

HPLC-一测多评法同时测定大青叶中6种抗肿瘤活性成分的含 量^Δ

罗文艳^{1*},段和祥²,刘绪平²,陈希²,章瑛²,李志勇^{1#}(1.南昌大学第四附属医院药学部,南昌 330003;2.江西省药品检验检测研究院/江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心,南昌 330029)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)19-2635-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.19.10

摘要 目的:建立同时测定大青叶中6种抗肿瘤活性成分含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Waters XTER-RA[®] MS C₁₈,流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,柱温为35℃,检测波长为254 nm,进样量为10 μL。以木犀草苷为内标,分别计算其与尿苷、腺苷、金丝桃苷、7-甲氧基香豆素、芹菜素的相对校正因子(RCF),通过RCF计算大青叶中上述5种抗肿瘤活性成分的含量,同时采用外标法测定这6种成分的含量,比较一测多评法和外标法的含量测定结果。结果:尿苷、腺苷、木犀草苷、金丝桃苷、7-甲氧基香豆素、芹菜素进样量检测线性范围分别为0.122 6~4.902、0.063 4~2.534、0.032 7~1.309、0.038 2~1.527、0.032 3~1.291、0.052 5~2.098 μg($r \geq 0.999 1$);检测限分别为3.06、1.58、0.82、0.96、0.81、1.31 μg/mL,定量限分别为10.21、5.28、2.73、3.18、2.69、4.37 μg/mL;精密性、稳定性(24 h)、重复性试验的RSD<2%($n=6$);加样回收率为96.45%~99.14%(RSD为0.8%~1.6%, $n=6$)。尿苷、腺苷、金丝桃苷、7-甲氧基香豆素、芹菜素的RCF分别为0.197、0.413、0.732、0.825、0.587。在不同试验条件下,RCF重现性良好。采用一测多评法和外标法的含量测定结果比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:该方法操作简单快捷、结果准确可靠,可用于大青叶中尿苷、腺苷、木犀草苷、金丝桃苷、7-甲氧基香豆素和芹菜素6种抗肿瘤活性成分含量的同时测定。

关键词 高效液相色谱法;一测多评法;大青叶;木犀草苷;抗肿瘤活性成分;相对校正因子

Content Determination of 6 Antitumor Active Constituents in *Folium isatidis* by HPLC-QAMS

LUO Wenyan¹, DUAN Hexiang², LIU Xuping², CHEN Xi², ZHANG Ying², LI Zhiyong¹(1.Dept. of Pharmacy, the Fourth Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330003, China; 2.Jiangxi Institute for Drug Control/Jiangxi Provincial Engineering Research Center for Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China)

gospermatism model[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 37(2):679-88.

[9] YANG L, SHEN JH, LI JK, et al. Facilitation of Sheng-jingbao to spermatogenesis in oligospermia mouse models and its action mechanisms[J]. *Int J Androl*, 2007, 13(9): 853-857.

[10] DONG WW, HUANG HL, WEI Y, et al. Testis-specific Fank1 gene in knockdown mice produces oligospermia via apoptosis[J]. *Asian J Androl*, 2014, 16(1): 124-130.

[11] YANG L, ZHANG D, WU H, et al. Basic fibroblast growth factor influences epidermal homeostasis of living skin equivalents through affecting fibroblast phenotypes and functions[J]. *Skin Pharmacol Physiol*, 2018, 31(4): 229-237.

[12] RAJABI S, PAHLAVAN S, ASHTIANI MK, et al. Human

Δ基金项目:江西省科技厅青年科学基金资助项目(No.20122 BAB215044);江西省食品药品监督管理局科研项目(No.2016YP18)

* 主管药师,硕士。研究方向:医院药学及中药分析。电话:0791-87029457。E-mail:33436602@qq.com

通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:医院药学。电话:0791-87029457。E-mail:11058579@qq.com

embryonic stem cell-derived cardiovascular progenitor cells efficiently colonize in bFGF-tethered natural matrix to construct contracting humanized rat hearts[J]. *Biomaterials*, 2017, 154(1):99-112.

[13] SUN D, WANG W, WANG X, et al. bFGF plays a neuroprotective role by suppressing excessive autophagy and apoptosis after transient global cerebral ischemia in rats [J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(2):172-186.

