

## 灯盏细辛(*Erigeron breviscapus*)的含量测定方法研究

杨文宇<sup>1,2</sup>, 张艺<sup>2</sup>(1. 西华大学生物工程学院, 成都 610039; 2. 成都中医药大学药学院, 成都 610075)

**摘要:**目的 在分析现有方法局限性的基础上建立合理的灯盏细辛的含量测定方法。方法 ①高效液相色谱-二极管阵列检测法(HPLC-DAD): Hypersil ODS2(250×4.6mm, 5 $\mu$ m)色谱柱, 乙腈-水-磷酸(18:82:0.2)为流动相, 流速0.8mL/min, 检测波长286nm, 柱温40℃; ②紫外分光光度法(UV)。结果 ①HPLC-DAD分析指出灯盏细辛的主要成分为咖啡酰衍生物和黄酮; ②提出测定野黄芩苷的HPLC方法和以咖啡酸为对照品测定总酚的UV方法。结论 将测定野黄芩苷和测定总酚相结合, 能有效控制灯盏细辛及其制剂的质量

**关键词:**灯盏细辛; 含量测定; 方法学

中图分类号: R282.710.3 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2006)08-0765-03

### Methodology study on quantitative assay of *Erigeron breviscapus*

YANG Wen-yu, ZHANG Yi(1. College of bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China; 2. College of pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a proper quantitative method for *Erigeron breviscapus* on the basis of the existed flaw methods. **METHODS** (1) High performance liquid chromatography and diotron array detection (HPLC-DAD): Column: Hypersil ODS2 (250 4.6mm, 5 $\mu$ m), mobile phase: acetonitrile-H<sub>2</sub>O-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (18:82:0.2), detection wavelength was at 286nm, temperature was at 40℃; (2) UV spectrophotometry analysis. **RESULTS** (1) Caffeoyl conjugates and flavonoids were regarded as the staple in *E. breviscapus*. (2) The methods to determine scutellarin by HPLC and total phenols by UV were raised. **CONCLUSION** Quantifying scutellarin and total phenols altogether can effectively control the quality of *E. breviscapus* and its preparations.

**KEY WORDS:** *Erigeron breviscapus*; quantitative assay; methodology

灯盏细辛为菊科植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand. - Mazz. 的干燥全草, 其临床、药理、生药、化学和制剂的研究已有很多报道, 但有关灯盏细辛及其制剂含量测定方法的研究不多、且存在不能全面反映药效成分含量的问题。建立方便、快速、准确、可靠而又与药效吻合的含量测定方法是控制灯盏细辛及其制剂的质量的关键环节。

#### 1 现有含测方法及其局限

##### 1.1 现有方法

已建立的方法主要有: (1) 分光光度法: 以芦丁为对照品测定灯盏细辛注射液<sup>[1,2]</sup>、灯盏细辛胶囊<sup>[3]</sup>、不同生长期灯盏细辛药材<sup>[4]</sup>中总黄酮含量, 以野黄芩苷(scutellarin, 灯盏乙素)为对照品测定灯盏花素片总黄酮含量<sup>[5]</sup>; (2) 高效液相色谱法(HPLC): 外标法测定灯盏细辛药材根茎叶花及全草中野黄芩苷的含量<sup>[6]</sup>; (3) 液相色谱-质谱-质谱联用法(LC/MS/MS): 对灯盏细辛提取物中的野黄芩苷<sup>[7,8]</sup>及黄芩苷、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷、槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷等成分<sup>[9]</sup>进行鉴定及定量, 不需对照品; (4) 高效毛细管电泳法(HPCE): 内标法(芦丁为内标)测定灯盏细辛药材及制剂中野黄芩苷的含量<sup>[10]</sup>, 等等。

