53(1):137-139.

[16] WEI L, WANG X, MU S, et al. Ultra high performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled with hierarchical cluster analysis to evaluate *Wikstroemia indica* (L.) C. A. Mey. from different geographical regions[J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(12):2093-2100.

[17] 张金娟,熊英,李玮,等.了哥王炮制前后的药效比较研究[J].时珍国医国药,2015,26(5):1118-1120.

[18] VLIETINCK AJ, DE BRUYNE T, APERS S, et al. plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection[J]. *Planta Med*, 1998, 64(2):97-109.

[19] CHEN HC, CHOU CK, KUO YH, et al. Identification of a protein kinase C (PKC) activator, daphnoretin, that suppresses hepatitis B virus gene expression in human hepatoma cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 1996, 52(7):1025-1032.

[20] HIRANO T, GOTOH M, OKA K. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells[J]. *Life Sci*, 1994, 55(13):1061-1069.

[21] LI YM, ZHU L, JIANG JG, et al. Bioactive components and pharmacological action of *Wikstroemia indica* (L.) C. A. Mey and its clinical application[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2009, 10(8):743-752.

[22] 冯果,李玮,何新,等.正交试验结合综合评分法优化苗药了哥王的提取工艺[J].中国药房,2017,28(16):2216-2219.

(收稿日期:2018-04-07 修回日期:2018-07-11)

(编辑:余庆华)