

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.16.008

高效液相色谱法同时测定荔枝草提取物中迷迭香酸、高车前苷、高车前素及芹菜素含量

陈 婷,徐加兵

(江苏省扬州市食品药品检验检测中心,江苏 扬州 225000)

摘要:目的 建立同时测定荔枝草提取物中迷迭香酸、高车前苷、高车前素及芹菜素含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为Phenomenex C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为0.1%磷酸水(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~8 min时15% B~38% B,8~17 min时38% B~56% B,17~28 min时56% B~82% B,28~35 min时82% B~95% B),检测波长为335 nm,流速为1 mL/min,柱温为35℃。结果 迷迭香酸、高车前苷、高车前素及芹菜素质量浓度分别在2.812 5~112.500 0,6.745~269.800,3.615~144.600,4.88~195.20 mg/L范围内与峰面积线性关系良好。荔枝草提取物中迷迭香酸、高车前苷、高车前素及芹菜素含量分别为6.186,18.253,9.665,11.162 mg/g。结论 该方法准确,可靠,重复性好,可用于荔枝草提取物的质量评价与控制。

关键词:荔枝草;迷迭香酸;高车前苷;高车前素;芹菜素;高效液相色谱法;含量测定

中图分类号:R286.0;R282.71

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)16-0023-03

Simultaneous Determination of Rosmarinic Acid, Homoplantagin, Hispidulin and Apigenin in Extract of *Salvia Plebeia* by HPLC

Chen Ting, Xu Jiabing

(Yangzhou Municipal Food and Drug Inspecting and Testing Center, Yangzhou, Jiangsu, China 225000)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of the content of rosmarinic acid, homoplantagin, hispidulin and apigenin in the extract of *Salvia plebeia*. **Methods** The Phenomenex C₁₈ column(250 mm×4.6 mm,5 μm) was adopted, the mobile phase was 0.1% phosphoric acid(A)-methanol(B) with gradient elution:0~8 min,15% B~38% B;8~17 min,38% B~56% B;17~28 min,56% B~82% B;28~35 min,82% B~95% B, the detection wavelength was 335 nm, the flow rate was 1 mL/min and the column temperature was 35℃. **Results** The linear ranges of rosmarinic acid, homoplantagin, hispidulin and apigenin were 2.812 5~112.500 0, 6.745~269.800, 3.615~144.600, 4.88~195.20 mg/L. The contents of rosmarinic acid, homoplantagin, hispidulin and apigenin in extract of *Salvia plebeia* were 6.186, 18.253, 9.665 and 11.162 mg/g. **Conclusion** The method is accurate, reliable and reproducible, which can be used for the quality evaluation and control of extract of *Salvia plebeia*.

Key words: *Salvia plebeia*; rosmarinic acid; homoplantagin; hispidulin; apigenin; HPLC; content determination

荔枝草为唇形科植物荔枝草 *Salvia plebeia* R. Br.的全草,多生长于山坡、路旁、荒地、河边湿地上,分布于全国各地。荔枝草味苦、辛,性凉,归肺、胃经,具有清热解毒、凉血散瘀、利水消肿的功效,常用于治疗感冒发热、咽喉肿痛、肺热咳嗽、咳血、吐血、尿血、崩漏、肾炎水肿、白浊、痢疾、痈肿疮毒、湿疹瘙痒、跌打损伤及蛇虫咬伤等症^[1]。荔枝草主要含有黄酮及苷类、萜类、苯丙素类、多糖类等化合物^[2]。现代药理研究表明,其具有抗菌、抗氧化、保肝、降血糖、抗炎、镇痛、止血及化痰止咳等作用^[3-8]。本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定荔枝草提取物中迷迭香酸、高车前苷、高车前素及芹菜素的含量,为以荔枝草为原料的功能性食品及相关新药的开发提供试验依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司,含 2787

