

HPLC法同时测定早莲草中木犀草素和芹菜素的含量[△]

邓斌*, 韦炳华, 黄盛超, 张志豪, 唐蕾[#](中山大学附属第一医院药学部, 广州 510080)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)39-3685-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.39.13

摘要 目的:建立同时测定早莲草提取物中木犀草素和芹菜素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Nucleodur 100-5 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液(50:50, V/V),流速为1 ml/min,检测波长为350 nm,柱温为40 ℃。结果:木犀草素和芹菜素的质量浓度均在0.02~50.00 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(*r*分别为0.999 5和0.999 3);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;平均加样回收率分别为97.2%和98.9%,RSD分别为2.41%和2.91%(*n*均为6)。结论:该方法快速、简便,结果准确,可用于不同产地早莲草药材的质量评价。

关键词 早莲草;木犀草素;芹菜素;高效液相色谱法;含量测定

Simultaneous Determination of Luteolin and Apigenin in *Eclipta prostrata* by HPLC

DENG Bin, WEI Bing-hua, HUANG Sheng-chao, ZHANG Zhi-hao, TANG Lei (Dept. of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of luteolin and apigenin in *Eclipta prostrata* extract. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was carried out on Neocleodur 100-5 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-0.2% phosphoric acid (50:50, V/V) at the flow rate of 1 ml/min. The detection wavelength was set at 350 nm and the column temperature was maintained at 40 ℃. RESULTS: The linear range were 0.25-50.00 μg/ml for luteolin (*r*=0.999 5) and 0.25-50.00 μg/ml for apigenin (*r*=0.999 3); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%. Average recovery rates were 97.2% (RSD=2.41%, *n*=6) and 98.9% (RSD=2.91%, *n*=6), respectively. CONCLUSIONS: The method is rapid, simple and accurate, and can be used for the quality evaluation of *E. prostrata*.

KEYWORDS *Eclipta prostrata*; Luteolin; Apigenin; HPLC; Content determination

早莲草(*Herba ecliptae*)为菊科一年生草本植物鳢肠*Eclipta prostrata* L.的干燥地上部分,又名墨旱莲、鳢肠草、金陵草等,具有滋肝补血、凉血止血之功效。早莲草是中山大学附属第一医院用于治疗慢性肾炎的医院制剂——丹墨胶囊的主要药材,也是中成药二至丸、乌发养颜活血散的主要成分,临床应用较为广泛。早莲草的化学成分主要有三萜皂苷、噻吩类、香豆草醚类、黄酮类化合物等^[1]。近年来,以木犀草素和芹菜素为代表的天然黄酮类的药效作用也受到广泛的关注^[2-3];有研究表明,早莲草中的黄酮类成分具有免疫调节作用和抗氧化功能^[4-5]。为了更准确地反映早莲草提取物中黄酮类化学成分的质量,笔者采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定早莲草提取物中木犀草素和芹菜素的含量,旨在为更好地开发、利用早莲草药材资源提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

Waters 600E型HPLC仪,包括600型低压梯度泵、717型自动进样器、486型紫外检测器和Empower色谱工作站(美国Waters公司);TC-15型套式恒温器(海宁市新华医疗器械厂);RE-2000A型旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限责任公司);

GM-0.33 II型隔膜真空泵(天津市津腾实验设备有限公司);AG-245型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

1.2 试剂

木犀草素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111520-200504);芹菜素对照品(美国Sigma公司,质量分数≈95%,批号:037K1450);95%乙醇(广东省广宁县顺宁葡萄糖药业有限公司,批号:20100101,每1 000 ml 95%乙醇加入391 ml蒸馏水即得70%乙醇);乙腈、甲醇均为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

