·基础研究·

波长切换 HPLC 同时测定车前草中 5 个活性成分的含量△

柴瑞平[1]，路娟[1]，王晓静[1,2]，赵颖[1]，吕欣锴[1]，陈曦[1,3*]

（1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所，北京　100193；2. 山东中医药大学，山东　济南　250355；
3. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所 云南分所，云南　景洪　666100）

［摘要］ **目的**：建立多波长切换 HPLC 同时测定车前草中大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木犀草素和芹菜素 5 个活性成分的含量测定方法。**方法**：采用 Waters Symmetry C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），以乙腈（A）-0.1% 甲酸水（B）溶液为流动相，梯度洗脱，检测波长为 330 nm（0～29 min 检测大车前苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷）、350 nm（29.01～31 min 检测木犀草素）和 338 nm（31.01～35 min 检测芹菜素），流速为 0.8 mL·min^{-1}，柱温为 25 ℃。**结果**：在所建立的色谱条件下各成分的专属性良好，无干扰峰；大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木犀草素和芹菜素的线性范围分别为 42.84～428.40 μg·mL^{-1}（r=0.999 7）、35.36～353.60 μg·mL^{-1}（r=0.999 5）、18.40～184.00 μg·mL^{-1}（r=0.999 5）、0.856～8.56 μg·mL^{-1}（r=0.999 6）和 0.108～1.08 μg·mL^{-1}（r=0.999 6）；平均回收率（n=6）分别为 98.62%（RSD=0.87%）、98.09%（RSD=1.10%）、98.19%（RSD=1.16%）、95.52%（RSD=1.03%）、92.34%（2.00%）；6 批车前草样品中 5 种成分的含量范围分别为 1.51～6.78、2.53～18.77、0.60～2.92、0.03～0.18、5.34～12.36 μg·g^{-1}。**结论**：该方法操作简单、准确、灵敏度高、重复性好，为车前草的质量控制提供参考依据。

［关键词］ 车前草；波长切换法；大车前苷；毛蕊花糖苷；异毛蕊花糖苷

Simultaneous Determination of 5 Active Components in Plantaginis Herba by HPLC with Wavelength Switching

CHAI Rui-ping[1], LU Juan[1], WANG Xiao-jing[1,2], ZHAO Ying[1], LYU Xin-kai[1], CHEN Xi[1*]

(1. *Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing* 100193, *China*;
2. *Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan* 250355, *China*;
3. *Yunnan Branch, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Jinghong* 666100, *China*)

［**Abstract**］ **Objective**: To establish a method for simultaneous determination of plantamajoside, acteoside, isoacteoside, luteolin and apigenin in Plantaginis herba by HPLC with wavelength switching. **Methods**: The samples were separated on a Waters Symmetry C_{18} column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) by a gradient elution using acetonitrile (A) and 0.1% formic acid (B) as mobile phase. The detection wavelength was set at 330 nm (0-29 min, for plantamajoside, acteoside, isoacteoside), at 350 nm (29.01-31 min, for luteolin), at 338 nm (31.01-35 min, for apigenin). The flow rate was 0.8 mL·min^{-1} and the column temperature was 25 ℃. **Results**: The specificity of the established method was good, and there was no interference peaks. The linear ranges of plantamajoside, acteoside, isoacteoside, luteolin and apigenin were 42.84-428.40 μg·mL^{-1} (r=0.999 7), 35.36-353.60 μg·mL^{-1} (r=0.999 5), 18.40-184.00 μg·mL^{-1} (r=0.999 5), 0.856-8.56 μg·mL^{-1} (r=0.999 6) and 0.108-1.08 μg·mL^{-1} (r=0.999 6), respectively. The average recoveries (n=6) were 98.62% (RSD=0.87%), 98.09% (RSD=1.10%), 98.19% (RSD=1.16%), 95.52% (RSD=1.03%) and 92.34% (RSD=2.00%), respectively. The contents of five components in 6 batches for samples were 1.51-6.78, 2.53-18.77, 0.60-2.92, 0.03-0.18 mg·g^{-1} and 5.34-12.36 μg·g^{-1}, respectively. **Conclusion**: The established method is simple, accurate, high sensi-

