

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.06.013

高效液相色谱波长切换法同时测定筋骨草中5种成分含量*

王淼,管敏[△]

(南京中医药大学附属医院,江苏 南京 210029)

摘要:目的 建立同时测定筋骨草中哈巴苷、乙酰哈巴苷、芹菜素、木犀草素和杯苋甾酮含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.4% 磷酸溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 202 nm(哈巴苷、乙酰哈巴苷)和 245 nm(杯苋甾酮、木犀草素、芹菜素),柱温为 30 ℃,进样量为 10 μL。结果 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 4.7%;哈巴苷、乙酰哈巴苷、杯苋甾酮、木犀草素和芹菜素质量浓度分别在 33.44~1 672.00 μg/mL、18.248 0~912.40 μg/mL、5.377 6~268.88 μg/mL、1.728 0~86.40 μg/mL、1.507 2~75.36 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好,平均加样回收率分别为 99.06%,98.89%,98.97%,99.61%,97.15%,RSD 分别为 0.56%,0.41%,0.77%,1.23%,1.08%(n=6)。结论 该方法高效、简便、稳定性、重复性好,可用于同时测定筋骨草中的 5 种成分。

关键词:筋骨草;高效液相色谱法;波长切换;哈巴苷;乙酰哈巴苷;杯苋甾酮;木犀草素;芹菜素

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)06-0047-04

Simultaneous Determination of Five Constituents in *Ajuga Decumbens* by HPLC with Wavelength Switching

WANG Miao, GUAN Min

(Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, China 210029)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography(HPLC) method for the simultaneous determination of hapagide, acetylhapagide, cyasterone, luteolin and apigenin in *Ajuga decumbens*. **Methods** The chromatographic column was Kromasil C₁₈ column(250 mm×4.6 mm,5 μm),the mobile phase was acetonitrile-0.4% phosphoric acid solution(gradient elution),the flow rate was 1.0 mL/min,the detection wavelength was 202 nm for hapagide and acetylhapagide and 245 nm for cyasterone,luteolin and apigenin,the column temperature was 30 ℃,and the injection volume was 10 μL. **Results** The RSDs of precision,stability and repeatability tests were less than 4.7%. The liner ranges of hapagide,acetylhapagide,cyasterone,luteolin and apigenin were 33.44-1 672.00 μg/mL,18.248 0-912.40 μg/mL,5.377 6-268.88 μg/mL,1.728 0-86.40 μg/mL and 1.507 2-75.36 μg/mL,respectively. The average recoveries of hapagide,acetylhapagide,cyasterone,luteolin and apigenin were 99.06%,98.89%,98.97%,99.61%,97.15% with RSDs of 0.56%,0.41%,0.77%,1.23%,1.08%(n=6),respectively. **Conclusion** The method is efficient, simple, stable and reproducible,which can be used for the simultaneous determination of five constituents in *Ajuga decumbens*.

Key words: *Ajuga decumbens*; HPLC; wavelength switching; hapagide; acetylhapagide; cyasterone; luteolin; apigenin

筋骨草始载于清代《本草纲目拾遗》,为唇形科植物筋骨草 *Ajuga decumbens* Thunb. 的干燥全草,又名白毛夏枯草,具有清热凉血、解毒消肿、止咳、化痰、平喘功效^[1-3]。其植物主要分布于浙江、江苏、福建等秦岭以南各省区,筋骨草、金疮小草和紫背金盘为同属近缘种植物,外观极相似^[4-5]。筋骨草主要成分为环烯醚萜苷类、黄酮类,具有抗菌、消炎、止咳平喘等作用^[6-8]。2015年版《中国药典(一部)》筋骨草项下仅以乙酰哈巴苷的含量作为质量控制指标^[9],乙酰哈巴苷并非筋骨草特有成分,金疮小草和紫背金盘中也能检测出乙酰哈巴苷^[4],故现行质量标准难以全面控制筋骨草药材的质量。本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定筋骨草中哈巴苷、乙酰哈巴苷、木犀草素、芹菜素、杯苋甾酮的含量,为筋骨草