##### 1.2 对现有方法的评价

中药的质量评价应尽量使药效成分在测定指标上反映出来。一般, 质量控制中用分光光度法测定总黄酮的前提是: 样品的主要成分是总黄酮并且总黄酮能代表样品的药效物质; 而对于具体测定, 则最好以总黄酮中含量较大的化合物为对照品。在灯盏细辛的研究中, 多种咖啡酰衍生物的鉴定及活性研究<sup>[11]</sup>使人们认识到其药效物质基础并不仅仅限于总黄酮。而在本实验中, 以芦丁为对照品, 用HPLC方法分析灯盏细辛水煎煮液和灯盏细辛注射液, 结果发现二者图谱中均无芦丁的峰, 说明灯盏细辛不含芦丁或含量低至无法检测。因此, 以芦丁为对照品, 以总黄酮为指标, 用分光光度法控制灯盏细辛及其制剂质量的方法值得商榷。文献<sup>[6]</sup>的HPLC方法是测定野黄芩苷的较好方法, 具有峰形对称、理论板数高、与相邻峰分离度较好等优点, 但该方法测定的只是单一指标, 有必要与其他方法结合进行质量控制。LC/MS/MS和HPCE方法具有快捷、精确、选择性好、灵敏度高、检测下限低、能对多个指标成分进行鉴定和定量等优点, 特别适于药代动力学、血清药理学研究, 但由于对仪器或实验条件要求太高, 难于普及, 因此目前不太适合用于药材和制剂

作者简介: 杨文宇(1973-), 男, 四川营山人, 毕业于成都中医药大学, 博士研究生, 讲师, 执业药师; 研究方向: 中药/民族药的化学、生药学研究。Tel: 028-89003719 Email: Oringyoung@126.com

的质量控制。

## 2 合理的含量测定方法的建立

含量测定的前提是对样品化学成分在适当程度上的认识。理想的含量测定是对样品的每个化学成分进行定量,例如对 HPLC 图谱上每个峰进行定量。对中药来说,弄清其含有的所有成分目前并不现实,但确定主要成分的类型并进行定量则容易做到。

### 2.1 灯盏细辛的主要成分类型研究

灯盏细辛中已鉴定的化学成分有黄酮类、咖啡酰类、 $\gamma$ -吡喃酮类、香豆素类、蒽类等,多为酚性成分,但含量较高的是哪些类型并不清楚。本实验用 HPLC 法、以二极管阵列检测器(DAD)分析紫外光谱的方法研究灯盏细辛的主要成分类型。

**2.1.1 仪器及试剂** Agilent 1100 series 高效液相色谱仪(泵:G1310A IsoPump;自动进样器:G1313A ALS;柱温箱:G1316A COLCOM;二极管阵列检测器:G1315B DAD)。

乙腈为色谱纯(Tedia Company Inc.),磷酸为分析纯(成都化学试剂厂),水为重蒸水。

**2.1.2 样品** 灯盏细辛水提液;灯盏细辛水提液经大孔树脂 AB-8 纯化物(用大孔树脂处理的目的是除去糖类并使酚性成分富集以便分析);野黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:880-200001);咖啡酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号:885-200102)。

**2.1.3 色谱条件**<sup>[6]</sup> 色谱柱:Hypersil ODS2(250×4.6mm, 5 $\mu$ m),大连依利特有限公司;流动相:乙腈-水-磷酸(18:82:0.2);流速:0.8mL/min;检测波长:286nm;柱温:40℃。

**2.1.4 结果** 色谱图如图1、2所示。

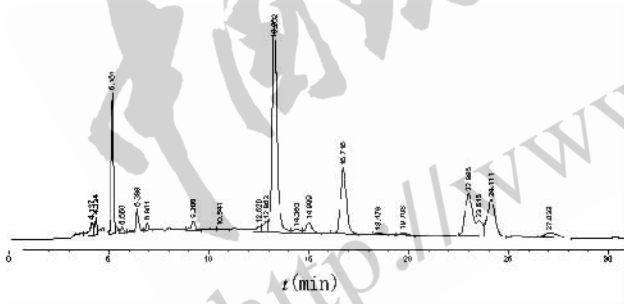


图1 水提液 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC chromatogram of water extraction of *E. breviscapus*

