

RP-HPLC 法测定短筒兔耳草中松果菊苷

宋杰^{1,2}, 崔保松¹, 李帅^{1*}, 马林¹, 张瑛¹, 石建功¹

1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050

2. 北京协和制药二厂, 北京 102600

摘要: 目的 建立短筒兔耳草中松果菊苷的 RP-HPLC 测定方法。方法 短筒兔耳草经流动相超声提取后, 用 RP-HPLC 法测定。采用 Alltech Prevail C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-甲醇-1%醋酸 (10:15:75), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 334 nm, 柱温为室温。结果 松果菊苷进样量在 0.46~18.40 μg 内与峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.999\ 9$); 平均回收率为 101.11%, RSD 为 2.09% ($n=6$)。结论 采用 RP-HPLC 测定短筒兔耳草药材中松果菊苷的含量, 该方法准确、快速、简便, 重复性好, 适用于短筒兔耳草中松果菊苷的质量控制。

关键词: 短筒兔耳草; 松果菊苷; RP-HPLC; 含量测定

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2013)02-0132-003

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.01.013

Determination of echinacoside in *Lagotis brevītuba* by RP-HPLC

SONG Jie^{1,2}, CUI Bao-song¹, LI Shuai¹, MA Lin¹, ZHANG Ying¹, SHI Jian-gong¹

1. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

2. Beijing Union Second Pharmaceutical Factory, Beijing 102600, China

Abstract: **Objective** To develop a RP-HPLC method for the determination of echinacoside in *Lagotis brevītuba*. **Methods** *L. brevītuba* was extracted with the mobile phase by ultrasound extraction and then determined by RP-HPLC. The chromatograph was carried out on Alltech Prevail C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-methanol-1% acetic acid (10:15:75) as the mobile phase at the flow rate of 1.0 mL/min, and the detection wavelength was set at 334 nm at room temperature. **Results** The linear range of echinacoside was 0.46—18.40 μg ($r=0.999\ 9$). The average recovery of echinacoside was 101.11% and RSD was 2.09% ($n=6$). **Conclusion** The method is accurate, quick, simple, and reproducible, and it could be used for the quality control of *L. brevītuba*.

Key words: *Lagotis brevītuba* Maxim.; echinacoside; RP-HPLC; content determination

短筒兔耳草来源于玄参科植物短筒兔耳草 *Lagotis brevītuba* Maxim. 的干燥全草, 生长在海拔 3 000~4 420 m 的高山草地及多砂砾的坡地上, 主要分布于甘肃西南部、青海东部及西藏等地。其全草入药, 为常用藏药, 称为洪连, 又名藏黄连, 始载于藏医古籍《月王药诊》、《四部医典》及《晶珠本草》。本品味苦、性寒, 具有清热解毒、行血调经之功效, 可治疗全身发热、肾炎、肺病、高血压、动脉粥样硬化、月经不调、综合物毒物中毒及“心热”症^[1-2]。目前来源于短筒兔耳草的藏药洪连广泛应用于藏医临床制剂中, 《中国药典》2005 版收载该药材及其制剂^[3], 但无质量控制方法。郑秀萍等^[4]

在 2004 年就报道从该植物中分得松果菊苷、毛蕊花糖苷等有效成分。为更好地控制短筒兔耳草药材及其制剂的质量, 本课题组在前期对其化学成分研究的基础上^[5-7], 选取主要活性成分松果菊苷为指标性成分, 建立了短筒兔耳草中松果菊苷的测定方法, 为其质量标准的控制提供了依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 包括 DAD 紫外检测器, Agilent 1100 色谱工作站 (Agilent 公司); 电子天平 (赛多利斯公司); 超声清洗器 (江苏昆山超声有限公司); 所用的甲醇、乙腈为色谱纯, 乙酸为分析纯, 水为娃哈哈纯净水。

收稿日期: 2013-01-22

基金项目: 《中国药典》2010 版一部标准研究项目 (YS-204)

