

RP-HPLC法测定不同产地荔枝草药材中高车前苷和高车前素的含量

孙海^{1*},李红磊¹,郑蕊²,傅中先¹(1.总后勤部司令部管理保障局第一门诊部,北京 100842;2.中国中医科学院附属北京西苑医院药剂科,北京 100091)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)11-1031-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.11.26

摘要 目的:建立测定不同产地荔枝草药材中高车前苷和高车前素含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Discovery C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸水(27:73, V/V, pH 2.4),流速为1.0 ml/min,检测波长为335 nm。结果:高车前苷和高车前素的质量浓度分别在20.44~204.40和5.04~50.40 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系(r 分别为0.999 7, 0.999 1);平均加样回收率分别为98.8%和98.9%,RSD分别为2.62%和2.20%(n 均为9)。以山东所产荔枝草质量为佳。结论:本方法简单、准确、精密度高、重复性好,可用于荔枝草药材的质量控制。

关键词 荔枝草;高车前苷;高车前素;反相高效液相色谱法;含量测定

Content Determination of Homoplantagin and Hispidulin in *Salvia plebeia* from Different Habitats by RP-HPLC

SUN Hai¹, LI Hong-lei¹, ZHENG Rui², FU Zhong-xian¹(1.First Clinic Department, Security Management Bureau of GLD, Beijing 100842, China; 2.Dept. of Pharmacy, Xiyuan Hospital Affiliated to China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of homoplantagin and hispidulin in *Salvia plebeia* from different habitats. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The separation was performed on Discovery C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (27:73, V/V, pH 2.40) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 335 nm. RESULTS: The linear ranges of homoplantagin and hispidulin were 20.44-204.40 μg/ml($r=0.999\ 7$) and 5.04-50.40 μg/ml($r=0.999\ 1$) respectively. The mean recoveries were 98.8% (RSD=2.62%, $n=9$) and 98.9% (RSD=2.20%, $n=9$). The optimal *S. plebeia* came from Shandong province. CONCLUSION: The method is simple, accurate, precise and reproducible for the quality control for *S. plebeia*.

KEY WORDS *Salvia plebeia*; Homoplantagin; Hispidulin; RP-HPLC; Content determination

荔枝草,又名雪见草、蛤蟆草、过冬青等,为唇形科鼠尾草属植物荔枝草 *Salvia plebeia* R. Br. 的全草。其性凉,味辛,具有清热解毒、凉血散瘀、利水消肿之功效。现代药理学研究表明,荔枝草有平喘、抑菌以及抗氧化等作用^[1],其主要含有二萜类、三萜类和黄酮类等活性成分。目前,有关荔枝草含量测定的方法有薄层扫描法^[2],但该法是一种离线分析技术,测定过程复杂、准确性差;曾有报道利用高效液相色谱(HPLC)法对荔枝草颗粒剂^[3]和荔大前合剂中高车前苷含量进行分析^[4]。本试验建立了以RP-HPLC法测定荔枝草中高车前苷和高车前素含量的方法,并在此基础上对不同产地荔枝草中2种成分的含量进行了测定。试验结果表明,本方法简单、准确、精密度高、重复性好,可用于荔枝草药材的质量控制。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A HPLC仪、SPD-20AC检测器(日本Shimadzu公司)。

1.2 试剂

乙腈(色谱纯,山东禹王实业有限公司);水为超纯水;高车前苷和高车前素对照品由上海医药工业研究院提供,经核磁共振光谱(NMR)确证,HPLC归一化确定纯度>98%。

*药师。研究方向:药物分析与制剂。电话:010-66887392。
E-mail:allan840128@hotmail.com

1.3 药材

荔枝草购自北京仟草中药饮片有限公司,由总后勤部司令部管理保障局第一门诊部傅中先副主任药师鉴定为唇形科鼠尾草属植物荔枝草 *S. plebeia* R. Br. 的全草。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取2种对照品各适量,置50 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,制成高车前苷质量浓度为1.0220 mg/ml和高车前素质量浓度为0.252 0 mg/ml的单一成分对照品贮备液。精密吸取2种贮备液各3.0 ml,置于同一10 ml量瓶中,用甲醇定容,摇匀,制成高车前苷质量浓度为306.60 μg/ml和高车前素质量浓度为75.60 μg/ml的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取药材粉末(过60目筛)1.0 g,置100 ml三角瓶中,加入50%乙醇50 ml,精密称定,回流提取3 h,冷却至室温,再次称定,用50%乙醇补足失质量,摇匀,经0.45 μm滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Discovery C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸水(27:73, V/V, pH 2.4);检测波长:335 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:35 ℃;进样量:10 μl。取供试品溶液在此色

谱条件下进样分析,理论板数按高车前素峰计算应不低于5 000;分离度>1.5;拖尾因子在0.95~1.05之间。色谱见图1。

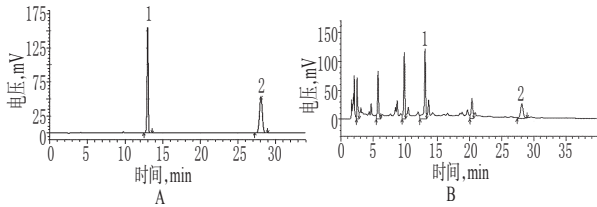


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;1.高车前苷;2.高车前素

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed control;B.test sample;1.homoplantagenin;2.hispidulin

