

试剂生成的甲臜物具有高度水溶性,不需要使用裂解液溶解沉淀,同时也不需要吸取上清,简便了实验步骤也大大提高了实验的敏感性。

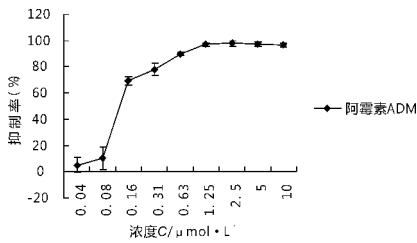


图 6 MTT法检测阿霉素 (ADM)对 PC3细胞的生长抑制作用曲线

在本实验中,探讨了 MTT法和 CCK-8法最佳实验条件,我们发现 CCK-8法最佳检测波长是 450 nm, CCK-8法的最佳检测时间为 4 h后,检测较好的细胞数量范围从 8×10^2 个到 5×10^4 个,而 MTT法最佳检测波长是 595 nm,最佳检测时间为 4 h后,细胞数量低于 6.3×10^3 个时检测效果较差。在检测抗肿瘤药物

阿霉素 (ADM)对 PC3细胞的增殖影响实验中,发现 CCK-8法测得数据线性相关性优于 MTT法,并且数据偏差较 MTT法小。

综上所述,CCK-8法与 MTT法比较可知,CCK-8法操作简便,灵敏度高,准确性和重复性好,是一种优于 MTT法的检测细胞增殖活性的方法。

参考文献:

[1] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods 1983 65 (1): 55.
 [2] 王开颜,房崇芸,彭光洁. 氢化可的松诱导特发性血小板减少性紫癜淋巴细胞凋亡和增殖抑制 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2000, 19 (2): 149.
 [3] Rassendren F, Buell G, Newbolt A., et al Identification of an amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor [J]. The EMBO Journal 1997 16 (2): 3446.
 [4] Tomiyama H., Ishiyama M., Ohseto F, et al A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay [J]. Anal Commun., 1999 36: 47.

唐古特铁线莲花中黄酮含量的反相高效液相色谱测定

张兴旺^{1,2}, 于瑞涛^{1,2}, 文怀秀¹, 梅丽娟¹, 邵 赞¹, 陶燕铎^{*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:目的 建立唐古特铁线莲花中黄酮含量测定的 RP-HPLC方法。方法:用甲醇提取,反相高效液相色谱法分析唐古特铁线莲花中槲皮素、山萘酚、异鼠李素 3种黄酮苷元。结果 采用 fusion-RP C₁₈柱 (4.6 mm × 250 mm, 4 μm), 以甲醇-0.2% 磷酸 (60:40) 为流动相,流速 1.0 ml · min⁻¹, 可使 3种黄酮苷元达到基线分离。结论 实验首次采用 RP-HPLC法测定唐古特铁线莲花中总黄酮含量,方法操作简便,快速,准确,可作为黄酮的定量分析方法。

关键词:反相高效液相色谱法; 槲皮素; 山萘酚; 异鼠李素; 唐古特铁线莲花

DOI标识: doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2010.12.005

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2010)12-3048-02

RP-HPLC Determination of Flavonoids in Flowers of *Clematis tangutica* (Maxim.) Korsh

ZHANG Xing-wang^{1,2}, YU Rui-tao^{1,2}, WEN Huai-xiu¹, MEI Li-juan¹, SHAO Yun¹, TAO Yan-duo^{*}

(1 Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008 China; 2 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049 China)

Abstract Objective To develop an RP-HPLC method for the determination of quercetin, kaempferol and isorhamnetin contents in flowers of *Clematis tangutica* (Maxim.) Korsh. **Methods** The analysis was performed on a fusion-RP C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 4 μm) with methanol-0.2% phosphoric acid (60:40) as mobile phase. **Results** The quercetin, kaempferol and isorhamnetin were separated well. **Conclusion** The contents of flavonoids in flowers of *Clematis tangutica* (Maxim.) Korsh were determined by RP-HPLC for the first time and the method can be used for quantitative determination of flavonoids in flowers of *Clematis tangutica* (Maxim.) Korsh.