*通信作者 李帅, 研究员。Tel: (010)63164628 E-mail: lishuai@imm.ac.cn

松果菊苷对照品(批号 111670-200503)购自中国食品药品检定研究院;短筒兔耳草药材采自西藏林周县(样品1)、青海大坂山(样品2)和购自青海省九康中药销售中心(样品3),经中国医学科学院药物研究所马林副研究员鉴定为玄参科短筒兔耳草 *Lagotis brevifolia* Maxim. 的全草。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取松果菊苷对照品适量,用乙腈-甲醇-1%醋酸溶液(10:15:75)溶解,制成 0.23 mg/mL 溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 短筒兔耳草粉碎,精密称取样品粉末(过四号筛)0.50 g,置具塞锥形瓶中,精密加入流动相:乙腈-甲醇-1%醋酸溶液(10:15:75)25 mL,称定质量。超声(230 W, 35 kHz)15 min,放置室温,加流动相补足减失的质量,经微孔滤膜(0.45 μ m)滤过,取续滤液,即得。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱为 Alltech Prevail C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相为乙腈-甲醇-1%醋酸溶液(10:15:75);体积流量 1.0 mL/min;柱温室温;检测波长 334 nm;进样量 20 μ L。

分别取对照品溶液及供试品溶液各 20 μ L,在“2.2”项色谱条件下,注入液相色谱仪测定,记录色谱图,见图 1。由图 1 可见,本实验条件下,样品色谱图中松果菊苷的保留时间约为 10 min,松果菊苷与其他化学成分能达到基线分离,其色谱峰与相邻色谱峰分离度良好(与相邻峰的分离度均大于 1.5),符合高效液相色谱定量分析的要求,理论塔板数以松果菊苷计算不低于 4 000。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 分别精密吸取上述对照品溶液 2、5、10、20、40、80 μ L,按上述色谱条件测定峰面积,以峰面积积分值为纵坐标,松果菊苷的进样量(μ g)为横坐标绘制标准曲线,得到松果菊苷的回归方程: $Y=972.84X-14.973$, $r=0.999\ 9$ ($n=6$)。结果表明松果菊苷进样量在 0.46~18.40 μ g 与峰面积有良好的线性关系。

2.3.2 精密度试验 精密吸取对照品溶液各 20 μ L,按“2.2”项色谱条件下,连续进样 6 次,根据松果菊苷峰面积的结果计算 RSD 值为 0.82%,结果表明仪器在分析过程中精密度良好。

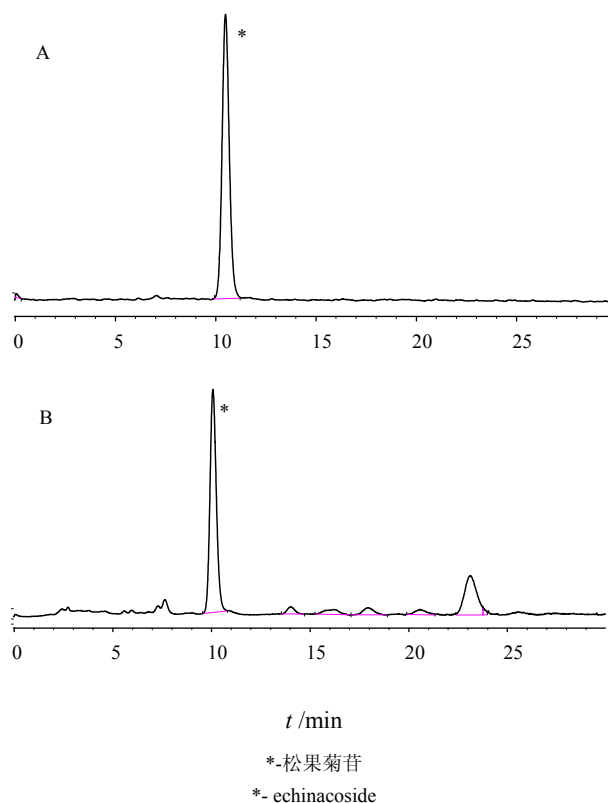


图 1 松果菊苷对照品(A)及短筒兔耳草样品(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of echinacoside reference substance (A) and *L. brevifolia* sample (B)