[14] MAKOLATI Z, MOVAHEDIN M, et al. Embryonic stem cell-derived germ cells induce spermatogenesis following transplantation to testis of adult mouse azoospermia model [J]. *Clinical Science*, 2017, 131(18):2381-2395.

[15] 陈建设,孙自学,吕水林,等.补肾活血通淋方对良性前列腺增生症大鼠模型bFGF的影响[J].中国男科学杂志, 2013, 40(3):19-22.

[16] 朱倩,崔毓桂.精子发生的调节机制及其进展[J].生殖医学杂志, 2016, 25(4):378-383.

[17] 王艳,秦瑛键.复方玄驹胶囊治疗少弱精子症的临床研究[J].中国性科学, 2014, 23(2):89-91.

(收稿日期:2018-05-21 修回日期:2018-08-02)

(编辑:林静)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of 6 antitumor active constituents in *Folium isatidis*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Waters XTERRA® MS C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.1% formic acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 35 °C, and detection wavelength was 254 nm. The injection volume was 10 µL. Using luteolin as internal standard, relative correction factors (RCF) of uridine, adenosine, hyperin, 7-methoxycoumarin and apigenin were calculated respectively. The contents of above 5 antitumor active components in *F. isatidis* were calculated by RCF. The contents of 6 components were determined by external standard method (ESM). The results of content determination by QAMS were compared with ESM. RESULTS: The linear range was 0.122 6-4.90 2 µg for uridine, 0.063 4-2.534 µg for adenosine, 0.032 7-1.309 µg for luteolin, 0.038 2-1.527 µg for hyperin, 0.032 3-1.291 µg for 7-methoxycoumarin, 0.052 5-2.098 µg for apigenin ($r \geq 0.999$). The limits of detection were 3.06, 1.58, 0.82, 0.96, 0.81, 1.31 µg/mL, respectively. The limits of quantification were 10.21, 5.28, 2.73, 3.18, 2.69, 4.37 µg/mL. RSDs of precision, stability (24 h) and reproducibility tests were less than 2% ($n=6$). The average recoveries were 96.45%-99.14% (RSDs were 0.8%-1.6%, $n=6$). RCFs of uridine, adenosine, hyperin, 7-methoxycoumarin and apigenin were 0.197, 0.413, 0.732, 0.825 and 0.587, respectively. RCFs repeatability was perfect under different experiment conditions. There was no significant difference between the quantitative results of the QAMS and ESM ($P>0.05$). CONCLUSIONS: QAMS method is simple, fast, accurate and feasible, and can be used for simultaneous determination of uridine, adenosine, luteolin, hyperin, 7-methoxycoumarin and apigenin in *F. isatidis*.

KEYWORDS HPLC; QAMS; *Folium isatidis*; Luteolin; Antitumor active constituent; Relative correction factor

大青叶(*Folium isatidis*)为十字花科植物菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.)的干燥叶,具有清热解毒、凉血消斑之功效,用于温病高热、神昏、发斑发疹、作腮、喉痹、丹毒、痈肿等的治疗^[1]。大青叶的化学成分主要有生物碱类、有机酸类、黄酮类、苷类、甾体类、氨基酸和无机元素等^[2-4]。现代药理研究表明,大青叶具有抗炎、抗病毒、解热、增强免疫力、抗肿瘤、抗内毒素等作用^[5-8]。大青叶中含有尿苷、腺苷、木犀草苷、金丝桃苷、7-甲氧基香豆素、芹菜素等抗肿瘤成分。本研究建立了高效液相色谱(HPLC)-一测多评(QAMS)法同时测定大青叶中6种抗肿瘤活性成分的含量,以木犀草苷为内标,计算尿苷、腺苷、金丝桃苷、7-甲氧基香豆素、芹菜素与其之间的相对校正因子(RCF),利用RCF测定各成分含量,并将结果与外标法(ESM)测得数据进行比较分析,旨在为大青叶药材质量控制和评价提供一种新的技术手段和依据。

1 材料

1.1 仪器

1260 Infinity II HPLC仪,包括二极管阵列检测器(美国Agilent公司);Alliance e2695 HPLC仪,包括二极管阵列检测器(美国Waters公司);色谱柱:Waters XTERRA® MS C₁₈、Inertsil ODS-3、ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(均为250 mm×4.6 mm, 5 µm);MS205DU电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);DS-8510DT超声波清洗机(上海生析超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

