

# HPLC法测定黄腺香青中银椴苷的含量

卢金清\*,唐瑶兴,杨珊,李婷,郭或,何冬黎(湖北中医药大学/湖北省药用植物研发中心,武汉 430065)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)39-3707-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.39.20

**摘要** 目的:建立测定黄腺香青中银椴苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.04%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为0.8 ml/min,柱温为30 ℃,检测波长为254 nm。结果:银椴苷的进样量在1.60~5.60 μg范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系( $r=0.999\ 9$ );精密性、重复性、稳定性试验的RSD<3%;平均加样回收率为98.84%,RSD=1.70%( $n=9$ )。结论:该方法操作简便、准确度高、重复性好,可作为黄腺香青中银椴苷的含量测定方法。

**关键词** 黄腺香青;银椴苷;高效液相色谱法;含量测定

## Content Determination of Tiliroside in *Anaphalis aureopunctata* by HPLC

LU Jin-qing, TANG Yao-xing, YANG Shan, LI Ting, GUO Yu, HE Dong-li (Hubei University of TCM/Research and Development Center of Medicinal Plants in Hubei Province, Wuhan 430065, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To develop a method for the content determination of tiliroside in *Anaphalis aureopunctata*. METHODS: HPLC method was used. The determination was performed on Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.04% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 0.8 ml/min. The detection wavelength was set at 254 nm and the column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear range of tiliroside was 1.60-5.60 μg ( $r=0.999\ 9$ ) with an average recovery of 98.84% (RSD=1.70%,  $n=9$ ). The RSDs of precision, reproducibility and stability tests were all lower than 3%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the content determination of tiliroside in *A. aureopunctata*.

**KEY WORDS** *Anaphalis aureopunctata*; Tiliroside; HPLC; Content determination

黄腺香青为菊科香青属植物黄腺香青 *Anaphalis aureopunctata* Lingelsh et Borza 的全草,为鄂西北土家族的民间常用药,在神农架地区和土家族中享有盛誉<sup>[1]</sup>。全草味甘,性凉,具有清热解毒、利湿消肿的功效,用于治疗口腔溃疡、小儿惊风、疮毒、泄泻、水肿、毒蛇咬伤、感冒、咳嗽痰喘、外伤出血等症。目前,国内、外对黄腺香青的研究报道较少,本课题组前期已对其挥发性化学成分进行过分析<sup>[2]</sup>;本试验中,笔者采用高效液相色谱(HPLC)法对黄腺香青中的黄酮类化合物银椴苷进行含量测定,以期对该植物的开发与应用提供更为全面的试验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

ULTIMATE 3000型HPLC仪(美国DIONEX公司);BSI型电子分析天平( $d=0.01\text{mg}$ ,北京赛多利斯天平有限公司);UP520H型超声波清洗机(熊猫集团南京电子计量有限公司)。

### 1.2 药材

黄腺香青(批号:091025、100920、110715、100628、090713)采自湖北神农架红坪镇,经中国科学院武汉植物园赵子恩教授鉴定为菊科香青属植物黄腺香青 *A. aureopunctata* Lingelsh et Borza 的全草,标本存放于湖北省药用植物研发中心。

\*教授,硕士研究生导师。研究方向:中药及其制剂的物质基础。E-mail:ljq59169@sohu.com

## 1.3 试剂

银椴苷对照品(上海阳光试剂有限公司,批号:A0018,纯度>98%);磷酸(分析纯,上海振兴化工一厂);甲醇、乙腈(色谱纯,美国天地公司);水为三蒸水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.04%磷酸水溶液-乙腈,梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:0.8 ml/min;柱温:30 ℃;检测波长:254 nm;进样量:10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution process

时间,min	0.04%磷酸水溶液,%	乙腈,%
0~5	90→85	10→15
>5~15	85→80	15→20
>15~20	80→78	20→22
>20~25	78→77	22→23
>25~30	77→76	23→24
>30~35	76→74	24→26
>35~40	74→70	26→30
>40~55	70→55	30→45

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取银椴苷对照品适量,加甲醇制成每1 ml含银椴苷0.4 mg的溶液,作为对照品溶液,即得。

### 2.3 供试品溶液的制备

称取黄腺香青粗粉 1.00 g,精密称定,精密加入 80% 甲醇 50 ml,密塞,称定质量,加热回流 1 h,放冷,再称定质量,用 80% 甲醇补足减少的质量,摇匀,滤过,即得。

## 2.4 系统适用性试验

取供试品溶液、对照品溶液及空白对照溶液,按上述色谱条件各进样 10  $\mu$ l,记录色谱图(图 1)。结果表明,银椴苷与相邻色谱峰的分离度为 2.1,基线分离良好;理论板数按银椴苷峰计算应不低于 5 000。

