HPLC 法同时测定刘寄奴中 5 个成分的含量*

柳贤福,丁聪,黄春燕,盘涌,覃日宏**

(广西中医药大学赛恩斯新医药学院,南宁 530222)

摘要 **目的:** 建立 HPLC 法同时测定刘寄奴中槲皮素、柚皮素、山柰酚、芒柄花素、异泽兰黄素 5 个成分的含量。**方法:** 采用 Syncronis C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.2% 磷酸水(40∶60),检测波长 260 nm,流速 1.0 mL·min^{-1},柱温 25 ℃,进样量 10 μL。**结果:** 将实验测得的图谱与标准物质进行对照,确定其 5 个成分分别为槲皮素、柚皮素、山柰酚、芒柄花素、异泽兰黄素;5 个成分分别在测定范围内(0.062~0.992 μg,0.031~0.496 μg,0.034~0.544 μg,0.022~0.352 μg,0.027~0.432 μg)线性关系良好;平均加样回收率为 97.8%~100.6%,RSD 均小于 3.0%;4 批样品中 5 个成分的含量分别为 0.022%~0.041%、0.009%~0.024%、0.011%~0.023%、0.006%~0.014%、0.017%~0.033%。**结论:** 该方法简便准确,重复性好,可用于刘寄奴 5 个成分的含量测定。

关键词:刘寄奴;槲皮素;柚皮素;山柰酚;芒柄花素;异泽兰黄素;高效液相色谱;含量测定

中图分类号: R 917 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-1793(2019)11-1998-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.11.10

Simultaneous determination of five components in Herba Artemisiae Anomalae by HPLC*

LIU Xian-fu, DING Cong, HUANG Chun-yan, PAN Yong, QIN Ri-hong**

(Faculty of Chinese Medical Science Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530222, China)

Abstract **Objective:** To establish an HPLC method for simultaneous determination of five components in Herba Artemisiae Anomalae. **Methods:** The HPLC assay was performed on a Syncronis C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column. The mobile phase was methanol-0.2% phosphoric acid (40∶60). The flow rate was 1 mL·min^{-1}, the detection wavelength was 260 nm, the column temperature was 25 ℃ and the injection volume was 10 μL. **Results:** Five constituents of quercetin, naringin, kaempferol, formononetin and eupatilin were identified by comparing with the spectra of standard substances. The linear relationship of the five components was good within the range (0.062-0.992 μg, 0.031-0.496 μg, 0.034-0.544 μg, 0.022-0.352 μg and 0.027-0.432 μg). The average recoveries of sample addition were in the range of 97.8%-100.6% (RSD<3.0%). The contents of five components in four batches of samples were 0.022%-0.041%, 0.009%-0.024%, 0.011%-0.023%, 0.006%-0.014% and 0.017%-0.033%.

* 广西壮族自治区中青年教师基础能力提升项目(编号:KY2016YB831)

** 通信作者 Tel:(0771)4736799;E-mail:306176171@qq.com

第一作者 Tel:(0771)4736299;E-mail:176336350@qq.com

Conclusion: The method is simple, accurate and reproducible. It can be used for the determination of five components in Herba Artemisiae Anomalae.

Keywords: Herba Artemisiae Anomalae; quercetin; naringenin; kaempferol; formononetin; eupatilin; HPLC; content determination

刘寄奴为菊科植物奇蒿 *Artemisia anomala* S. Moore 的干燥地上部分，又名南刘寄奴、六月霜、九牛草、野马兰头等[1]，主要分布于华东、中南及西南各省区，主产于江苏、浙江、广西、湖南等地。奇蒿始载于《雷公炮制论》，其性温，味苦[2]，具有清热解暑、破血通经、散瘀止痛、消食化积的功效[3]，用于治疗血漏经闭、产后阻腹痛[4]、食积不化[5]、炎症[6]、金黄色葡萄球菌感染[7]、局灶性脑缺血[8]等症。有文献报道，从刘寄奴中分离得到倍半萜内酯、黄酮和香豆素类等化合物，其中包括槲皮素、柚皮素、山柰酚、芒柄花素和异泽兰黄素 5 个成分[9-13]，本文采用 HPLC 法对刘寄奴中上述 5 个成分的含量进行同时测定，为刘寄奴质量评价提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪（Agilent 公司）；KQ-100DE 型数控超声波清洗仪（昆山市超声波仪器有限公司）；BP211D 万分之一电子分析天平（赛多利斯公司）；Millipore Simplicity-185 超纯水仪（密里博公司）等。