△［基金项目］ 国家自然科学基金面上项目（81673667）；中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助项目（2016-I2M-3-015，2017-I2M-B&R-09）；云南省中青年学术带头人后备人才项目（2013HB099）

*［通信作者］ 陈曦，博士，副研究员，研究方向：中药药理与毒理；Tel：（010）57833257，E-mail：chenx_ implad@163.com

tive and well reproducible, which could provide a theoretical basis for the quality control of Plantaginis herba.

[**Keywords**]　Plantaginis Herba; Wavelength switching; plantamajoside; acteoside; isoacteoside

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180402008

车前草为车前科植物车前 *Plantago asiatica* L. 和平车前 *Plantago depressa* Willd. 的干燥全草，具有清热、利尿、通淋、祛痰、凉血解毒的功效，常用于治疗热淋涩痛、水肿尿少、暑湿泄泻、痰热咳嗽、臃肿疮毒等疾病[1-4]。作为一味常用中药，始载于《神农本草经》，列为上品[5]。苯乙醇苷类化合物是车前草中极具代表性的成分，目前已经报道的车前草中苯乙醇苷类成分主要有大车前苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷等[4,6-8]。黄酮类化合物[9-11]也是车前草主要有效成分之一，主要有芹菜素、木犀草素、木犀草苷等。2015 版《中华人民共和国药典》(《中国药典》)中，以大车前苷的含量(不得少于 0.1%)作为车前草的质控标准，但是文献报道[2,7]均证实了该标准不能全面反映不同产地及不同基原车前草的质量。本研究采用多波长切换的方法对大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木犀草素和芹菜素 5 种成分在最大吸收波长下同时进行测定，以期为进一步制订与提升车前草质控标准提供参考。

1　仪器与试药

1.1 仪器

Waters Acquity 超高效液相色谱仪，配置四元高压泵、自动进样器、PDA 检测器；Mettler AB265-S 电子分析天平(Mettler Toledo 仪器有限公司)；LD-T100 型中草药粉碎机(上海顶帅电器有限公司)。

1.2 试剂与试药

对照品大车前苷(批号：150930，纯度 >98%)、毛蕊花糖苷(批号：160517，纯度 >98%)、异毛蕊花糖苷(批号：160917，纯度 >98%)、木犀草素(批号：160420，纯度 >99%)、芹菜素(批号：160503，纯度 >99%)，均购自上海融禾医药科技有限公司。乙腈(色谱纯，Fisher)，甲酸(分析纯，汕头市西陇化工有限公司)，水(屈臣氏去离子水)。

车前草共 6 批次，分别产自陕西宝鸡(1 号，购于秦岭野生中药材批发零售网店)、湖北襄阳(2 号，购于亳州中药材市场)、河南信阳(3 号，购于信阳正宗大别山农村苏仙石土特产店)、江西吉安(4 号，购于北京同仁堂有限责任公司马连洼药店)、山东潍坊(5 号，购于王小二的新田园网店)、湖北张家界(6 号，购于张家界土家族野生药材店)。经中国医学科学院药用植物研究所云南分所李海涛副研究员鉴定，1、2、6 号药材基原为车前 *Plantago asiatica* L.，3、4、5 号药材基原为平车前 *Plantago depressa* Willd.，均为正品，符合《中国药典》相关规定。

