

HPLC法同时测定益母草中4种成分

乔晶晶，吴啟南^{*}，许一鸣，薛敏，王倩，赵玲玲

(南京中医药大学药学院，中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心，江苏省中药资源产业化过程协同创新中心，江苏南京 210023)

摘要：目的 建立HPLC法同时测定益母草 *Leonurus japonicas* Houtt. 药材中盐酸益母草碱、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷的含有量。方法 益母草70%乙醇提取液的分析采用HPLC-PDA、Waters XBridgeTM C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)；以甲醇-水(含0.1%甲酸)为流动相；体积流量1.0 mL/min；检测波长277 nm；柱温30℃。采用灰色关联度分析(GRA)对其进行综合评价。结果 盐酸益母草碱、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷分别在3.73~466(*r*=1.000 0)、0.40~198.4(*r*=0.999 9)、0.50~47.92(*r*=0.999 4)、1.83~109.68(*r*=0.999 6) μg/mL的范围内线性关系良好，平均加样回收率分别为98.25%、99.46%、98.61%、98.91%，RSDs分别为1.97%、2.67%、2.19%、2.17%。同一产地中的不同成分、不同产地中的同一成分均存在一定差异，河南-南阳的益母草样品综合品质评价最优。结论 该方法准确稳定，重复性好，可用于益母草的质量控制。

关键词：益母草；盐酸益母草碱；芦丁；金丝桃苷；异槲皮苷；HPLC

中图分类号：R284.1 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2018)11-2467-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.11.021

Simultaneous determination of four constituents in *Leonurus japonicas*

QIAO Jing-jing, WU Qi-nan^{*}, XU Yi-ming, XUE Min, WANG Qian, ZHAO Ling-ling

(Jiangsu Province Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: AIM To establish an HPLC method for simultaneous determination of leonurine hydrochloride, rutin, hyperoside and isoquercetin in *Leonurus japonicas* Houtt.. **METHODS** The analysis of 70% ethanol extract was performed on a 30 °C Waters XBridgeTM C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of methanol - water (containing 0.1% formic acid) flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 277 nm. Grey relational analysis (GRA) was used to comprehensively evaluate the quality of the samples. **RESULTS** Leonurine hydrochloride, rutin, hyperoside and isoquercetin showed good linear relationships within the ranges of 3.73~466 (*r*=1.000 0), 0.40~198.4 (*r*=0.999 9), 0.50~47.92 (*r*=0.999 4), 1.83~109.68 (*r*=0.999 6) μg/mL, whose average recoveries were 98.25%, 99.46%, 98.61%, 98.91% with the RSDs of 1.97%, 2.67%, 2.19%, 2.17%, respectively. There were some differences in components in *L. japonicas* from the same region and the same component in *L. japonicas* from different regions. The results of comprehensive evaluation showed that *L. japonicas* from Nanyang City of Henan Province were the samples with the best quality. **CONCLUSION** This accurate, stable and reproducible method can be used for the quality control of *L. japonicas*.

KEY WORDS: *Leonurus japonicas* Houtt. ; leonurine hydrochloride; rutin; hyperoside; and isoquercetin; HPLC

收稿日期：2018-02-24

基金项目：中医药行业科研专项(2015468002-3)；江苏高校优势学科建设工程资助项目(ysxk-2010)；江苏省中药资源产业化过程协同创新中心(2011)

作者简介：乔晶晶(1996—)，女，硕士生，研究方向为中药资源与鉴定。Tel: 18260092558, E-mail: qiao19900420@163.com

*通信作者：吴啟南(1963—)，男，博士，教授，博士生导师，研究方向为中药资源与鉴定。Tel: (025) 85811010, E-mail: qnwyjs@163.com

益母草为唇形科植物益母草 *Leonurus japonicas* Houtt. 的新鲜或干燥地上部分^[1]。又称茺蔚、益明、郁臭草、坤草(通称)、益母蒿、月母草(四川)等。归心、肝、膀胱经。益母草入药始见于《神农本草经》“茺蔚子”条目，列为上品。《名医别录》云“茺蔚生海滨池泽，五月采”。《本草纲目》记载“此草及子皆茺盛密蔚，故名茺蔚，其功宜于妇人及明目之精，故有益母之称”。辛、苦、微寒。具有活血调经，利水消肿，清热解毒的功效^[2]。常用于血滞经闭、痛经、经行不畅、水肿、小便不利等病症。