早莲草药材(批号:20080520、20090610、20091201)由广东省药材公司中药饮片厂提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Nucleodur 100-5 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.2%磷酸水溶液(50:50, V/V);流速:1 ml/min;检测波长:350 nm;柱温:40 ℃;进样量:30 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取木犀草素对照品适量,置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,即得质量浓度为1.5 mg/ml的木犀草素对照品贮备液。精密称取芹菜素对照品适量,置于10 ml量瓶中,加入适量二甲基亚砜(DMSO)溶解,再用甲醇稀释至刻度,即得质量浓度为1.0 mg/ml的芹菜素对照品贮备液。分别精密吸取两种对照品贮备液各适量,置于10 ml量瓶

[△]基金项目:建设中医药强省资助科研项目(No.20131145)

* 主管药师,硕士。研究方向:药理学。电话:020-87334586。

E-mail: dengbin@sohu.com

[#] 通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:临床药理学。电话:

020-87334586。E-mail: pharma_TL@163.com

中,用甲醇依次稀释,制成质量浓度分别为0.02、0.05、0.10、0.50、1.00、5.00、10.00、50.00 $\mu\text{g/ml}$ 的混合对照品溶液,于冰箱中 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。

2.2.2 供试品溶液 精密称取早莲草药材10 g,加300 ml 70%乙醇浸泡过夜,80 $^{\circ}\text{C}$ 回流提取2 h,药渣再加150 ml 70%乙醇提取1 h,合并药液,抽滤,于80 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至45 ml,用石油醚1:1(V/V)萃取3次,去除叶绿素等杂质,再于80 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至3 ml,即得每1 ml含原药材3.33 g的提取液。精密量取提取液0.25 ml,加80%甲醇稀释至25 ml,取2.5 ml稀释液加入5 μl 浓盐酸,置70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中水解2 h,经0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 系统适用性试验

分别取上述对照品溶液和供试品溶液各适量,按上述色谱条件进样测定。结果,木犀草素和芹菜素的保留时间分别为15.2、23.8 min,各组分分离良好,且其他成分无干扰。理论板数以木犀草素峰计算为4 900;分离度 >1.5 。色谱见图1。

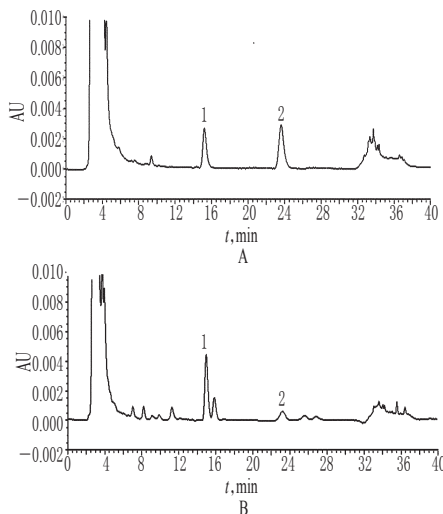


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;1.木犀草素;2.芹菜素

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed control; B.test samples; 1.luteolin; 2.apigenin

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下的系列混合对照品溶液适量,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度($x, \mu\text{g/ml}$)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标进行线性回归,得木犀草素的回归方程分别为 $y=99\ 176\ 644.4x-11\ 091$ ($r=0.999\ 5$)和芹菜素 $y=85\ 009\ 388x-510.89$ ($r=0.999\ 3$)。结果表明,木犀草素和芹菜素的质量浓度在0.02~50.00 $\mu\text{g/ml}$ 范围内与其各自峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液适量,按上述色谱条件进样测定,重复6次,记录峰面积。结果,木犀草素和芹菜素的RSD分别为1.13%和1.47%(n 均为6),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液适量,分别于0、4、8、12、24 h按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,木犀草素和芹菜素的RSD分别为1.36%和1.72%(n 均为5),表明混合对照品溶液在24 h内基本稳定。

2.7 重复性试验

取同批次的早莲草样品适量,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量。结果,样品中木犀草素的平均含量为0.45 mg/g, RSD=1.42%($n=6$);芹菜素的平均含量为0.035 mg/g, RSD=1.88%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取在同一时间采集(采集时间:2009年6月10日)的已知含量的早莲草样品约5 g,共6份,分别精密加入木犀草素和芹菜素对照品贮备液1.5、0.175 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery test($n=6$)