2　方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Waters Symmetry C_{18} 色谱柱(250 mm × 4.6 mm，5 μm)；以乙腈为流动相 A，0.1% 甲酸-水溶液为流动相 B，梯度洗脱(0 ~ 15 min，19% A；15 ~ 18 min，19% ~ 25% A；18 ~ 22 min，25% A；22 ~ 27 min，25% ~ 45% A；27 ~ 35 min，45% A)；流速：0.8 mL·min^{-1}，检测波长：330 nm(0 ~ 29 min)、350 nm(29.01 ~ 31 min)和 338 nm(31.01 ~ 35 min)，柱温：25 ℃，进样量：10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液　精密称取对照品大车前苷 10.71 mg、毛蕊花糖苷 10.10 mg、异毛蕊花糖苷 13.14 mg、木犀草素 8.56 mg、芹菜素 8.64 mg，用甲醇溶解并定容至 10 mL，分别制成以下质量浓度的对照品溶液：大车前苷 1.071 mg·mL^{-1}、毛蕊花糖苷 1.010 mg·mL^{-1}、异毛蕊花糖苷 1.314 mg·mL^{-1}、木犀草素 0.856 mg·mL^{-1}、芹菜素0.864 mg·mL^{-1}。移取芹菜素对照品溶液 0.5 mL，置于 10 mL 容量瓶中，甲醇稀释并定容，得质量浓度为 0.043 2 mg·mL^{-1}的芹菜素储备液。

2.2.2 混合对照品溶液　分别精密量取各对照品储备液适量，用甲醇定容，配制成含大车前苷 428.4 μg·mL^{-1}、毛蕊花糖苷 353.6 μg·mL^{-1}、异毛蕊花糖苷 184.0 μg·mL^{-1}、木犀草素 8.56 mg·mL^{-1}、芹菜素 1.08 μg·mL^{-1}的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液　各产地车前草样品均粉碎后过二号筛，精密称取 1 号样品 0.501 2 g、2 号样品 1.016 2 g、3 号样品 1.016 6 g、4 号样品 1.020 2 g、5 号样品 0.199 7 g、6 号样品 1.020 0 g，置于 50 mL

具塞锥形瓶中，精密移取 60% 甲醇 25 mL 加入锥形瓶中，称定质量，超声处理 30 min，放冷，再称定质量，用 60% 甲醇补足减少的质量，过滤，得供试品溶液。

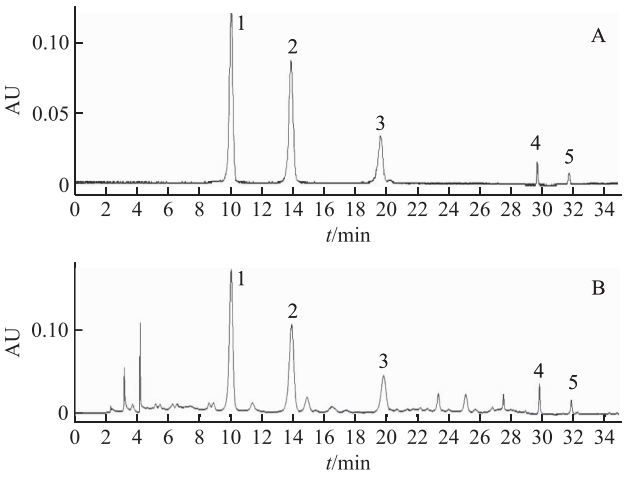
2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察　精密吸取 2.2.2 项下混合对照品溶液 1.6、1.2、0.8、0.4、0.2 mL 分别置于 2 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，过 0.22 μm 滤膜，按照 **2.1** 色谱条件进样。以对应的对照品质量浓度（$\mu g \cdot mL^{-1}$）为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y），进行线性回归，得回归方程和线性范围。将最小质量浓度混合对照品溶液逐级稀释，以仪器信噪比 S/N = 3 时作为最低检测限（LOD），S/N = 10 时作为最低定量限（LOQ），结果见表 1。

2.3.2 专属性考察　按照 **2.1** 项下色谱条件，分别精密吸取混合对照品溶液、1 号和 5 号供试品溶液各 10 μL 进样分析，记录色谱图（见图 1）。5 种被测成分分离度良好，均能达到基线分离，本方法专属性良好。