现代研究表明，益母草含有多种化学成分，具有广泛的药理活性、开发价值、研究意义。现已从益母草中分离得到生物碱^[3]、黄酮^[4]、二萜^[5]、挥发油^[6]、香豆素^[7]等多种类型化合物。生物碱类一直是公认的益母草有效成分，其中盐酸益母草碱是其特有的生物碱，可作为定性鉴别与定量测定的质量标志物^[8-10]，也是2015版《中国药典》规定的质量控制指标成分之一。此外，益母草中含有黄酮类化合物有抗菌、抗炎、抗氧化等多种功效^[11-12]，亦有对益母草中黄酮类化合物含有量测定的文献报道^[13,14]。本实验采用HPLC对益母草中盐酸益母草碱与芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷4种成分的含有量同时测定，以期为其质量评价提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Waters 2695 高效液相色谱仪(Waters 2998 PDA检测器)、XBridgeTM C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)(美国Waters公司)；KQ-500B型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)；AUW220D电子天平(百万分之一, 日本岛津公司)；Sartorius BT 125D型电子天平(十万分之一, 北京Sartorius公司)。SAGA-10TY实验室级超纯水仪(南京易普易达科技发展有限公司)。

1.2 试剂 对照品盐酸益母草碱(SL8020, 含有量≥98%)购自北京索莱宝科技有限公司；芦丁(JBZ-0660, 含有量≥98%)、异槲皮苷(JBZ-1459, 含有量≥98%)、金丝桃苷(JBZ-0554, 含有量≥98%)均购自南京森贝伽生物科技有限公司。无水乙醇(分析纯, 成都市科隆化学品有限公司)；乙腈(色谱纯, 美国默克公司)；甲酸(色谱纯, 批号J161006, 美国阿拉丁公司)；超纯水为实验室自制。

1.3 材料 益母草药材为各产地收集购买所得, 2468

经南京中医药大学吴啟南教授鉴定为唇形科植物益母草 *Leonurus japonicas* Houtt. 的干燥地上部分。详细信息见表1。

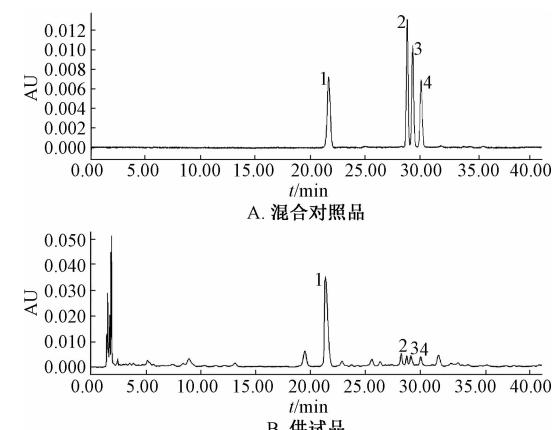
表1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

样品	产地	样品	产地
S1	河北-安国-1	S11	江苏-南京-1
S2	河北-安国-2	S12	江苏-南京-2
S3	山东-聊城	S13	江苏-淮安
S4	山东-临沂	S14	安徽-亳州
S5	湖北-鄂州	S15	河南-平顶山
S6	福建-龙岩-1	S16	安徽-六安
S7	福建-龙岩-2	S17	四川-南充
S8	河南-南阳	S18	吉林-松原
S9	江苏-宿迁	S19	广西-柳州
S10	河北-保定		

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters XBridgeTM C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)；流动相乙腈(B)-水(含0.1%甲酸, A), (0~10 min, 10% B; 10~18 min, 10%~13% B; 18~25 min, 13%~18% B; 25~35 min, 18% B; 35~40 min, 18%~30% B)梯度洗脱；体积流量1.0 mL/min；柱温30℃；进样量10 μL；检测波长277 nm。色谱图见图1。



1. 盐酸益母草碱 2. 芦丁 3. 金丝桃苷 4. 异槲皮苷
1. leonurine hydrochloride 2. rutin 3. hyperoside 4. soqueretin

图1 各成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液制备 精密称定盐酸益母草碱、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷对照品4.660、4.960、5.990、4.570 g, 分别用70%乙醇定容至5 mL量瓶中, 得各对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 精密称取益母草粉末1.0 g(过3号筛), 置于100 mL锥形瓶中, 精密

加入70%乙醇25 mL,超声(功率500 W,频率40 kHz)提取30 min,补足质量,过滤,取续滤液,过0.45 μm微孔滤膜即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 标准曲线、检测限和定量限 将各对照品

溶液逐级稀释,在“2.1”项色谱条件下进样,以对照品峰面积为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X)进行线性回归,得回归方程、相关系数和线性范围。按S/N=3计算检测限(LOD),以S/N=10计算定量限(LOQ),见表2。

