

HPLC 测定白花蛇舌草不同采收期 及不同部位中异高山黄芩素含量

曹广尚¹, 杨培民^{1*}, 王新风¹, 李芳^{1,2}, 高鹏²

(1. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011; 2. 山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱测定不同采收期白花蛇舌草茎、叶中异高山黄芩素含量的方法。方法: 采用 Kromasil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸(44:56), 检测波长 280 nm, 柱温 35 °C。结果: 异高山黄芩素进样量在 0.145 ~ 1.595 μg 线性关系良好($r=1$)。异高山黄芩素的平均加样回收率为 99.97%, RSD 0.95%。8~9 月份采收的白花蛇舌草中异高山黄芩素含量最高, 叶中含量是茎中含量的 3~4 倍。结论: 该测定方法简便、准确、可靠, 可用于白花蛇舌草的质量控制, 并为白花蛇舌草合理采收提供理论依据。

[关键词] 白花蛇舌草; 异高山黄芩素; 高效液相色谱; 采收期; 茎; 叶

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0049-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170049

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140715.1341.015.html>

[网络出版时间] 2014-07-15 13:41

Determination of Isoscutellarein in Different Parts of *Hedyotidis diffusa* in Different Harvest Time by HPLC

CAO Guang-shang¹, YANG Pei-min^{1*}, WANG Xin-feng¹, LI Fang^{1,2}, GAO Peng²

(1. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250011, China;
2. Shandong University of TCM, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** The study was aimed to develop a HPLC method for the determination of a new active component isoscutellarein in *Hedyotidis diffusa*. **Method:** The column was Kromasil-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The acetonitrile-0.1% phosphoric acid (44:56) was used as mobile phase, with UV detection was at 280 nm, the detector drift tube and column temperature at 35 °C. **Result:** The sample showed good linear relationship with sample volume in the range of 0.145-1.595 μg for isoscutellarein ($r=1$). The average recovery of isoscutellarein was 99.97%, with a RSD value of 0.95%. The content of isoscutellarein in leaf collected in August-September was the highest and was three to four times that of the stem. **Conclusion:** The method is simple, accurate, replicable, and can be used for the quality control of isoscutellarein in *H. diffusa*. The study also provides a theoretical basis for reasonable harvest time of *H. diffusa*.

[Key words] *Hedyotidis diffusa*; isoscutellarein; HPLC; harvest time; stem; leaf relationship with sample volume

[收稿日期] 20131124(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274052); 山东省自然科学基金项目(ZR2011HL043); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2013YY052)

[第一作者] 曹广尚, 硕士, 主管药师, 从事中药制剂及质量控制研究, Tel:13793159405, 0531-68617919, E-mail: cgs198041@163.com

[通讯作者] * 杨培民, 博士, 教授、主任药师, 博士生导师, 从事中药制剂等研究, Tel:0531-68617607, E-mail: jnypm7777@126.com

白花蛇舌草为茜草科植物白花蛇舌草的干燥全草,主产于长江以南福建、广东、云南、江苏、安徽等地区,此外山东、河南、河北等地也多有栽培,具有清热、解毒、利湿之功效^[1-2],主要用于治疗恶性肿瘤、呼吸、泌尿系感染、胃肠炎、盆腔炎、附件炎等疾病,尚有提高免疫力、抗衰老、抗氧化等作用^[3-5]。主要含环烯醚萜类、黄酮类、蒽醌类、多糖等化学成分^[6]。2010 年版《中国药典》及历版药典均未收载本品,上海、山东、福建等地方标准虽有收载,但质量标准很低,仅有药材性状鉴别,未见药材指标成分的质量控制。

目前白花蛇舌草含量测定指标主要为三萜(熊果酸、齐墩果酸等)、黄酮(槲皮素、山柰酚)、环烯醚萜(车叶草酸、对香豆酰鸡屎藤苷甲酯等)和蒽醌类成分^[7-8]。本文在前期大量研究的工作基础上对其有关成分进行了分离和初步药效筛选,从中分离出一新成分,经鉴定为异高山黄芩素,与文献相关研究一致^[3]。经课题组初步药效学证实,本成分具有良好的抗肿瘤活性,本研究以该成分为指标,采用 DAD 检测器建立其含量测定方法,并对不同采收期的白花蛇舌草留样药材进行了测定,同时对药材中茎、叶中异高山黄芩素进行了比较,为本药材质控方法的完善和采收季节的确定提供科学依据。

