

# RP-HPLC 同时测定硬尖神香草中 4 种成分含量

魏敏, 孙璇\*

(新疆医科大学第六附属医院, 乌鲁木齐 830002)

**[摘要]** 目的:建立维吾尔族药材硬尖神香草中槲皮素、咖啡酸、木犀草素、金合欢素 4 种成分的含量测定方法。方法:使用 Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.2% 乙酸水溶液(30:70), 检测波长 340 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL。结果:槲皮素、咖啡酸、木犀草素、金合欢素分别在 0.120 2~1.081 8 mg( $r=0.998\ 6$ ), 0.031~0.279 mg( $r=0.999\ 9$ ), 0.052~0.468 mg( $r=0.998\ 9$ ), 0.098 1~0.882 9 mg( $r=0.998\ 8$ ) 呈良好的线性关系, 回收率分别为 98.62% (RSD 1.4%), 97.38% (RSD 1.7%), 99.41% (RSD 1.5%), 99.81% (RSD 1.0%), 结论:采用 RP-HPLC 同时测定硬尖神香草中 4 种成分含量方法, 该方法可行且简单有效, 可作为硬尖神香草含量测定的理论指标。

**[关键词]** 硬尖神香草; 反向高效液相色谱法; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0077-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110077

## Simultaneous Determination of Four Constituents in *Hyssopus cuspidatus* by RP-HPLC

WEI Min, SUN Xuan\*

(Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for determining the contents of quercetin, caffeic acid, luteolin, and acacetin in Uygur Medicine *Hyssopus cuspidatus*. **Method:** Agilent C<sub>18</sub> chromatographic column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with methanol-0.2% acetic acid solution as the mobile phase. The detection wavelength was set at 340 nm and the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was 30 ℃ and the injection volume was 10 μL. **Result:** Quercetin, caffeic acid, luteolin, and acacetin showed good linear relationship in 0.120 2-1.081 8 mg ( $r=0.998\ 6$ ), 0.031-0.279 mg ( $r=0.999\ 9$ ), 0.052-0.468 mg ( $r=0.998\ 9$ ), and 0.098 1-0.882 9 mg ( $r=0.998\ 8$ ) respectively, and their recovery rate was 98.62% (RSD 1.4%), 97.38% (RSD 1.7%), 99.41% (RSD 1.5%), and 99.81% (RSD 1.0%) respectively. **Conclusion:** This RP-HPLC method is feasible and simple for simultaneous determination of 4 components in *H. cuspidatus*, which can provide theoretical indicators for the content determination of *H. cuspidatus*.

**[Key words]** *Hyssopus cuspidatus*; RP-HPLC; content determination

硬尖神香草是维吾尔族民间习用药<sup>[1]</sup>。多年生草本或亚灌木,喜阳耐旱,在我国广泛分布于新疆天山、阿尔泰山、准噶尔西部山地、帕米尔高原和昆仑山的山地草原<sup>[2]</sup>。维吾尔名为“祖帕”,被维吾尔族医广泛用于治疗咳嗽、气喘、支气管炎、外伤和风湿等<sup>[3]</sup>。《维吾尔药志》中记载:药用全草,全株主

要含挥发油,具有清除异常黏液质、促进机体自然随和、止咳化痰、平喘利肺的功效<sup>[4]</sup>。

国内外学者近几年报道了硬尖神香草主要含挥发油、萜类、生物碱、黄酮类等化学成分<sup>[5-6]</sup>。药理研究表明,硬尖神香草有提高超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽酶(GST)的活性<sup>[7]</sup>,还具有抗菌、

**[收稿日期]** 20150403(008)

**[第一作者]** 魏敏,主管药师,从事药物分析研究, Tel:13899883125, E-mail:45149286@qq.com

**[通讯作者]** \*孙璇,主管药师,从事药物分析研究, Tel:18167878668, E-mail:jgyyyjk@163.com

抗氧化和抗肿瘤等多种生物活性。目前针对硬尖神香草多种成分含量测定及质量研究还未见报道。本试验针对硬尖神香草中槲皮素、咖啡酸、木犀草素、金合欢素 4 种成分运用反向高效液相色谱法 (RP-HPLC) 同时测定的评价方法,为更好地控制维吾尔族药材硬尖神香草的质量和药效,以期评价其药用价值提供科学理论数据。

### 1 仪器与试药

1260 系列高效液相色谱仪 (Chemstation1260 工作站, Agilent), BS124S 型电子天平 (德国赛多利斯科学仪器厂), ZL-1 电热蒸馏水器 (北京市永光明医疗仪器厂), SZ-93 型双重纯水蒸馏器 (巩义市英峪予华仪器厂)。

药材共计 5 个批次, 购买于新疆各地药材市场、维吾尔医院 (批号分别为 20130807, 20130910, 20140403, 20131011, 20130922), 由新疆医科大学附属中医医院药学部副主任药师田红林鉴定为硬尖神香草 *Hyssopus cuspidatus* 地上干燥部分; 对照品槲皮素 (批号 100081-200406), 咖啡酸 (批号 110861-200808), 木犀草素 (批号 111520-200504), 金合欢素 (批号 111901-201001) 均购自中国食品药品检定研究院。甲醇为色谱纯, 95% 乙醇、冰乙酸为分析纯, 水为超纯水。

