

UPLC-PDA 测定不同产地墨旱莲中的4种皂苷

赵晶, 夏明辉, 李莉, 韩立峰, 张祎, 王涛*

(天津中医药大学 天津市中药化学与分析重点实验室, 天津 300193)

[摘要] 目的:建立墨旱莲中早莲苷 C,早莲苷 IV,早莲苷 A,刺囊酸-28-*O*- β -D-葡萄糖苷的含量测定方法。方法:样品用50%甲醇超声提取,采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 1.7 μ m),流动相乙腈-水,流速 0.3 mL·min⁻¹,检测波长 210 nm,柱温 30 $^{\circ}$ C,进样量 5 μ L。结果:早莲苷 C,早莲苷 IV,早莲苷 A,刺囊酸-28-*O*- β -D-葡萄糖苷 4 种皂苷成分的加样回收率均在 95% ~ 105%,其 RSD 均 < 3%。结论:该方法快速、简便、准确,可用于墨旱莲中早莲苷 C,早莲苷 IV,早莲苷 A,刺囊酸-28-*O*- β -D-葡萄糖苷的含量测定。

[关键词] 超相液相色谱法; 墨旱莲; 早莲苷 C; 早莲苷 IV; 早莲苷 A; 刺囊酸-28-*O*- β -D-葡萄糖苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0063-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030063

UPLC-PDA Method for Determination of Four Saponins in Eclipta Herba from Different Habitats

ZHAO Jing, XIA Ming-hui, LI Li, HAN Li-feng, ZHANG Yi, WANG Tao*

(Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of
Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determining the contents of ecliptasaponin C, ecliptasaponin IV, ecliptasaponin A, and echinocystic acid 28-*O*- β -D-glucoside in Eclipta Herba. **Method:** Samples were extracted with 50% MeOH, and the chromatographic separation was performed on Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μ m), with a mobile phase of acetonitrile-water at flow rate of 0.3 mL·min⁻¹. PDA detection was carried out at a wavelength of 210 nm. The column was maintained at 30 $^{\circ}$ C, and the injection volume was 5 μ L. **Result:** The measured data showed that the recovery rate of the four compounds ranged from 95% to 105%, and their RSD values were all less than 3%. **Conclusion:** This method is simple, precise, and rapid, and could be used for the content determination of ecliptasaponin C, ecliptasaponin IV, ecliptasaponin A, and echinocystic acid 28-*O*- β -D-glucoside in Eclipta Herba.

[Key words] UPLC; Eclipta Herba; ecliptasaponin C; ecliptasaponin IV; ecliptasaponin A; echinocystic acid 28-*O*- β -D-glucoside

墨旱莲别名早莲草、金陵草、莲子草、早莲子,为补阴常用中药之一^[1-2]。具有滋补肝肾、凉血止血之功效,主要用于肝肾阴虚、牙齿松动、须发早白、眩晕耳鸣、腰膝酸软、阴虚血热吐血、衄血、尿血、血痢、崩漏下血、外伤出血等^[3-5]。墨旱莲的化学成分主要

有三萜类、香豆草醚类、黄酮类、噻吩类、甾体类以及挥发油、有机酸等^[6-9]。关于墨旱莲的含量测定报道大多集中在香豆草醚和黄酮类上,吴红霞等^[10]采用高效液相色谱法测定了蟛蜞菊内酯的含量;原红霞等^[11-12]以蟛蜞菊内酯、异去甲基蟛蜞菊内酯、木犀草

[收稿日期] 20150115(013)

[基金项目] 天津市高等学校科技发展基金项目(20120203);高等学校博士学科点专项科研基金项目(博导类,20121210110007)

[第一作者] 赵晶,硕士,从事中药质量控制研究,Tel:022-59596163,E-mail:zhaojing19891125@163.com

[通讯作者] *王涛,博士,研究员,从事中药抗糖尿病药效物质及作用机制研究,Tel:022-59596163,E-mail:wangt@263.net

素-7-*O*-葡萄糖苷、醴肠醛为指标采用液相色谱法进行含量测定;杨海英等^[13]采用高效液相色谱法测定旱莲草中木犀草素和芹菜素的含量;邵振中等^[14]利用高效液相色谱法测定墨旱莲中齐墩果酸的含量,笔者前期对墨旱莲化学成分研究发现其皂苷类成分含量较多^[6],本实验选择早莲苷 C,早莲苷 IV,早莲苷 A,刺囊酸-28-*O*- β -*D*-葡萄糖苷为指标成分,建立了墨旱莲中 4 种皂苷成分的 UPLC 的测定方法。