1 材料

1260 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent,包括四元泵、DAD 检测器、自动进样器、柱温箱),AB135-S 型电子天平(METTLER TOLEDO)。

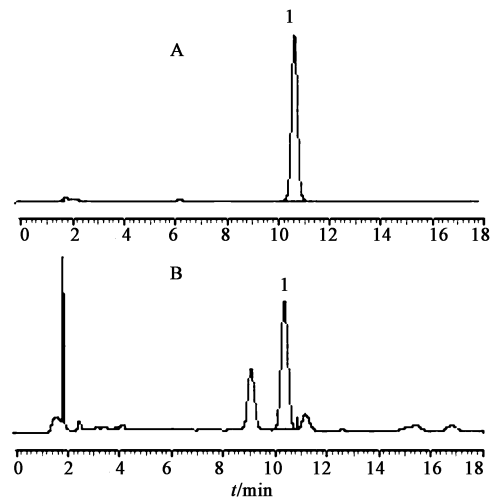
白花蛇舌草药材产地为山东临沂,经山东中医药大学李峰教授鉴定为茜草科植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd. 的干燥全草。异高山黄芩素对照品(本单位自制,分子式 $C_{15}H_{10}O_6$,经 HPLC 归一法测定其纯度 > 98%)。乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司),磷酸为色谱纯(天津科密欧化学试剂有限公司),纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸(44:56),流速 1 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,检测波长 280 nm,柱温 35 °C,理论板数按异高山黄芩素峰计算不低于 5 000。异高山黄芩素峰分离度良好,见图 1。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取异高山黄芩素对照品 15.60 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解



A. 对照品; B. 样品; 1. 异高山黄芩素

图 1 白花蛇舌草样品 HPLC

并定容至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取白花蛇舌草粉末(过 40 目筛)约 0.5 g,精密称定,置圆底烧瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,水浴回流提取 30 min,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,以微孔滤膜(0.22 μm)滤过,即得。

2.3 线性关系考察 分别精密量取 2.2.1 项下对照品储备液,加甲醇制成质量浓度分别为 14.5, 43.5, 72.5, 101.5, 130.5, 159.5 mg·L⁻¹ 的对照品溶液,分别进样 10 μL,以异高山黄芩素进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,计算得线性回归方程为 $Y = 8.55 \times 10^5 X + 4.2 \times 10^2$ ($r = 1$)。结果表明异高山黄芩素在 0.145 ~ 1.595 μg 线性关系良好。

2.4 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液 10 μL,连续进样 6 次,分别测定峰面积,结果异高山黄芩素 RSD 0.58%,表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 称取同一采收期的白花蛇舌草细粉(过 40 目筛)约 0.5 g,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 按 2.1 项色谱条件进行测定,结果异高山黄芩素峰面积 RSD 0.95%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.6 重复性试验 称取同一采收期的白花蛇舌草细粉(过 40 目筛)6 份,每份约 0.5 g,精密称定,按 2.2.2 项制备供试品溶液,按 2.1 项色谱条件进行测定,结果异高山黄芩素含量 RSD 1.45%,表明本方法重复性好。

2.7 回收率试验 取已知含量的同一采收期的白花蛇舌草细粉(过 40 目筛),约 0.25 g,共 6 份,分别精密加入 0.695 g·L⁻¹ 的对照品溶液 1 mL,挥干溶

剂,按 2.2.2 项制备供试品溶液,按 2.1 项色谱条件测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 异高山黄芩素加样回收率试验

样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.685	1.377	99.67		
0.680	1.377	100.33		
0.690	1.379	99.05	99.97	0.95
0.682	1.387	101.48		
0.689	1.381	99.64		
0.698	1.390	99.63		