紫外检测器);旋转蒸发仪(上海雅东玻璃制品有限公司);微量移液器(大龙光创实验仪器<北京>有限公司);KH3200型超声清洗机(宁波鄞州恒大超声设备有限公司);电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 试药

迷迭香酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号为111871-201706);高车前苷对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号为P180322);高车前素对照品(上海纯优生物科技有限公司,批号为P170214);芹菜素(中国食品药品检定研究院,批号为111901-201603);荔枝草提取物(自制,批号分别为20170906,20170914,20170925);甲醇为色谱纯(美国 Tedia 公司);纯化水(自制);其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);

流动相:0.1%磷酸水(A)-甲醇(B),梯度洗脱,0~8 min时15%B~38%B,8~17 min时38%B~56%B,17~28 min时56%B~82%B,28~35 min时82%B~95%B;流速:1 mL/min;柱温:35℃;进样量:10 μL;检测波长:335 nm。

2.2 溶液制备

对照品溶液:精密称取迷迭香酸、高车前苷、高车前素和芹菜素对照品适量置容量瓶中,甲醇溶解并定容,配制迷迭香酸、高车前苷、高车前素和芹菜素质量浓度分别为112.5,269.8,144.6,195.2 mg/L的混合对照品溶液,作为贮备液。

供试品溶液:称取经干燥并粉碎的荔枝草适量,加10倍量水回流提取1次,再加6倍量水回流提取2次,合并3次提取液,减压浓缩至相对密度为1.25,加95%乙醇醇沉至含醇量达50%,静置12 h,离心取上清液,并减压浓缩至无醇味,过HPD826大孔吸附树脂,依次用3倍柱体积(3BV)水、2BV 15%乙醇和2BV 40%乙醇洗脱以除杂质,用75%乙醇4BV洗脱,收集洗脱液,浓缩后真空干燥,即得荔枝草提取物。称取荔枝草提取物100 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,用75%乙醇超声溶解,定容至刻度,摇匀,过0.45 μm滤膜,备用。

2.3 方法学考察

专属性试验:在拟订色谱条件下进样分析,得对照品和荔枝草提取物色谱图(图1)。由图1可见,迷迭香酸、高车前苷、高车前素和芹菜素色谱峰的分度良好,其他成分不干扰上述4种成分的测定。

线性关系考察:分别精密吸取混合对照品贮备液0.25,0.50,1.00,2.50,5.00,10.00 mL,置10 mL容量瓶中,用甲醇稀释,定容,摇匀。配制成分别含迷迭香酸2.812 5, 5.625 0, 11.250 0, 28.125 0, 56.250 0, 112.500 0 mg/L,高车前苷6.745, 13.490, 26.980, 67.450, 134.900, 269.800 mg/L,高车前素3.615, 7.230, 14.460, 36.150, 72.300, 144.600 mg/L和芹菜素4.88, 9.76, 19.52, 48.80, 97.60, 195.20 mg/L的系列对照品溶液。按拟订色谱条件进样分析,记录峰面积,以峰面积(A)对对照品溶液质量浓度(C)进行线性回归,得迷迭香酸、高车前苷、高车前素和芹菜素的标准曲线分别为 $A = 5.974\ 9 \times 10^5 C + 398.7 (r = 0.999\ 8)$, $A = 1.185\ 3 \times 10^6 C - 339.4 (r = 0.999\ 7)$, $A = 6.784\ 3 \times 10^5 C - 227.3 (r = 0.999\ 8)$, $A = 9.417\ 8 \times 10^5 C + 205.6 (r = 0.999\ 8)$,质量浓度分别在2.812 5~112.500 0, 6.745~269.800, 3.615~144.600, 4.88~195.20 mg/L范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取含迷迭香酸11.25 mg/L、高车前苷26.98 mg/L、高车前素14.46 mg/L和芹菜素