Key words RP-HPLC; Quercetin; Kaempferol; Isorhamnetin; Determination

唐古特铁线莲 (*Clematis tangutica* (Maxim.) Korsh) 是毛茛科 (Ranunculaceae) 藤本植物, 分布于新疆、青海、甘肃、陕西、西藏及四川西部^[1]。全草入药, 可治风湿性关节炎^[2], 同时能健胃、消食, 治消化不良, 恶心, 并有排脓、除疮、消痞块等作用^[3]。据报道, 铁线莲属植物里含有皂苷、黄酮类化合物、木质素、生物碱、挥发油等多种化学成分^[4], 其中皂苷化合物含量最多^[5]。研究表明, 黄酮类化合物具有抗癌、抗肿瘤、抗心脑血管疾病、抗炎镇痛、免疫调节、降血糖、治疗骨质疏松、抑菌抗病毒、抗氧化、抗

收稿日期: 2009-12-06 修订日期: 2010-07-23

基金项目: 科技部国家科技支撑计划 (No. 2007BA145B00)

作者简介: 张兴旺 (1982-), 男 (汉族), 山东德州人, 现为中国科学院西北高原生物研究所硕士研究生, 主要从事天然药物化学研究工作。

* 通讯作者简介: 陶燕铎 (1963-), 男 (汉族), 青海西宁人, 现任中国科学院西北高原生物研究所研究员, 博士学位, 主要从事天然药物研究与开发工作。

衰老、抗辐射等的生理活性^[6,7]。对于总黄酮含量的测定多采用比色法,未见用 HPLC 法测定唐古特铁线莲中总黄酮成分含量的报道。本实验参照《中国药典》2005 年版 I 部“银杏叶”含量测定项下银杏总黄酮的测定方法,采用反相高效液相色谱法测定了唐古特铁线莲中 3 种苷元的含量,以反映其中黄酮类成分的含量,为开发和利用唐古特铁线莲中有效成分提供理论依据。

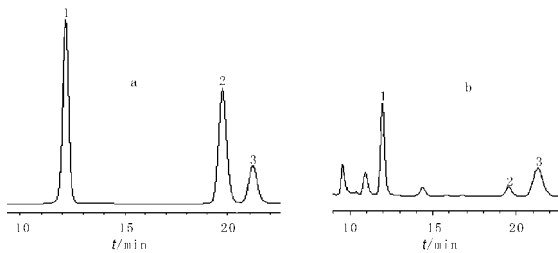
1 仪器与材料

Agilent 1200LC 高效液相色谱仪, G1379A 在线脱气机, G1311A 四元泵, G1329A 标准型自动进样器, G1316A 柱温箱, Agilent 1200 色谱工作站, DZKW - C 型电子恒温水浴锅(北京化玻联联医疗器械公司); 超声振荡仪; RE - 52 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); AG 204 电子分析天平。

唐古特铁线莲 *Clematis tangutica* (Maxim.) Korsh 花部分于 2008 - 07 月上旬采自青海省境内,由中国科学院西北高原生物研究所梅丽娟高级工程师鉴定。甲醇、磷酸均为分析纯, 25% 盐酸溶液, 色谱甲醇。槲皮素、山萘酚、异鼠李素均购自中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 4 μm), 以甲醇 - 0.2% 磷酸(60:40)为流动相, 流速 1.0 ml·min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长 360 nm, 采集时间 30 min, 对照品色谱图见图 1。



1 槲皮素 2 山萘酚 3 异鼠李素
图 1 对照品 (a) 和样品 (b) HPLC 图

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取经五氧化二磷干燥过夜的槲皮素、山萘酚、异鼠李素对照品适量, 加甲醇制成 0.075, 0.035, 0.075 g·L⁻¹ 的溶液, 摇匀, 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取本品花粉末约 3 g 精密称定, 置具塞三角瓶中, 精密加入甲醇 60 ml 密封称重, 超声处理 1 h, 取出冷至室温, 称重, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 滤液减压浓缩至干; 加甲醇 - 25% 盐酸溶液(4:1)混合液 25 ml 90 °C 回流 30 min 冷却; 转移至 25 ml 量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 即得。

2.4 标准曲线及线性范围 分别精密吸取对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 μl 在上述色谱条件依次进样, 以进样量(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线, 回归方程见表 1。

表 1 3 种黄酮标准曲线

化合物	线性范围 m/μg	标准曲线回归方程	r
槲皮素	0.15~0.75	Y = 5.184 66X - 16.44	0.999 9
山萘酚	0.07~0.35	Y = 4.628 143X - 9.83	0.999 9
异鼠李素	0.15~0.75	Y = 3.583 667X - 29.23	0.999 9

2.5 精密度实验 精确吸取对照品溶液 10 μl 按“2.1”项下色谱条件测定 5 次, 结果槲皮素、山萘酚和异鼠李素峰面积的 RSD 分别为 1.1%, 0.81% 和 0.94%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性实验 精密称取唐古特铁线莲花粉末 3 g 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 后在上述色谱条件下进样 20 μl 结果槲皮素、山萘酚和异鼠李素峰面积的 RSD 分别为 1.2%, 1.42% 和 1.7%, 表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 重复性实验 精密称取唐古特铁线莲花粉末 3 g 按上述供试品溶液的制备方法和测定条件, 重复测定 5 份, 结果槲皮素、山