表2 各成分线性关系、检测限和定量限

Tab. 2 Linear relationships, LODs and LOQs of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/(μg·mL⁻¹)	检测限/(μg·mL⁻¹)	定量限/(μg·mL⁻¹)
盐酸益母草碱	$Y = 11\ 029.24X - 886.81$	1.000 0	3.73~466	0.373	1.86
芦丁	$Y = 17\ 814.29X - 9\ 848.44$	0.999 9	0.40~198.4	0.397	0.794
金丝桃苷	$Y = 2\ 013.39X + 7\ 037.11$	0.999 4	0.50~47.92	0.048	0.366
异槲皮苷	$Y = 24\ 303.04X - 18\ 780.65$	0.999 6	1.83~109.68	0.479	0.958

2.3.2 精密度试验 将混合对照品溶液在“2.1”项色谱条件下连续进样6次,测定并记录各对照品的峰面积,计算RSD值,见表3。

表3 各成分精密度、稳定性、重复性

Tab. 3 Precision, stability and reproducibility of various constituents

成分	精密度 RSD/%	稳定性 RSD/%	重复性 RSD/%
盐酸益母草碱	1.84	1.17	1.04
芦丁	0.42	1.19	1.37
金丝桃苷	0.49	1.51	1.96
异槲皮苷	0.44	1.42	1.61

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下分别于0、2、4、6、8、10、12 h进样,测定并记录各成分的峰面积,计算其RSD值,见表3。

2.3.4 重复性试验 取同一批次样品粉末6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下测定并记录各成分的峰面积,计算含有量及其RSD值,见表3。

2.3.5 加样回收率试验 精密称定已知含有量的样品粉末9份,每3份为1组,分别加入样品中各成分含有量的80%、100%、120% 3个水平的标准品溶液,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,平行3份。测定并记录各成分的峰面积,计算回收率及其RSD值,见表4。

2.4 样品含有量测定 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样,根据线性关系计算样品中4种成分含有量,见表5。

2.5 GRA 分析

2.5.1 关联度计算 灰色关联度分析(GRA)是

表4 各成分加样回收率试验结果(n=9)

Tab. 4 Results of recovery tests for various constituents (n=9)

成分	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
盐酸益母草碱	3.185 3	2.548 2	5.693 2	98.42	98.25	1.97
	3.201 3	2.561 0	5.703 2	97.69		
	3.204 4	2.563 6	5.792 7	100.96		
	3.184 7	3.184 7	6.261 9	96.63		
	3.187 5	3.187 5	6.282 1	97.08		
	3.194 6	3.194 6	6.257 8	95.89		
	3.200 3	3.840 4	6.986 3	98.58		
	3.200 6	3.840 7	6.938 6	97.32		
	3.192 3	3.830 8	7.086 7	101.66		
芦丁	0.743 4	0.594 7	1.324 8	97.75	99.46	2.67
	0.747 2	0.597 7	1.361 6	102.80		
	0.747 9	0.598 3	1.334 9	98.11		
	0.743 3	0.743 3	1.461 6	96.64		
	0.744 0	0.744 0	1.469 8	97.57		
	0.745 6	0.745 6	1.513 9	103.05		
	0.746 9	0.896 3	1.668 3	102.79		
	0.747 0	0.896 4	1.635 7	99.14		
	0.745 1	0.894 1	1.614 8	97.28		
金丝桃苷	1.091 7	0.873 4	1.938 2	96.92	98.61	2.19
	1.097 2	0.877 7	1.959 3	98.22		
	1.098 3	0.878 6	1.998 6	102.47		
	1.091 5	1.091 5	2.152 8	97.24		
	1.092 5	1.092 5	2.162 7	97.96		
	1.094 9	1.094 9	2.152 9	96.63		
	1.096 8	1.316 2	2.385 2	97.88		
	1.097 0	1.316 3	2.387 6	98.05		
	1.094 1	1.312 9	2.435 1	102.14		
异槲皮苷	0.901 1	0.720 9	1.602 5	97.30	98.91	2.17
	0.905 6	0.724 5	1.615 6	98.00		
	0.906 5	0.725 2	1.648 5	102.31		
	0.900 9	0.900 9	1.826 7	102.76		
	0.901 7	0.901 7	1.793 8	98.93		
	0.903 7	0.903 7	1.780 7	97.04		
	0.905 3	1.086 4	1.962 8	97.33		
	0.905 4	1.086 5	1.977 2	98.64		
	0.903 1	1.083 7	1.963 9	97.89		

表5 各成分含有量测定结果(%)

Tab. 5 Results of content determination of various constituents (%)