注:加入量均为 0.695 mg。

2.8 供试品测定 取山东临沂地区不同采收期的白花蛇舌草粉末(过 40 目筛),各 3 份,每份 0.5 g,精密称定,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,测定峰面积,计算样品中异高山黄芩素的含量,结果见表 2。

表 2 不同采收期白花蛇舌草茎和叶中异高山黄芩素含量

采收时间	异高山黄芩素质量分数 mg·g ⁻¹	
	叶	茎
2013-06-15	1.11	0.35
2013-07-05	1.45	0.49
2013-07-26	1.98	0.70
2013-08-10	2.44	0.78
2013-08-20	2.68	0.84
2013-09-06	2.72	0.94
2013-09-20	2.38	0.76
2013-10-09	1.86	0.62
2013-10-25	1.63	0.43
2013-11-16	1.37	0.36

3 小结与讨论

本课题组对白花蛇舌草进行了一系列研究,从中分离出一活性成分明确的新化合物异高山黄芩素,建立了该成分的质控方法,并选择山东临沂地区的白花蛇舌草栽培品进行含量测定,为全面制定白花蛇舌草质控标准提供参考。

采用 DAD 检测器进行全波长扫描(190~400 nm),分析异高山黄芩素的紫外吸收光谱。测定波长为 280 nm 时,该成分有较强吸收,且成分分离好,故选择在此波长下测定。

分别试用了甲醇-水、甲醇-磷酸水系统,乙腈-水、乙腈-磷酸水系统,结果乙腈-磷酸水系统为佳,同时换用乙腈-0.1% 磷酸水(42:58)、乙腈-0.1% 磷酸水(44:56)等不同流动相比比例,结果以乙腈-0.1% 磷酸水(44:56)时异高山黄芩素峰分离好,保留时间适中,杂质无干扰,故最终确定此流动相。

供试品制备中曾分别以甲醇超声和甲醇回流处理样品,结果回流提取率较高,故选用甲醇回流提取;并继续考察了回流时间对提取率的影响,结果回流提取 30 min 异高山黄芩素成分已提取充分,故确定此提取时间。

异高山黄芩素在白花蛇舌草中的积累呈现出明显的规律,相同采收期叶和花中异高山黄芩素含量比茎中的含量高 3~4 倍,可见该成分主要分布在该全草植物的叶和花中,茎中含量较少。通过不同采收期的数据对比可以看出,自 6 月后植物体内异高山黄芩素含量逐渐增加,至 8~9 月植物体内含量最高,此时植物处于开花和结果期,10 月后药材逐渐枯萎,含量也开始降低,可见该成分以白花蛇舌草植物花果期含量最高,白花蛇舌草采集的最佳时节应为 8~9 月。由于白花蛇舌草药材资源分布广,成分复杂,还需对多批次、多地区、代表性强的样本进行测定。

[参考文献]

- [1] 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:附录 23.
- [2] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药志[M]. 南宁:广西壮族自治区人民出版社,1963:275.
- [3] Kim D H, Lee H J, Oh Y J, et al. Iridoid glycosides isolated from *Oldenlandia diffusa* inhibit LDL-oxidation [J]. Arch Pharm Res, 2005, 28(10):1156.
- [4] 黄建荣,刘咏海,喻志标,等. 白花蛇舌草化学成分和药理活性研究进展[J]. 中成药, 2005, 27(11):1329.
- [5] 陈秀珍,朱大诚,王艳辉. 白花蛇舌草药理作用及临床应用研究新进展[J]. 中药材, 2009, 32(1):157.
- [6] 施峰,贾晓斌,贾东升,等. 白花蛇舌草预防肺癌物质基础研究 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(3):403.
- [7] 晏利芝,王英锋,余启荣. HPLC 同时测定白花蛇舌草有效部位中对香豆酸和反式 6-O-对香豆酰鸡屎藤苷甲酯的含量[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(13):1554.
- [8] 张瑜,谈献和,崔小兵,等. HPLC 法测定不同产地白花蛇舌草中熊果酸和齐墩果酸的含量[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(4):274.

[责任编辑 顾雪竹]