

HPLC 同时测定北刘寄奴中毛蕊花糖苷、木犀草素和芹菜素

鱼江,曾邦国,肖隆祥

(乐山职业技术学院药学系,四川乐山 614000)

摘要:目的 建立北刘寄奴药材中毛蕊花糖苷、木犀草素和芹菜素的含量测定方法。方法 采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相乙腈与 0.1%磷酸(22:78);流速 1.0 mL/min;柱温 35 ℃;进样量 10 μL;检测波长 340 nm。结果 毛蕊花糖苷、木犀草素和芹菜素分别在 0.197 6~1.482 μg、0.100 8~0.756 μg 和 0.043 2~0.324 μg 范围内线性关系良好,回归方程分别为 $Y=7.171 \times 10^5 X+2.094 \times 10^3$, $r=0.999 8$, $Y=6.833 \times 10^5 X+1.306 \times 10^3$, $r=0.999 7$, $Y=7.210 \times 10^5 X+9.73 \times 10^2$, $r=0.999 7$, 平均加样回收率分别为 99.7%(RSD=2.0%)、99.5%(RSD=2.3%)、99.4%(RSD=2.2%)。结论 所建立的方法准确性高,重复性好,可作为北刘寄奴药材的质量控制方法。

关键词:北刘寄奴;毛蕊花糖苷;木犀草素;芹菜素

中图分类号:R282.71

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)23-3040-02

Determination of verbascoside, luteolin and apigenin in siphonostegia chinensis by HPLC

Yu Jiang, Zeng Bangguo, Xiao Longxiang

(Pharmacy Department of Leshan Vocational & Technical College, Leshan, Sichuan 614000, China)

Abstract: Objective To study and establish the quantitative analysis method for verbascoside, luteolin and apigenin in Siphonostegia chinensis by HPLC. Methods HPLC was performed on Kromasil C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), the mobile phase consisted of acetonitrile and water (containing 0.1% phosphoric acid) at a flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was set at 35 ℃, and the eluate was detected at 340 nm. Results Quantitative analysis of HPLC showed that the linear ranges of verbascoside, luteolin and apigenin were 0.197 6~1.482 μg ($r=0.999 8$), 0.100 8~0.756 μg ($r=0.999 7$), 0.043 2~0.324 μg ($r=0.999 7$) respectively. The average recovery of verbascoside, luteolin and apigenin were 99.7% (RSD=2.0%), 99.5% (RSD=2.3%), 99.4% (RSD=2.2%) respectively. Conclusion The method is accurate, feasible and reliable, therefore it's available for the quality control of Siphonostegia chinensis.

Key words: siphonostegia chinensis; verbascoside; luteolin; apigenin

北刘寄奴又名阴行草,始载于《图经本草》,味苦性寒,具有活血祛瘀、通经止痛、凉血、止血、清热利湿之功效^[1]。可用于治疗跌打损伤、外伤出血、月经不调、产后瘀痛、癥瘕积聚、血痢、血淋、湿热黄疸、水肿腹胀、白带过多等^[2]。现代药理研究表明,北刘寄奴具有保肝利胆、抗血小板聚集、降低血清胆固醇等作用^[3]。现代分析研究表明,北刘寄奴中主要含有挥发油、黄酮、奎尼酸酯、生物碱及木质素等化学成分,其中毛蕊花糖苷和芹菜素的含量分别可达 7 和 1 mg/g^[4-5]。《中国药典》2010 年版仅以木犀草素作为北刘寄奴含量测定的指标成分,鉴于毛蕊花糖苷和芹菜素也具有可测性,为全面控制北刘寄奴的质量,本研究对同时测定药材中毛蕊花糖苷、木犀草素和芹菜素的方法进行探索。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪;G1316A TCC DE63067867 检测器;四元泵 G1311A;柱温箱 GP1316A;在线脱气机 G1322A;Chem-Station 工作站;METTLER TOLEDO AL104 型电子天平;KQ-250VDV 型双频数控超声波清洗器。

1.2 试剂 对照品毛蕊花糖苷(111530-200706)、木犀草素(111520-200504)、芹菜素(111901-201102)均购自中国食品药品检定研究院(供含量测定用);乙腈、磷酸(色谱纯, Fisher 公

司),水为超纯水(自制),其余试剂均为分析纯;药材分别购自河北安国、安徽亳州、吉林长春、山东临沂和湖北黄冈,经江西中医药大学杨武亮教授鉴定为玄参科植物阴行草(Siphonostegia chinensis Benth)的干燥全草。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件^[6-8] Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相乙腈与 0.1%磷酸(22:78);流速 1.0 mL/min;柱温 35 ℃;进样量 10 μL;检测波长 340 nm。