药材及其制剂的质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

AR2140 型电子天平(美国 Ohaus 集团,精度为 0.1 mg);BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司,精度为 0.01 mg);SK6200H 型超声清洗仪(上海科导超声仪器有限公司);1260S 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

1.2 试剂

哈巴苷对照品(批号为 111729-201204),乙酰哈巴苷对照品(批号为 111925-201001),木犀草素对照品(批号为 111520-201605),芹菜素对照品(批号为 111901-201102),杯苋甾酮对照品(批号为 111804-

*基金项目:江苏省中医药管理局科技项目[JD2019SZ04]。

第一作者:王淼,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为中药制剂,(电子信箱)w.m.ssh@126.com。

[△]通信作者:管敏,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为药物制剂与质量控制,(电子信箱)guanmin_1987@163.com。

201705),均购于中国食品药品检定研究院,含量均不低于98%;甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水;筋骨草药材饮片(安徽井泉集团中药饮片有限公司,批号分别为20160101,20180401,20180501,20180701,20180901)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.4%磷酸溶液(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 mL/min;检测波长:202 nm(哈巴苷、乙酰哈巴苷)、245 nm(杯苋甾酮、木犀草素、芹菜素);柱温:30℃;进样量:10 μL。

表1 梯度洗脱程序及波长设置

Tab.1 Gradient elution programs and wavelength setting

时间(min)	A(%)	B(%)	波长(nm)	时间(min)	A(%)	B(%)	波长(nm)
0	6	94	202	24	28	72	245
10	6	94	202	52	28	72	245
13	20	80	202	54	6	94	245
22	20	80	202	55	6	94	245

2.2 溶液制备

取木犀草素对照品10.80 mg、芹菜素对照品9.42 mg和杯苋甾酮对照品33.61 mg,精密称定,加甲醇溶解,超声(功率200 W,频率40 kHz,下同)处理15 min,加甲醇定容至25 mL,作为对照品溶液A;称取哈巴苷对照品83.60 mg、乙酰哈巴苷对照品45.62 mg,精密称定,加入对照品溶液A 10 mL及适量甲醇,超声处理15 min,加甲醇定容至20 mL,制成混合对照品母液;量取5 mL,置50 mL容量瓶中,制成每1 mL含哈巴苷418.0 μg、乙酰哈巴苷228.1 μg、木犀草素21.6 μg、芹菜素18.84 μg、杯苋甾酮67.22 μg的混合对照品溶液。取筋骨草药材饮片粉末约1 g,精密称定,加入30 mL甲醇,加热回流1 h,放冷,滤过,残渣用甲醇洗涤3次,与滤液并入

50 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。以甲醇作为阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:取2.2项下3种溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,色谱见图1。结果5种成分基线均能分离,各峰分离度良好。

线性关系考察:分别精密量取2.2项下混合对照品母液0.2,0.5,1.0,2.0,5.0,10.0 mL,置25 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,制成系列混合对照品溶液。精密量取10 μL,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得哈巴苷、乙酰哈巴苷、杯苋甾酮、木犀草素、芹菜素回归方程分别为 $Y_1 = 3.8214X_1 - 1.7369$ ($R_1^2 = 0.9999$)、 $Y_2 = 9.1564X_2 - 12.382$ ($R_2^2 = 0.9999$)、 $Y_3 = 13.442X_3 + 4.2746$ ($R_3^2 = 0.9999$)、 $Y_4 = 84.67X_4 - 1.1375$ ($R_4^2 = 0.9999$)、 $Y_5 = 89.22X_5 - 5.9164$ ($R_5^2 = 0.9999$)。结果表明,哈巴苷、乙酰哈巴苷、杯苋甾酮、木犀草素、芹菜素质量浓度在33.44~1 672.00 μg/mL、18.248 0~912.40 μg/mL、5.377 6~268.88 μg/mL、1.728 0~86.40 μg/mL、1.507 2~75.36 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果哈巴苷、乙酰哈巴苷、杯苋甾酮、木犀草素、芹菜素峰面积的RSD分别为0.64%,0.25%,0.44%,0.35%,0.29% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液(批号为20160101)适量,依法制备供试品溶液,分别于室温下放置0,2,4,6,12 h时按2.1项下色谱条件进样测定。结果哈巴苷、乙酰哈巴苷、杯苋甾酮、木犀草素、芹菜素峰面积的RSD分别为0.76%,0.39%,3.73%,1.48%,