1 材料

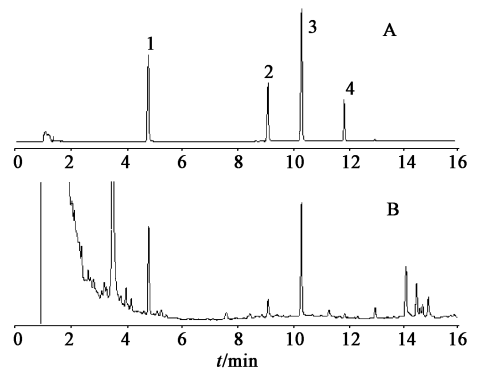
1.1 仪器与试剂 ACQUITY 型超高效液相色谱仪 (PDA 检测器,美国 Waters), Milli-Q II 型超纯水器 (美国 Millipore 公司), 3K15 型高速离心机 (美国 Sigma 公司), KQ-250E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), AX 205 型 1/10 万天平 (瑞士 Mettler Toledo), BP121S 型 1/1 万天平 (德国 Sartorius 公司), XW-80A 型涡旋混合器 (上海沪西分析仪器厂)。乙腈色谱纯,甲醇分析纯,超纯水自制;早莲苷 C,早莲苷 IV,早莲苷 A,刺囊酸-28-*O*- β -*D*-葡萄糖苷对照品均为自制 (经 HPLC-ELSD 检测,纯度均 >98%)。

1.2 药材 6 批不同产地的墨旱莲药材 (S1 ~ S6) 于 2012 年 6 月购自于河北省安国药材市场,经天津中医药大学张丽娟教授鉴定为菊科植物醴肠 *Eclipta prostrata* 的干燥地上部分。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm), VanGuard™ BEH C₁₈ 预柱 (2.1 mm × 5 mm, 1.7 μm), 流动相水 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 30% ~ 35% B; 5 ~ 15 min, 35% ~ 70% B; 15 ~ 16 min, 70% ~ 30% B), 流速 0.3 mL·min⁻¹, 样品温度 10 °C, 柱温 30 °C, 进样量 5 μL, 检测波长 210 nm。见图 1。

2.2 供试品溶液的制备 取墨旱莲药材 (过 60 目筛) 约 1 g 精密称定,置于 50 mL 的锥形瓶中,精密加入新鲜配制的 50% 甲醇 25 mL,称定质量,超声提取 30 min,室温下冷却后,再称定质量,用 50% 甲



A. 对照品; B. 供试品; 1. 早莲苷 C; 2. 早莲苷 IV; 3. 早莲苷 A; 4. 刺囊酸-28-*O*- β -*D*-葡萄糖苷

图 1 墨旱莲 UPLC

Fig. 1 UPLC chromatograms of Eclipta Herba

醇补足减失的质量,摇匀。纱布过滤后,用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,取续滤液 14 000 r·min⁻¹ 高速离心 10 min,取上清液 5 μL 进样^[15-16]。

2.3 对照品溶液的制备 取早莲苷 C,早莲苷 IV,早莲苷 A,刺囊酸-28-*O*- β -*D*-葡萄糖苷对照品约 3.98, 2.04, 4.04, 2.14 mg 分别置于 2 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 4 种对照品储备液,然后将刺囊酸-28-*O*- β -*D*-葡萄糖苷对照品储备液再稀释 2 倍得质量浓度为 535.00 mg·L⁻¹,再将 4 个对照品储备液等体积混合,依次稀释得到 7 个质量浓度的混合对照品溶液,早莲苷 C 的质量浓度为 0.50, 1.99, 4.98, 9.95, 24.88, 49.75, 248.95 μg·L⁻¹,早莲苷 IV 的质量浓度为 0.26, 1.02, 2.55, 5.10, 12.75, 25.50, 127.50 μg·L⁻¹,早莲苷 A 的质量浓度为 0.51, 2.02, 5.05, 10.10, 25.25, 50.50, 252.50 μg·L⁻¹,刺囊酸-28-*O*- β -*D*-葡萄糖苷的质量浓度为 0.13, 0.54, 1.34, 2.68, 6.69, 13.38, 66.88 μg·L⁻¹。

2.4 线性关系考察 取对照品储备液依次稀释的 7 个质量浓度的混合对照品溶液,各精密吸取 5 μL 进样,以峰面积 (Y) 对对照品溶液质量浓度 (X) 线性回归,回归方程见表 1。

表 1 墨旱莲中 4 种皂苷成分的线性方程

Table 1 Regression equations and linear ranges of four reference substances

化合物	回归方程	线性范围/μg·L ⁻¹
早莲苷 C	$Y = 3.760 \times 10^3 X - 9.020 \times 10^3$	0.50 ~ 248.75
早莲苷 IV	$Y = 5.000 \times 10^3 X - 1.580 \times 10^3$	0.26 ~ 127.50
早莲苷 A	$Y = 5.810 \times 10^3 X - 4.330 \times 10^3$	0.51 ~ 252.50
刺囊酸-28- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷	$Y = 6.150 \times 10^3 X - 5.060 \times 10^2$	0.13 ~ 66.88