1.3.2 溶液的配制

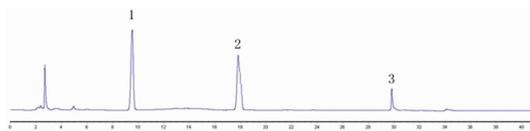
1.3.2.1 混合对照品溶液 分别取毛蕊花糖苷、木犀草素和芹菜素对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并制成每 1 mL 含毛蕊花糖苷 49.4 μg、木犀草素 25.2 μg、芹菜素 10.8 μg 的混合溶液,即得。

1.3.2.2 供试品溶液^[2] 取北刘寄奴样品粉末(过 2 号筛)约 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2 结果

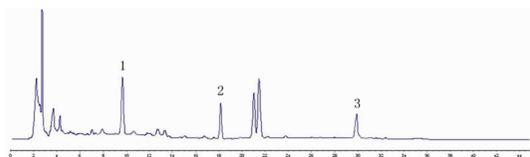
2.1 方法学考察

2.1.1 系统适应性试验 精密吸取上述混合对照品溶液、供试品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪中, 按色谱条件进行测定, 记录色谱图。结果见图 1、2, 供试品图谱中, 毛蕊花糖苷、木犀草素和芹菜素的保留时间与相应对照品图谱一致, 与其相邻色谱峰的分度均大于 1.5。



1: 毛蕊花糖苷; 2: 木犀草素; 3: 芹菜素。

图 1 混合对照品 HPLC 图谱



1: 毛蕊花糖苷; 2: 木犀草素; 3: 芹菜素。

图 2 供试品 HPLC 图谱

2.1.2 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液, 分别进样 4、6、8、10、20、30 μL, 按照色谱条件进行测定。以毛蕊花糖苷、木犀草素和芹菜素进样量(μg)为横坐标(X), 对应峰面积为纵坐标(Y), 分别绘制标准曲线, 得回归方程分别为: $Y = 7.171 \times 10^5 X + 2.094 \times 10^3$, $r = 0.9998$; $Y = 6.833 \times 10^5 X + 1.306 \times 10^3$, $r = 0.9997$; $Y = 7.210 \times 10^5 X + 9.73 \times 10^2$, $r = 0.9997$ 。结果表明毛蕊花糖苷、木犀草素和芹菜素分别在 0.1976~1.4820 μg、0.1008~0.7560 μg 和 0.0432~0.3240 μg 范围内线性关系良好。

2.1.3 精密度试验 取混合对照品溶液, 按色谱条件进行测定, 重复测定 6 次。结果毛蕊花糖苷、木犀草素和芹菜素峰面积的 RSD 分别为 0.63%、0.71%、0.54%, 表明仪器精密度良好。

2.1.4 重复性试验 取同一批样品 6 份, 分别按供试品溶液制备法制得供试品溶液, 按照色谱条件进行测定。结果北刘寄奴药材中毛蕊花糖苷、木犀草素和芹菜素的平均含量分别为 2.11、1.09、0.44 mg/g, RSD 分别为 2.0%、1.7%、1.7%, 表明本含量测定方法重复性较好。

2.1.5 稳定性试验 取上述供试品溶液, 分别于配制后的 1、3、5、7、9 h 测定毛蕊花糖苷、木犀草素和芹菜素的峰面积。结果毛蕊花糖苷、木犀草素和芹菜素的峰面积的 RSD 分别为 0.83%、0.71% 和 0.99%, 表明供试品溶液在 9 h 内稳定性良好。

2.1.6 加样回收率试验^[9] 取已知含量(毛蕊花糖苷 2.11 mg/g、木犀草素 1.09 mg/g、芹菜素 0.44 mg/g)的北刘寄奴粉末(过 2 号筛)约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 按样品含量与对照品量大致 1:1 的比例精密加入混合对照品溶液(毛蕊花糖苷 0.2023 g/L、木犀草素 0.1175 g/L、芹菜素 0.0461 g/L)10 mL 和甲醇 40 mL, 密塞, 称定重量, 其余按供试品溶液制备法制得供试品溶液, 平行 6 份, 按色谱条件进行测定, 计算加样回收率。见表 1。

