

HPLC 法比较不同产地夏枯草属药材中成分组成的差异性

刘光敏^{1,2}, 贾晓斌^{1,2*}, 陈彦¹, 朱粉霞¹, 封亮¹, 蒋俊¹, 施峰¹

(1 江苏省中医药研究院中药新型给药系统重点实验室, 国家中医药管理局中药口服释药系统重点研究室, 江苏 南京 210028; 2 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 目的 通过研究不同产地、品种夏枯草药材的组成差异性, 为全面评价夏枯草属药材质量提供参考依据。方法 通过 HPLC 法测定来源于 9 个产地夏枯草属 3 种药材, 夏枯草 *Prunella vulgaris* L., 山菠菜 *P. asiatica* Nakai, 硬毛夏枯草 *P. hispida* Benth 中咖啡酸、迷迭香酸、芦丁、槲皮素的量, 并计算分析各成分间的结构比。结果 不同品种的夏枯草药材中咖啡酸、迷迭香酸、芦丁、槲皮素量及组成结构比存在着较大差别; 同一品种不同产地的夏枯草药材其 4 种成分量及组成结构比也存在着较大差别。其中江西产夏枯草中咖啡酸、迷迭香酸、芦丁、槲皮素量均最高; 安徽产夏枯草和江苏产山菠菜 4 种成分量及组成结构比较相似, 分别为 1.0: 14.7: 3.9: 1.0 和 1.0: 14.8: 4.0: 0.8。结论 由于产地、品种的不同, 夏枯草属药材成分的组成存在差异性; 成分间的结构比可能是夏枯草药效差异的根本原因, 可用于夏枯草属药材的质量控制。

关键词: 夏枯草; 山菠菜; 硬毛夏枯草; 咖啡酸; 迷迭香酸; 芦丁; 槲皮素; HPLC

中图分类号: R286.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2010)08-1384-03

夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 为唇形科植物, 具有清火、明目、散结、消肿之功效, 用于目赤肿痛、目珠夜痛、头痛眩晕、瘰疬、癭瘤等症, 收载于 2005 版《中国药典》一部^[1]。夏枯草属植物在全国大部分地区均有分布, 主要有 4 种及 3 变种^[2], 市场上有多种夏枯草属药材流通。研究表明, 不同品种、不同产地夏枯草属药材药效不尽相同。咖啡酸、迷迭香酸、芦丁、槲皮素为夏枯草属药材中重要的酚酸黄酮类成分^[3-4], 具有多种药理活性^[5]。因此, 本研究采用 HPLC 法比较市场上流通的 9 个产地夏枯草属 3 种药材夏枯草 *Prunella vulgaris* L., 山菠菜 *P. asiatica* Nakai, 硬毛夏枯草 *P. hispida* Benth 中咖啡酸、迷迭香酸、芦丁、槲皮素的量及组成结构, 评价产地及品种因素对夏枯草属药材质量的影响, 为更好探讨夏枯草药效物质基础提供依据^[6]。

1 仪器与试药

Agilent 1200 型高效液相色谱仪: 包括 DAD 检测器, 四元泵; BP-211D 分析电子天平 (德国 Sartorius 公司, 十万分之一)。甲醇、冰醋酸 (TEDIA, 色谱纯)。咖啡酸对照品, 芦丁对照品, 槲皮素对照品均购自中国药品生物制品检定所, 迷迭香酸对照品购自上海顺勃生物工程有限公司 (批号 080420, 质量分数 ≥98%)。

夏枯草属药材购买于药材市场, 经南京中医药

大学吴德康教授鉴定, 分别为四川产硬毛夏枯草 *Prunella hispida* Benth, 江西、广西、湖北、安徽、贵州产夏枯草 *P. vulgaris* L., 江苏、河南、浙江产山菠菜 *P. asiatica* Nakai。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Alltima C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 检测波长 350 nm, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL。流动相为甲醇 (A)-0.1% 冰醋酸梯度洗脱 (0~10 min, 25%~40% A; 10~60 min, 40%~60% A; 60~70 min, 60%~60% A)。分析时间 70 min。体积流量 1 mL/min。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的配制: 分别精密称取恒重的对照品咖啡酸、迷迭香酸、芦丁、槲皮素适量, 加 60% 乙醇溶液分别制成浓度为咖啡酸 77.28 μg/mL、迷迭香酸 84.96 μg/mL、芦丁 238.00 μg/mL、槲皮素 30.60 μg/mL 的溶液。另各取 1 mL 配成混合对照品溶液。

