

# 夏枯草中异迷迭香酸苷 TLC 鉴别和 HPLC 含量测定

许招懂<sup>1</sup>, 王智民<sup>3</sup>, 刘菊妍<sup>4</sup>, 李春<sup>3</sup>, 林丽美<sup>2,4\*</sup>

(1. 广州星群(药业)股份有限公司, 广州 510288; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208;  
3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 4. 广州医药集团有限公司, 广州 510130)

**[摘要]** 目的: 建立夏枯草中异迷迭香酸苷的 TLC 鉴别和 HPLC 含量测定方法, 为完善夏枯草质量标准提供参考。方法: 采用薄层色谱法对夏枯草及夏枯草不同部位中的异迷迭香酸苷进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法对夏枯草中异迷迭香酸苷进行含量测定, 以 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 为色谱柱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 319 nm, 柱温 30 °C, 进样体积 10 μL, 流动相 16% 乙腈-84% 水 (含 1.0% 醋酸) 等度洗脱。结果: 异迷迭香酸苷斑点清晰, 且仅存在药用部位果穗中, 无干扰; 异迷迭香酸苷进样在 0.032 667 ~ 0.653 34 μg 与峰面积线性关系良好 ( $r = 0.999\ 9$ ), 平均回收率为 98.18%, RSD 0.25%, 异迷迭香酸苷在夏枯草中的含量 > 0.1‰。结论: 所选指标为夏枯草药用部位果穗中的特征成分, 所建立方法操作简单、专属性和重复性良好, 可作为夏枯草的质量控制方法。

**[关键词]** 夏枯草; 异迷迭香酸苷; 薄层色谱; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0106-03

## Qualitative and Quantitative Analysis of Salviaflaside in *Prunella vulgaris* by TLC and HPLC

XU Zhao-dong<sup>1</sup>, WANG Zhi-min<sup>3</sup>, LIU Ju-yan<sup>4</sup>, LI Chun<sup>3</sup>, LIN Li-mei<sup>2,4\*</sup>

(1. Guangzhou Xingqun Pharmaceutical Co. Ltd., Guangzhou 510288, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

4. Guangzhou Pharmaceutical Holdings Ltd., Guangzhou 510130)

**[Abstract]** **Objective:** To establish an effective TLC and HPLC method for qualitative and quantitative analysis of salviaflaside in *P. vulgaris* which can be used to be one of the quality control of *P. vulgaris*. **Method:** Salviaflaside was identified by TLC in *P. vulgaris* and different parts from *P. vulgaris*; salviaflaside was determined by RP-HPLC. Chromatography conditions were Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with mobile phase of acetonitrile-1.0% acetic acid (16:84), UV detection wavelength was set at 319 nm and the column temperature was set at 30 °C with the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; the sample injection was 10 μL. **Result:** The TLC spots developed were fairly clear only in flower spike with no interference; good linearity of salviaflaside was obtained in the range of 0.032 667-0.653 34 μg ( $r = 0.999\ 9$ ). The recovery of salviaflaside was 99.18% and RSD was 0.25%. The content of salviaflaside was more than 0.1‰. **Conclusion:** Salviaflaside was characteristic compound in flower spike of *P. vulgaris*. The method is simple, reliable and accurate, which can be applied as the quantity control method of *P. vulgaris*.

**[Key words]** *P. vulgaris*; salviaflaside; TLC; HPLC

夏枯草为唇形科植物夏枯草 (*Prunella vulgaris* L.) 的干燥成熟果穗, 具有清肝泻火、明目, 散结消

**[收稿日期]** 2012-02-14

**[基金项目]** 湖南省科技厅项目(2011FJ7008); 湖南省教育厅项目(11C0958)

**[第一作者]** 许招懂, 硕士, 高级工程师, 从事新药研究及质量标准化研究, Tel: 020-84051281, E-mail: xuzd1688@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 林丽美, 博士, 副教授, 从事中药药效物质基础及质量标准化研究, Tel: 0731-88458232, E-mail: lizasmile@163.com

肿之功效<sup>[1]</sup>。夏枯草是常用疗效明确的湖南道地药材,是大品种夏桑菊颗粒、王老吉凉茶等主要原料药材之一,市场需求量极大,导致非药用部位投料现象严重。2010年版《中国药典》以夏枯草主要药效成分迷迭香酸为质控指标<sup>[1]</sup>。但是,本课题组研究发现迷迭香酸存在于夏枯草各部位(果穗、叶、茎、根),且均为主要成分。可见,目前报道的夏枯草含量测定文献均没有采用夏枯草果穗的专属性成分<sup>[2-4]</sup>。本课题组从夏枯草中寻找分离到 salviaflaside,命名为“异迷迭香酸苷”,该化合物仅存在于夏枯草果穗中,叶、茎、根部位没有或极低(HPLC测不出来),属于夏枯草果穗的特征性成分。同时课题组已经建立了异迷迭香酸苷和迷迭香酸同步测定的 HPLC 方法<sup>[5]</sup>。但是所建方法需要梯度洗脱,限制了使用范围。为了提供夏枯草鉴别的简便方法,课题组建立了夏枯草中异迷迭香酸苷 TLC 鉴别和 HPLC 含量测定方法,为完善夏枯草的质量标准提供参考。