萘酚和异鼠李素峰面积的 RSD 分别为 1.3%, 1.6% 和 1.4%, 表明重复性良好。

2.8 加样回收率实验 称取已知槲皮素、山萘酚和异鼠李素含量的唐古特铁线莲花粉末 5 份, 每份约 3 g 加入对照品储备液 3.0 ml 制备样品溶液。精密吸取 20 μl 进样分析, 计算平均回收率。结果见表 2。

表 2 槲皮素、山萘酚、异鼠李素加样回收率

化合物	样品中量 m/mg	加入量 m/mg	测得量 m/mg	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
槲皮素	0.510	0.225	0.731	99.5	98.3	0.88
	0.506	0.225	0.720	98.5		
	0.502	0.225	0.713	98.1		
	0.511	0.225	0.724	98.4		
	0.506	0.225	0.710	97.1		
	0.091	0.105	0.192	98.0		
山萘酚	0.083	0.105	0.202	100.1	98.2	1.31
	0.094	0.105	0.192	96.5		
	0.088	0.105	0.189	98.0		
	0.094	0.105	0.196	98.5		
	0.541	0.225	0.761	99.3		
	0.540	0.225	0.749	97.9		
异鼠李素	0.543	0.225	0.757	98.6	98.8	0.56
	0.539	0.225	0.756	99.0		
	0.536	0.225	0.754	99.1		

2.9 样品含量测定 取供试品溶液, 过 0.45 μm 的微孔滤膜, 分别进样 20 μl 测定 (n = 3), 取 3 次测定的平均值, 分别计算 3 种黄酮苷元的含量, 以下式换算成总黄酮醇苷的含量。结果见表 3。

$$\text{总黄酮醇苷含量} = (\text{槲皮素含量} + \text{山萘酚含量} + \text{异鼠李素含量}) \times 2.51$$

表 3 唐古特铁线莲花中黄酮含量 %

样品	产地	槲皮素	山萘酚	异鼠李素	总黄酮醇苷
唐古特铁线莲	南窑山	0.017 1	0.003 0	0.018 2	0.096 1
唐古特铁线莲	平安	0.021 2	0.003 3	0.016 3	0.102 4
唐古特铁线莲	青沙山	0.020 3	0.003 1	0.019 1	0.106 7
唐古特铁线莲	互助	0.019 3	0.003 0	0.018 0	0.101 2
唐古特铁线莲	大通	0.015 0	0.003 5	0.020 1	0.096 9
唐古特铁线莲	玉树	0.019 1	0.003 1	0.014 3	0.091 6

3 讨论

本实验比较了甲醇、乙醇、2.5 mol·L⁻¹ 盐酸甲醇溶液等不同的提取溶剂, 结果表明以甲醇提取的黄酮苷元含量较高, 色谱峰的峰形好, 且分离效果亦好。

本实验比较了热回流、索氏和超声提取 3 种提取方法对黄酮苷元提取的影响, 结果发现 3 种方法黄酮苷元提取率没有明显差异, 考虑到超声提取方法简单, 耗时短, 所以选择超声提取法。

目前有关唐古特铁线莲黄酮类化合物的含量测定只有传统的比色法。本实验首次采用 RP - HPLC 法测定唐古特铁线莲中总黄酮含量, 操作简便, 快速, 准确, 可作为黄酮的定量分析方法。

参考文献:

[1] 中国科学院西北高原生物研究所. 青海经济植物志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1987: 160
 [2] 新疆植物志编辑委员会. 新疆植物志 [M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1994.
 [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 (3) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998: 211.
 [4] 刘玉国, 李玉芳, 刘玉红, 等. 铁线莲属药用植物化学研究概况 [J]. 新疆中医药, 2000, 18 (1): 58.
 [5] 宋志宏, 赵玉英, 段京莉, 等. 铁线莲属植物的化学成分及药理作用研究概况 [J]. 天然产物研究与开发, 1995, 7 (2): 66.
 [6] 谭萍, 赵云婵. 黔产酢浆草总黄酮含量的测定及提取方法研究 [J]. 山西医药杂志, 2006, 35 (5): 462
 [7] 俞一心, 戈升荣, 王桂珍. 槲皮素及其衍生物的药理作用研究进展 [J]. 中药材, 2003, 26 (12): 902