3批大青叶药材购于樟树康健中药材有限公司,经江西省药品检验检测研究院中药室万林春副主任中药师鉴定为十字花科植物菘蓝(*I. indigotica* Fort.)的干燥叶。大青叶药材来源详见表1。

表1 大青叶药材来源

Tab 1 Resource of *F. isatidis*

批号	产地	采集时间	采集人
170001	江西省九江市修水县	2017年6月	张敏
170002	福建省三明市泰宁县	2017年6月	张敏
170003	江苏省淮安市涟水县	2017年7月	张敏

尿苷(批号:110887-200202,纯度:100%)、腺苷(批号:110879-201703,纯度:99.7%)、木犀草苷(批号:111720-201609,纯度:94.9%)、金丝桃苷(批号:111521-201708,纯度:95.1%)、7-甲氧基香豆素(批号:111513-200001,纯度:100%)、芹菜素(批号:111901-201603,纯度:99.2%)对照品均来源于中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters XTERRA® MS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 µm);流动相:甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~75 min, 10%→64% A; 75~80 min, 64%→90% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:35 °C;进样量:10 µL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取尿苷、腺苷、木犀草苷、金丝桃苷、7-甲氧基香豆素、芹菜素对照品适量,精密称定,用70%甲醇溶液溶解并定量稀释制成每1 mL中分别含上述对照品122.6、63.4、32.7、38.2、32.3、52.5 µg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 称取大青叶药材10 g,剪碎,置于具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇溶液100 mL,密塞,称定质量,超声(功率:500 W,频率:40 kHz)提取45 min,取出,放冷,再称定质量,用70%甲醇溶液补足减失

的质量,摇匀,用0.45 μm有机系微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.2.3 空白溶液 取70%甲醇溶液作为空白溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和空白溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果,在该色谱条件下,各待测成分色谱峰都可以达到基线分离,各对照品色谱峰与相邻峰之间分离度均>1.5,理论板数按木犀草苷峰计>3 000,详见图1。

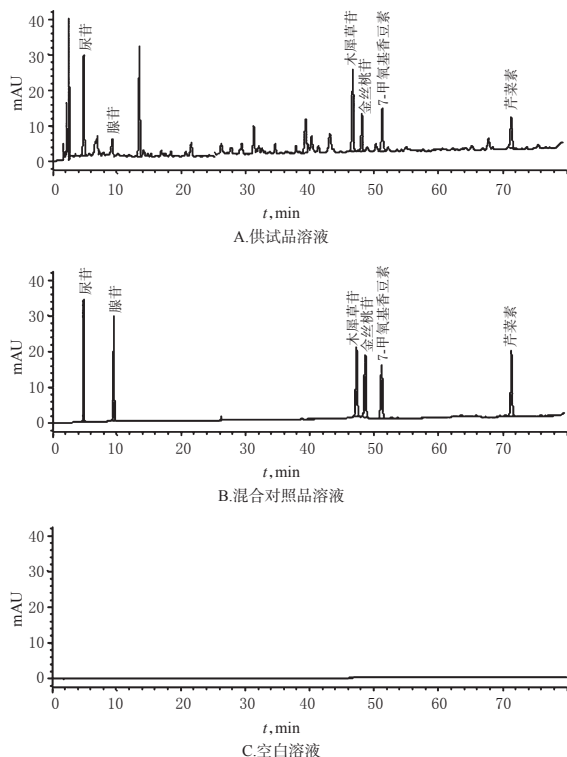


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液1、2、5、10、20、40 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以待测成分进样量为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,结果见表2。

表2 6种成分的回归方程和线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges of 6 components

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
尿苷	y=154 542x+2 379.2	0.999 3	0.122 6~4.90 2
腺苷	y=319 136x+4 143.6	0.999 1	0.063 4~2.534
木犀草苷	y=780 590x-5 802.7	0.999 5	0.032 7~1.309
金丝桃苷	y=580 526x+7 327.2	0.999 7	0.038 2~1.527
7-甲氧基香豆素	y=639 492x-4 397.7	0.999 6	0.032 3~1.291
芹菜素	y=455 384x+225.94	0.999 9	0.052 5~2.098

2.5 检测限与定量限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,根据色谱峰响应情况逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录