注:R² 均为 0.999 9。

2.5 精密度试验 按 2.1 项色谱条件, 日内精密度为取混合对照品溶液低、中、高 3 个质量浓度各 5 μL 在同 1 d 连续重复测定 6 次, 测得早莲苷 C 低、中、高 3 个浓度峰面积的 RSD 分别为 0.6%, 0.3%, 0.7%; 早莲苷 IV 低、中、高 3 个质量浓度峰面积的 RSD 分别为 0.7%, 0.6%, 0.6%; 早莲苷 A 低、中、高 3 个质量浓度峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 0.7%, 0.3%; 刺囊酸-28-*O*- β -D-葡萄糖苷低、中、高 3 个质量浓度峰面积的 RSD 分别为 1.8%, 0.6%, 0.3%; 日间精密即连续 3 d 各进样 3 个不同质量浓度的同一份样品, 测得早莲苷 C 低、中、高 3 个质量浓度峰面积的 RSD 分别为 1.2%, 0.8%, 0.7%; 早莲苷 IV 低、中、高 3 个质量浓度峰面积的 RSD 分别为 1.8%, 0.6%, 1.2%; 早莲苷 A 低、中、高 3 个质量浓度峰面积的 RSD 分别为 1.4%, 0.7%, 1.6%; 刺囊酸-28-*O*- β -D-葡萄糖苷低、中、高 3 个质量浓度峰面积的 RSD 分别为 1.8%, 0.6%, 0.7%; 结果表明仪器的精密度良好。

2.6 重复性试验 取药材 S1 平行制备 6 份供试品溶液, 计算早莲苷 C, 早莲苷 IV, 早莲苷 A, 刺囊酸-28-*O*- β -D-葡萄糖苷的平均质量分数分别为 2.59, 0.25, 0.90, 0.12 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 0.4%, 0.3%, 1.1%, 0.4%。

2.7 稳定性试验 取同一份供试品 (S1), 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 h 时进样测定^[19], 结果早莲苷 C, 早莲苷 IV, 早莲苷 A, 刺囊酸-28-*O*- β -D-葡萄糖苷峰面积的 RSD 分别为 1.0%, 1.2%, 0.3%, 0.9%。

2.8 加样回收率试验 取同一批已知含量的墨早莲药材 S2 粉末约 0.5 g, 平行精密称定 9 份, 分别按高、中、低 3 个质量浓度水平精密加入早莲苷 C, 早莲苷 IV, 早莲苷 A, 刺囊酸-28-*O*- β -D-葡萄糖苷混合对照品溶液, 每个质量浓度 3 份, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进样测定, 计算加样回收率^[20], 结果见表 2。

2.9 样品含量测定 取不同产地的样品, 按 2.2 项下方法操作, 精密吸取供试品溶液 5 μL , 进样 3 次, 以外标法计算早莲苷 C, 早莲苷 IV, 早莲苷 A, 刺囊酸-28-*O*- β -D-葡萄糖苷的含量, 结果见表 3。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化 分别考察了不同比例的流动相甲醇-水、乙腈-水测定早莲苷 C, 早莲苷 IV, 早莲苷 A, 刺囊酸-28-*O*- β -D-葡萄糖苷 4 种皂苷成分, 其洗脱效果较好的为乙腈-水系统, 能够完全分离,

表 2 墨早莲中 4 种皂苷成分的加样回收率 ($n=3$)

Table 2 Recoveries of four constituents ($n=3$)

成分	样品中量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	平均回 收率/%	RSD /%
早莲苷 C	87.1	69.7	156.74	99.78	2.3
		87.1	172.55	97.87	1.2
		105.0	191.10	98.95	1.7
早莲苷 IV	40.8	32.6	73.06	98.97	2.2
		40.8	82.48	102.15	2.1
		49.0	90.92	102.28	2.4
早莲苷 A	230.0	287.5	522.48	101.95	2.8
		288.0	584.40	102.91	0.8
		351.0	649.57	103.01	0.8
刺囊酸-28- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	7.4	5.8	12.97	100.14	2.2
		7.2	14.61	102.86	1.1
		8.6	15.86	100.70	2.5

表 3 6 批墨早莲中 4 种皂苷成分的含量 ($n=3$)

Table 3 Results for quantification of four saponins in six batch of Eclipta Herba ($n=3$)

样品号	产地	早莲苷 C	早莲苷 IV	早莲苷 A	刺囊酸-28- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷
S1	河北	2 754.52	266.77	1 003.97	13.90
S2	河北	169.61	83.11	570.61	15.18
S3	河北	2 314.55	250.39	604.82	7.34
S4	河北	5 379.39	407.01	1 759.39	32.55
S5	河南	1 186.36	113.64	433.61	3.12
S6	河南	1 731.14	288.33	1 126.93	ND

