

## HPLC - DAD 法测定水母雪莲中牛蒡子苷元含量\*

于瑞涛<sup>1,2</sup>, 罗智敏<sup>1,2</sup>, 张兴旺<sup>1,2</sup>, 陶燕铎<sup>1\*\*</sup>, 梅丽娟<sup>1</sup>, 邵赞<sup>1</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要 目的:** 建立测定藏药水母雪莲中牛蒡子苷元含量的 HPLC 法。**方法:** Eclipse XDB - C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 水 (1:1), 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 210 nm; 柱温: 25 °C。**结果:** 牛蒡子苷元进样量在 0.672 ~ 4.704 μg 范围内线性关系良好, 其回归方程为:  $Y = 4577.98837X + 122.00$ ,  $r = 0.9999$ , 牛蒡子苷元的含量为 7.078 mg · g<sup>-1</sup>。**结论:** 本方法简便、快速, 具有良好的精密性和重复性。

**关键词:** 水母雪莲; 牛蒡子苷元; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793 (2010) 02 - 0294 - 03

## HPLC - DAD determination of arctigenin in *Saussurea medusa* Maxim.\*

YU Rui - tao<sup>1,2</sup>, LUO Zhi - min<sup>1,2</sup>, ZHANG Xing - wang<sup>1,2</sup>,  
TAO Yan - duo<sup>1\*\*</sup>, MEI Li - juan<sup>1</sup>, SHAO Yun<sup>1</sup>

(1. Northwest Plateau of Biology Institute, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract Objective:** To develop a reversed - phase HPLC method for the determination of arctigenin in *Saussurea medusa* Maxim. **Methods:** Eclipse XDB - C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was adopted with the mobile phase acetonitrile - water (1:1); The flow rate was 1 mL · min<sup>-1</sup>, and the wavelength was set at 210 nm. **Results:** The linear range of arctigenin was 0.672 - 4.704 μg, the standard curve:  $Y = 4577.98837X + 122.00$ ,  $r = 0.9999$ . The determination of arctigenin in *Saussurea medusa* Maxim. was 7.078 mg · g<sup>-1</sup>. **Conclusions:** The method is simple, fast and accurate with good reproducibility.

**Key words:** *Saussurea medusa*; arctigenin; HPLC

水母雪莲花, 又名水母雪兔子, 为菊科凤毛菊属植物水母雪莲花 *Saussurea medusa* Maxim. 的干燥全草, 分布于甘肃、青海、四川、云南、西藏等地, 生于多砾石山坡, 高山流石滩, 海拔 4350 ~ 5600 米<sup>[1]</sup>, 是藏药中的名贵药材, 已被收入藏药部颁标准中。水母雪莲具有清热解暑、消肿止痛等功效, 可用于头部创伤、炭疽、热性刺痛、妇科病、类风湿性关节炎、中风、外敷消肿<sup>[2]</sup>。其化学成分已有诸多研究报道, 包括黄酮类、黄酮苷类、木脂素类、香豆素类、挥发油、多糖等多种成分<sup>[3~10]</sup>。目前尚无药材水母雪莲含量测定方法的报道, 牛蒡子苷元为水母雪莲中的主要有效成分, 具有多种作用。本文采用 HPLC - DAD 测定水母雪莲药材中牛蒡子苷元的含量, 为水母雪莲的质量控制提供依据。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 包括 G1311A 四元输液泵, G1316A 柱温箱, G1329A 自动进样器, G1315A 二级管阵列 (DAD) 检测器, Agilent 1200 色谱工作站。HH - 6 数显恒温水浴锅 (国华电器有限公司)。

牛蒡子苷元为自制, 经光谱鉴定并经 HPLC 分析为单一峰, 纯度 > 99%。乙腈为色谱纯, 水为电阻值 18.25 MΩ 超纯水, 其余试剂均为分析纯。试验中所用药材 2008 年 7 月采自青海省祁连山, 由中国科学院西北高原生物所梅丽娟工程师鉴定为菊科凤毛菊属植物水母雪莲。

### 2 色谱条件

Eclipse XDB - C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5

\* 国家科技支撑计划项目 (编号: 2007BAH5B00)

\*\* 通讯作者 Tel: 13897406734; E - mail: yuruitao521@163.com

$\mu\text{m}$ );流动相:乙腈 - 水 (1 : 1),流速:  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;进样量:  $10 \mu\text{L}$ ;检测波长:  $210 \text{ nm}$ ;柱温:  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 。色谱图见图 1。

### 3 溶液的制备

**3.1 对照品溶液** 精密称取牛蒡子苷元对照品  $8.4 \text{ mg}$ 置  $25 \text{ mL}$ 量瓶中,配制成浓度为  $0.336 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

**3.2 供试品溶液** 称取水母雪莲药材,粉碎。精密称取  $1.0 \text{ g}$  3份,置平底烧瓶中,分别精密加入甲醇  $50 \text{ mL}$ ,  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  加热回流  $2 \text{ h}$ 趁热过滤,冷却室温,定容于  $100 \text{ mL}$ 量瓶中。摇匀,取适量用微孔滤膜 ( $0.45 \mu\text{m}$ )滤过,即得。