各色谱峰。以信噪比为3:1作为检测限,以信噪比为10:1作为定量限。结果,尿苷、腺苷、木犀草苷、金丝桃苷、7-甲氧基香豆素、芹菜素的检测限分别为3.06、1.58、0.82、0.96、0.81、1.31 μg/mL,定量限分别为10.21、5.28、2.73、3.18、2.69、4.37 μg/mL。

2.6 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液10 μL,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,尿苷、腺苷、木犀草苷、金丝桃苷、7-甲氧基香豆素、芹菜素峰面积的RSD分别为1.24%、1.08%、0.32%、1.55%、0.89%、1.68%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

精密量取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:170001)10 μL,分别于室温下放置0、4、8、12、18、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,尿苷、腺苷、木犀草苷、金丝桃苷、7-甲氧基香豆素、芹菜素峰面积的RSD分别为0.27%、1.12%、1.47%、1.77%、1.65%、0.78%(n=6),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取大青叶药材(批号:170001)各约10 g,剪碎,精密称定,置于具塞锥形瓶中,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,尿苷、腺苷、木犀草苷、金丝桃苷、7-甲氧基香豆素和芹菜素含量的RSD分别为1.6%、1.1%、1.4%、0.8%、1.9%、1.2%(n=6),表明该方法的重复性良好。

2.9 加样回收试验

取大青叶药材(批号:170001)约10 g,共6份,剪碎,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入一定量的各待测成分对照品,按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。由表3可见,各成分平均回收率为96.45%~99.14%。

2.10 QAMS法

2.10.1 RCF的计算 以木犀草苷为内标物,采用斜率校正法^[9],RCF计算公式为 $f_{k/s} = a_k/a_s^{[10-11]}$ (a为回归方程的斜率,s为内标物,k为其他待测组分),分别计算尿苷、腺苷、金丝桃苷、7-甲氧基香豆素和芹菜素与内标物木犀草苷的RCF。结果,尿苷、腺苷、金丝桃苷、7-甲氧基香豆素、芹菜素的RCF分别为0.197、0.413、0.732、0.825、0.587。

2.10.2 RCF重现性考察 取“2.2.1”项下的混合对照品溶液和“2.2.2”项下供试品溶液,分别进样10 μL测定分析,考察2个不同厂家的HPLC仪和3个不同品牌的色谱柱对RCF的影响,结果RSD均小于2.4%(n=6),表明在不同试验环境下,该方法均具有较好的重现性。不同色谱仪和不同色谱柱条件下测得的 $f_{k/s}$ 结果见表4。

表3 加样回收试验结果(n=6)
Tab 3 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %			
尿苷	10.502 5	2.174 0	2.032 0	4.161 0	97.79	98.63	0.9			
	10.279 1	2.127 8	2.032 0	4.119 8	98.03					
	10.820 1	2.239 8	2.032 0	4.257 8	99.31					
	10.124 9	2.095 9	2.032 0	4.124 9	99.85					
	10.412 3	2.155 3	2.032 0	4.142 0	97.77					
	10.731 2	2.221 4	2.032 0	4.233 4	99.02					
	10.502 5	1.071 3	1.050 8	2.097 1	97.62					
	10.279 1	1.048 5	1.050 8	2.074 3	97.62					
	10.820 1	1.103 7	1.050 8	2.105 5	95.34					
	10.124 9	1.032 7	1.050 8	2.058 6	97.62					
腺苷	10.412 3	1.062 1	1.050 8	2.073 9	96.29	97.19	1.2			
	10.731 2	1.094 6	1.050 8	2.131 4	98.67					
	10.502 5	7.750 8	7.549 3	14.995 1	95.96					
	10.279 1	7.586 0	7.549 3	15.150 3	100.20					
	10.820 1	7.985 2	7.549 3	15.536 5	100.03					
	10.124 9	7.472 2	7.549 3	15.001 5	99.74					
	10.412 3	7.684 3	7.549 3	15.163 6	99.07					
	10.731 2	7.919 6	7.549 3	15.456 9	99.84					
	10.502 5	4.432 1	4.348 9	8.755 0	99.40					
	10.279 1	4.337 8	4.348 9	8.586 7	97.70					
木犀草苷	10.820 1	4.566 1	4.348 9	8.745 0	96.09	99.14	1.6			
	10.124 9	4.272 7	4.348 9	8.486 6	96.90					
	10.412 3	4.394 0	4.348 9	8.622 9	97.24					
	10.731 2	4.528 6	4.348 9	8.712 5	96.21					
	10.502 5	5.807 9	5.517 0	11.334 9	100.18					
	10.279 1	5.684 3	5.517 0	11.141 3	98.91					
	10.820 1	5.983 5	5.517 0	11.505 5	100.09					
	10.124 9	5.599 1	5.517 0	11.117 1	100.02					
	10.412 3	5.758 0	5.517 0	11.102 0	96.86					
	10.731 2	5.934 4	5.517 0	11.315 4	97.53					
7-甲氧基香豆素	10.502 5	4.180 0	4.201 1	8.231 1	96.43	98.93	1.5			
	10.279 1	4.091 1	4.201 1	8.092 2	95.24					
	10.820 1	4.306 4	4.201 1	8.387 5	97.14					
	10.124 9	4.029 7	4.201 1	8.120 8	97.38					
	10.412 3	4.144 1	4.201 1	8.169 2	95.81					
	10.731 2	4.271 0	4.201 1	8.332 1	96.67					
	芹菜素	10.502 5	4.180 0	4.201 1	8.231 1			96.43	96.45	0.8
		10.279 1	4.091 1	4.201 1	8.092 2			95.24		
		10.820 1	4.306 4	4.201 1	8.387 5			97.14		
		10.124 9	4.029 7	4.201 1	8.120 8			97.38		
10.412 3		4.144 1	4.201 1	8.169 2	95.81					
10.731 2		4.271 0	4.201 1	8.332 1	96.67					

