# 益母草流浸膏的指纹图谱和多指标成分含量测定方法研究

钟宁远[1]，张文婷[2*]，唐登峰[2](1.绍兴市食品药品检验中心，浙江 绍兴 312071；2.浙江省食品药品检验研究院，杭州 310004)

**摘要：目的** 建立益母草流浸膏的指纹图谱方法及多指标成分含量测定方法。**方法** 通过水饱和正丁醇萃取，采用 HPLC，Kromasil $C_{18}$(250 mm×4.6 mm，5 μm)色谱柱，柱温 30 ℃，流动相为乙腈-0.1%甲酸，梯度洗脱，流速为 1.0 mL·min$^{-1}$，检测波长为 275 nm。**结果** 建立益母草流浸膏的 HPLC 指纹图谱，得到共有峰 6 个，指认其中 3 个并测定含量，对羟基苯甲酸、丁香酸和盐酸益母草碱分别在进样量 3.952~790.4 ng($r$=1.000 0)、10.427~2 085.4 ng($r$=1.000 0)和 6.983~ 1 396.6 ng($r$=0.999 9)内呈良好的线性关系；平均回收率分别为 98.6%、97.8%和 97.9%，RSD 分别为 1.5%、2.0%和 1.8%。**结论** 该指纹图谱特征性明显，方法简便，重复性好，可为益母草流浸膏提供有效的鉴别依据；多指标含量测定方法可同时控制指纹图谱中 3 个成分的含量，方法简便、准确，可为综合评价和控制产品质量提供依据。

**关键词：**益母草流浸膏；指纹图谱；含量测定

**中图分类号：**R917.101　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1007-7693(2015)12-1467-05

**DOI:** 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.12.014

## Fingerprint Method and Multi-Component Quantification Analysis Method Study of Leonurus Liquid Extract

ZHONG Ningyuan[1], ZHANG Wenting[2*], TANG Dengfeng[2](*1.Shaoxing Institute for Food and Drug Control, Shaoxing 312071, China; 2.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China*)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish the fingerprint chromatogramand multi-component quantification analysis method of Leonurus liquid extract. **METHODS** Extracted by n-Buthyl alcohol, the extract was analyzed on Kromasil $C_{18}$ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm)and the temperature of column was 30 ℃. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min$^{-1}$. The detection wavelength was at 275 nm. **RESULTS** HPLC fingerprint of characteristic components of Leonurus liquid extract was established for the first time, 6 common peaks were figured out, and 3 of them were identified and determinated. P-hydroxybenzoic acid, syringic acid, and hydrochloric acid leonurine showed good linearities in the ranges of 3.952−790.4 ng($r$=1.000 0), 10.427−2 085.4ng($r$=1.000 0) and 6.983−1 396.6 ng($r$=0.999 9), the average recoveries were 98.6%, 97.8% and 97.9%, with RSD of 1.5%, 2.0% and 1.8%, respectively. **CONCLUSION** The HPLC characteristic fingerprint for the identification of Leonurus liquid extract was specific, simple and reproducible. The established multi-component quantification analysis method could be used to control the quality of Leonurus liquid extract, and provided the basis of comprehensive evaluation and quality control.

**KEY WORDS:** Leonurus liquid extract, fingerprint, content determination

益母草流浸膏为益母草经加工制成的流浸膏剂，同益母草一样具有活血调经之功效，用于血瘀所致的月经不调，症见经水量少，一直为《中国药典》收载品种。但比较益母草流浸膏和益母草药材的现行标准可以发现，益母草流浸膏现行质量标准质控指标中只对水苏碱单一特征成分进行控制，而没有关注到其他化学成分的情况，难以从整体上把握益母草流浸膏的内在品质。大量文献表明[1-3]，盐酸益母草碱为益母草中最主要的活性成分之一，具有补益子宫、保护心血管系统、降低血液粘度、兴奋子宫平滑肌等作用。丛悦等[4]首次从益母草中分离得到丁香酸、苯甲酸等酚酸类成分，并对这类酚酸类成分做了药理实验，证明其对子宫肌具有很强的作用。其中丁香酸具有很好的抗内毒素作用[5]、抗肿瘤和抗氧化等作用[6]。

由于益母草流浸膏采用的是水提醇沉工艺，其成分可能主要集中在极性较大的部分，本课题希望从中寻找出特征性成分，建立指纹图谱，同时进行多成分含量测定来有效控制益母草流浸膏的质量，从而提高和完善益母草流浸膏质量标准。

## 1　仪器与试剂

### 1.1　仪器

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)；AE-240 电子天平(Mettler Toledo)；

**作者简介：**钟宁远，女，硕士，主管药师　Tel: (0575)88361692　E-mail: ningyuan_123@163.com　***通信作者：**张文婷，女，博士，主任中药师　Tel: (0571)86459425　E-mail: leozhwt@163.com

UNIVERSAL 320R 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司)；KQ-300VDB 型双频数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 试药与样品

