

HPLC 测定淡竹叶中日本当药黄素的含量

张靖^{1, 2}, 王春华^{1, 3}, 王勇⁴, 王英^{1, 3}, 李药兰^{1, 3}, 叶文才^{1, 3*}

- (1. 暨南大学中药及天然药物研究所, 广州 510632; 2. 广东省中医院中药制剂实验室, 广州 510120;
3. 中药药效物质基础及创新药物研究广东省高校重点实验室, 广州 510632;
4. 江苏省食品药品检验所, 南京 210008)

[摘要] 目的:建立中药淡竹叶中日本当药黄素的 RP-HPLC 含量测定方法。方法:高效液相色谱法,采用 Cosmosil 5 C₁₈-ms-II 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.05% 醋酸水溶液(14:86),流速 1.0 mL·min⁻¹,分析时间 20 min,检测波长 350 nm,进样体积 10 μL。结果:日本当药黄素进样量与峰面积呈良好线性关系,线性范围为 0.3~5.0 μg, $r=1.000\ 0$ ($n=5$),回收率为 100.2% ($n=6$)。结论:该方法首次测定了 8 个地区淡竹叶药材中日本当药黄素的含量,该方法准确、简便、重复性好。

[关键词] 淡竹叶;日本当药黄素;高效液相色谱;含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)06-0051-03

HPLC Determination of Swertiajaponin in Leaves of *Lophatherum gracile*

ZHANG Jing^{1,2}, WANG Chun-hua^{1,3}, WANG Yong⁴, WANG Ying^{1,3}, LI Yao-lan^{1,3}, YE Wen-cai^{1,3*}

- (1. Institute of Traditional Chinese Medicine & Natural Products, Jinan University, Guangzhou 510632, China;
2. Preparation Laboratory of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Hospital of
- Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China;
3. Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of Traditional Chinese Medicine and New
- Drugs Research, Jinan University, Guangzhou 510632, China;
4. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a reversed-phase HPLC method for the determination of swertiajaponin in the leaves of *Lophatherum gracile*. **Method:** Cosmosil 5 C₁₈-ms-II (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was adopted with the mobile phase of acetonitrile-0.05% acetic acid solution (14:86); the flow rate was 1 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was set at 350 nm. **Result:** The calibration curve was linear in the range of 0.3~5.0 μg ($r=1.000\ 0$); the average recovery was 100.2%. **Conclusion:** The content of swertiajaponin in the leaves of *L. gracile* from 8 different sources was determined for the first time. The developed method is simple, accurate with good reproducibility.

[Key words] *Lophatherum gracile*; swertiajaponin; HPLC; content determination

中药淡竹叶,禾本科(Gramineae)淡竹叶属植物 淡竹叶 *Lophatherum gracile* Brongn. 的干燥茎叶,为

[收稿日期] 20101011(004)

[基金项目] 广东省自然科学基金团队项目(8351063201000003);国家自然科学基金面上项目(81072535);澳门特别行政区科学技术发展基金(013/2008/A1)。

[第一作者] 张靖,实习研究员,硕士,从事天然药物科学研究与开发, Tel:020-39318571, E-mail: ginniezj@gmail.com

[通讯作者] * 叶文才,教授,博士生导师,从事中药及天然药物化学成分研究, Tel/Fax:020-85221559, E-mail: chywc@yahoo.com.cn

岭南地区常用道地药材。淡竹叶味甘性寒,具清热、除烦、利尿等功效,现代药理学研究表明,淡竹叶具解热、利尿、抗菌、抗肿瘤、升高血糖等药理作用^[1]。在对其化学成分的分离研究中^[2],我们得到了一系列黄酮类化合物,并进一步发现该植物主要含有黄酮碳苷类成分。其中日本当药黄酮的含量较高,为其主要化学成分之一。文献显示^[3-5],黄酮碳苷类化合物具有一定的抗氧化、抗菌、抗病毒作用,考虑到淡竹叶在临床上多用于清热解毒,故推测该类化合物可能是淡竹叶的主要药效物质基础。近年来,已有淡竹叶含量测定的相关报道^[6],且多以荭草苷或异荭草苷为对照品。但实验研究中发现,日本当药黄酮的相对含量更高,为其特征性指标成分,更适合于质量控制标准的建立。因此,本文选择以日本当药黄酮作为对照品,建立淡竹叶药材中日本当药黄酮的 RP-HPLC 含量测定方法,并测定 8 个地区淡竹叶药材中该成分的含量。