成分	称样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	$\bar{x},\%$	RSD,%
木犀草素	5.002	2.251	2.250	4.413	96.1	97.2	2.41
	4.989	2.248	2.250	4.539	101.8		
	4.991	2.246	2.250	4.424	96.8		
	5.000	2.250	2.250	4.389	95.0		
	5.004	2.252	2.250	4.412	96.0		
	5.022	2.260	2.250	4.456	97.6		
芹菜素	5.002	0.175	0.175	0.352	101.4	98.9	2.91
	4.989	0.175	0.175	0.355	102.8		
	4.991	0.175	0.175	0.345	97.4		
	5.000	0.175	0.175	0.349	99.3		
	5.004	0.175	0.175	0.341	94.8		
	5.022	0.176	0.175	0.347	97.6		

2.9 样品含量测定

取不同批次的早莲草样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,每批平行测定3份,记录峰面积,计算木犀草素和芹菜素的含量。结果,3批样品(批号:20080520、20090610、20091201)中木犀草素的平均含量分别为0.39、0.41、0.45 mg/g($n=3$),芹菜素的平均含量分别为0.028、0.033、0.035 mg/g($n=3$)。

3 讨论

据文献^[6]报道,不同产地的早莲草中木犀草素的质量分数为0.08%~0.329%;云南产早莲草中木犀草素质量分数为0.079%,芹菜素质量分数为0.006 4%^[7]。本试验所测广东产早莲草中的木犀草素和芹菜素的含量均低于文献报道,这可能与药材产地、采收时间、提取方法不同及贮存条件有关。但是,本试验测得芹菜素的质量分数为木犀草素的7.8%,与文献^[7]中计算的8.1%较为接近。

研究表明,早莲草中分离出的化学成分主要有香豆草醌类、三萜皂苷类、甾体类、噻吩类、黄酮类及挥发油等。早莲草的免疫调节作用与其黄酮类成分有关。据报道,早莲草中的黄酮类成分主要有槲皮素、木犀草素、木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷(luteolin-7-*O*-glucoside)、芹菜素、芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷(apigenin-7-*O*-glucoside)及蒙花苷等^[8]。但是,笔者在预实验中测定了多批市售早莲草药材,发现其主要含木犀草素、木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷,以及少量芹菜素、芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷,而未检出槲皮素及蒙花苷。

黄酮类化合物少数以游离形式存在,大部分以碳糖或氧糖配基的形式与糖结合成苷类。Shimoi K等^[9]报道,给大鼠灌

HPLC法同时测定镇惊泻火颗粒中4种成分的含量^Δ

许丽雯*,奚之骏(上海中医药大学附属龙华医院,上海 200032)

中图分类号 R283.6;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)39-3687-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.39.14

摘要 目的:建立同时测定镇惊泻火颗粒中芒果苷、芦荟大黄素、大黄素和大黄酚含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Capcell Pak C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为254 nm,柱温为20 ℃。结果:芒果苷、芦荟大黄素、大黄素和大黄酚的质量浓度分别在10.180~101.800、2.016~20.160、1.072~10.720、1.024~10.240 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(r 分别为0.999 8、0.999 6、0.999 5、0.999 6);精密度、稳定性、重复性试验的RSD≤1.4%(n 均为6);平均加样回收率分别为98.05%、97.39%、97.91%和98.93%,RSD分别为1.3%、1.5%、1.2%和1.4%(n 均为6)。结论:该方法准确、稳定、重复性好,可用于镇惊泻火颗粒的质量控制。

关键词 芒果苷;芦荟大黄素;大黄素;大黄酚;镇惊泻火颗粒;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of 4 Components in Zhenjing Xiehuo Granules by HPLC