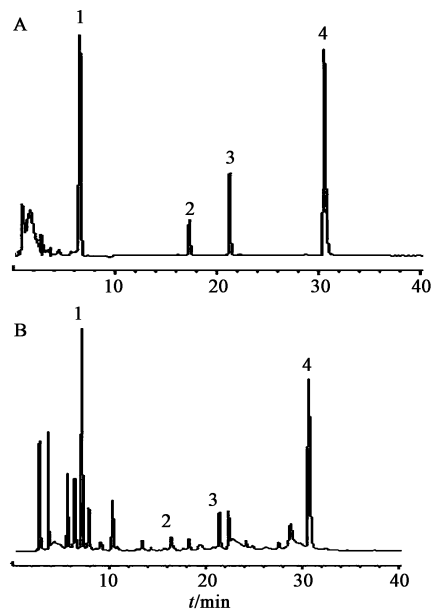
### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Agilent ZORBAX Extend C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.2% 乙酸水溶液 (30:70), 检测波长 340 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL, 按照上述条件各组分分离度良好, 见图 1。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取槲皮素、咖啡酸、木犀草素、金合欢素 12.02, 3.10, 5.20, 9.81 mg 置 10 mL 量瓶, 加入甲醇溶解并定容至刻度, 得到质量浓度分别为 1.202, 0.310, 0.520, 0.981 g·L<sup>-1</sup> 混合对照品溶液, 于 4 °C 冰箱储存备用。

**2.3 供试品溶液制备** 取硬尖神香草全草粉碎过 40 目筛, 精密称定 4 g 置于 250 mL 圆底烧瓶中, 加 70% 甲醇 40 mL, 回流提取 1 h, 提取液过滤, 水浴蒸干, 残渣用甲醇溶解, 定容至 25 mL, 摇匀, 滤液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

**2.4 线性关系考察** 精密吸取上述 2.2 项下混合对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 9.0 mL 置 10 mL 棕色量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀。按照 2.1 项下色谱条件, 分别精密吸取上述溶液各 10 μL 注入液相色谱仪, 以对照品浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标作标准曲线,



A. 对照品; B. 供试品; 1. 槲皮素; 2. 咖啡酸; 3. 木犀草素; 4. 金合欢素

图 1 硬尖神香草 HPLC

Fig. 1 HPLC of *Hyssopus cuspidatus*

得到槲皮素、咖啡酸、木犀草素、金合欢素回归方程为  $Y_1 = 2.058X + 125.9$  ( $r_1 = 0.9986$ ),  $Y_2 = 2.398.32X - 134.09$  ( $r_2 = 0.9999$ ),  $Y_3 = 1.246.06X - 105.89$  ( $r_3 = 0.9989$ ),  $Y_4 = 3.467.42X - 186.34$  ( $r_4 = 0.9988$ ), 线性范围分别为 0.120 2 ~ 1.081 8, 0.031 ~ 0.279, 0.052 ~ 0.468, 0.098 1 ~ 0.882 9 g·L<sup>-1</sup>。

**2.5 精密度试验** 精密称取硬尖神香草药材 (批号 20130807) 粉末 4.0 g, 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 重复进样 6 次, 每次进样 10 μL 测定, 结果槲皮素、咖啡酸、木犀草素、金合欢素色谱峰面积的 RSD 分别为 1.6%, 1.8%, 0.9%, 1.3%, 证明该仪器精密度良好。

**2.6 稳定性试验** 取同一批的硬尖神香草, 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 室温放置, 分别在 0, 4, 8, 12, 24 h 进样量 10 μL, 记录槲皮素、咖啡酸、木犀草素、金合欢素的峰面积, 结果峰面积 RSD 分别为 1.5%, 1.7%, 0.8%, 1.4%, 表明 24 h 内样品含量稳定。

**2.7 重复性试验** 精密称取同一批硬尖神香草供试品 6 份每份约 4.0 g, 按照 2.3 项下方法制备, 进样 10 μL, 结果槲皮素、咖啡酸、木犀草素、金合欢素质量分数分别为 5.110, 0.818, 1.956, 4.434 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 分别为 0.9%, 1.0%, 0.7%, 0.9%, 表明制备方法重复性良好。

**2.8 加样回收率试验** 精密称取同一批硬尖神香草粉末 2.0 g, 分别精密加入各对照品适量, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 槲皮素、咖啡酸、木犀草素、金合欢素回收率及 RSD 见表 2。