样品	盐酸益母草碱	芦丁	金丝桃苷	异槲皮苷
S1	0.170 1	0.106 7	0.134 2	0.093 8
S2	0.053 1	0.078 4	0.052 3	0.045 9
S3	0.334 4	0.054 8	0.052 6	0.043 9
S4	0.284 4	0.026 5	0.012 3	0.028 9
S5	0.102 7	0.040 6	0.016 0	0.022 6
S6	0.111 6	0.111 3	0.118 8	0.156 5
S7	0.137 6	0.109 2	0.133 8	0.122 4
S8	0.355 1	0.068 0	0.125 6	0.071 6
S9	0.371 4	0.052 0	0.033 2	0.043 0
S10	0.270 9	0.066 0	0.009 7	0.027 1
S11	0.280 8	0.036 0	0.007 5	0.017 3
S12	0.235 1	0.043 1	0.042 1	0.035 6
S13	0.319 2	0.074 5	0.109 4	0.090 3
S14	0.164 3	0.081 6	0.024 3	0.027 9
S15	0.301 1	0.008 1	0.007 9	0.012 7
S16	0.140 5	0.033 4	0.044 7	0.032 5
S17	0.086 3	0.088 3	0.011 4	0.015 7
S18	0.311 0	0.040 9	0.089 9	0.051 3
S19	0.233 1	0.159 1	0.011 8	0.080 2
$\bar{x} \pm s$	0.224 4 ± 0.099 8	0.067 3 ± 0.036 6	0.054 6 ± 0.047 8	0.053 6 ± 0.039 2

根据因素之间发展趋势的相似或相异程度，作为衡量因素间关联程度的一种方法^[15]。应用GRA分析评价样品中盐酸益母草碱和黄酮类成分与品质的关联度，并基于品质分析不同产地益母草质量差异。公式为

$$r_{i'} = \sum_{j=1}^n (\alpha_{ij} \times \omega K)$$

其中， ωK 表示评价样品的关联度； α_{ij} 表示第*i*个评价对象在第*j*个指标上的取值； $r_{i'}$ 表示第*i*个评价对象在所有指标上的取值得分。

2.5.2 GRA分析 按照 $r_{i'}$ 的大小将各个评价对象排序， $r_{i'}$ 值越大，表示综合质量越好。不同样品的GRA分析结果见表6。从益母草药材中总成分和产地的关联度分析，总成分的含有量与河南-南阳的关联度高于其它产地，表明对河南-南阳益母草样品总成分的评价最优。以黄酮类成分为分析标准，福建-龙岩-1的评价最优。

3 讨论

3.1 提取方法选择 考察了提取溶剂和提取方法，发现以70%乙醇为提取溶剂时最佳，超声提取结果略优于加热回流，且超声提取更简单易行。在此基础上对超声提取时间进行研究，发现30 min时各成分含有量最高，最终确定最佳提取方法为70%乙醇超声提取30 min。

3.2 色谱柱与流动性选择 考察了Waters

表6 各成分GRA分析结果

Tab. 6 Results of GRA evaluation of various constituents

样品	总和		黄酮类	
	$r_{i'}$	排序	$r_{i'}$	排序
S1	0.640 092	7	0.719 846	3
S2	0.408 648	16	0.438 898	8
S3	0.529 829	8	0.416 746	9
S4	0.438 261	11	0.354 598	17
S5	0.365 209	19	0.362 491	16
S6	0.680 049	2	0.800 614	1
S7	0.662 502	3	0.765 924	2
S8	0.693 69	1	0.607 974	4
S9	0.568 744	6	0.395 526	11
S10	0.446 935	10	0.380 258	14
S11	0.433 159	13	0.351 189	18
S12	0.434 344	14	0.392 441	12
S13	0.626 188	5	0.575 247	6
S14	0.414 257	15	0.406 111	10
S15	0.436 755	12	0.333 585	19
S16	0.392 859	17	0.386 767	13
S17	0.386 772	18	0.398 23	10
S18	0.540 178	9	0.465 986	7
S19	0.585 114	4	0.605 223	5

XBridgeTM C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、Waters XBridgeTM C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)、SHI-SEIDO CAPCELL PAK C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)色谱柱，发现Waters XBridgeTM C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)色谱柱的分离度及柱效最好。另考察了不同流动相发现乙腈-0.1%甲酸可以使芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷实现基线分离，