1.2 试药 对照品槲皮素（批号 100081-201610）购于中国食品药品检定研究院；对照品柚皮素（批号 3457，HPLC 法测得纯度≥ 98.5%）、山柰酚（批号 3532，HPLC 法测得纯度≥ 98.0%）、芒柄花素（批号 3524，HPLC 法测得纯度≥ 98.0%）、异泽兰黄素（批号 3670，HPLC 法测得纯度≥ 98.0%）购于上海诗丹德标准技术服务有限公司。

刘寄奴药材（批号 18020601，产于广西，购于南宁市宾阳县万润本草有限责任公司中药饮片厂；批号 150501，产于浙江，购于南宁市万药堂药业有限公司；批号 160701，产于浙江，购于南宁市万药堂药业有限公司；批号 160301，产于江苏，购于广西贵港市缘之源种养发展有限公司中药饮片厂），经广西中医药大学赛恩斯新医药学院药用植物学教研室苑敏副教授鉴定均为菊科植物奇蒿 *Artemisia anomala* S. Moore 的干燥地上部分；甲醇为色谱纯，Fisher 科学世界公司；其余试剂均为分析纯；水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Syncronis C_{18} 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm），流动相为甲醇 -0.2% 磷酸水溶液（40∶60），检测波长 260 nm，流速 1.0 mL·min^{-1}，柱温 25 ℃，进样量为 10 μL。

2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取槲皮素、柚皮素、山柰酚、芒柄花素、异泽兰黄素的对照品适量，加甲醇制成每 1 mL 分别含槲皮素 0.062 mg、柚皮素 0.031 mg、山柰酚 0.034 mg、芒柄花素 0.022 mg、异泽兰黄素 0.027 mg 的混合溶液，即得。

2.3 供试品溶液的制备 取刘寄奴药材粉末（过 40 目筛）约 1 g，精密称定，精密加入甲醇 20 mL，称量，回流提取 1 h，放冷，用甲醇补足减失的量，摇匀，过 0.45 μm 微孔滤膜，取续滤液，即得。

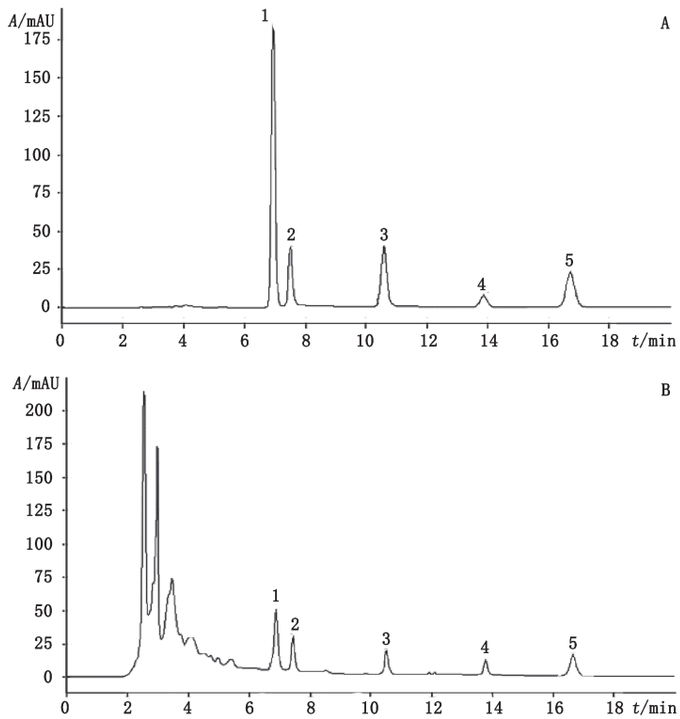
2.4 专属性试验 分别精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各 10 μL 进样分析，色谱图见图 1。

