

· 论著 ·

## 应用高效液相色谱法测定中药奇蒿中异泽兰黄素和奇蒿黄酮的含量

邱智泉<sup>a</sup>, 曹青青<sup>b</sup>, 谭蔚锋<sup>a</sup>, 周瑾<sup>b</sup>, 吕磊<sup>b</sup> (第二军医大学附属东方肝胆外科医院 a.胆道一科, b.药材科, 上海200438)

**[摘要]** 目的 采用高效液相色谱(HPLC)法测定中药奇蒿中异泽兰黄素和奇蒿黄酮的含量。方法 奇蒿药材以10倍体积甲醇超声60 min提取。色谱分离采用资生堂MG-C<sub>18</sub>色谱柱(3.0 mm×100 mm, 3 μm), 流动相为乙腈-0.1%甲酸(40:60, V/V), 等度洗脱, 流速0.5 ml/min, 检测波长350 nm, 柱温25℃, 进样量5 μl。结果 异泽兰黄素和奇蒿黄酮在15 min内基线分离, 线性良好。方法学验证表明, 日内、日间精密性, 重复性和稳定性的范围均符合相关标准。异泽兰黄素的低、中、高加样回收率分别为100.26%, 99.58%和102.24%; 奇蒿黄酮的低、中、高加样回收率分别为99.09%, 101.12%和101.43%。结论 该方法快捷简单, 稳定可靠, 可用于对奇蒿药材进行质量控制。

**[关键词]** 奇蒿; 异泽兰黄素; 奇蒿黄酮; 高效液相色谱; 含量测定

**[中图分类号]** R93 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2016)02-0163-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.02.016

## Assay of eupatilin and arteanoflavone in *Artemisia anomala* by HPLC

QIU Zhiqun<sup>a</sup>, CAO Qingqing<sup>b</sup>, TAN Weifeng<sup>a</sup>, ZHOU Jin<sup>b</sup>, LÜ Lei<sup>b</sup> (a. Department of Biliary Tract Surgery, b. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

**[Abstract]** **Objective** To determine the concentration of eupatilin and arteanoflavone in *Artemisia anomala* by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** *Artemisia anomala* was extracted by ultrasonic for 60 minutes with 10 times volume of methanol. The HPLC was performed on a SHISEIDO MG-C<sub>18</sub> column (3.0 mm×100 mm, 3 μm). The mobile phase was a mixture of acetonitrile (ACN) and 0.1% formic acid (40:60, V/V). The detection wavelength was 350 nm, the column temperature was 25℃ and the injection volume was 5 μl. **Results** Eupatilin and arteanoflavone were separated at baseline within 15min with good linearity. The method validation results show that the precisions, repeatability and stability were all in the normal range. The low, medium and high level recoveries of eupatilin were 100.26%, 99.58%, 102.24%, and those of arteanoflavone were 99.09%, 101.12%, 101.43%, respectively. **Conclusion** The method was rapid, simple, reproducible and accurate. It can be used to control the quality of *Artemisia anomala*.

**[Key words]** *Artemisia anomala*; eupatilin; arteanoflavone; HPLC; determination

奇蒿又名南刘寄奴、六月霜、九牛草、野马兰头等, 为菊科多年生草本植物奇蒿(*Artemisia anomala* S. Moore)的全草<sup>[1]</sup>。主要分布于我国华东、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<sup>[2]</sup>。全草入药有清热解暑、破血通经、散瘀止痛、消食化积的功效, 主治血漏经闭、产后瘀阻腹痛、食积不化等症<sup>[3]</sup>。现代药理学研究表明, 奇蒿可以影响血液系统和内分泌功能, 亦具有抗菌、抗缺氧、抑制亚硝化反应、抗氧化、镇痛、保肝等作用<sup>[4]</sup>。近期有学者研究发现,

奇蒿中的黄酮具有调节多靶点发挥抗血管炎症的功效<sup>[5]</sup>, 奇蒿的乙酸乙酯提取部位具有强大的抗炎活性<sup>[6]</sup>。

奇蒿全草具有黄酮苷反应, 经植物化学研究发现, 黄酮类化合物是奇蒿的重要成分之一<sup>[7]</sup>。因此, 研究奇蒿黄酮类化合物对奇蒿的药理活性机制探索具有重要意义。据文献报道, 异泽兰黄素主要存在于艾科植物中<sup>[8]</sup>, 奇蒿黄酮仅存在于蒿属奇蒿中, 以上两种特征性黄酮化合物可以作为奇蒿药材鉴定的参考依据。目前, 有关奇蒿中黄酮类化合物的研究较少, 尤其是特征黄酮类化合物的提取和含量测定未见报道。因此, 建立简单、高效的方法测定奇蒿中特征化合物, 对药材的开发应用具有重要意义。本实验采用正交设计法对奇蒿中异泽兰黄素和奇蒿黄酮的提取条件进行优化, 并采用高效液相色谱