1 仪器与试药

Agilent-1200 高效液相色谱系统:G1311A 泵、G1316A 紫外检测器、色谱工作站。

日本当药黄酮对照品为自制,经光谱分析鉴定为日本当药黄酮,经 DAD 检测器检测,采用峰面积归一化法计算其纯度 > 98%;色谱纯乙腈为 Merck 公司产品,色谱纯甲醇为 Dima 公司产品,水为自制双蒸水,其他试剂均为分析纯。

方法学考察所用淡竹叶药材购自湖南长沙药材市场,产地湖南益阳(080615),由暨南大学中药及天然药物研究所周光雄教授鉴定为淡竹叶 *L. gracile* 的干燥茎叶。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

2.1.1 对照品溶液储备液的制备 精密称取日本当药黄酮对照品 10.0 mg,置 10 mL 量瓶中,加 70% 甲醇-水溶液溶解并定容至刻度,摇匀,即得。

2.1.2 供试品溶液的配制 淡竹叶干燥药材粉碎,过 60 目筛,精密称取粗粉 4.0 g,置于 100 mL 三角瓶中,精密加入 70% 甲醇溶液 100 mL,精密称定质量,超声提取 60 min (250 W, 40 kHz),温度 50 ℃。放置至室温后,精密称定质量,以 70% 甲醇溶液补足减失的质量。滤过,精密吸取续滤液 50.0 mL,减压浓缩溶剂至干,残渣加 70% 甲醇溶液使溶解,转移至 10 mL 量瓶中,加 70% 甲醇定容至刻度,摇匀,

经微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.2 色谱条件与系统适应性试验 Cosmosil 5 C₁₈-ms-II 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.05% 醋酸水溶液(14:86);流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长 350 nm;柱温 30 ℃。分别量取对照品溶液(100.6 g·L⁻¹)和供试品溶液 10 μL 进样,记录色谱图,日本当药黄酮的保留时间约为 16.7 min,与其他化学成分能达到基线分离,理论塔板数按日本当药黄酮计算为 3 200,见图 1。

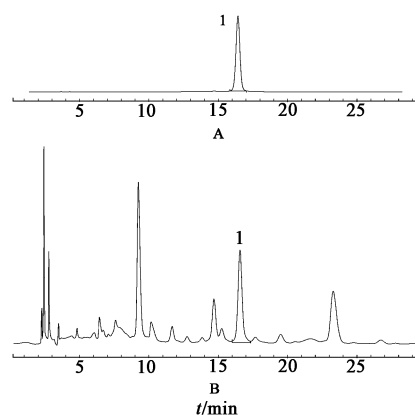


图 1 对照品(A)和淡竹叶样品(B)的 HPLC 色谱图

1. 日本当药黄酮

2.3 线性关系考察 精密量取对照品储备液(1.006 g·L⁻¹)适量,加 70% 甲醇逐级稀释,分别得到浓度为 503.0, 251.5, 125.8, 62.9, 31.4 mg·L⁻¹ 的溶液,分别精密吸取 10 μL 进样,依照上述色谱条件,以峰面积为纵坐标,进样量(μg)为横坐标,得到标准曲线,其回归方程为 $Y = 2\,097.3X - 46.519$, $r = 1.000\,0$,线性范围为 0.3 ~ 5.0 μg。

2.4 精密度试验 取对照品溶液(100.6 mg·L⁻¹)重复进样 6 次,进样量为 10 μL,测得日本当药黄酮峰面积, RSD 为 0.5%,结果表明精密度良好。

2.5 稳定性试验 取一份供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 进样 10 μL,在上述色谱条件下进行分析测定,记录峰面积,计算峰面积的 RSD 为 0.9%,结果表明供试品溶液在 8 h 内基本稳定。