2.2.2 样品溶液的制备: 取夏枯草属药材 0.5 g, 分别用 50 mL 60% 乙醇提取 (2 次, 2 h/次), 溶液回收酒精, 浓缩液于水浴挥干, 加 60% 乙醇定容至 10 mL, 制成供试品溶液。样品离心 (14 000 r/min, 15 min), 进样分析。

2.3 系统适用性试验: 分别取混合对照品溶液、样

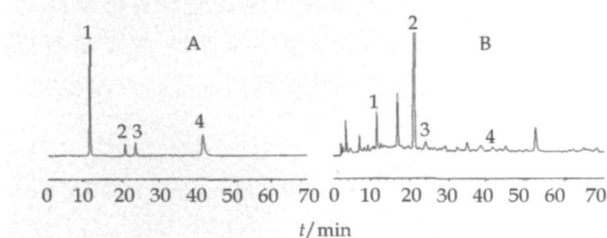
* 收稿日期: 2009-10-30

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2006155) 江苏省中医药领军人才项目 (2006, 2009)

作者简介: 刘光敏 (1985—), 在读硕士, 研究方向为中药复方药理机制及现代剂型研究。E-mail: gml1216@126.com

* 通讯作者 贾晓斌 Tel/Fax: (025) 85637809 E-mail: jxiaobin2005@hotmail.com

品溶液按上述色谱条件实验,对供试品峰和对照品峰的系统适应性参数进行考察,咖啡酸、迷迭香酸、芦丁、槲皮素的理论塔板数分别为18 221, 31 009, 9 465, 59 469。色谱图见图1。



1-咖啡酸 2-迷迭香酸 3-芦丁 4-槲皮素

1-caffeic acid 2-rosmarinic acid 3-rutin 4-quercetin

图1 对照品(A)和夏枯草药材(B) HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC Chromatograms of reference substances (A) and *Spica Prunellae* (B)

2.4 线性关系考察:取浓度分别为76.8、38.4、19.2、9.6、4.8、2.4 $\mu\text{g/mL}$ 咖啡酸对照品溶液;85.0、42.5、21.3、10.6、5.3、2.7 $\mu\text{g/mL}$ 迷迭香酸对照品溶液;238.0、119.0、59.5、29.8、14.9、7.5 $\mu\text{g/mL}$ 芦丁对照品溶液;30.6、15.3、7.7、3.8、1.9、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 槲皮素对照品溶液,分别进样20 μL ,按色谱条件测定峰面积。以峰面积为纵坐标,以进样浓度为横坐标进行线性回归,咖啡酸、迷迭香酸、芦丁、槲皮素的线性回归方程分别为 $Y=34\,862X+0.79$, $r=0.9998$; $Y=23\,570X-0.12$, $r=0.9995$; $Y=4\,690X+1.63$, $r=0.9999$; $Y=24\,347X+0.53$, $r=0.9998$;线性范围分别为2.4~76.8 $\mu\text{g/mL}$, 2.7~85.0 $\mu\text{g/mL}$, 7.5~238.0 $\mu\text{g/mL}$, 1.0~30.6 $\mu\text{g/mL}$ 。4种成分分别在其线性范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验:取同一样品溶液(安徽产地),连续进样6次,记录峰面积,计算咖啡酸、迷迭香酸、芦丁、槲皮素峰面积的RSD值分别为1.13%, 0.22%, 1.15%, 1.13%。结果表明,仪器精密度良好。

2.6 重现性试验:精密称定同一批样品(安徽产地),按供试品溶液制备方法分别制备6份供试品溶液,按上述色谱条件测定咖啡酸、迷迭香酸、芦丁、槲皮素峰面积,计算其质量分数的RSD值分别为2.18%, 1.62%, 1.60%, 1.73%,结果表明,重现性良好。