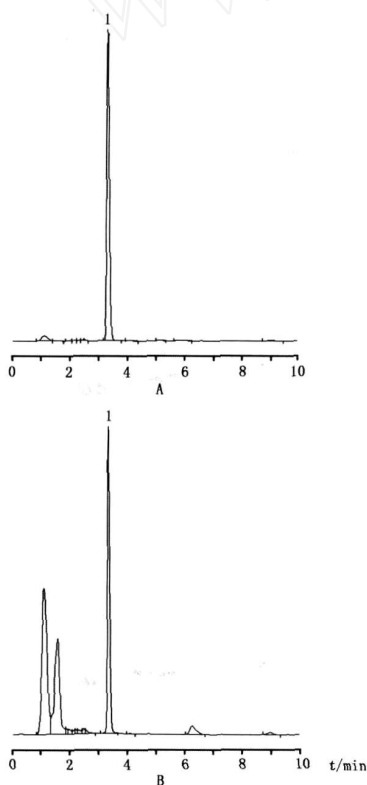


图 1 牛蒡子苷元对照品 (A)、水母雪莲 (B) HPLC 图

Fig 1 HPLC of artigenin reference substance (A) and *Saussurea Medusa Maxim.* (B)

1. 牛蒡子苷元 (artigenin)

### 4 方法与结果

**4.1 线性关系考察** 用自动进样器分别精密吸取  $0.336 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 牛蒡子苷元对照品溶液  $2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0 \mu\text{L}$ 自动进样,记录峰面积与保留时间,以牛蒡子苷元对照品进样量  $X (\mu\text{g})$ 为横坐标,峰面积  $Y$ 为纵坐标,绘制标准曲线,结果表明,牛蒡子苷元进样量在  $0.672 \sim 4.704 \mu\text{g}$ 范围内线性关系良好,其回归方程为:

$$Y = 4577.98837X + 122.00 \quad r = 0.9999$$

**4.2 稳定性试验** 自动进样器依次对同一供试品溶液进样,在  $1, 3, 5, 7, 9, 12 \text{ h}$ 后分别进样  $10 \mu\text{L}$ ,其峰面积积分值  $\text{RSD} (n = 6)$ 为  $0.28\%$ ,说明供试品溶液在  $12 \text{ h}$ 内稳定。

**4.3 精密度试验** 分别准确吸取同一牛蒡子苷元对照品溶液  $10 \mu\text{L}$ ,进样  $5$ 次,峰面积积分值  $\text{RSD} (n = 5)$ 为  $0.14\%$ 。

**4.4 重复性试验** 取同一样品  $5$ 份,分别按“3.2”项下方法测定,记录峰面积积分值,  $\text{RSD}$ 为  $1.25\%$ 。

**4.5 加样回收率试验** 精称已知含量样品粉末  $0.5 \text{ g}$ 共  $9$ 份,每  $3$ 份为一组,每组分别精密加入牛蒡子苷元对照品溶液  $2, 4, 6 \text{ mL}$ 。按“3.2”项下方法制备所需溶液,在上述色谱条件下进行含量测定,计算回收率 ( $n = 3$ )。结果牛蒡子苷元低、中、高  $3$ 种浓度的回收率分别为  $98.24\%, 99.13\%, 101.68\%$ ;  $\text{RSD}$ 分别为  $1.60\%, 0.83\%, 0.45\%$ 。

**4.6 计算方法** 将 HPLC 中所测药材中的的峰面积  $Y$ 代入回归方程,求得质量  $X$ 。具体按下式计算。牛蒡子苷元的含量 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) =  $(10 \mu\text{L}$ 的牛蒡子苷元峰面积 - 截距) / 斜率  $\times 100 \times$ 量瓶体积 /  $1 \text{ g} \times 1000$ 。

### 5 结果与讨论

**5.1 流动相的选择** 选择乙腈 - 水的比例分别为  $25 : 75, 40 : 60, 50 : 50$ ,结果乙腈 - 水 ( $50 : 50$ )作为流动相分离效果最好。

**5.2 波长的选择** 采用全波长扫描,  $195, 210, 230, 240, 254, 290, 320, 365 \text{ nm}$ 结合最大吸收峰面积及  $3\text{D}$ 图取以下  $5$ 个波长 ( $210, 254, 240, 290, 226 \text{ nm}$ )为检测波长。结果表明,牛蒡子苷元在  $210 \text{ nm}$ 处有最大吸收。

**5.3 不同提取溶剂的选择** 对石油醚、氯仿、无水乙醇、丙酮、甲醇做了比较。结果表明,甲醇提取的提取率最高;其次为无水乙醇、丙酮、氯仿;提取效果最差的为石油醚。

**5.4 提取方法的选择** 采用甲醇索氏提取,和回流提取进行比较,  $2 \text{ h}$ 内两者提取效果相差不大。

**5.5 用不同浓度的甲醇提取水母雪莲中的牛蒡子苷元**,采用  $60\%, 80\%, 100\%$ 的甲醇进行实验,结果表明,提取效果与甲醇浓度呈正相关。  $100\%$ 甲醇提取效果最好。

**5.6 Hirano T等<sup>[12]</sup>证明牛蒡子苷元对白血病细胞株 HL - 60有强的抑制活性,  $\text{IC}_{50} < 100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,几乎和目前使用的抗白血病药物活性相当,牛蒡子**