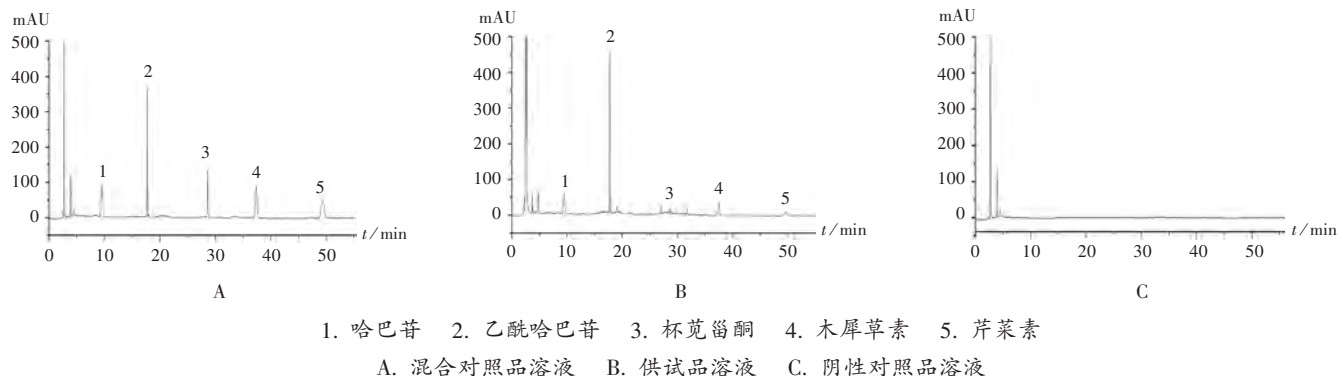


图1 高效液相色谱图

1. hapagide 2. acetylhapagide 3. cyasterone 4. luteolin 5. apigenin
A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig.1 HPLC chromatograms

2. 55% ($n=5$), 表明供试品溶液在室温放置 12 h 内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为 20160101)适量,各 6 份,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果哈巴苷、乙酰哈巴苷、杯苋甾酮、木犀草素、芹菜素含量平均值分别为 0.960%, 0.830%, 0.040%, 0.020%, 0.014%, RSD 分别为 0.80%, 0.58%, 2.40%, 2.62%, 4.68% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号 20160101)适量,共 6 份,每份约 0.5 g,分别加入一定质量浓度的哈巴苷、乙酰哈巴苷、杯苋甾酮、木犀草素、芹菜素对照品溶液,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表 2。

2.4 样品含量测定

取 5 批样品各适量,分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1 项下色谱条件进样测定,平行测定 3 次,记录峰面积,并计算样品含量。结果见表 3。

3 讨论

筋骨草中环烯醚萜苷类、黄酮类具有抗菌、消炎、止咳平喘等作用,是发挥功效的主要成分^[7-8]。环烯醚萜苷类中哈巴苷和乙酰哈巴苷是含量最高的 2 种成分,乙酰哈巴苷也是 2015 年版《中国药典(一部)》^[9]中筋骨草项下规定的质量控制指标,本课题组前期研究也证实了筋骨草中哈巴苷和乙酰哈巴苷的抗菌活性。木犀草素、芹菜素是黄酮类中含量较高且有明显保肝利胆和止咳平喘作用的成分^[10-11],杯苋甾酮也具有抗炎、抗菌活性^[12]。因此,本研究中以哈巴苷、乙酰哈巴苷、木犀草素、芹菜素和杯苋甾酮作为筋骨草的质量控制指标。

乙腈的洗脱能力优于甲醇,流动相中加入少量的酸性溶液可有效改善峰形。预试验中先采用 0.4% 甲酸溶液,但其在 202 nm 波长处有吸收,基线不稳,因此选择乙腈-0.4% 磷酸溶液为流动相,基线平稳,各成分峰形较好。哈巴苷和乙酰哈巴苷的检测波长为 202 nm,木犀草素、芹菜素和杯苋甾酮在 245 nm 波长处有较大吸收,因此在 0~22 min 时,设置检测波长为 202 nm,22 min 后切换波长为 245 nm,通过波长切换方法实现多种不同结构成分的同时测定,大大提高了检测效率。