**[作者简介]** 邱智泉, 主治医师, 讲师, 研究方向: 普外科疾病治疗。Tel: (021)81875582; E-mail: qzqh423@126.com

**[通讯作者]** 吕磊, 硕士, 主管药师, 研究方向: 中药质量标准研究。Tel: (021)81875578; E-mail: k\_owen2002@126.com

(HPLC)法测定两者的含量,为奇蒿中特征化合物的研究和质量控制提供依据。

## 1 仪器和试剂

**1.1 仪器** Agilent 1100 系列 HPLC 仪(美国安捷伦公司),配有 G1379A 真空脱气机、G1311A 四元泵、G1367A 自动进样器、G1316A 柱温箱和 G1315B DAD 检测器;KUDOS-SK2200H 超声发生器(上海科导超声仪器公司);METTLER AE240 型十万分之一电子天平(德国梅特勒公司);DJ-04 药材粉碎机(上海淀久公司)。

**1.2 药品和试剂** 异泽兰黄素和奇蒿黄酮对照品购自上海诗丹德生物技术有限公司(纯度>98%),奇蒿药材购自亳州市中药材饮片公司,共5个批次,产地分别为:浙江(批号:20140517)、江西(批号:20140712)、广西(批号:20140621)、湖北(批号:20140704)、江苏(批号:20140813)。经第二军医大学药学院生药学教研室黄宝康教授鉴定为菊科植物奇蒿(*Artemisia anomala* S. Moore)的全草。乙腈和甲酸为色谱纯,购自 Fisher 公司;水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的配制

**2.1.1 对照品溶液** 分别精密称取异泽兰黄素和奇蒿黄酮对照品 10.40、10.34 mg,置 10 ml 量瓶

中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得浓度分别为 1.040、1.034 mg/ml 的母液。精密量取上述对照品溶液 10、20、50、100、200  $\mu$ l,分别至 10 ml 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得系列浓度的混合对照品溶液,置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

**2.1.2 样品溶液** 精密称取奇蒿药材粉末约 2.0 g(过 40 目筛),置具塞锥形瓶中,加甲醇 20 ml,超声提取 1 h,降至室温,补足失重,摇匀,过 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜,取续滤液,即得,置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

**2.2 色谱条件** 色谱柱:资生堂 MG-C<sub>18</sub> 色谱柱(3.0 mm $\times$ 100 mm,3.0  $\mu$ m);流动相为乙腈-0.1% 甲酸(40:60,V/V),等度洗脱;流速 0.5 ml/min;检测波长 350 nm,柱温 25  $^{\circ}$ C;进样量 5  $\mu$ l。

### 2.3 方法学验证

**2.3.1 系统适用性** 按出峰顺序,异泽兰黄素和奇蒿黄酮的保留时间分别为 6.129、7.762 min。根据对照品溶液的色谱图中 2 个峰的相关参数,计算系统适用性,其理论塔板数分别为 8 852、8 345;分离度为 5.43;拖尾因子分别为 1.012、1.034。空白、奇蒿对照品及样品溶液的色谱图见图 1。

**2.3.2 线性关系** 分别将“2.1.1”项下制备的不同浓度的混合对照品溶液按“2.2”项下色谱条件依次连续进样,重复 3 次,以对照品溶液浓度( $X$ , $\mu$ g/ml)对峰面积( $Y$ )进行线性回归,呈良好的线性关系,如表 1 所示。

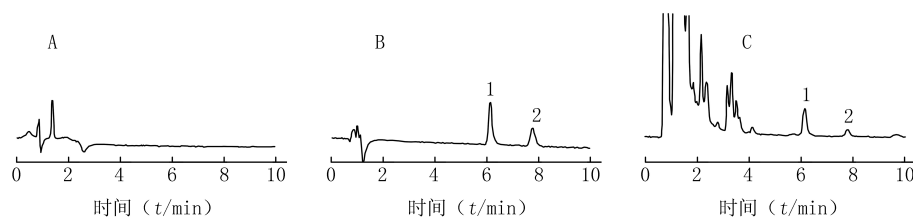


图 1 奇蒿的 HPLC 图

A. 空白溶液; B. 对照品溶液; C. 样品溶液; 1. 异泽兰黄素; 2. 奇蒿黄酮

表 1 异泽兰黄素、奇蒿黄酮的线性关系( $n=3$ )