注: ND 表示没有检测到。

峰形较好, 保留时间适合。本实验还考察了不同温度 (25, 30, 35 $^{\circ}\text{C}$) 及流速 (0.2, 0.25, 0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$) 对分离条件的影响, 其中分离效果较好的温度为 30 $^{\circ}\text{C}$, 流速 0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

3.2 提取条件的优化 实验中比较了用不同比例甲醇 (50%, 70%, 80%) 提取, 以 50% 甲醇提取效果最佳。实验还对不同提取体积 (15, 25, 35 mL), 不同超声时间 (20, 30, 40 min) 进行考察, 最终选择采用 25 mL, 30 min 作为供试品溶液的制备方法。

3.3 样品含量测定结果讨论 对不同产地的 6 个批次的墨早莲进行早莲苷 C, 早莲苷 IV, 早莲苷 A, 刺囊酸-28-*O*- β -D-葡萄糖苷 4 种皂苷成分的含量测定, 结果表明各地区不同批次中墨早莲药材中的早莲苷 C, 早莲苷 IV, 早莲苷 A, 刺囊酸-28-*O*- β -D-葡萄

糖苷的含量差异较大,可能是由于地理分布、采收季节等因素造成的。

本实验建立 UPLC-PDA 测定墨旱莲药材中的旱莲苷 C,旱莲苷 IV,旱莲苷 A,刺囊酸-28-O-β-D-葡萄糖苷 4 种皂苷成分的含量方法,该方法灵敏度高、重复性、稳定性好,结果准确,可用于墨旱莲药材的质量控制。

[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.

[2] 李娟,王玉香. 墨旱莲化学成分及药理作用研究概况[J]. 中国药师,2010,13(8):1193-1194.

[3] 汤海峰,赵越平,蒋永培. 中药墨旱莲的研究概况[J]. 西北药学杂志,1999,14(1):32-33.

[4] 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,2009,19(36):2876-2878.

[5] 过七根. 传统中药旱莲草的研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(24):12026-12027.

[6] Han L F, Zhao J, Zhang Y, et, al. Chemical constituents from dried aerial parts of *Eclipta prostrata* [J]. Chin Herb Med,2013,5(4):313-316.

[7] 韩英,夏超,陈小媛,等. 墨旱莲化学成分及药理活性的初步研究[J]. 中国中药杂志,1998,23(11):680-682.

[8] 施妈妈,张丽,丁安伟. 墨旱莲化学成分及药理作用研究[J]. 吉林中医药,2011,31(1):68-70.

[9] 袁继承,蒋永和,沈志滨. 旱莲草化学成分的研究进展[J]. 亚太传统医药,2009,5(1):125-128.

[10] 吴红霞,高晓霞,赵云丽,等. 墨旱莲药材的高效液相

指纹图谱及聚类分析[J]. 沈阳药科大学学报,2006,23(2):97-100.

[11] 原红霞,赵云丽,王晓英,等. 反相高效液相色谱法同时测定墨旱莲中的蟛蜞菊内酯和异去甲基蟛蜞菊内酯的含量[J]. 色谱,2007,25(3):371-373.

[12] 原红霞. 墨旱莲质量控制方法和相关成分药动学研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2007.

[13] 杨海英,王雪梅,杜刚,等. 高效液相色谱法测定旱莲草中木犀草素和芹菜素的含量[J]. 时珍国医国药,2008,19(12):2944-2945.

[14] 邵振中,贾晓斌,施峰,等. 反相高效液相色谱法测定墨旱莲中齐墩果酸的含量[J]. 中华中医药杂志,2009,24(7):924-926.

[15] 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]. 中国药业,2007,16(23):12-13.

[16] 周燕园. HPLC 法测定墨旱莲配方颗粒中绿原酸和咖啡酸[J]. 中成药,2012,34(2):374-377.

[17] Han L F, Liu E W, Kojo A, et al. Qualitative and quantitative analysis of *Eclipta prostrata* L. by LC/MS [J]. Sci World J,2015, Article ID 980890.

[18] 张宏梅,崔佰吉,张秀荣. HPLC 同时测定灯延颗粒中灯盏乙素、原阿片碱、芹菜素和延胡索乙素[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(24):82-85.

[19] 周燕园,吴怀恩,梁臣艳,等. HPLC 测定墨旱莲配方颗粒中的原儿茶酸和原儿茶醛[J]. 华西药学杂志,2013,28(5):514-516.

[20] 刘和平,彭招华,张润容,等. 黄芪药材中黄芪甲苷 UPLC-ELSD 含量测定方法的优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(5):37-40.

[责任编辑 顾雪竹]