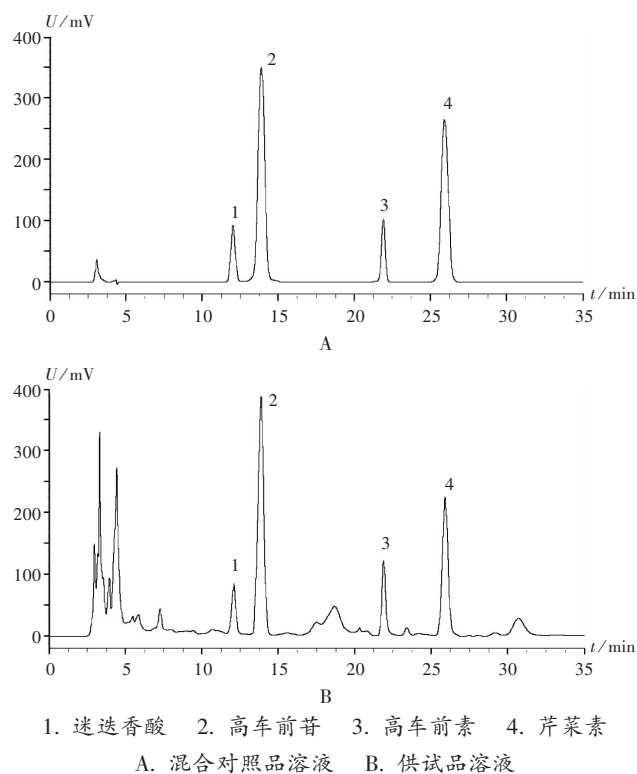


图1 高效液相色谱图

19.52 mg/L的混合对照品溶液10 μL,按拟订色谱条件重复进样分析6次,记录峰面积。结果迷迭香酸、高车前苷、高车前素和芹菜素峰面积的RSD分别为1.13%, 0.85%, 0.97%和0.92% (n=6),表明仪器精密度良好。

重复性试验:称取荔枝草提取物(批号为20170906)6份,每份100 mg,精密称定,配制供试品溶液,再按拟订色谱条件进样分析,记录峰面积,计算含量。结果迷迭香酸、高车前苷、高车前素和芹菜素在荔枝草提取物中的含量分别为6.185, 18.274, 9.692, 11.169 mg/g, RSD分别为1.31%, 1.02%, 1.23%和1.09% (n=6)。

稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液,按拟订色谱条件分别于0, 2, 4, 8, 15, 24 h时进样分析,记录峰面积。结果迷迭香酸、高车前苷、高车前素和芹菜素峰面积的RSD分别为1.47%, 1.26%, 1.51%, 1.33% (n=6),表明供试品溶液在24 h内稳定。

加样回收试验:称取已知含量的荔枝草提取物(批号为20170906)6份,每份40 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,加入5 mL分别含迷迭香酸、高车前苷、高车前素和芹菜素56.25, 134.90, 72.30, 97.60 mg/L的混合对照品溶液,甲醇定容至刻度。6份样品进样前均经0.45 μm滤膜滤过,进样分析,记录峰面积,计算回收率。结果见表1。

2.4 样品含量测定

称取3批次荔枝草提取物各100 mg,精密称定,依

表1 加样回收试验结果($n=6$)