2.7 稳定性试验:取同一夏枯草样品溶液(安徽产地),分别于0、2、4、8、12、24 h进样测定,考察其稳定性。记录峰面积,计算咖啡酸、迷迭香酸、芦丁、槲

皮素峰面积的RSD值分别为1.34%、0.44%、1.13%、0.61%。结果表明,供试品溶液在24 h内稳定。

2.8 加样回收率:称取已知咖啡酸、迷迭香酸、芦丁、槲皮素量的夏枯草药材6份,每份约0.5 g,分别加入咖啡酸(9.6 $\mu\text{g/mL}$) 4.4 mL、迷迭香酸(85.0 $\mu\text{g/mL}$) 7.8 mL、芦丁(119.0 $\mu\text{g/mL}$) 1.5 mL、槲皮素(30.6 $\mu\text{g/mL}$) 1.4 mL,按供试品溶液制备方法制备,得供试品溶液。按上述色谱条件进样分析,计算咖啡酸、迷迭香酸、芦丁、槲皮素的回收率分别为99.0% (RSD=1.2%), 99.0% (RSD=0.1%), 97.8% (RSD=0.8%); 101.2 (RSD=2.3%)。

2.9 样品测定:取不同产地、不同品种夏枯草属药材,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件测定咖啡酸、迷迭香酸、芦丁、槲皮素的质量分数。结果见表1。

表1 夏枯草属药材中4种成分的量及结构比($n=3$)

Table 1 Content and ratio of four components in species of *Prunella* L. ($n=3$)

产地	药材品种	质量分数/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)				结构比
		咖啡酸	迷迭香酸	芦丁	槲皮素	
江西	夏枯草	0.15	2.31	2.12	0.52	1.0:15.4:14.1:3.5
广西	夏枯草	0.12	1.61	0.96	0.18	1.0:13.4:8.0:1.5
安徽	夏枯草	0.09	1.32	0.35	0.09	1.0:14.7:3.9:1.0
贵州	夏枯草	0.05	0.35	0.23	0.07	1.0:7.0:4.6:1.4
湖北	夏枯草	0.04	0.17	0.00	0.05	1.0:4.3:0.0:1.3
河南	山菠菜	0.14	1.19	0.81	0.08	1.0:8.5:5.8:0.6
江苏	山菠菜	0.09	1.33	0.36	0.07	1.0:14.8:4.0:0.8
浙江	山菠菜	0.06	0.90	0.22	0.09	1.0:15.0:3.7:1.5
四川	硬毛夏枯草	0.11	1.08	0.49	0.15	1.0:9.8:4.5:1.4

3 讨论

3.1 从表1可以看出,夏枯草药材中,江西樟树、广西南宁、安徽亳州、贵州贵阳、湖北随州5个产地的4种成分的量各不相同:其中江西樟树的4种成分量均最高,湖北随州4种成分量均最低,且各产地中此咖啡酸、迷迭香酸、芦丁、槲皮素4种成分内在的结构比(成分间量的比)均有很大差别:分别为1.0:15.4:14.1:3.5, 1.0:13.4:8.0:1.5, 1.0:14.7:3.9:1.0, 1.0:7.0:4.6:1.4, 1.0:4.3:0.0:1.3。山菠菜药材中,咖啡酸、芦丁为河南桐柏最高,迷迭香酸为江苏南京最高,槲皮素为浙江温州最高;浙江温州产的咖啡酸、迷迭香酸和芦丁量最低,江苏南京产地槲皮素量最低。3个产地的山菠菜结构比也存在着很大的差异。此结果说明同一品种夏枯草药材因产地不同其酚酸黄酮类成分量及结

构比均具有较大差异。

3.2 夏枯草、山菠菜、硬毛夏枯草 3 个不同品种的夏枯草药材中咖啡酸、迷迭香酸、芦丁、槲皮素 4 种成分的量及组分结构比均存在较大差异。其中安徽夏枯草和江苏山菠菜 4 种成分的量及组成结构比较相似, 分别为 1.0 : 14.7 : 3.9 : 1.0 和 1.0 : 14.8 : 4.0 : 0.8。推测原因可能是江苏、安徽两产地地域相近, 生长环境相似。本实验结果说明不同产地、不同品种夏枯草药材中的咖啡酸、迷迭香酸、芦丁、槲皮素成分量及组成结构比存在着较大差异。