2.6 重复性试验 精密称取同批样品 6 份(批号 080615),每份 4.0 g,精密称定,按供试品溶液制备方法操作,进样 10 μL,在上述色谱条件下进行分析测定,外标法计算样品中日本当药黄酮的平均质量分数 0.057%, RSD 1.9%,说明该方法的重复性良好。

2.7 加样回收率试验 精密称取已知含量的同批

药材样品 6 份(批号 080615),每份约 2.0 g。分别精密加入 1.141 g·L⁻¹的对照品溶液各 1.0 mL,按供试品溶液制备方法操作,进样 10 μL,在上述色谱条件下进行分析测定,平均加样回收率为 100.2%,RSD 2.4%,说明加样回收率良好。结果见表 1。

表 1 日本当药黄素加样回收率(n=6)

No.	样品中 含量/mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	1.109	1.136	101.99	100.24	2.4
2	1.137	1.135	99.37		
3	1.183	1.172	101.83		
4	1.202	1.164	98.58		
5	1.141	1.122	96.63		
6	1.148	1.162	103.03		

注:加入量均为 1.414mg。

2.8 样品测定 收集购自 8 个地区的药材,按上述方法进行分析测定,外标法计算样品的含量,结果见表 2。

表 2 不同产地淡竹叶中的日本当药黄素测定(n=3) %

购买地	产地	日本当药黄素
浙江金华	江西(081108)	0.04
安徽安庆	四川(080812)	0.10
宁夏银川	四川(081103)	0.04
湖南长沙	湖南(080615)	0.05
山东烟台	河南(080906)	0.05
四川成都	四川(081028)	0.05
江苏南京	四川(080708)	0.09
广东东莞	广东(080325)	0.04

3 讨论

淡竹叶药材在 2010 年版《中国药典》中并未有含量测定项。本文首次建立了以日本当药黄素为指标成分的淡竹叶药材含量测定方法,该方法准确、简便、重复性好,可用于淡竹叶药材的质量控制。

本文测定了全国 8 个不同购买地的淡竹叶药材中的日本当药黄素含量,其药材的 HPLC 色谱图基本一致,该成分的含量为 0.04% ~0.10%,其中购买自安徽安庆,产地为四川的药材中日本当药黄素含量最高。

取对照品甲醇溶液在 190 ~400 nm 进行扫描,确定最大吸收波长 350 nm 为检测波长。

本文对流动相的系统组成进行了考察,分别试用了 甲醇-水、甲醇-0.1% 醋酸水、乙腈-水、乙腈-0.1% 醋酸水、乙腈-0.05% 醋酸水等系统,根据分离情况,认为乙腈-0.05% 醋酸水溶液(14:86)系统较适宜。

本文对样品的处理方法进行了考察,分别试用了加热回流提取和超声提取法。结果显示,加热回流提取法与超声提取法得到的日本当药黄素含量差别不大,综合各项因素,认为超声提取的优点高于加热回流。

本文分别采用 50%,70%,95% 甲醇和纯甲醇考察了提取溶剂对日本当药黄素的含量的影响,结果显示 70% 甲醇溶液提取时日本当药黄素的含量最高。又分别考察了 30,60,120 min 对日本当药黄素的含量的影响,结果表明超声 60 min 时提取完全。

[参考文献]

[1] 肖培根.新编中药志.第 3 卷[M].北京:化学工业出版社,2002: 335.

[2] 张靖,王英,张晓琦,等.淡竹叶化学成分研究[J].中国天然药物,2009,7(6): 428.

[3] Islam W T, Sleem A A. Phytochemical and biological study of the flower-heads of *Gaillardia aristata* Pursh. cultivated in Egypt [J]. Bulletin of the Faculty of Pharmacy, 2006, 44 (2): 105.

[4] Cheel J, Theoduloz C, Rodriguez J. Free radical scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) [J]. Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53 (7): 2511.

[5] Kumarasamy Y, Byres M, Cox P J, et al. Isolation, structure elucidation, and biological activity of flavone 6-C-glycosides from *Alliaria petiolata* [J]. Chem Nat Comp, 2004, 40 (2): 122.

[6] 袁珂,薛月芹,殷明文. RP-HPLC 同时测定淡竹叶中 4 种黄酮苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2008, 33 (19):2215.

[责任编辑 蔡仲德]