2.3.3 精密度试验　精密吸取 2.2.2 项下混合对照品溶液，按照 **2.1** 色谱条件连续进样 6 次，测得大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木犀草素和芹菜素峰面积的 RSD 分别为 0.78%、1.03%、0.95%、1.51% 和 1.62%，表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验　取 1 号样品的供试品溶液，分别在 0、2、4、8、12、24 h 按照 **2.1** 色谱条件进行测定，测得大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木犀草素和芹菜素峰面积的 RSD 分别为 1.05%、0.82%、1.22%、1.85%、2.17%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。



注：A. 混合对照品；B. 1 号样品；C. 5 号样品；1. 大车前苷；2. 毛蕊花糖苷；3. 异毛蕊花糖苷；4. 木犀草素；5. 芹菜素。

图 1　混合对照品及车前草供试样品 HPLC 图

2.3.5 重复性试验　取 1 号样品粉末约 0.5 g，共 6 份，按照 2.2.3 项下方法制备供试品溶液，按 **2.1** 项下色谱条件测定，计算含量。结果 6 份样品中，大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木犀草素和芹菜素含量的 RSD 分别为 0.96%、1.29%、1.13%、1.52% 和 2.35%，表明该方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验　取已知含量的 1 号样品粉末约 0.25 g，共 6 份，精密称定，每份中精密加入按照 2.2.2 项下配制的混合对照品溶液 4 mL，按照 2.2.3 项下方法制备供试品溶液，按 **2.1** 色谱条件测定，结果见表 2、3。由表中各成分平均回收率及 RSD 可以看出，该方法加样回收率符合要求。

表 1　5 个活性成分的回归方程、线性范围、定量限及检测限测定结果

成分	回归方程	r	线性范围/ $\mu g \cdot mL^{-1}$	定量限（LOD）/ng	检测限（LOQ）/ng
大车前苷	$Y = 2.069\,4 \times 10^4 X + 1.733\,8 \times 10^4$	0.999 7	42.84 ~ 428.40	1.07	3.21
毛蕊花糖苷	$Y = 2.182\,9 \times 10^4 X + 1.101\,6 \times 10^5$	0.999 5	35.36 ~ 353.60	1.18	3.53
异毛蕊花糖苷	$Y = 1.814\,1 \times 10^4 X + 3.797\,1 \times 10^4$	0.999 5	18.40 ~ 184.00	0.92	2.74
木犀草素	$Y = 5.828\,1 \times 10^4 X - 3.139\,4 \times 10^3$	0.999 6	0.856 ~ 8.56	0.57	1.71
芹菜素	$Y = 5.907\,2 \times 10^5 X - 7.080\,6 \times 10^3$	0.999 6	0.108 ~ 1.08	0.36	1.08

表 2　车前草中大车前苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的加样回收率试验结果

成分	样品量/g	各成分含有量/mg	对照品加入量/mg	测得量/mg	回收率（%）	平均回收率（%）	RSD（%）
大车前苷	0.266 1	1.804 2	1.713 6	3.453 2	98.16	98.62	0.87
	0.253 7	1.720 1	1.713 6	3.412 0	99.37		
	0.272 4	1.846 9	1.713 6	3.542 6	99.50		
	0.263 9	1.789 2	1.713 6	3.457 8	98.71		