2.4 标准曲线的制备

分别取高车前苷和高车前素的对照品贮备液0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml,置于25 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制得系列对照品溶液。取上述溶液各10 μl进样,按上述色谱条件进行分析。以对照品质量浓度(x)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得高车前苷和高车前素的回归方程分别为 $y=635\ 463x-24\ 613(r=0.999\ 7, n=6)$ 、 $y=476\ 657x-322\ 770(r=0.999\ 1, n=6)$ 。结果表明,高车前苷和高车前素的质量浓度分别在20.44~204.40、5.04~50.40 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

精密量取混合对照品溶液适量,在上述色谱条件下连续进样6次,测定峰面积。结果,高车前苷和高车前素峰面积的RSD分别为0.11%和0.15%(n均为6),表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

精密称取同一批样品6份,每份1.0 g,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样分析。结果,高车前苷和高车前素平均含量的RSD分别为1.69%和1.78%(n均为6),表明本方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液适量,室温下放置,分别于0、2、4、6、8、10、12、24 h进样测定,记录峰面积。结果,高车前苷和高车前素平均含量的RSD分别为0.15%和0.16%(n均为8),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的荔枝草药材9份,每份约为0.5 g,精密称定,每3份为一组,按高、中、低质量浓度分别精密加入高车前苷和高车前素的对照品溶液,照“2.2”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样分析,计算加样回收率,结果见表1。

2.9 样品含量测定

精密称取不同产地的干燥荔枝草药材粉末各1.0 g,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样分析,测定峰面积,计算样品中高车前苷和高车前素的含量,结果见表2。

3 讨论

3.1 流动相的选择

在流动相筛选过程中,曾尝试甲醇-水、甲醇-磷酸水、乙腈-水、乙腈-磷酸水系统。结果显示,甲醇系统分离效果较差;而乙腈-水、乙腈-磷酸水系统都有较好的分离度,相比之下乙腈-0.1%磷酸水的基线更稳定、峰形更好,因此选用乙腈-0.1%磷酸水(27:73, V/V)为本试验流动相。

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery test(n=9)

成分	称样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%		
高车前苷	0.50	2.480	1.265	3.674	94.4	98.8	2.62		
	0.50	2.503	2.530	4.973	97.6				
	0.51	2.499	3.785	6.422	103.7				
	0.52	2.536	1.265	3.805	100.3				
	0.52	2.531	2.530	5.000	97.6				
	0.50	2.506	3.785	6.277	99.3				
	0.50	2.498	1.265	3.725	97.0				
	0.49	2.406	2.530	4.936	100.0				
	0.51	2.530	3.785	6.296	99.5				
	0.51	0.805	0.800	1.583	97.2			98.9	2.20
0.51	0.810	1.200	1.994	98.7					
0.50	0.798	0.400	1.200	100.6					
0.51	0.802	0.800	1.604	100.2					
0.49	0.797	1.200	2.037	103.3					
0.52	0.800	0.400	1.190	97.6					
0.50	0.805	0.800	1.571	95.8					
0.51	0.811	1.200	1.983	97.7					
高车前素	0.50	0.802	0.400	1.197	98.8				
	0.51	0.805	0.800	1.583	97.2				
	0.51	0.810	1.200	1.994	98.7				
	0.50	0.798	0.400	1.200	100.6				
	0.51	0.802	0.800	1.604	100.2				
	0.49	0.797	1.200	2.037	103.3				
	0.52	0.800	0.400	1.190	97.6				

表2 不同产地荔枝草中高车前苷和高车前素的含量(mg/g)
Tab 2 Contents of homoplantagenin and hispidulin in *S. ple-beian* from different habitats(mg/g)

编号	产地	批号	高车前苷	高车前素
1	山东	200902	5.060	1.600
2	江苏	200903	3.724	1.011
3	湖北	200901	4.524	1.482
4	浙江	200902	5.595	1.028
5	浙江	200903	4.657	0.882
6	安徽	200901	5.156	0.953
7	安徽	200902	4.689	1.394

3.2 检测波长的选择

采用二极管阵列检测器对荔枝草化学成分的紫外吸收波长进行考察,并选择210、250、300、335、380 nm 5个波长进行比较。结果表明,335 nm波长处的高车前苷色谱峰强度大、特征性强,而高车前素在此波长下亦能很好的检出,故最终选择335 nm为检测波长。

3.3 结果分析

上述测定结果表明,以高车前苷为指标计算荔枝草含量由高到低的顺序为:4号、6号、1号、7号、5号、3号、2号;以高车前素为指标计算荔枝草含量由高到低的顺序为:1号、3号、7号、4号、2号、6号、5号。综合考虑,以山东产荔枝草(1号)质佳。不同产地荔枝草中高车前苷和高车前素含量差异较大,可能是产地气候、土壤、采集时间、贮藏时间长短不同造成的,因此需要建立统一的药材质量标准。

参考文献

- [1] 赵丽,娄红祥,钟蒙,等.荔枝草的化学成分及制剂质量标准的研究[J].山东医科大学学报,1996,34(3):258.
- [2] 吴正红,裴云萍.高效液相色谱法测定复方荔枝草颗粒剂中高车前苷含量[J].药物分析杂志,2000,20(6):388.
- [3] 吴正红,裴云萍,方云,等.高效液相色谱法测定荔大前合剂中高车前苷含量[J].中药新药与临床药理,2001,12(6):435.

(收稿日期:2012-03-12 修回日期:2012-04-27)