2.3.3 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 20 μ L,分别于 0、1、2、4、8、16、24 h 进样,在“2.2”项色谱条件下测定,根据测定的松果菊苷的峰面积的结果计算 RSD 值为 3.11%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.4 重复性试验 取同一批次(样品号 1-1)的供试品约 0.5 g,精密称定,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液 6 份,在“2.2”项色谱条件下,进行含量测定。结果样品中松果菊苷的 RSD 值为 1.17%,说明方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 取同一批(样品号 1-1)已知含量的样品(过 4 号筛)0.10 g,共 6 份,分别精密加入松果菊苷对照品 1.07、0.91、1.01、1.07、1.07、0.96 mg。按“2.1.2”项下方法制备所需溶液,在“2.2”项色谱条件下测定,计算松果菊苷平均回收率为 101.11%,RSD 值为 2.09% ($n=6$)。

2.4 样品测定

从 3 批药材中各取 2 份样品,按“2.1.2”项下的方法制备供试品溶液,在“2.2”项色谱条件下测

定,每份样品均进样3次,记录松果菊苷的峰面积,按外标法计算含量,结果见表1。

表1 短筒兔耳草样品中松果菊苷的测定结果 ($n=3$)
Table 1 Determination of echinacoside in *L. brevifolia* from different samples ($n=3$)

样品号	松果菊苷/%	RSD/%
1-1	1.02	0.43
1-2	1.01	0.28
2-1	1.23	2.49
2-2	1.24	1.28
3-1	1.41	0.49
3-2	1.41	0.20

3 讨论

本实验采用 RP-HPLC 法对短筒兔耳草中松果菊苷定量测定进行了方法学考察,并研究了短筒兔耳草中松果菊苷的最佳提取溶剂、提取方式。从实验结果来看,由流动相提取得到的样品色谱图有良好的分离度,松果菊苷峰形较好,色谱峰的面积比其他溶剂提取的大;用不同的提取方法(如超声、冷浸、索氏提取等)提取得到的峰面积相差不大,故采取简便、快速的超声提取。溶剂用量和超声时间通过实验确定为 50 倍量提取液超声 15 min。

色谱流动相参考《中国药典》2005 年版肉苁蓉中松果菊苷的含量测定方法,以乙腈-甲醇-1%醋酸溶液(10:15:75)为流动相。现有文献报道中松果菊苷的含量测定大多采用该流动相^[8]。

由 DAD 紫外检测器得到松果菊苷在 200~400 nm 紫外吸收图,其最大吸收波长在 334 nm 左右,且在 334 nm 处杂质干扰少,故选用 334 nm 为其检

测波长。

不同色谱柱的比较结果表明,采用 Alltech Prevail C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 的色谱图峰形和分离度等优于其他色谱柱。

本试验采用 HPLC-紫外检测法测定短筒兔耳草中松果菊苷的量,灵敏度高,准确性和精密度好,操作简便,色谱峰分离优良,回收率高。所建立的方法可用于短筒兔耳草药材及其制剂的质量控制。

此外,短筒兔耳草中还含有毛蕊花糖苷,但由于在此条件下 HPLC 色谱图中毛蕊花糖苷的色谱峰峰形较宽,不适合含量测定,因此只选用松果菊苷作为来源于短筒兔耳草的洪连药材的指标成分。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准 [S]. 藏药 (第 1 册). 1995.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (67 卷第 2 册) [M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2005.
- [4] 郑秀萍, 石建功. 短筒兔耳草化学成分的研究 [J]. 中草药, 2004, 35(5): 503-504.
- [5] Zong Y Y, Che C T. Glucosides from *Lagotis brevifolia* [J]. *Planta Med*, 1995, 61(6): 585-586.
- [6] 史高峰, 黄新异, 鲁润华. 藏药短筒兔耳草的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(2): 164-165.
- [7] 刘德铭, 杨仕兵, 彭 敏, 等. 藏药短筒兔耳草脂溶性化学成分的 GC-MS 分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19: 62-64.
- [8] 张思巨, 刘 丽, 于江泳, 等. HPLC 同时测定肉苁蓉药材中松果菊苷和毛蕊花糖苷含量 [J]. 中国药学杂志, 2004, 39(10): 740-741.