XU Li-wen, XI Zhi-jun (Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of mangiferin, aloe-emodin, emodin, chrysophanol in Zhenjing xiehuo granule. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Capcell Pak C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 254 nm. The column temperature was 20 ℃. RESULTS: The linear ranges were 10.180-101.800 μg/ml for mangiferin ($r=0.999\ 8$), 2.016-20.160 μg/ml for aloe-emodin ($r=0.999\ 6$), 1.072-10.720 μg/ml for emodin ($r=0.999\ 5$) and 1.024-10.240 μg/ml for chrysophanol ($r=0.999\ 6$), respectively. RSD of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1.4% ($n=6$). The average recoveries were 98.05% (RSD=1.3%, $n=6$), 97.39% (RSD=1.3%, $n=6$), 97.91% (RSD=1.4%, $n=6$) and 98.93% (RSD=1.5%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is accurate, reliable, reproducible and specific, and is suitable for quality control of Zhenjing xiehuo granules.

KEYWORDS Mangiferin; Aloe-emodin; Emodin; Chrysophanol; Zhenjing xiehuo granule; HPLC

镇惊泻火颗粒为上海中医药大学附属龙华医院研制开发的中药复方制剂,由甘草、淮小麦、大枣、知母、大黄等药味组成,临床用于治疗抑郁症、广泛性焦虑和精神障碍等多种精

神、情志疾病^[1-3]。为更全面地控制产品质量,本试验采用高效液相色谱(HPLC)法测定了方中芒果苷、芦荟大黄素、大黄素和大黄酚的含量。

胃木犀草素-7-*O*-β-葡糖苷后,在其血浆样品中检测不到木犀草素苷,而只检测到其苷元木犀草素。因此,为准确测量早莲草中木犀草素和芹菜素的质量分数,笔者考察了盐酸质量浓度、水解时间、温度对样品中所含黄酮苷元质量分数的影响。结果表明,未经水解处理,游离木犀草素和芹菜素很少,经水解后木犀草素和芹菜素的质量分数大大增加。最后经正交试验法确定水解条件为:在2.5 ml提取物稀释液中加入5 μl浓盐酸,于70 ℃水浴下水解2 h。

综上所述,本方法快速、简便,结果准确、可靠、简单、快速,可用于不同产地早莲草药材的质量评价。

参考文献

- [1] 营大礼. 墨旱莲化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国药房, 2008, 19(36): 2 876.
- [2] 张梅, 邸晓辉, 刘梅. 早莲草中黄酮类成分的免疫调节作

用[J]. 中草药, 1997, 28(10): 615.

- [3] 林朝朋, 芮汉明, 许晓春. 墨旱莲黄酮类提取物抗自由基作用及体内抗氧化功能的研究[J]. 军事医学科学院院刊, 2005, 29(4): 344..
- [4] 屈凌波, 王玲, 杨冉, 等. 木犀草素、芹菜素与牛血清白蛋白相互作用的研究[J]. 药学学报, 2006, 41(4): 352.
- [5] 孙斌, 瞿伟菁, 张晓玲. 芹菜素的药理作用研究进展[J]. 中药材, 2004, 27(7): 68.
- [6] 刘翔, 曹云飞, 窦金凤. 不同产地墨旱莲中木犀草素含量测定[J]. 药物鉴定, 2007, 16(23): 12.
- [7] 杨海英, 王雪梅, 杜刚, 等. 高效液相色谱法测定早莲草中木犀草素和芹菜素的含量[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 2 994.
- [8] 袁继承, 蒋永和, 沈志滨. 早莲草化学成分的研究进展[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(01): 125.
- [9] Shimoi K, Saka N, Nozawa R, et al. Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation[J]. *Drug Metab Dispos*, 2001, 29(12): 1 521.

(收稿日期:2014-03-20 修回日期:2014-08-10)

^Δ 基金项目:上海市卫生局中药新药及院内制剂研发项目(No.2010Y013A)

* 副主任药师。研究方向:医院药学。电话:021-64385700-7303。E-mail:lhyyxlw@163.com