预试验中分别比较了乙醇、甲醇、50% 甲醇为提取溶剂时的提取效果,用乙醇提取时筋骨草药材饮片各成分含量均较低;用 50% 甲醇提取时哈巴苷和乙酰哈巴苷提取率较高,芹菜素、木犀草素和杯苋甾酮提取率低;用甲醇提取时 5 种成分均有相对较高的提取率。加热回流 1 h,各成分的提取率显著高于超声提取。

表 2 加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 2 Results of recovery tests($n=6$)

待测成分	取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
哈巴苷	0.504 7	4.845 1	4.796 0	9.632 1	99.81	99.06	0.56
	0.512 6	4.921 0	4.796 0	9.645 0	98.50		
	0.511 1	4.906 6	4.796 0	9.656 7	99.04		
	0.509 8	4.894 1	4.796 0	9.612 0	98.37		
	0.507 8	4.874 9	4.796 0	9.627 8	99.10		
	0.504 6	4.844 2	4.796 0	9.616 6	99.51		
乙酰哈巴苷	0.504 7	4.189 0	4.206 0	8.368 9	99.38	98.89	0.41
	0.512 6	4.254 6	4.206 0	8.387 6	98.26		
	0.511 1	4.242 1	4.206 0	8.391 9	98.66		
	0.509 8	4.231 3	4.206 0	8.387 1	98.81		
	0.507 8	4.214 7	4.206 0	8.377 7	98.98		
	0.504 6	4.188 2	4.206 0	8.362 2	99.24		
杯苋甾酮	0.504 7	0.201 9	0.200 3	0.401 1	99.46	98.97	0.77
	0.512 6	0.205 0	0.200 3	0.401 6	98.13		
	0.511 1	0.204 4	0.200 3	0.403 7	99.48		
	0.509 8	0.203 9	0.200 3	0.401 1	98.44		
	0.507 8	0.203 1	0.200 3	0.400 1	98.34		
	0.504 6	0.201 8	0.200 3	0.402 1	99.98		
木犀草素	0.504 7	0.100 9	0.098 9	0.200 1	100.26	99.61	1.23
	0.512 6	0.102 5	0.098 9	0.199 8	98.36		
	0.511 1	0.102 2	0.098 9	0.199 5	98.36		
	0.509 8	0.102 0	0.098 9	0.200 3	99.13		
	0.507 8	0.101 6	0.098 9	0.200 5	100.04		
	0.504 6	0.100 9	0.098 9	0.201 3	101.50		
芹菜素	0.504 7	0.070 7	0.070 7	0.139 9	97.94	97.15	1.08
	0.512 6	0.071 8	0.070 7	0.140 6	97.36		
	0.511 1	0.071 6	0.070 7	0.138 8	95.11		
	0.509 8	0.071 4	0.070 7	0.140 2	97.35		
	0.507 8	0.071 1	0.070 7	0.139 8	97.18		
	0.504 6	0.070 6	0.070 7	0.139 9	97.96		

表 3 样品中 5 种成分含量测定结果(% , $n=3$)

Tab. 3 Results of content determination of five constituents in the samples(% , $n=3$)

批号	哈巴苷	乙酰哈巴苷	杯苋甾酮	木犀草素	芹菜素
20160101	0.960	0.830	0.040	0.020	0.014
20180401	0.880	0.820	-	0.038	0.019
20180501	0.830	0.760	0.042	0.041	0.043
20180701	1.020	0.810	0.032	0.017	0.034
20180901	0.780	0.710	-	0.031	0.017

注: - 为含量未达到检测限。

Note: - indicates that the content doesn't reach the limit of detection.

不同批次筋骨草药材饮片中杯苋甾酮的含量差异较大,有的批次未能检测出杯苋甾酮,可能与杯苋甾酮的稳定性有关。其应在低温(0~10℃)下避光保存,如长时间暴露在空气中,含量会降低。因此,筋骨草药材在