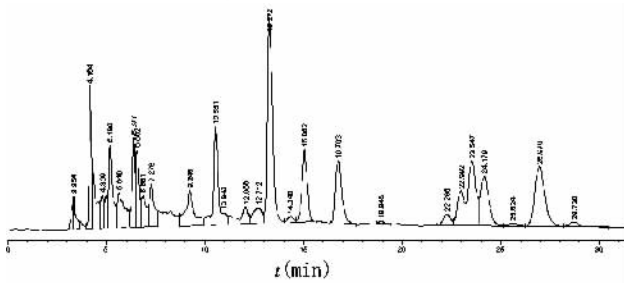


图2 水提液经大孔树脂 AB-8 纯化物 HPLC 图谱

Fig 2 HPLC chromatogram of water extraction of *E. breviscapus* treated by AB-8 macro-porous resin

图谱表明,灯盏细辛水提液经大孔树脂纯化后,各种成分更加富集,因而有利于分析。图2中,保留时间  $t_R$  13.272 为野黄芩苷峰,  $t_R$  6.861 为咖啡酸峰;  $t_R$  23.547、 $t_R$  25.624 和  $t_R$  28.730 这3个峰的紫外光谱与野黄芩苷一样具有典型黄酮的吸收带 I (300~400nm) 和 II (240~280nm);  $t_R$  4.360、 $t_R$  5.190、 $t_R$  5.649、 $t_R$  6.377、 $t_R$  6.562、 $t_R$  14.340、 $t_R$  15.052、 $t_R$  16.763、 $t_R$  22.992 和  $t_R$  24.179 共10个峰的紫外光谱则与咖啡酸紫外光谱的谱线轮廓一致,都具有310~330nm 强吸收带、285~310nm 肩峰和215~245nm 吸收带;因此灯盏细辛至少含有4个黄酮类成分和11个咖啡酰衍生物;其余峰的成分类型尚难于确定,其中  $t_R$  3.354、 $t_R$  4.164、 $t_R$  7.276、 $t_R$  9.246、 $t_R$  10.551 和  $t_R$  26.970 共6个峰的峰高相对较高,它们的紫外光谱均在250~350nm 有吸收带,可能是一些酚性成分,如  $\gamma$ -吡喃酮类、香豆素类。虽然仅根据紫外光谱推断化合物的类型缺乏充分性,但文献已报道从灯盏细辛中分离鉴定了多个黄酮类化合物和咖啡酰衍生物等酚性成分<sup>[10]</sup>。因此,可以认为灯盏细辛的主要成分是酚性成分;由图2可知,其中以黄酮类和咖啡酰类为主。

### 2.2 含量测定方法的建立

含量测定的策略是测定主要成分或主要大类成分。图2中峰面积最大的是野黄芩苷,其测定方法已经建立<sup>[6]</sup>。

灯盏细辛的主要成分是酚性成分。因此有必要测定总的酚性成分。测总酚可以采用紫外分光光度法(UV)。对灯盏细辛水提液的大孔树脂 AB-8 纯化物进行紫外扫描,结果如图3所示。

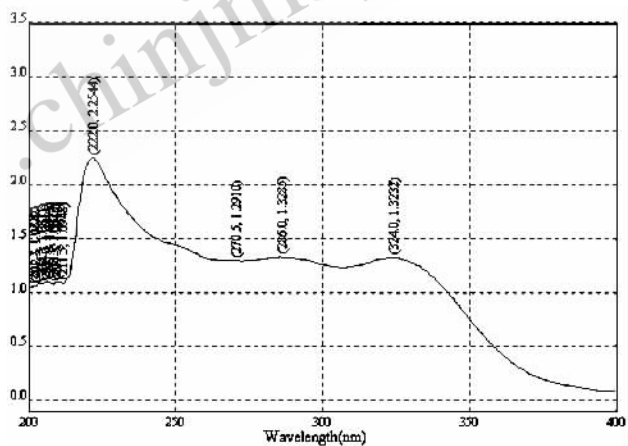


图3 大孔树脂 AB-8 纯化物的紫外光谱

Fig 3 UV spectrum of water extraction of *E. breviscapus* treated by AB-8 macro-porous resin