续表 2

成分	样品量/g	各成分含有量/mg	对照品加入量/mg	测得量/mg	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
	0.258 8	1.754 7	1.713 6	3.428 1	98.84		
	0.263 2	1.784 5	1.713 6	3.398 4	97.15		
毛蕊花糖苷	0.266 1	1.378 4	1.414 4	2.757 1	98.72	98.09	1.10
	0.253 7	1.314 2	1.414 4	2.686 6	98.46		
	0.272 4	1.411 0	1.414 4	2.753 2	97.44		
	0.263 9	1.367 0	1.414 4	2.696 4	96.94		
	0.258 8	1.340 6	1.414 4	2.749 3	99.79		
	0.263 2	1.363 4	1.414 4	2.699 3	97.17		
异毛蕊花糖苷	0.266 1	0.777 0	0.736 0	1.506 1	99.54	98.19	1.16
	0.253 7	0.740 8	0.736 0	1.427 7	96.67		
	0.272 4	0.795 4	0.736 0	1.498 9	97.88		
	0.263 9	0.770 6	0.736 0	1.487 2	98.71		
	0.258 8	0.755 7	0.736 0	1.448 4	97.10		
	0.263 2	0.768 5	0.736 0	1.492 7	99.21		

表 3　车前草中木犀草素和芹菜素的加样回收率试验结果

成分	样品量/g	各成分含有量/μg	对照品加入量/μg	测得量/μg	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
木犀草素	0.266 1	47.90	34.24	79.02	96.20	95.52	1.03
	0.253 7	45.67	34.24	76.54	95.79		
	0.272 4	49.03	34.24	80.36	96.50		
	0.263 9	47.50	34.24	76.85	94.02		
	0.258 8	46.58	34.24	76.34	94.45		
	0.263 2	47.38	34.24	78.47	96.15		
芹菜素	0.266 1	3.29	4.32	7.21	94.76	92.34	2.00
	0.253 7	3.14	4.32	6.72	90.13		
	0.272 4	3.37	4.32	7.08	92.11		
	0.263 9	3.26	4.32	7.15	94.30		
	0.258 8	3.20	4.32	6.91	91.90		
	0.263 2	3.25	4.32	6.88	90.85		

2.4 样品含量测定

取 2.2.3 供试品溶液，按照 **2.1** 色谱条件进行含量测定，计算 1 ~6 号供试品中各成分的含量，结果见表 4。

表 4　车前草中 5 个活性成分含量测定结果(n = 3)

$mg \cdot g^{-1}$

编号	质量分数				
	大车前苷	毛蕊花糖苷	异毛蕊花糖苷	木犀草素	芹菜素
1	6.78	5.18	2.92	0.18	12.36
2	2.97	–	–	–	–
3	1.51	2.53	0.60	0.06	5.34
4	–	3.99	–	–	–
5	–	18.77	1.25	0.03	–
6	3.54	–	–	–	–

注：-表示含量未达到检测限

3　讨论

从表 4 可以看出，不同产地的车前草样品中各成分的含量差异较大，1 号、2 号、3 号和 6 号样品中大车前苷含量均达到了《中国药典》中规定的含量限度，其中 1 号样品中大车前苷含量最高。4 号和 5 号样品中未检测到大车前苷的存在，以毛蕊花糖苷为主成分，其中 5 号样品中毛蕊花糖苷含量最高。1 号陕西宝鸡样品中 5 种成分的含量均较高，质量最佳，这可能与土壤、采收季节、基原和环境等因素有关。因此以单一成分大车前苷作为中药的质控指标不足以反映其整体信息，多成分同时进行定量，可以准确地控制车前草的质量，保证中药质量的稳定性。

中药成分复杂，在一个波长下难以体现所有成分的特征，故采用波长切换法。大车前苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷为苯乙醇苷类化合物，苯乙醇苷类化合物在 220、247、290、330 nm 均有较大吸收，一般选择样品杂峰数目更少的 330 nm 作为检测波长[4]。木犀草素最大吸收波长为 350 nm[12]，芹菜素最大吸收波长选择 338 nm[13]。

本研究建立的多波长切换 HPLC 用于车前草药材中大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木犀草素和芹菜素含量的同时测定，通过方法学考察表明该方法准确、简单。实验测得不同产地车前草药材质量存在较大差异，所以需要用多成分同时定量以保证药材质量稳定性，该方法可以为车前草药材的质量控制提供参考。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:69.