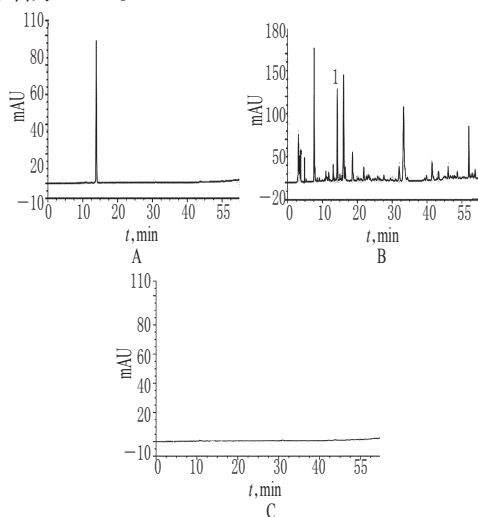


图 1 高效液相色谱图

A. 银椴苷对照品; B. 供试品; C. 空白对照; 1. 银椴苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. tiliroside control; B. test samples; C. blank control; 1. tiliroside

## 2.5 线性关系考察

分别精密量取银椴苷对照品溶液 4、6、8、10、12、14  $\mu$ l,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,记录峰面积。以银椴苷进样量(x)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为  $y=4.7516x-1.0855$  ( $r=0.9999, n=6$ )。结果表明,银椴苷进样量在 1.60~5.60  $\mu$ g 范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系。

## 2.6 精密度试验

精密吸取银椴苷对照品溶液 10  $\mu$ l,连续进样 5 次,按上述色谱条件测定,记录峰面积。结果显示,  $RSD=0.57%$  ( $n=5$ ),表明仪器精密度良好。

## 2.7 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液 10  $\mu$ l,分别于 0、3、6、9、12、24 h 注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,记录峰面积。结果显示,  $RSD=0.74%$  ( $n=6$ ),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

## 2.8 重复性试验

取同一批黄腺香青药材粗粉 6 份,每份 1.00 g,精密称定,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件分别进样 10  $\mu$ l,记录峰面积,以峰面积计算 6 份供试品溶液中银椴苷的含量。结果显示,银椴苷的平均质量分数为 1.77%,  $RSD=2.75%$  ( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

## 2.9 加样回收率试验

称取同一批已知含量的黄腺香青粗粉约 0.50 g,精密称定 9 份,分别置于 50 ml 量瓶中,分别加入适量银椴苷对照品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样 10  $\mu$ l,记录峰面积,测定银椴苷的含量并计算加样回收率,结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果 ( $n=9$ )

Tab 2 Results of recovery tests ( $n=9$ )

取样量,mg	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$ ,%	RSD,%
499.81	9.05	4.50	13.38	96.22		
500.03	9.05	4.50	13.49	98.67		
500.28	9.06	4.50	13.57	100.22		
499.94	9.05	9.00	17.85	97.78		
500.17	9.05	9.00	18.16	101.22	98.84	1.70
499.62	9.04	9.00	17.76	96.89		
500.33	9.06	13.50	22.38	98.67		
500.12	9.05	13.50	22.63	100.59		
499.76	9.05	13.50	22.45	99.26		

## 2.10 样品含量测定

取 5 批黄腺香青粗粉各适量,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,以峰面积计算样品中银椴苷的含量,每批样品测定 3 份,结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果 ( $n=3$ )

Tab 3 Results of content determination of samples ( $n=3$ )

批号	取样量,g	银椴苷质量分数,%	平均质量分数,%
110715	2.000 6	1.81	
	2.001 2	1.79	
	2.000 8	1.80	
100628	2.001 3	1.80	
	2.004 1	1.95	
	2.000 3	1.89	
100920	1.996 9	1.87	
	1.998 7	1.85	1.79
	2.001 3	1.72	
090713	2.001 9	1.72	
	2.002 5	1.57	
	1.999 1	1.63	
091025	1.998 6	1.79	
	1.997 9	1.78	
	2.003 6	1.81	

## 3 讨论

### 3.1 检测波长的选择

笔者曾对黄腺香青样品药材和银椴苷对照品在 200~400 nm 波长范围内进行紫外扫描,发现样品和对照品中银椴苷均在 254 nm 波长处有最大吸收,且该波长处基线平稳、不易漂移,各色谱峰峰形和分离度好,故选择 254 nm 为检测波长。

### 3.2 流动相的选择

笔者曾对甲醇-水、乙腈-水、0.04% 磷酸水溶液-甲醇、0.2% 醋酸水溶液-乙腈、0.05% 磷酸水溶液-甲醇、0.04% 磷酸水溶液-乙腈等流动相进行考察,发现只有以 0.04% 磷酸水溶液-乙腈作为流动相梯度洗脱时,银椴苷色谱峰峰形对称、分离效果好、基线平稳,故选择其为流动相。

综上,本方法操作简便、准确度和回收率高、重复性和稳定性好,可作为黄腺香青中银椴苷的含量测定方法。

## 参考文献

- [1] 傅书遐.湖北植物志:第四卷[M].武汉:湖北科学技术出版社,1979:69.
- [2] 卢金清,何冬黎,许家琦,等.黄腺香青挥发油化学成分 GC-MS 分析[J].中药材,2011,34(3):392.

(收稿日期:2012-09-14 修回日期:2013-03-18)