## 1 仪器、试剂和材料

Waters2695-2996 高效液相色谱系统,Empower 工作站,含四元梯度泵、自动进样器(Waters 公司);KQ-100B 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司),BPZ11D 型电子分析天平(Sartorius 公司)。

比较用夏枯草植物全草采集于药材种植基地,不同产地的夏枯草果穗购于各药材市场。所有样品均由湖南中医药大学药室刘塔斯教授鉴定为唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L.。

对照品异迷迭香酸苷(本课题组自制,通过三个 TLC 不同溶剂系统展开均为一个斑点,HPLC 鉴定其纯度 > 98%),甲醇(色谱纯,TEDEA 公司),乙腈(色谱纯,Fisher 公司),水为哇哈哈纯净水;氯仿、醋酸、甲醇、甲酸、浓硫酸(分析纯,北京化工厂),香草醛(武汉远城科技发展有限公司),硅胶 G 薄层板(本课题组自制,青岛海洋化工厂)。

## 2 TLC 鉴别

**2.1 条件** 展开剂氯仿-甲醇-甲酸(7:3:0.5),温度 15 ℃,湿度 38%,UV365 nm,显色剂 1% 香草醛浓硫酸,在 105 ℃ 加热至斑点清晰。

**2.2 对照品溶液的制备** 取对照品异迷迭香酸苷 9.8 mg,置 100 mL 量瓶,甲醇溶解定容,得对照品母液浓度为 0.098 g·L<sup>-1</sup>,取母液 3 mL,置 10 mL 量瓶,甲醇定容,配制成质量浓度为 0.032 667 g·L<sup>-1</sup> 的溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 分别取夏枯草果穗、叶、

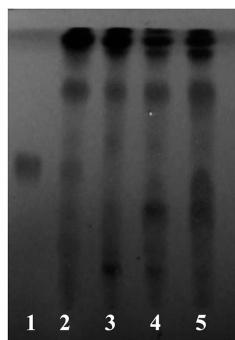
茎和根粉末约 1 g,精密称定,加甲醇 10 mL,超声 30 min(功率 250 W,频率 40 kHz),取出,静置,放凉,过滤。

分别取不同产地的夏枯草果穗样品粉末约 1 g,精密称定,加甲醇 10 mL,超声 30 min(功率 250 W,频率 40 kHz),取出,静置,放凉,过滤。

**2.4 点样、展开、显色** 分别吸取对照品溶液异迷迭香酸苷和供试品溶液 15 μL 点样于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以氯仿-甲醇-甲酸(7:3:0.5)为展开剂,展开至薄层板顶端约 0.5 cm 时取出,晾干,1% 香草醛浓硫酸显色,105 ℃ 加热至斑点清晰。

## 2.5 结果

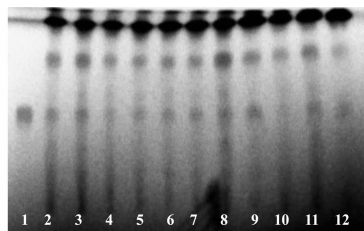
**2.5.1 夏枯草不同部位** 供试品色谱中,在于对照品色谱的相应位置上,只有夏枯草果穗显相同颜色的斑点;夏枯草叶、茎和根样品与对照品异迷迭香酸苷没有对应斑点。见图 1。



1. 对照品异迷迭香酸苷;2,3,4,5 分别为夏枯草果穗、叶、茎、根

图 1 夏枯草不同部位的 TLC

**2.5.2 不同产地夏枯草** 供试品色谱中,在于对照品色谱的相应位置上,显相同颜色的斑点。见图 2。



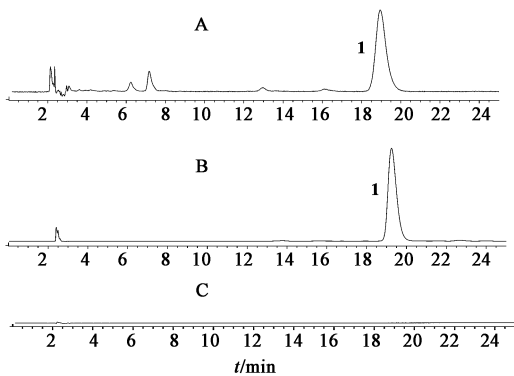
1. 对照品异迷迭香酸苷;2. 江苏;3. 湖北襄樊;4. 江苏(070518);  
5. 河南(8072701);6. 河南(8080901);7. 湖南;  
8. 安徽(803000502);9. 安徽华佗镇;10. 湖北罗田;  
11. 河南(8090623);12. 安徽亳州