2.10.3 待测组分色谱峰的定位 在无对照品的条件下,准确定位每个色谱峰是QAMS法成功应用的关键,文献[12]大都采用相对保留时间(r_{1S})进行峰定位,

表6 QAMS法与ESM法测定6种成分的含量结果(n=3, mg/g)

Tab 6 Results of content determination of 6 components determined by QAMS and ESM(n=3, mg/g)

批号	木犀草苷	尿苷			腺苷			金丝桃苷			7-甲氧基香豆素			芹菜素		
		ESM	QAMS	d, %	ESM	QAMS	d, %	ESM	QAMS	d, %	ESM	QAMS	d, %	ESM	QAMS	d, %
170001	0.738	0.207	0.209	0.48	0.102	0.105	1.45	0.422	0.428	0.71	0.553	0.546	0.64	0.398	0.401	0.38
170002	0.691	0.223	0.231	1.76	0.118	0.120	0.84	0.431	0.445	1.60	0.561	0.572	0.97	0.421	0.414	0.84
170003	0.702	0.211	0.209	0.48	0.107	0.111	1.83	0.412	0.423	1.32	0.582	0.578	0.34	0.406	0.409	0.37

3 讨论

3.1 质量控制指标的选择

大青叶在抗菌、抗炎、抗病毒方面报道较多,在抗肿瘤方面关注较少,本试验重点研究其抗肿瘤作用的活性成分。尿苷是合成很多抗肿瘤核苷类成分的前体^[15];腺苷在调节肿瘤细胞的生长和凋亡中起着关键作用^[15-16];木犀草苷对食管鳞状癌 Eca109 细胞的生长有显著抑制

表4 不同色谱仪和不同色谱柱条件下测得的 $f_{k/s}$ (n=6)
Tab 4 $f_{k/s}$ with different instruments and chromatographic columns(n=6)

HPLC仪	色谱柱	$f_{尿苷/木犀草苷}$	$f_{腺苷/木犀草苷}$	$f_{金丝桃苷/木犀草苷}$	$f_{7-甲氧基香豆素/木犀草苷}$	$f_{芹菜素/木犀草苷}$
Agilent 1260 Infinity II	Waters XTERRA® MS C ₁₈	0.198	0.409	0.733	0.819	0.583
	Inerstil ODS-3	0.189	0.405	0.738	0.823	0.576
	ZORBAX Eclipse XDB-C ₁₈	0.200	0.419	0.742	0.841	0.602
Waters alliance e2695	Waters XTERRA® MS C ₁₈	0.193	0.406	0.736	0.824	0.572
	Inerstil ODS-3	0.201	0.420	0.729	0.825	0.595
	ZORBAX Eclipse XDB-C ₁₈	0.197	0.421	0.715	0.816	0.591
平均值		0.197	0.413	0.732	0.825	0.587
RSD, %		2.32	1.80	1.30	1.05	1.97