2.5 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液 1、4、8、12、16 μL，按“2.1”项下色谱条件进样分析，以进样量（*X*）为横坐标，峰面积（*Y*）为纵坐标绘制标准工作曲线，结果见表 1。

2.6 检测下限与定量下限 取“2.2”项下混合对照品溶液，用甲醇逐级稀释后进样测定，测得槲皮素、柚皮素、山柰酚、芒柄花素和异泽兰黄素的检测下限（*S*/*N*=3）分别为 0.22、0.35、0.32、0.42 和 0.36 ng，定量下限（*S*/*N*=10）分别为 0.75、1.20、1.10、1.40 和 1.20 ng。

2.7 精密度试验 精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液 10 μL，连续进样 6 次，计算槲皮素、柚皮素、山柰酚、芒柄花素和异泽兰黄素峰面积的 RSD 分别为 0.37%、1.0%、0.90%、1.2%、0.92%。表明仪器精密度良好。

2.8 重复性试验 取同一批样品（广西 18020601），按“2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进行测定，记录峰面积，通过回归方程计算槲皮素、柚皮素、山柰酚、芒柄花素和异泽兰黄素平均含量分别为 0.315 7 、0.216 7、0.172 6、0.118 4、0.248 5 mg·g^{-1}，RSD 分别为 0.45%、0.97%、1.4%、1.4%、0.58%。表明方法重复性良好。



1. 槲皮素（quercetin）　2. 柚皮素（naringenin）　3. 山柰酚（kaempferol）4. 芒柄花素（formononetin）　5. 异泽兰黄素（eupatilin）

图 1　混合对照品（A）和刘寄奴样品（B）色谱图

Fig. 1　HPLC chromatograms of mixed reference substances（A）and sample（B）

表 1　线性关系考察结果

Tab. 1　The results of calibration

成分（component）	回归方程（regression equation）	r	线性范围（linear range）/μg
槲皮素（quercetin）	Y=1562.1X−17.367	0.999 5	0.062~0.992
柚皮素（naringenin）	Y=725.84X+5.952 1	0.999 2	0.031~0.496
山柰酚（kaempferol）	Y=832.73X−4.444 2	0.999 5	0.034~0.544
芒柄花素（formononetin）	Y=275.84X+6.418 2	0.999 4	0.022~0.352
异泽兰黄素（eupatilin）	Y=906.55X+2.750 3	0.999 1	0.027~0.432

2.9　稳定性试验　取同一份供试品溶液（广西18020601），按“2.1”项下色谱条件，分别在0、2、4、6、8、12 h进样测定，计算槲皮素、柚皮素、山柰酚、芒柄花素和异泽兰黄素峰面积的RSD分别为0.39%、0.76%、0.93%、1.5%、1.0%，表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.10　加样回收率试验　取同一批号（广西18020601）已知含量的样品6份，每份约0.5 g，精密称定，分别精密加入一定量的5个成分对照品，按“2.3”项下方法制备供试溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，计算5个成分的平均回收率，结果见表2。

2.11　样品测定　取4个不同批次的刘寄奴样品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，测定5个成分的含量，结果见表3。

3　讨论

3.1　供试品溶液制备方法考察　根据待测成分的性质分别考察了回流提取、超声提取和不同提取时间（0.5、1、2 h），结果显示回流提取效果较好，回流提取2 h和1 h无明显差异，故选择回流提取1 h；考察不同提取溶剂（甲醇、70%甲醇水、乙醇、70%乙醇水），经HPLC测定，比较其色谱图，结果表明以甲醇作为提取溶剂提取率较高，且干扰少。故最终确定以甲醇为提取溶剂，回流提取1 h。