成分	浓度 ( $\rho_B/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	峰 面积	线性方程	线性范围 ( $\rho_B/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	$r$
异泽兰黄素	1.04	18.55	$Y=16.41X+2.394$	1.04~ 20.80	0.999 5
	2.08	34.59			
	5.20	89.70			
	10.40	175.38			
	20.80	342.38			
奇蒿黄酮	1.034	7.73	$Y=7.369X+0.581$	1.034~ 20.68	0.999 5
	2.068	15.66			
	5.170	38.77			
	10.34	77.83			
	20.68	152.47			

**2.3.3 定量限和检测限** 将混合对照品溶液进行逐级稀释,以信噪比 10:1 时,确定其最低定量限;以信噪比 3:1 时,确定其最低检测限。异泽兰黄素和奇蒿黄酮的最低定量限分别为 1.04 和 1.03  $\mu$ g/ml,最低检测限分别为 0.64 和 0.86  $\mu$ g/ml。

**2.3.4 精密度的试验** 取“2.1.1”项下制备的不同浓度的混合对照品溶液中的第 2、3、5 个点作为低、中、高浓度点,在 1 d 以内连续进样 3 次,以及连续 3 d 分别进样,根据所得峰面积分别考察日内精密度和日间精密度( $n=3$ )。结果异泽兰黄素和奇蒿黄酮的日内精密度低浓度点  $RSD<2.0\%$ ,中、高浓度点  $RSD<1.5\%$ ,日间精密度低、中浓度点  $RSD<$

2.0%,高浓度点 RSD<1.5%,表明本方法的精密  
度良好。

**2.3.5 加样回收率试验** 精密称取同一批次奇蒿  
样品 1 g(产地:浙江,批号:20140517),共 9 份,每 3  
份为 1 组,按低、中、高 3 个浓度分别加入对照品一  
定量(样品中各成分含量的 50%、100%、150%)。  
按“2.1.2”项下制备,进样分析,结果异泽兰黄素低、  
中、高浓度的回收率( $n=3$ )分别为 100.26%  
(RSD=1.81%)、99.58% (RSD=1.45%) 和  
102.24% (RSD=1.26%);奇蒿黄酮低、中、高浓度  
的回收率( $n=3$ )分别为 99.09% (RSD=1.91%)、  
101.12% (RSD=1.12%) 和 101.43% (RSD=  
1.49%)。结果表明,以本法同时测定奇蒿中异泽兰  
黄素和奇蒿黄酮的含量回收率结果良好。

**2.3.6 重复性试验** 精密称取同一批次奇蒿样品  
2 g(批号:20140517),共 5 份。按“2.1.2”项下方法  
分别制成样品溶液,进样分析。结果显示,异泽兰黄  
素和奇蒿黄酮( $n=5$ )的平均含量分别为  
70.49  $\mu\text{g/g}$ (RSD=1.25%)和 56.70  $\mu\text{g/g}$ (RSD=  
1.75%)。结果表明,本方法的重复性良好。

**2.3.7 稳定性试验** 同法制备奇蒿药材样品提取  
溶液(批号:20140517),分别在 0、2、4、8、12、24 h 测  
定 2 种奇蒿黄酮类化合物的峰面积,考察其稳定性。  
异泽兰黄素和奇蒿黄酮的峰面积 RSD( $n=6$ )分别  
为 1.74%、1.45%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.4 样品测定** 按“2.1.2”项下方法制备 5 个不同  
产地(浙江、江西、广西、湖北、江苏)的奇蒿药材样品  
溶液,各样品溶液按“2.2”项下色谱条件分析,计算  
样品含量,结果见表 2。

表 2 各产地奇蒿药材中异泽兰黄素和  
奇蒿黄酮的含量测定结果( $n=3$ )

产地	异泽兰黄素( $\mu\text{g/g}$ )	奇蒿黄酮( $\mu\text{g/g}$ )
浙江	70.63	56.43
江西	79.98	69.64
广西	44.85	34.31
湖北	117.19	85.84
江苏	80.90	57.77

### 3 讨论

**3.1 提取方法的优化** 对于奇蒿中黄酮类化合物  
的含量测定方法,文献[9]报道了采用索氏回流法提  
取总黄酮化合物,因操作过程烦琐,提取时间较长,  
本实验采用正交设计法制订超声提取方案。以 3 因  
素、3 水平考察了对超声提取有影响的因素:物料