$r_{1S} = t_{R(1)}/t_{R(S)}$ ^[13-14](t_R 为保留时间, I 为待测成分, S 为内标物)。本试验以木犀草苷为内标物,采用相对保留时间结合化合物的紫外光谱特征来定位,计算2个不同厂家的HPLC仪和3个不同品牌的色谱柱的相对保留时间,结果RSD<2.7%(n=6),表明该方法重现性好。不同色谱条件下的相对保留时间结果见表5。

表5 不同色谱仪和不同色谱柱条件下的相对保留时间(n=6)

Tab 5 r_{1S} with different instruments and chromatographic columns(n=6)

HPLC仪	色谱柱	$r_{尿苷/木犀草苷}$	$r_{腺苷/木犀草苷}$	$r_{金丝桃苷/木犀草苷}$	$r_{7-甲氧基香豆素/木犀草苷}$	$r_{芹菜素/木犀草苷}$
Agilent 1260 Infinity II	Waters XTERRA® MS C ₁₈	0.106	0.205	1.028	1.081	1.507
	Inerstil ODS-3	0.110	0.216	1.035	1.096	1.503
	ZORBAX Eclipse XDB-C ₁₈	0.103	0.204	1.022	1.076	1.514
Waters alliance e2695	Waters XTERRA® MS C ₁₈	0.104	0.202	1.023	1.079	1.518
	Inerstil ODS-3	0.105	0.203	1.021	1.078	1.526
	ZORBAX Eclipse XDB-C ₁₈	0.106	0.211	1.032	1.088	1.517
平均值		0.106	0.207	1.027	1.083	1.514
RSD, %		2.29	2.66	0.56	0.70	0.54

2.10.4 QAMS法与ESM法测定结果比较 取3批大青叶药材,按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法制备样品,分别进样10 μL测定,采用QAMS法与ESM法计算各成分含量,结果相对偏差(d)均<2.0%;同时,通过 t 检验对两种方法所测含量结果进行比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。QAMS法与ESM法测定6种成分的含量结果见表6。

作用^[17];金丝桃苷能通过阻断细胞周期、诱导细胞凋亡抗胃癌^[18];香豆素抗肿瘤活性具有高效低毒的特点,在香豆素7位连接适当长度的基团能显著增强抗肿瘤活性^[19];芹菜素对肺癌细胞的抗增殖作用和抗肿瘤药物的增敏作用良好^[20]。大青叶药材中含有以上6种成分,且都对肿瘤细胞有一定的抑制作用,因此选取上述6种成分作为大青叶质量控制的指标。

3.2 流动相的选择

笔者也曾比较了甲醇-水、乙腈-水两种流动相,发现甲醇-水作为流动相洗脱效果明显优于乙腈-水。在甲醇-水的基础上进一步考察了含0.1%甲酸的甲醇、0.1%醋酸的甲醇、0.1%醋酸铵的甲醇、0.1%磷酸的甲醇,发现含0.1%甲酸的甲醇作为流动相洗脱效果最佳,各峰分离度均>1.5,故本试验最终选取甲醇-0.1%甲酸水溶液作为流动相。

3.3 检测器的选择

笔者在190~400 nm波长范围内对6种成分进行紫外扫描,发现各成分均有紫外吸收。但由于各成分的最大吸收波长不同,为便于在试验过程中观察各成分峰在不同波长处的响应值及分离度情况,本试验最终选择二极管阵列检测器进行试验。

3.4 检测波长的选择

本试验采用二极管阵列检测器,在190~400 nm波长范围内对混合对照品溶液中的待测成分进行了全波长扫描,获得尿苷、腺苷、木犀草苷、金丝桃苷、7-甲氧基香豆素、芹菜素的吸收波长分别为261、258、254、255、323、337 nm,6种成分中有4种成分的最大吸收波长集中在254 nm附近,2种成分的最大吸收波长在330 nm附近。若检测波长设定为330 nm,则对腺苷、尿苷和金丝桃苷色谱峰响应值的影响较大;若检测波长设定为254 nm,则对7-甲氧基香豆素和芹菜素色谱峰响应值的影响较小。以木犀草苷的最大吸收波长254 nm作为检测波长,能兼顾各成分色谱峰的峰高与分离度,故本试验最终选取木犀草苷的最大吸收波长254 nm作为检测波长。