表 2 加样回收率的实验结果（n=6）

Tab. 2 Results of recovery tests

成分（component）	样品量（sample amount）/g	已知量（original）/mg	加入量（added）/mg	测得量（measured）/mg	加样回收率（recovery）/%	平均回收率（average recovery）/%	RSD/%
槲皮素（quercetin）	0.502 5	0.158 6	0.156 0	0.313 9	99.5	100.6	1.6
	0.506 8	0.160 0	0.156 0	0.318 5	101.6		
	0.502 4	0.158 6	0.156 0	0.312 4	98.6		
	0.506 6	0.159 9	0.156 0	0.315 3	99.6		
	0.505 8	0.159 7	0.156 0	0.317 4	101.1		
	0.504 3	0.159 2	0.156 0	0.319 8	102.9		
柚皮素（naringenin）	0.502 5	0.108 9	0.106 0	0.214 2	99.4	99.3	0.96
	0.506 8	0.109 8	0.106 0	0.216 1	100.3		
	0.502 4	0.108 9	0.106 0	0.213 7	98.9		
	0.506 6	0.109 8	0.106 0	0.214 6	98.9		
	0.505 8	0.109 6	0.106 0	0.215 9	100.3		
	0.504 3	0.109 3	0.106 0	0.212 9	97.8		
山柰酚（kaempferol）	0.502 5	0.086 7	0.085 0	0.170 8	98.9	99.3	1.45
	0.506 8	0.087 5	0.085 0	0.171 2	98.5		
	0.502 4	0.086 7	0.085 0	0.172 4	100.8		
	0.506 6	0.087 4	0.085 0	0.173 1	100.8		
	0.505 8	0.087 3	0.085 0	0.169 8	97.1		
	0.504 3	0.087 0	0.085 0	0.171 7	99.6		
芒柄花素（formononetin）	0.502 5	0.059 5	0.062 0	0.118 6	95.3	97.8	2.08
	0.506 8	0.060 0	0.062 0	0.119 8	96.4		
	0.502 4	0.059 5	0.062 0	0.122 2	101.2		
	0.506 6	0.060 0	0.062 0	0.121 3	98.9		
	0.505 8	0.059 9	0.062 0	0.120 3	97.4		
	0.504 3	0.059 7	0.062 0	0.120 1	97.4		
异泽兰黄素（eupatilin）	0.502 5	0.124 9	0.125 0	0.249 1	99.4	98.9	0.91
	0.506 8	0.125 9	0.125 0	0.251 2	100.2		
	0.502 4	0.124 8	0.125 0	0.247 8	98.4		
	0.506 6	0.125 9	0.125 0	0.248 9	98.4		
	0.505 8	0.125 7	0.125 0	0.249 7	99.2		
	0.504 3	0.125 3	0.125 0	0.247 4	97.7		

表 3 含量测定结果（%，n=3）

Tab. 3 Results of content determination

产地（批号）[habitat（batch）]	槲皮素（quercetin）	柚皮素（naringenin）	山柰酚（kaempferol）	芒柄花素（formononetin）	异泽兰黄素（eupatilin）
广西（18020601）	0.032	0.022	0.017	0.012	0.025
浙江（160701）	0.027	0.014	0.023	0.008	0.033
浙江（150501）	0.022	0.009	0.011	0.006	0.017
江苏（160301）	0.041	0.024	0.014	0.014	0.021

3.2 色谱条件考察 通过全波长扫描得到5个成分的3D图谱,结果显示在波长260 nm处5个成分均有吸收且灵敏度较好。考察不同比例的乙腈–0.2%磷酸水、甲醇–0.2%磷酸水、乙腈–水、甲醇–水等流动相系统,结果显示以甲醇–0.2%磷酸水溶液(40∶60)为流动相,分离度较好,保留时间适中,峰形较对称。

3.3 小结 根据实验结果,4批刘寄奴不同成分的含量有一定的差异,其原因是否与产地及采收时间等因素有关,还需采集更多样品进行比较研究。本文所建立的同时测定刘寄奴中5个成分的方法简便准确,精密度高,稳定性和重复性好,加样回收率符合相关规定,可用于评价刘寄奴的内在质量。