苷元对 HL - 60 细胞几乎无毒性。而且牛蒡子苷元能有效抑制急性早幼粒细胞白血病 HL - 60 的增殖<sup>[13]</sup>, 牛蒡子苷元还具有一定的抗肿瘤活性<sup>[11]</sup>, 以及良好的抑菌效果<sup>[14]</sup>, 水母雪莲是一种比较珍贵的藏药材, 目前已有报道吉林大安市冰花沃花卉研究所已成功培育出比野生提前 2 年盛开的水母雪莲花<sup>[15]</sup>。解决了水母雪莲花稀少, 没有足够的资源进行研究的难题。藏药水母雪莲中牛蒡子苷元的含量丰富, 达  $7.078 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。因此, 对于藏药水母雪莲中的牛蒡子苷元的药理药效学活性有待于进一步研究。

### 参考文献

- Editorial Committee of Flora of China, CAS (中国科学院中国植物志编辑委员会). Flora of China (中国植物志). 1999, 78 (2): 20
- Committee of Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典委员会). Drug Standard of Ministry of Public Health of the People's Republic of China, Vol 1 (中华人民共和国卫生部药品标准, 藏药第一册). 1995, 94.
- JIA Zhong - jian (贾忠建), FEI Hou - man (费厚满), LI Yu (李瑜), et al. Studies on the constituents of *Saussurea medusa* Maxim. (I) [水母雪莲化学成分研究 (I)]. *Chin J Chin Univ* (高等学校化学学报), 1986, 7 (9): 789
- JIA Zhong - jian (贾忠建), GONG Ni - chun (宫尼春), DU Mei (杜枚). Studies on the constituents of *Saussurea medusa* Maxim. (II) [水母雪莲化学成分研究 (II)]. *Chin J Chin Univ* (高等学校化学学报), 1989, 11 (2): 202
- JIA Zhong - jian (贾忠建), FEI Hou - man (费厚满), LI Yu (李瑜), et al. Studies on the flavonoid glycosides of *Saussurea medusa* Maxim. (水母雪莲黄酮甙的研究). *J Lanzhou Univ (Nat Sci)* (兰州大学学报 自然科学版), 1984, 20 (4): 128
- DA Wa - zhuo - ma (达娃卓玛), GUAN Yan - li (官艳丽), GE Sang - suo - lang (格桑索朗), et al. Chemical analysis of the essential oil from the whole plant of *Saussurea medusa* Maxim by GC - MS (水母雪莲花挥发油的 GC - MS 分析). *Chin J Anal Lab* (分析实验室), 2007, 26 (7): 27
- LI Jing (李菁), HOU Yuan - ming (侯苑茗), GE Fa - huan (葛发欢). Studies on chemical constituents of supercritical CO<sub>2</sub> extraction on *Saussurea medusa* Maxim. (水母雪莲花超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物化学成分研究). *J Chin Med Mater* (中药材), 2002, 25 (10): 718
- Cheng QF, Jian MY. Biologically active phenols from *Saussurea medusa*. *Bioorg Med Chem*, 2003, 11: 703
- Hongquan Duana, Yoshihisa Takaishia. Immunosuppressive constituents from *Saussurea medusa*. *Phytochemistry*, 2002, 59: 85
- LI Jun - shan (李君山), CAI Shao - qing (蔡少青). Chemical and pharmacological advance on snow btuses (雪莲花类药材的化学和药理研究进展). *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1998, 33 (8): 449
- Midori Takasakia, Takao Konoshima. Anti - tumor - promoting activity of lignans from the aerial part of *Saussurea medusa*. *Cancer Lett*, 2000, 158: 53
- Hirano T, Gotoh M, Oka K. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL - 60 cells. *Life Sci*, 1994, 55: 1061
- WANG Lu (王潞), ZHAO Feng (赵烽), LIU Ke (刘珂). Induction of apoptosis of the human leukemia cells by arctigenin and its mechanism of action (牛蒡子苷元诱导人白血病细胞凋亡的作用及机制). *Acta Pharm Sin* (药学报), 2008, 43 (5): 542
- LI Da - liang (李大亮), SONG Yang (宋杨), ZHOU Ao - huan (周傲华), et al. Antibacterial experimental studies on arctiin, glucosides and decoction of arctigenin in vitro (牛蒡子水煎液及牛蒡子、牛蒡子苷元体外抗菌实验研究). *Heilongjiang Med J* (黑龙江医药), 2004, 17 (6): 433
- SMA Xian - guang (司马宪光), SINA (司楠). *Saussurea medusa* cultivated successfully (水母雪莲花培育成功). *New Technol Country* (农村新技术), 2008, 11: 28

(本文于 2009 年 3 月 5 日收到)