2.2 样品含量测定 取不同产地样品各 3 份, 按供试品溶液制备法制得供试品溶液, 并按色谱条件进行测定, 采用标准曲

线法计算, 结果见表 2。

表 1 加样回收试验(n=6)

| 成分 | 样品含量 (mg) | 加入量 (mg) | 测得量 (mg) | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | RSD (%) |
|-------|-----------|----------|----------|---------|-----------|---------|
| 毛蕊花糖苷 | 2.213 0 | 2.023 | 4.207 8 | 98.61 | 99.7 | 2.0 |
| | 2.082 1 | 2.023 | 4.088 0 | 99.15 | | |
| | 2.393 0 | 2.023 | 4.370 2 | 97.74 | | |
| | 2.064 0 | 2.023 | 4.138 0 | 102.52 | | |
| | 2.094 0 | 2.023 | 4.151 2 | 101.69 | | |
| | 2.321 2 | 2.023 | 4.307 8 | 98.20 | | |
| 木犀草素 | 1.143 2 | 1.175 | 2.300 8 | 98.52 | 99.5 | 2.3 |
| | 1.075 6 | 1.175 | 2.236 0 | 98.76 | | |
| | 1.236 2 | 1.175 | 2.377 9 | 97.17 | | |
| | 1.066 2 | 1.175 | 2.273 3 | 102.73 | | |
| | 1.081 7 | 1.175 | 2.280 5 | 102.03 | | |
| | 1.199 1 | 1.175 | 2.351 1 | 98.04 | | |
| 芹菜素 | 0.461 5 | 0.461 | 0.912 0 | 97.72 | 99.4 | 2.2 |
| | 0.434 2 | 0.461 | 0.886 2 | 98.05 | | |
| | 0.499 0 | 0.461 | 0.950 0 | 97.83 | | |
| | 0.430 4 | 0.461 | 0.900 1 | 101.89 | | |
| | 0.436 7 | 0.461 | 0.909 0 | 102.45 | | |
| | 0.484 0 | 0.461 | 0.936 5 | 98.16 | | |

表 2 不同产地北刘寄奴药材中 3 种成分的含量(mg/g, n=3)

| 产地 | 毛蕊花糖苷 | 木犀草素 | 芹菜素 |
|------|-------|------|------|
| 河北安国 | 1.97 | 0.74 | 0.52 |
| 安徽亳州 | 1.24 | 0.81 | 0.35 |
| 吉林长春 | 2.75 | 1.83 | 0.26 |
| 山东临沂 | 2.11 | 1.09 | 0.44 |
| 湖北黄冈 | 5.02 | 2.88 | 0.81 |

3 讨论

北刘寄奴作为临床常用中药, 其质量的优劣直接关系到对疾病的疗效, 《中国药典》2010 年版仅以木犀草素作为含量测定的指标, 来评价质量的优劣。从表 2 可以看出, 木犀草素的含量高低和其他 2 种成分的含量并没有完全一致性, 因此, 仅以 1 种成分来评价药材质量的优劣, 不够全面。随着仪器分析手段的提高和对中药质量重视程度的提高, 有必要对单一药材进行多指标含量测定, 以期更全面地控制药材的质量。

毛蕊花糖苷、木犀草素、芹菜素的最大吸收波长分别为 332、350 和 340 nm^[10-12], 数值比较接近, 在 340 nm 处均有较大吸收, 能保证检测的灵敏度, 因此选择 340 nm 为检测波长。如果想进一步提高检测的灵敏度, 可以采用二极管阵列检测器的程序可变波长法^[13], 分别在 3 种物质最大吸收波长处进行检测, 但是此种分析方法不适用与普通紫外检测器。

有操作简单、模型诱导成功率高、结果稳定、省时省力、大鼠存活率高、利于长时间观察等优点,能为大批量 SAP 模型的制备提供较为可靠的方法。

参考文献:

- [1] 杨元生,崔淑兰,陈昱,等.重症急性胰腺炎实验动物模型的研究进展[J].世界华人消化杂志,2009,17(25):2601-2606.
- [2] 许娟娟,刘俊,侯晓华.急性胰腺炎动物模型不同造模方法与肠道细菌易位的关系[J].中华胰腺病杂志,2010,10(3):225-226.
- [3] Schmidt J,Rattner DW,Lewandrowski K,et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy[J]. Ann Surg,1992,215(1):44-56.
- [4] 钱明平,房林,沈蓉蓉,等. BD 针在大鼠急性胰腺炎模型制作中的应用[J]. 重庆医学,2008,37(11):1219-1220.
- [5] 朱长炎,赵海峰,曾宥有,等.一种新型小鼠重症急性胰腺炎模型的制作及评估[J].中国组织工程研究,2012,16(42):7861-7865.
- [6] 杨平,寇明文,赵戈,等. L-精氨酸和雨蛙素诱导急性胰腺炎模型的对比研究[J].现代生物医学进展,2012,12(15):2810-2813.
- [7] 沈佳庆,杨丽娟,胡国勇,等.牛磺胆酸钠在大鼠急性胰腺炎模型中的半数致死量(LD50)研究[J].现代生物医学进展,2011,11(19):3618-3620.
- [8] 闫堃,黎一鸣,纪宗正,等.缓释泵法制急性胰腺炎大鼠模型[J].中国普外基础与临床杂志,2011,18(7):717-