且盐酸益母草碱峰型较好，因而最终选择乙腈-0.1%甲酸。

3.3 结果分析 结果表明不同产地之间4种成分含有量差异较大，对于芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷，建立总含有量不少于0.05%^[16]。产地结合GRA分析结果可知，各产地益母草药材成分含有量差异较大，其中河南-南阳和福建-龙岩益母草药材综合评价较好，四川-南充和湖北-益母草药材综合评价较低，各大产区并没有表现出规律性。由于盐酸水苏碱化学性质的特殊，本方法并不能测定其含有量，故而在比较益母草药材样品的角度与方法上或许存在缺陷。本实验仅以测得的4种化学成分为指标评价各产地益母草药材的品质，尚需进一步研究益母草多种成分的含有量测定方法。

参考文献：

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015.
- [2] 高学敏. 中药学[M]. 北京：中国中医药出版社，2013，325.
- [3] 罗淑荣，麦路，朱兆仪. 益母草中生物碱的分离及含量测定[J]. 中国中药杂志，1985，10(1)：32.
- [4] 邓屾，王涛，吴春华，等. 益母草黄酮类成分的分离与鉴定[J]. 中国药物化学杂志，2013，23(3)：209-212, 234.
- [5] 周勤梅，彭成，刘娟，等. 益母草属二萜类化合物的研究进展[J]. 中药材，2014，37(9)：1691-1695.
- [6] Xiong L, Peng C, Zhou Q M, et al. Chemical composition and

antibacterial activity of essential oils from different parts of *Leonurus japonicus* Houtt [J]. *Molecules*, 2013, 18 (1) : 963-973.

- [7] 杨槐，周勤梅，彭成，等. 益母草香豆素类化学成分与抗血小板聚集活性[J]. 中国中药杂志，2014，39(22)：4356-4359.
- [8] 熊亮，彭成. 基于中药质量标志物（Q-Marker）的基本条件研究益母草和赶黄草的Q-Marker[J]. 中草药，2016, 47(13)：2212-2220.
- [9] 张铁军，许浚，韩彦琪，等. 中药质量标志物（Q-marker）研究：延胡索质量评价及质量标准研究[J]. 中草药，2016, 47(9)：1458-1467.
- [10] 刘昌孝，陈士林，肖小河，等. 中药质量标志物（Q-Marker）：中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药，2016, 47 (9)：1443-1457.
- [11] 李素云，姜水印，卫洪昌，等. 益母草生物碱和黄酮成分抗大鼠心肌缺血药效学研究[J]. 上海中医药大学学报，2006, 20(1)：61-63.
- [12] 林萍，易宏伟，张斐. 金丝桃苷药理作用研究进展[J]. 中国现代中药，2012, 14(10)：23-26.
- [13] 陈军华，周光明，邓永利，等. 超声辅助萃取-高效液相色谱同时测定益母草中8种有效成分[J]. 食品科学，2016, 37(8)：86-90.
- [14] 翁爱彬，郑荔莉，方剑英. HPLC法测定益母草中的黄酮类化合物[J]. 河北医药，2013, 33(6)：926-927.
- [15] 胡鹏，张园娇，蔡静，等. 高分离度快速液相色谱质谱联用同时测定不同部位和不同加工方法的萝藦中氨基酸和核苷类成分含量[J]. 中国药学杂志，2017, 52(13)：1177-1182.
- [16] 李可强. 北豆根等五味中药材的质量与评价研究[D]. 沈阳：辽宁中医药大学，2008.

蛞蝓化学成分的研究

黄永林¹，韦用琼²，何瑞杰¹，李岳²，唐培德²，阮俊²，王亚凤^{1,3}，李典鹏¹
(1. 广西壮族自治区中国科学院，广西植物研究，所广西植物功能物质研究与利用重点实验室，广西桂林 541006；2. 广西久福生物科技有限公司，广西南宁 530012)

摘要：目的 研究蛞蝓 *Agriolimax agrestis* Linnaeus 的化学成分。**方法** 蛞蝓正己烷提取物采用结晶、半制备柱进行分离纯化，根据理化性质及波谱数据鉴定所得化合物的结构。**结果** 从中分离得到6个化合物，分别鉴定为胆固醇(1)、 β -谷甾醇(2)、链甾醇(3)、菜籽甾醇(4)、麦角甾醇(5)、豆甾醇(6)。**结论** 所有化合物均为首次从蛞蝓中分离得到。

关键词：蛞蝓；化学成分；分离鉴定

中图分类号：R284.1

文献标志码：A

文章编号：1001-1528(2018)11-2471-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.11.022

收稿日期：2017-12-01

基金项目：国家自然科学基金项目（21562008）；南宁市科技型中小企业技术创新资金项目（1298014-10）

作者简介：黄永林（1974—），男，博士，研究员，主要从事天然产物化学及开发利用研究。E-mail：hyl@gxib.cn