3.3 在分析的九产地夏枯草药材中, 江西夏枯草中咖啡酸、迷迭香酸、芦丁、槲皮素成分量均最高, 但在对 A549 和 SPG-A-1 细胞的药效评价中, 其 IC_{50} 分别为 58.43 和 52.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[7], 按照南美抗肿瘤药物研发办公室制定的植物提取物细胞筛选实验 $IC_{50} \leq 50 \mu\text{g}$ 提取物/ mL 认为有效的标准^[8], 对肺癌细胞的抑制效果并不明显。而安徽夏枯草和江苏山菠菜此 4 类成分量均较低, 但 4 类成分间的结构比相似, 在对 A549 和 SPG-A-1 细胞的药效评价中, 均表现出了很强的肺癌细胞抑制活性。结合各

产地夏枯草属药材的药效分析^[7], 单纯的某一类或某几类成分的量较高并不一定具有更好的疗效, 即量高低与疗效强弱并无明确的相关性, 而成分间的结构比(各成分量比例)与药效具有密切相关性。这表明这种组分结构比的差异可能是造成夏枯草药材药效差异的根本原因。为保证临床疗效, 夏枯草属药材的质量应从成分量和结构比两方面进行严格控制。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005
- [2] 孟歌, 张可杰, 张明智. 夏枯草的化学成分和抗癌活性研究[J]. 西北药学杂志, 2007, 22(4): 211-213
- [3] 封亮, 贾晓斌, 陈彦, 等. 夏枯草化学成分及抗肿瘤机制研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(5): 428-433
- [4] 贾晓斌, 封亮, 陈彦, 等. 夏枯草肺癌化学预防物质基础研究思路与方法[J]. 中草药, 2009, 40(2): 316-318
- [5] 刘光敏, 贾晓斌, 王恒斌, 等. 夏枯草防治肿瘤化学成分/组分及作用机制研究进展[J]. 中药材, 2009, 32(12): 114-120
- [6] 贾晓斌, 陈彦, 李霞, 等. 中药复方物质基础研究新思路和方法[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(5): 420-425
- [7] 封亮. 夏枯草防治肺癌物质基础筛选体系的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2009
- [8] Mans D R, Rocha A B, Schwartzmann G. Anti-cancer drugs discovery and development in Brazil: Targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds [J]. *Oncologist*, 2000, 5(3): 185-198

HPLC 法同时测定救必应药材中紫丁香苷和长梗冬青苷

毕福钧¹, 钟顺好², 陈 藻³, 顾利红^{1*}

(1. 广州市药品检验所, 广东 广州 510160; 2 天祥(广州)技术服务有限公司, 广东 广州 510730;

3. 广东药学院, 广东 广州 510006)

摘要:目的 建立 HPLC 同时测定救必应药材中紫丁香苷(syringin)和长梗冬青苷(pedunculoside)的方法。方法 采用 Dikma C₁₈ 色谱柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 乙腈-水(10:90)为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 210 nm。结果 紫丁香苷线性范围为 0.198 0~3.465 0 μg , $r = 0.999\ 9$ ($n = 8$), 平均回收率为 97.1% ($n = 6$), RSD 为 1.9%; 长梗冬青苷线性范围为 0.539 8~9.446 5 μg , $r = 0.999\ 9$ ($n = 8$), 平均回收率为 99.2% ($n = 6$), RSD 为 1.6%。结论 本法操作简便、准确, 具有良好的重现性, 为救必应药材的合理利用与质量控制奠定基础。

关键词: 救必应; 紫丁香苷; 长梗冬青苷; 高效液相色谱

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)08-1386-03

救必应为冬青科植物铁冬青 *Ilex rotunda* Thunb. 的干燥树皮,《中国药典》1977 年版一部曾经有过收载, 目前收载于《广东省中药材标准》第一册。救必应具有清热解毒、凉血止血、行气止痛等功效, 用于治疗痲疹发热、感冒发热、乳蛾、脘腹胀痛,

腹泻、痢疾; 外用治烧烫伤^[1]。据文献报道, 救必应药材中含黄酮、酚类、木脂素和皂苷等化合物^[2], 其中紫丁香苷和长梗冬青苷是主要的有效成分^[3,4], 因此, 本实验采用 HPLC 法同时测定救必应药材中紫丁香苷和长梗冬青苷的量, 该方法简便, 分离效果

* 收稿日期: 2009-12-15

作者简介: 毕福钧(1982—), 男, 硕士, 药师, 主要从事药品检验和质量标准的研究工作。

Tel: (020) 26282368-335 E-mail: bifu@hot.com

* 通讯作者 顾利红 Tel: (020) 26282368-335 E-mail: gulh@gzfd.gov.cn