取样量 (mg)	样品含量(μg)				加入量(μg)				测得量(μg)			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
40.27	249.07	735.89	390.30	449.78	281.25	674.50	361.50	488.00	523.54	1403.11	748.62	924.31
40.43	250.06	738.82	391.85	451.56	281.25	674.50	361.50	488.00	526.36	1409.61	747.42	932.68
40.35	249.56	737.36	391.07	450.67	281.25	674.50	361.50	488.00	528.17	1409.97	749.25	928.03
40.18	248.51	734.25	389.42	448.77	281.25	674.50	361.50	488.00	525.57	1412.53	744.63	939.80
40.07	247.83	732.24	388.36	447.54	281.25	674.50	361.50	488.00	527.31	1389.47	738.62	933.15
40.29	249.19	736.26	390.49	450.00	281.25	674.50	361.50	488.00	523.22	1399.09	749.64	930.04
取样量 (mg)	回收率(%)				$\bar{X}$ (%)				RSD(%)			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
40.27	97.59	98.92	99.12	97.24								
40.43	98.24	99.45	98.36	98.59								
40.35	99.06	99.72	99.08	97.82	98.37	99.14	98.51	98.69	0.79	1.12	0.92	1.23
40.18	98.51	100.56	98.26	100.62								
40.07	99.37	97.44	96.89	99.51								
40.29	97.43	98.27	99.35	98.37								

注:A为迷迭香酸,B为高车前苷,C为高车前素,D为芹菜素。下表同。

表2 样品含量测定结果

批号	含量(mg/g)				平均含量(mg/g)				RSD(%)			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
20170906	6.183	18.267	9.685	11.163								
20170914	6.164	18.354	9.597	11.078	6.186	18.253	9.665	11.162	0.38	0.59	0.63	0.75
20170925	6.211	18.139	9.713	11.245								

法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样分析,记录峰面积,计算含量。结果见表2。

3 讨论

将迷迭香酸、高车前苷、高车前素和芹菜素对照品经紫外全波长扫描,记录最大吸收波长。结果表明,迷迭香酸在223 nm和328 nm波长处有最大吸收,高车前苷在276 nm和336 nm波长处有最大吸收,高车前素在258 nm和343 nm波长处有最大吸收,芹菜素在268 nm和339 nm波长处有最大吸收,故初步选择335 nm作为检测波长。经比较,当检测波长为335 nm时,各色谱峰强度大、特异性亦较强。

选择流动相组成及比例时,考察了甲醇-水体系与乙腈-水体系对基线、峰形及分离度等的影响。通过比较,甲醇-水体系梯度洗脱时的峰形及分离度均优于乙腈-水体系,仅基线平稳性稍差于乙腈-水体系,能较好地分离迷迭香酸、高车前苷、高车前素和芹菜素4种成分,同时加入0.1%的磷酸可以获得更优的峰形。

本研究结果显示,荔枝草提取物中高车前苷的含量最高,为18.253 mg/g,其

他3种成分含量分别为迷迭香酸6.186 mg/g,高车前素9.665 mg/g和芹菜素11.162 mg/g。

本研究中建立的HPLC法可同时测定荔枝草提取物中迷迭香酸、高车前苷、高车前素和芹菜素的含量,且方法快速,结果准确,重复性高,可作为荔枝草提取物的质量控制标准。

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(第7册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:186-188.
- [2] 孙启文,吴松,柳航,等. 荔枝草的化学成分及药理作用研究新进展[J]. 中国药师,2014,17(3):481-483.
- [3] 杨泽华,杨长水,韦建华,等. 荔枝草提取物的体外抗菌活性研究[J]. 广西中医药大学学报,2015,18(2):65-67.
- [4] 师梅梅,杨建雄,任维. 荔枝草总黄酮的体外抗氧化研究[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版),2012,40(5):60-63.
- [5] 师梅梅,杨建雄,任维. 荔枝草提取物对大鼠肝线粒体损伤的保护作用[J]. 中成药,2011,33(10):1673-1676.
- [6] 康文艺,张丽,陈林. 两种唇形科植物荔枝草和夏至草 α -糖苷酶抑制活性研究[J]. 中成药,2010,32(3):493-495.
- [7] 张红霞. 荔枝草的药效学研究[J]. 中国民族民间医药,2010,19(1):35-36.
- [8] 喻樊. 荔枝草的化痰、止咳、抗炎药效学的研究[J]. 海峡药学,2009,21(10):31-33.

(收稿日期:2017-12-28)

本栏目由
重庆英康医疗器械有限公司
协办