表 2 硬尖神香草中 4 种成分回收率试验

Table 2 Recoveries test of four compounds in *Hyssopus cuspidatus*

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测定量 /mg	回收率 /%	平均值 (RSD) /%
槲皮素	2.002	10.002	10.815	20.801	0.999	98.62
	2.000	10.024	10.815	20.536	0.972	(1.4)
	2.002	9.996	10.815	20.699	0.990	
	2.002	9.956	10.815	20.782	1.001	
	2.098	10.038	10.815	20.729	0.989	
	2.256	10.200	10.815	20.661	0.967	
咖啡酸	2.000	2.000	2.250	4.190	0.973	97.38
	2.042	2.022	2.250	4.226	0.980	(1.7)
	2.000	1.996	2.250	4.200	0.980	
	2.202	2.006	2.250	4.130	0.944	
	2.368	2.060	2.250	4.250	0.973	
	2.112	1.996	2.250	4.230	0.993	
木犀草素	2.004	3.718	3.500	7.220	1.001	99.41
	2.008	3.722	3.500	7.260	1.011	(1.5)
	2.202	3.734	3.500	7.190	0.987	
	2.098	3.716	3.500	7.210	0.998	
	2.168	3.658	3.500	7.160	1.001	
	2.242	3.756	3.500	7.140	0.967	
金合欢素	2.082	8.002	8.100	16.005	0.988	99.81
	2.204	7.996	8.100	16.024	0.991	(1.0)
	2.202	7.978	8.100	15.998	0.990	
	2.020	8.024	8.100	16.134	1.001	
	1.998	8.006	8.100	16.224	1.015	
	2.256	8.212	8.100	16.342	1.004	

**2.9 样品含量测定** 对不同产地硬尖神香草中槲皮素、咖啡酸、木犀草素、金合欢素含量测定, 计算各产地硬尖神香草中成分的含量, 见表 3。

表 3 硬尖神香草中槲皮素、咖啡酸、木犀草素、金合欢素质量分数测定

Table 3 Determination of quercetin in hard and sharp *Hyssopus officinalis*, Coffee acid, luteolin, acacetin content

样品	槲皮素	咖啡酸	木犀草素	金合欢素
1	5.351	0.881	1.781	4.678
2	5.421	0.899	2.693	3.719
3	5.283	1.201	1.394	3.722
4	3.363	1.222	1.691	4.817
5	5.382	1.162	1.667	4.559

### 3 讨论

试验中结合前期的研究基础筛选了流动相乙腈-水、甲醇-0.1% 磷酸、甲醇-0.2% 乙酸水溶液的分

离效果, 发现当乙腈-水为流动相时, 分离效果不好、杂峰较多, 甲醇-0.1% 磷酸作为流动相时, 槲皮素吸收波长 327 nm, 木犀草素吸收波长 320 nm 的峰和杂质峰难以区分, 且杂质峰较多, 当甲醇-0.2% 乙酸水溶液作为流动相时能实现槲皮素、咖啡酸、木犀草素、金合欢素和杂质峰较好分离且峰型较好, 故最终选用甲醇-0.2% 乙酸水溶液作为流动相。

分别筛选了 30%, 70%, 90% 甲醇回流提取硬尖神香草, 结果发现 30% 和 90% 甲醇回流提取槲皮素和木犀草素分离效果较差且质量分数较低。而 70% 甲醇回流提取的各项指标成分均达到最高, 色谱分离度较好。

本文运用 RP-HPLC 方法针对硬尖神香草中含有的槲皮素、咖啡酸、木犀草素、金合欢素进行含量测定。该方法能够准确、有效定性和定量其指标性成分, 能够充分利用地理和自然条件的优势, 控制和规范新疆传统维药硬尖神香草的药用价值<sup>[8-9]</sup>, 为维吾尔族医药市场更好地控制硬尖神香草的质量和评价提供有效的理论数据。

#### [参考文献]

- [1] 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志. 第 66 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 243-244.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·维吾尔药分册[S]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999: 78.
- [3] 刘勇民. 维吾尔药志. 上册[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999: 423-429
- [4] 侯敏, 马秀敏, 丁剑冰, 等. 维药神香草对哮喘大鼠血清嗜酸性粒细胞趋化因子和可溶性 P 选择素的影响[J]. 科技导报, 2009, 27(19): 90-93.
- [5] Ufuk Ozgen, Handan Sevindik, Cavit Kazaz, et al. A new Sulfated lonone Glycoside from *Sonchus erzincani* CUS [J]. Molecules, 2010, 15(4): 2593-2599.
- [6] 裘惠霞, 姚雷. 神香草及提取物的抗衰老作用[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2005, 23(1): 1-4.
- [7] Ablizl P, Cong Y Y, Musa M, et al. Chemical composition of the essential oil of *Hyssopus cuspidatus* from Xinjiang, China [J]. Chem Nat Compd, 2009, 45(3): 445-449.
- [8] Furukawa M, Makino M, Ohkoshi E, et al. Terpenoids and phenethyl glucosides from *Hyssopus cuspidatus* (Labiatae) [J]. Phytochemistry, 2011, 72(17): 2244-2252.
- [9] Li H T, Zhao N N, Yang K, et al. Chemical composition and toxicities of the essential oil derived from *Hyssopus cuspidatus* flowering aerial parts against *Sitophilus zeamais* and *Heterodera Avenae* [J]. J Med Plant Res, 2013, 7(7): 343-348.

[责任编辑 顾雪竹]