图 2 不同产地夏枯草果穗的 TLC

## 3 HPLC 含量测定

**3.1 色谱条件** Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 319 nm,柱温 30 ℃,进样体积 10 μL,流动相

乙腈-1.0% 醋酸水(16:84)。按照上述色谱条件,目标色谱峰分离良好。结果见图 3。



A. 夏枯草药材; B. 对照品异迷迭香酸苷; C. 空白; 1. 异迷迭香酸苷

图 3 夏枯草药材及对照品 HPLC

**3.2 溶液制备** 对照品溶液制备: 配制过程与 2.2 项相同, 0.22 μm 滤膜滤过, HPLC 分析。

供试品溶液制备: 取夏枯草果穗粉末约 1 g, 精密称定置 50 mL 三角瓶中, 加甲醇 10 mL, 称重, 超声 30 min(功率 250 W, 频率 40 kHz), 取出, 静置, 放凉, 补重, 0.22 μm 滤膜滤过, HPLC 分析。

**3.3 标准曲线的绘制** 分别精密吸取 0.032 667 mg·L<sup>-1</sup> 的异迷迭香酸苷对照品溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20 μL, 记录按上述色谱条件测定的峰面积。以峰面积为纵坐标(Y), 进样量(μg)为横坐标(X), 得回归方程  $Y = 9.0 \times 10^6 X + 21\ 395$  ( $r = 0.999\ 9$ ), 线性范围 0.032 667 ~ 0.653 34 μg。

**3.4 精密度试验** 分别精密吸取供同一供试品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 按上述色谱条件测定异迷迭香酸苷的峰面积, 其 RSD 0.16%。

**3.5 稳定性试验** 精密吸取供同一供试品溶液 10 μL, 分别在 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 进样, 按上述色谱条件测定异迷迭香酸苷的峰面积, 其 RSD 0.18%。

**3.6 重复性试验** 取同一份样品 6 份, 精密称定, 按照 2.3.2 项下制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定异迷迭香酸苷的峰面积, 其 RSD 0.72%。

**3.7 回收率试验** 取同一批已知含量的药材粉末约 0.5 g, 精密称定, 分别精密加入 1 mL 异迷迭香酸苷对照品母液, 按 3.2 项制成加样供试品溶液, 按上述色谱条件测定含量, 计算回收率, 结果见表 1。

**3.8 含量测定** 按照上述色谱条件, 将收集的不同产地夏枯草进行处理和进样, 每一个相同产地的样品称 3 份, 每份样品平行各进样 2 次, 计算平均值。

**3.9 结果** 根据不同产地夏枯草的峰面积, 计算不同产地夏枯草中异迷迭香酸苷含量, 结果见表 2。

表 1 异迷迭香酸苷的加样回收率试验(n=6)

加入量 /mg	原有量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.098	0.0968	0.1929	98.06	98.18	0.25
0.098	0.0969	0.1928	97.86		
0.098	0.0967	0.1928	98.06		
0.098	0.0968	0.193	98.16		
0.098	0.0966	0.1931	98.47		
0.098	0.0964	0.1929	98.47		

表 2 不同产地夏枯草中异迷迭香酸苷的含量(n=3)

产地	异迷迭香酸苷 /‰	产地	异迷迭香酸苷 /‰
湖北 襄樊	0.29	河南 鹿邑	0.41
湖北 随州	0.38	河南(8072701)	0.22
湖北 罗田	0.11	河南(8080901)	0.24
安徽 亳州	0.38	河南(8090623)	0.32
安徽 华佗镇	0.44	江苏	0.31
安徽(803000502)	0.22	江苏(70518)	0.13
湖南	0.25	浙江	0.27

#### 4 讨论

TLC 分析异迷迭香酸苷夏枯草不同部位和不同产地夏枯草中的对应关系, 结果说明异迷迭香酸苷仅存在于夏枯草的果穗之中, 属于夏枯草果穗中的特征成分, 建立的 TLC 方法可以用以区别夏枯草药用部位果穗和夏枯草非药用部位叶、茎和根。该方法不仅简单, 易重复, 而且具有明显的实用性, 可以作为夏枯草的质量标准之一。

HPLC 测量全国不同产地夏枯草中异迷迭香酸苷的含量结果表明异迷迭香酸苷在夏枯草中的含量均在万分之一以上(最低值为 0.11‰), 该成分为夏枯草果穗中最主要的活性特征成分, 所建含量测定方法简单、易重复, 可以作为夏枯草特含量测定的质量标准之一。建议收录《中国药典》标准中且规定夏枯草中异迷迭香酸苷的含量不低于 0.1‰。

#### [参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010, 263.  
 [2] 刘伟, 崔永霞, 陈志红, 等. HPLC 测定不同产地夏枯草中齐墩果酸、熊果酸、迷迭香酸含量. 中医学报, 2011, 26(8): 964.  
 [3] 秦雯, 张兰珍, 石任兵. 不同产地夏枯草中熊果酸和齐墩果酸的含量比较[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(7): 478.  
 [4] 王玉霞, 尹金宝, 郭巧生, 等. 夏枯草不同部位活性成分含量动态研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 741.  
 [5] 林丽美, 许招懂, 姚江雄, 等. 中药夏枯草中异迷迭香酸苷和迷迭香酸的含量测定[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(15): 30.

[责任编辑 顾雪竹]