721.

- [9] 杜章,吴伟林,邵峰,等.应用一次性静脉留置针对大鼠重症急性胰腺炎模型制作方法的改进[J].肝胆胰外科杂志,2012,24(5):399-402.
- [10] 白槟,徐斌,刘朝旭,等.逆行胰胆管注射牛磺胆酸钠诱导重症急性胰腺炎模型多器官损害观察[J].科学技术与工程杂志,2013,10(15):225-226.
- [11] 谢阳云,余凤梅,杨丽红,等.逆行胃左动脉腹腔干治疗大鼠胰腺炎的模型制作[J].肝胆胰外科杂志,2013,25(1):47-50.
- [12] 刘君君,陈昱,龙友明,等. L-精氨酸诱导大鼠急性坏死性胰腺炎模型的建立[J].中国药理学通报,2009,25(10):1392-1394.
- [13] 刘震雄,李慧艳,赵曙光,等.大鼠重症急性胰腺炎模型制备方法的建立与探讨[J].中国现代医学杂志,2010,20(6):861-864.
- [14] 程飞,张献全,虎琼华,等.大剂量 L-精氨酸分 3 次腹腔内注射制备大鼠急性坏死性胰腺炎模型[J].第三军医大学学报,2010,32(17):1838-1841.
- [15] 郝建志,方驰华,范应方,等.一种效果确切的大鼠重症急性胰腺炎模型[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(28):5193-5196.
- [16] 刘尧,兑丹华,兰天罡,等.大鼠急性重症胰腺炎模型制备的技术改进[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,32(6):570-572,582.

(收稿日期:2014-02-08 修回日期:2014-04-22)

(上接第 3041 页)

参考文献:

- [1] 何铸.中药刘寄奴的考证[J].中药材科技,1981,16(4):42-44.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:91-92.
- [3] 汪凤山,刘娟.阴行草化学成分及药理作用研究进展[J].黑龙江医药科学,2008,31(6):61-62.
- [4] Zhao MB,Wei HL,Li J,et al. Determination of luteolin and acteoside in Siphonostegiae Herba by high-performance liquid chromatography[J]. J Chin Pharmac Sci,2012,15(21):333-335.
- [5] 林宗涛,梁毅,刘娟娟,等. HPLC 法测定北刘寄奴中木犀草素和芹菜素的含量[J].药物分析杂志,2011,31(9):1689-1692.
- [6] 刘吉成. HPLC 测定黑草中木犀草素和芹菜素的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(20):72-74.
- [7] 李才堂,文萍,郭琦丽,等. HPLC 测定裸花紫珠药材中毛蕊花糖苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(1):

84-86.

- [8] 陈腾飞,萧伟,尚强,等. HPLC 法测定不同产地墨旱莲药材中木犀草素含量[J].南京中医药大学学报,2011,27(2):158-160.
- [9] 肖琳,贾娜,何姣,等.青叶胆药材及饮片中獐牙菜苦苷和龙胆苦苷的含量测定[J].药物分析杂志,2009,29(5):876-879.
- [10] 邹国栋,程艳阳,方铁铮,等. HPLC 法测定紫珠叶中毛蕊花糖苷的含量[J].药物分析杂志,2010,30(1):160-162.
- [11] 黄权芳,伍小燕,黄敏,等. HPLC 法测定壮骨清热颗粒中木犀草素的含量[J].中药新药与临床药理,2010,21(3):285-287.
- [12] 苏春英,苏本华,孙静. HPLC 法测定浮萍中芹菜素的含量[J].中医药信息,2013,30(3):32-34.
- [13] 宋丽军,赵文昌,曾秋玲,等.护骨胶囊中 5 种成分 HPLC 同时测定方法的建立[J].中药材,2012,35(12):2019-2023.

(收稿日期:2014-02-01 修回日期:2014-04-13)