参考文献

[1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1991
China Botanical Flora Editorial Committee. China Botanical Flora[M]. Beijing: Science Press, 1991

[2] 吴巧凤,张光霁. 南刘寄奴中总黄酮的提取工艺优选[J]. 中国医药学报,2000,15(5):63
WU QF, ZHANG GJ. Optimum extraction process of total flavonoids in *Artemisia anomala* S. Moore[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2000, 15(5): 63

[3] 谭蔚峰,王靖,邢新. 中药奇蒿提取物体外抗菌活性的实验研究[J]. 药学实践杂志,2010,28(2):101
TAN WF, WANG J, XING X. Experimental study on *in vitro* antimicrobial activity of extracts from *Artemisia anomala* S. Moore[J]. J Pharm Pract, 2010, 28(2): 101

[4] 沈舒,王琼,赵鑫,等. 18种活血化瘀中药对Factor Xa的抑制作用[J]. 中医药信息,2012,29(1):20
SHEN S, WANG Q, ZHAO X, *et al*. Inhibitory effect of 18 Chinese herbs for promoting blood circulation and removing blood stasis on Factor Xa[J]. Inf Tradit Chin Med, 2012, 29(1): 20

[5] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999
Editorial Board of Chinese Materia Medica of State Administration of Traditional Chinese Medicine. Chinese Materia Medica[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999

[6] 章丹丹,潘一峰,唐宁,等. 刘寄奴抗炎组分筛选及其机制研究[J]. 上海中医药杂志,2009,43(7):70
ZHANG DD, PAN YF, TANG N, *et al*. Screening of anti-inflammatory components and its mechanism for *Artemisia anomala* S. Moore[J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2009, 43(7): 70

[7] 陈俊,徐雷,曹青青,等. 中药奇蒿氯仿、乙酸乙酯提取物的抗菌化学组分研究[J]. 第二军医大学学报,2016,37(2):236
CHEN J, XU L, CAO QQ, *et al*. Study on the antibacterial chemical components of the extracts of chloroform and ethyl acetate from *Artemisia anomala* S. Moore[J]. Acad J Second Mil Med Univ, 2016, 37(2): 236

[8] 龚雪媛,楼烨亮,黄真,等. 刘寄奴醇提物抗局灶性脑缺血有效部位筛选研究[J]. 中国现代应用药学,2016,33(10):1243
GONG XY, LOU YL, HUANG Z, *et al*. Screening of anti-focal cerebral ischemia effective components from ethanol extract of *Artemisia anomala* S. Moore[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2016, 33(10): 1243

[9] 肖同书,王琼,蒋骊龙,等. 刘寄奴化学成分研究[J]. 中草药,2013,44(5):515
XIAO ST, WANG Q, JIANG LL, *et al*. Studies on chemical constituents of *Artemisia anomala* S. Moore[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2013, 44(5): 515

[10] 杜华洲,罗集鹏. 刘寄奴的本草考证及紫外光谱法鉴别[J]. 中药材,2004,27(9):638
DU HZ, LUO JP. Herbal textual research and identification by ultraviolet spectroscopy of *Artemisia anomala* S. Moore[J]. J Chin Med Mater, 2004, 27(9): 638

[11] 田富饶,张琳,田景奎,等. 南刘寄奴的化学成分研究[J]. 中国药物化学杂志,2008,18(5):362
TIAN FR, ZHANG L, TIAN JK, *et al*. Studies on chemical constituents of *Artemisia anomala* S. Moore[J]. Chin J Med Chem, 2008, 18(5): 362

[12] 温晶,史海明,刘艳芳,等. 刘寄奴黄酮类成分研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(14):1827
WEN J, SHI HM, LIU YF, *et al*. Studies on flavonoids from *Artemisia anomala* S. Moore[J]. China J Chin Mater Med, 2010, 35(14): 1827

[13] 徐瑞兰,师彦平. 刘寄奴的化学成分研究[J]. 中草药,2014,45(11):1521
XU RL, SHI YP. Studies on chemical constituents of *Artemisia anomala* S. Moore[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(11): 1521

(本文于2019年1月10日收到)