3.5 内标的选择

笔者采用ESM法计算6种成分的含量时发现,木犀草苷的含量较其他5种成分高,可获得性强,以木犀草苷为内标,建立其与尿苷、腺苷、金丝桃苷、7-甲氧基香豆素和芹菜素的RCF。在不同色谱仪和不同色谱柱中RSD均小于2.4%,相对保留时间RSD小于2.5%。采用QAMS法与ESM法同时检测3批大青叶药材中6种活性成分的含量,相对偏差小于2.0%。故本试验选择木犀草苷作为内标进行QAMS分析。

综上所述,本文建立的含量测定方法操作简单快捷、结果准确可靠,可用于大青叶中尿苷、腺苷、木犀草苷、金丝桃苷、7-甲氧基香豆素和芹菜素6种抗肿瘤活性成分含量的同时测定。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:21-22.
[2] 李雪虎,梁剑平,陆锡宏.大青叶的化学成分的研究[J].时

珍国医国药,2011,22(9):2144-2145.

[3] 姬志强,李永丽,张永飞,等.大青叶药材化学成分研究[J].中国药师,2013,16(10):1467-1469.
[4] 李宝国,李峰.大青叶中18种无机元素的含量测定[J].中国现代药物应用,2009,3(18):1-2.
[5] 吴启南,王立新,蒋小文,等.大青叶中有机酸药理作用研究[J].南京中医药大学学报,2008,24(3):187-189.
[6] 简晓顺,尹一子,陈健清,等.大青叶乙醇提取液含药血清体外抗肿瘤活性研究[J].中药材,2013,36(4):633-635.
[7] 张海涛,刘祺凤,田璐阳,等.超声波辅助提取大青叶中总黄酮及其抗氧化性研究[J].湖北农业科学,2014,53(9):2124-2126.
[8] 高博,张建明,王宇平,等.大青叶水溶性提取物对登革病毒抑制作用及机制探讨[J].海峡药学,2013,25(7):205-207.
[9] 何兵,刘艳,杨世艳,等. HPLC一测多评法同时测定双青咽喉片中10种成分[J].中草药,2013,44(8):974-981.
[10] 何兵,刘艳,李春红,等.多指标定量指纹图谱在中药金银花质量评价中的应用[J].中国药学杂志,2015,50(14):1237-1242.
[11] 梁文仪,袁永兵,陈文静,等.一测多评技术在3种丹参制剂质量控制中的可行性分析[J].中草药,2016,47(23):4179-4185.
[12] 常志惠,胡军华,万亚菲,等.一测多评法同时测定保肾乙丸中5种蒽醌类成分的含量[J].中国药房,2016,27(36):5156-5159.
[13] 刘慧妍,沈国滨.一测多评法同时测定野菊花中7种成分[J].中草药,2017,48(10):2012-2017.
[14] 王智民,钱忠直,张启伟,等.一测多评法建立的技术指南[J].中国中药杂志,2011,36(6):657-658.
[15] 刘洋,李明花,邢向红.核苷类抗肿瘤药物研究进展[J].中国新药杂志,2012,21(21):2493-2498.
[16] 田亭,罗和生,周宇,等.腺苷受体在消化系统肿瘤中作用的研究现状[J].胃肠病学和肝病学杂志,2016,25(10):1198-1201.
[17] 王婷婷,王少康,黄桂玲,等.木犀草苷对人食管鳞状癌Eca109细胞生长的抑制作用及其机制[J].中草药,2013,44(12):1604-1609.
[18] 孙时华,姜荣华,祝海燕,等.金丝桃苷体外抗胃癌作用及其机制研究[J].中国临床药理学与治疗学,2014,19(9):979-983.
[19] 李林虎,陈莉,夏玉凤.抗肿瘤香豆素类化合物的研究进展[J].中国药科大学学报,2013,44(4):374-379.
[20] 黄好武,黄欢文,姜一平,等.芹菜素对肺癌细胞的抗增殖作用和抗肿瘤药物的增敏作用[J].中国药业,2017,26(12):20-22.

(收稿日期:2018-06-28 修回日期:2018-08-21)

(编辑:余庆华)