比、提取溶剂和提取时间。物料比( $m/V$ )为 1:10、  
1:20、1:30;提取时间为 30、45、60 min;提取溶  
剂为 70%乙醇、50%甲醇、甲醇,正交试验结果见表  
3。根据表中 2 种黄酮总含量由高到低的顺序可判  
断,以甲醇为提取溶剂,物料比 1:10,超声时间  
60 min 时,异泽兰黄素和奇蒿黄酮的综合提取效率  
最高,故采用 2 g 奇蒿药材加入 20 ml 甲醇溶剂,超  
声 60 min 作为最佳前处理条件。

表 3 正交试验结果

No.	溶剂体积 (V/ml)	溶剂种类	超声时间 (t/min)	异泽兰黄 素含量 ( $\mu\text{g/g}$ )	奇蒿黄 酮含量 ( $\mu\text{g/g}$ )	2 种黄酮 总含量 ( $\mu\text{g/g}$ )
1	20	甲醇	60	71.22	57.93	128.98
2	20	70%乙醇	30	83.39	37.00	120.21
3	40	甲醇	30	66.59	44.12	110.54
4	60	70%乙醇	60	78.73	10.47	88.98
5	60	甲醇	45	43.44	33.67	76.92
6	20	50%甲醇	45	41.32	33.72	74.85
7	40	50%甲醇	60	43.77	30.54	74.11
8	40	70%乙醇	45	22.89	39.79	62.50
9	60	50%甲醇	30	42.16	8.22	50.15

### 3.2 液相条件的选择

**3.2.1 色谱柱** 色谱柱的选择对能否形成良好分  
离度具有重要影响,我们考察了 250 mm $\times$ 4.6 mm  
(粒径 5  $\mu\text{m}$ )、150 mm $\times$ 4.6 mm(粒径 5  $\mu\text{m}$ )以及  
100 mm $\times$ 3.0 mm(粒径 3  $\mu\text{m}$ )3 种规格的柱子。经  
比较发现,长柱的分离度高,但分析时间较长;短柱  
的粒径小,柱效高,分析时间短,故选用 100 mm $\times$   
3.0 mm(粒径 3  $\mu\text{m}$ )柱进行分析。

**3.2.2 检测波长和流动相** 异泽兰黄素是艾科艾  
属植物艾叶中的有效成分之一,前期相关学者对艾  
叶中异泽兰黄素的含量进行了研究<sup>[10,11]</sup>。在异泽  
兰黄素含量测定研究条件的基础上,我们选择 240、  
275、350 nm 3 个吸收波长比较了异泽兰黄素和奇  
蒿黄酮的吸收强弱,流动相比例设为乙腈-0.1% 甲  
酸溶液(40:60, V/V),等度洗脱,结果表明,异泽兰  
黄素和奇蒿黄酮在波长为 350 nm 处吸收最强,且  
在该流动相条件下,两者基线分离。本实验所选检  
测波长和流动相条件能够准确测定奇蒿中异泽兰黄  
素和奇蒿黄酮的含量。

**3.2.3 温度和流速** 温度和流速对样品的检测有  
重要影响,降低温度能够提高样品的分离度,但会增  
加流动相在柱子中的黏度,从而增加检测系统的压  
力。一般情况下,柱温设为 25  $^{\circ}\text{C}$ 。流速过高会降低  
分离度,且出峰时间会过早。对于短柱,我们控制的  
流速是 0.5 ml/min,该流速条件下,样品的分离度

良好,且出峰时间合适,故选为分析条件。

**3.3 测定结果分析** 本实验对5个产地奇蒿药材中的异泽兰黄素和奇蒿黄酮进行了含量测定。实验结果表明,异泽兰黄素的含量依次为:湖北>江苏>江西>浙江>广西;奇蒿黄酮的含量依次为:湖北>江西>江苏>浙江>广西。其中,产地为湖北的药材其目标成分的含量达到广西产的2倍。出现以上含量差异的原因可能与药材生长的土壤成分、日照时间、光照强弱等因素有关。此研究进一步确定了各产地奇蒿中的特征黄酮成分的含量,通过后期系统的统计学分析,可对不同产地的奇蒿药材质量进行评价,也可为道地药材的鉴别提供依据。

#### 4 小结

本实验采用HPLC法对奇蒿药材中的异泽兰黄素和奇蒿黄酮进行含量测定,方法学验证表明,日内及日间精密密度、重复性、稳定性、加样回收率的范围均符合相关标准,该方法成功运用于5个产地奇蒿药材的含量测定。本实验建立的方法简单快速、稳定可靠,可为奇蒿药材的质量控制提供依据。