[2] 黄桃芬,卢丹逸,喻芳君,等. HPLC 法同时测定车前草中 4 种成分的含量[J]. 中药材,2017,40(3):645-648.

[3] 颜佩芳,刘桂英,赵士敏,等. 平车前化学成分的研究[J]. 中国药学杂志,2009,44(1):19-21.

[4] 封传华,任琦,汤小林,等. 车前草中总苯乙醇苷及毛蕊花糖苷的含量测定[J]. 中国药师,2017,20(8):1477-1479.

[5] 王锦军,张秀梅,王宏林. 反相高效液相色谱法同时测定车前草中槲皮素、木犀草素、山柰酚、芹菜素的含量[J]. 中成药,2009,31(5):772-775.

[6] 杨洋,封传华,李刚,等. 车前草中总苯乙醇苷提取工艺研究[J]. 中国现代中药,2018,20(1):93-97.

[7] 孙虔,耿放,程雪梅,等. 车前草中大车前苷的定性和定量分析[J]. 中国中药杂志,2010,35(16):2095-2098.

[8] 许兵兵,黄碧涛,曾金祥,等. 车前子及车前草中毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷的含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2016(18):64-67.

[9] 张雪芹,曲玮,梁敬钰. 车前草化学成分和药理作用研究进展[J]. 海峡药学,2013,25(11):1-8.

[10] Nishibe S. Studies on the flavonoids of the Plantago herbs [J]. Nat Med,1995,49(3):340.

[11] Janković T, Zdunĭ G, Beara I, et al. Comparative study of some polyphenols in Plantago, species[J]. Biochemi Syst Ecol,2012,42:69-74.

[12] 王柯,王艳艳,赵东保,等. HPLC 法测定金银花不同部位中木犀草素及其苷的含量[J]. 河南大学学报(自然科学版),2011,41(1):39-43.

[13] 王晓静,路娟,彭纪铭,等. 密蒙花中 4 个化合物含量的多波长高效液相色谱法测定[J]. 时珍国医国药,2017(10):2329-2331.

(收稿日期　2018-04-02)

(上接第 1091 页)

[9] Qu L, Chen J B, Zhang G J, et al. Chemical profiling and adulteration screening of Aquilariae Lignum Resinatum by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and two-dimensional correlation infrared (2D-IR) spectroscopy [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2016, 174: 177-182.

[10] Xiang L, Wang J, Zhang G, et al. Analysis and identification of two similar traditional Chinese medicines by using a three-stage infrared spectroscopy: Ligusticum chuanxiong, Angelica sinensis, and their different extracts [J]. J Mol Struct Mol Struct, 2016, 1124: 164-172.

[11] Liu H, Sun S, Lu G, et al. Discrimination of extracted lipophilic constituents of Angelica with multi-steps infrared macro-fingerprint method[J]. Vib Spectrosc, 2006, 40(2): 202-208.

[12] Liu H X, Sun S Q, Lu G H, et al. Study on Angelica and its different extracts by Fourier transform infrared spectroscopy and two-dimensional correlation IR spectroscopy[J]. Spectrochimi Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2006, 64(2): 321-326.

[13] 吕光华,孙素琴,梁曦云,等. 归头和归尾二维相关红外光谱法的鉴别研究[J]. 光谱学与光谱分析,2004,24(3):311-314.

[14] Li J R, Sun S Q, Wang X X, et al. Differentiation of five species of Danggui, raw materials by FTIR combined with 2D-COS IR[J]. J Mol Struct, 2014, 1069(1): 229-235.

[15] Chen J B, Sun S Q, Zhou Q. Data-driven signal-resolving approaches of infrared spectra to explore the macroscopic and microscopic spatial distribution of organic and inorganic compounds in plant. [J]. Anal Bioanal Chem, 2015, 407(19): 5695-5706.

(收稿日期　2018-04-18)