图3中  $\lambda_{max}$  286nm 为野黄芩苷的特征吸收带,  $\lambda_{max}$  324nm 为咖啡酸的特征吸收带,而野黄芩苷、咖啡酰衍生物在220nm 附近均有较强吸收,这也证明了以野黄芩苷为主的黄酮类成分以及咖啡酰衍生物是灯盏细辛的主要成分。由于在野黄芩苷的吸收带 I 336nm 附近并没有吸收峰出现,因此,灯盏细辛中咖啡酰衍生物的含量应高于黄酮类成分。据此可以建立灯盏细辛总酚的含量测定方法:以咖啡酸为对照品,在324nm 附近进行测定。

### 3 讨论

**3.1** 将 HPLC 法测定野黄芩苷和 UV 法测定总酚相结合,对灯盏细辛的主要成分进行了分析,故能较全面反映灯盏细辛及其制剂的质量。

**3.2** 在 HPLC 实验中,当增大流动相极性,换为乙腈-水-磷酸(35:65:0.2)时,图 2 中所有峰均在 5min 内出峰,在  $t_{R5} \sim 60\text{min}$  内均无峰出现;另外,当波长换为 220nm、240nm、260nm、325nm、336nm、370nm 时,均无新峰出现。因此,图 2 较全面地反映了灯盏细辛的酚性成分。

**3.3** 灯盏细辛水煎煮液中被大孔树脂除去的成分,经检测,没有紫外吸收,它们是否是有效成分有待研究。

**3.4** 在以灯盏花素为原料制得的制剂中,由于灯盏花素为“短葶飞蓬中提取的黄酮类成分,含量以野黄芩苷( $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$ )干燥品计算,应为 95.0 ~ 105.0%”<sup>[5]</sup>,因此,以野黄芩苷为对照品,采用 HPLC 或 UV 法均能有效控制质量,不必再以咖啡酸为对照品测定总酚。

### 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 灯盏细辛注射液[S]. 中华人民共和国药典(1977 年版·一部). 人民卫生出版社, 1978:247.
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 灯盏细辛注射液[S]. 中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第二十册), 1998:105.

- [3] 杨晖. 灯盏细辛胶囊的检测方法[J]. 中成药, 1997, 19(7): 37-38.
- [4] 苏文华, 陆洁, 张光飞, 等. 短葶飞蓬总黄酮含量的生物学分析[J]. 中草药, 2001, 32(12): 11-19.
- [5] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 灯盏花素片[S]. 中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第十三册), 1998:76.
- [6] 杨文字, 张艺, 段俊国. 高效液相色谱法测定灯盏细辛中灯盏乙素的含量[J]. 成都中医药大学学报, 2001, 24(3): 37-38.
- [7] Qu J, Wang Y, Luo G. Determination of scutellarin in *Erigeron breviscapus* extract by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2001, 919(2): 437-441.
- [8] 曲峻, 王义明, 罗国安, 等. LC/MS/MS 的多反应监测方法测定灯盏乙素[J]. 药学学报, 2000, 35(2): 139-141.
- [9] Qu J, Wang Y, Luo G, Wu Z. Identification and determination of glucuronides and their aglycones in *Erigeron breviscapus* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2001, 928(2): 155-162.
- [10] 饶毅, 魏惠珍, 王义明, 等. 毛细管电泳法测定灯盏花及提取物中灯盏花乙素含量[J]. 中草药, 2002, 33(9): 796-798.
- [11] 张卫东, HA. Thi Bang Tam, 陈万生, 等. 中药灯盏细辛中酚酸类化合物的结构与活性研究[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(8): 579-581.

收稿日期: 2005-01-12