#### 【参考文献】

[1] 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): 63-63.  
 [2] 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): 101-104.  
 [3] 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): 638-641.  
 [4] 年 华,郑汉臣. 奇蒿的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2002, 20(5): 305-309.  
 [5] 潘一峰,章丹丹,凌 霜,等. 南刘寄奴总黄酮体外抗血管炎症的机制分析[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(17): 2597-2602.  
 [6] Tan X, Wang YL, Yang XL, et al. Ethyl Acetate extract of *Artemisia anomala* S. Moore displays potent anti-inflammatory effect[J]. Evid Based Compl Alternat Med, 2014, 2014(68): 1352-1362.  
 [7] 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): 1827-1830.  
 [8] Son JE, Lee E, Seo SG, et al. Eupatilin, a major flavonoid of *Artemisia*, attenuates aortic smooth muscle cell proliferation and migration by inhibiting PI3K, MKK3/6, and MKK4 activities. *Planta Med*, 2013, 79(12): 1009-1016.  
 [9] 黄雅萍,王鸿燕,叶陈奎,等. 正交试验优化六月霜中总黄酮的提取工艺[J]. 天津药学, 2010, 22(5): 3-5.  
 [10] Lee YW, Jin YZ, Row KH, et al. Extraction and purification of eupatilin from *Artemisia princeps* PAMPAN recycling preparative HPLC[J]. *Korean J Chem Eng*, 2006, 23(2): 279-282.  
 [11] 龙 澜,李亚杰,程新华,等. 艾叶中异泽兰黄素的含量测定[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版), 2010, 28(4): 395-396.

[收稿日期] 2015-02-10 [修回日期] 2015-06-08  
 [本文编辑] 李睿旻

(上接第141页)

[8] Okino T, Yoshimura E, Hirota H, et al. Antifouling kalihinenes from the marine sponge *Acanthella cavernosa* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1995, 36(47): 8637-8640.  
 [9] Hirota H, Tomono Y, Fusetani N. Terpenoids with antifouling activity against barnacle larvae from the marine sponge *Acanthella cavernosa* [J]. *Tetrahedron*, 1996, 52(7): 2359-2368.  
 [10] Okino T, Yoshimura E, Hirota H, et al. New antifouling kalihipyranes from the marine sponge *Acanthella cavernosa* [J]. *J Nat Prod*, 1996, 59(11): 1081-1083.  
 [11] Xu Y, Li N, Jiao WH, et al. Antifouling and cytotoxic constituents from the South China Sea sponge *Acanthella cavernosa* [J]. *Tetrahedron*, 2012, 68(13): 2876-2883.  
 [12] Xu Y, Lang JH, Jiao WH, et al. Formamido-diterpenes from the South China Sea Sponge *Acanthella cavernosa*. *Marine drugs*, 2012, 10(12): 1445-1458.  
 [13] Sun JZ, Chen KS, Yao LG, et al. A new kalihinol diterpene from the Hainan sponge *Acanthella* sp [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(11): 1581-1584.  
 [14] Yan XH, Zhu XZ, Yu JL, et al. 3-Oxo-axisonitrile-3, a new sesquiterpene isocyanide from the Chinese marine sponge

*Acanthella* sp [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2006, 8(6): 579-584.  
 [15] Qiu Y, Deng Z W, Xu M, et al. New A-nor steroids and their antifouling activity from the Chinese marine sponge *Acanthella cavernosa* [J]. *Steroids*, 2008, 73(14): 1500-1504.  
 [16] 许 磊,吴 迪,吴立军,等. 辽细辛地上部分化学成分的分离与鉴定(2) [J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(12): 964-967.  
 [17] Wang RP, Lin HW, Song SJ, et al. Monoindole alkaloids from a marine sponge *Mycale fibrexilis* [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2012, 43(8): 210-213.  
 [18] Dillman RL, Cardellina JH. Aromatic secondary metabolites from the sponge *Tedania Ignis* [J]. *J Nat Prod*, 1991, 54(4): 1056-1061.  
 [19] Harrigan GG, Ahmad A, Baj N, et al. Bioactive and other sesquiterpenoids from *Porella cordeana* [J]. *J Nat Prod*, 1993, 56(6): 921-925.  
 [20] 王茹萍,吴 迪,高慧媛,等. 天女木兰叶中甾类化合物的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2009, (11): 874-877.

[收稿日期] 2015-08-11 [修回日期] 2016-01-05  
 [本文编辑] 李睿旻