盐酸益母草碱对照品(中国药品生物制品检定研究院，批号：111823-201202，含量以 94.7%计)；对羟基苯甲酸对照品(上海晶纯试剂有限公司，批号：130122，纯度：99%)；丁香酸对照品(上海晶纯试剂有限公司，阿拉丁 22852，纯度：98%)；乙腈(MERCK 公司，色谱纯)；超纯水；其余试剂均为分析纯；6 批益母草流浸膏样品由国内 3 家药品生产企业提供，样品信息见表 1。

**表 1** 样品信息

**Tab. 1** Samples information

| 编号 | 生产企业 | 批号 |
|---|---|---|
| G01 | 四川成都同道堂制药有限责任公司 | 100401 |
| G02 | 四川成都同道堂制药有限责任公司 | 100402 |
| G03 | 四川成都同道堂制药有限责任公司 | 100403 |
| G04 | 四川逢春制药有限公司 | 130205 |
| G05 | 广东万年青制药有限公司 | 130301 |
| G06 | 广东万年青制药有限公司 | 130302 |

## 2 方法和结果

### 2.1 色谱条件和系统适应性试验

色谱柱：Kromasil $C_{18}$(250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相：乙腈(A)-0.1%甲酸(B)，梯度洗脱程序如下：0→20 min，7%A→15%A；20→40 min，15%A→22.5%A。柱温：30 ℃；流速：1.0 mL·min$^{-1}$；检测波长：275 nm；进样量：5 μL。在此色谱条件下，各特征峰可达到较好分离，生成的对照指纹图谱见图 1。对照品定位、混合对照品与样品溶液 HPLC 色谱图见图 2。

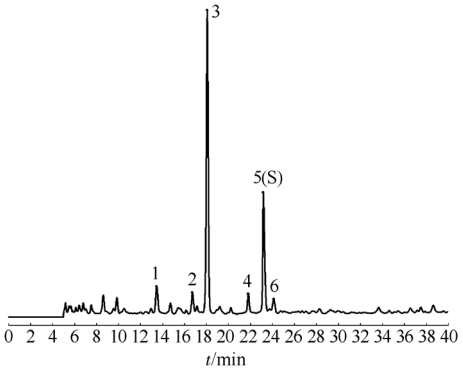


**图 1** 益母草流浸膏对照指纹图谱

1–对羟基苯甲酸；3–丁香酸；5–盐酸益母草碱；2，4，6–特征峰。

**Fig. 1** Fingerprint chromatogram of Leonurus liquid extract

1–p-hydroxybenzoic acid; 3–syringic acid; 5–hydrochloric acid leonurine, 2, 4, 6–characteristic peak.

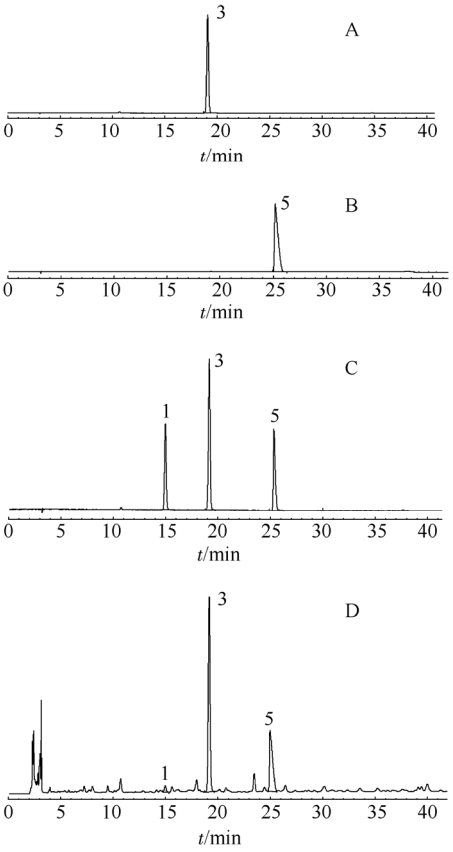


**图 2** 高效液相色谱图

A–丁香酸对照品；B–盐酸益母草碱对照品；C–混合对照品溶液；D–供试品溶液；1–对羟基苯甲酸；3–丁香酸；5–盐酸益母草碱。

**Fig. 1** HPLC chromatograms

A–syringic acid; B–hydrochloric acid leonurine; C–mixed standard solution; D-sample solution; 1–p-hydroxybenzoic acid; 3–syringic acid; 5–hydrochloric acid leonurine.

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取对羟基苯甲酸、丁香酸和盐酸益母草碱对照品适量，加 70%乙醇制成浓度分别为 39.52，104.27，69.83 μg·mL$^{-1}$ 的混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

精密量取益母草流浸膏 5 mL，蒸干，用 20 mL 水分次溶散到分液漏斗中，再用水饱和的正丁醇萃取 4 次，每次 20 mL，合并正丁醇液，蒸干，用 70%乙醇定容至 10 mL，离心，取上清液，即得。

### 2.4 指纹图谱方法学考察

**2.4.1** 精密度试验 取同一供试品溶液(G05)，按“2.1”项下方法连续进样 6 次，记录色谱图，测定主要共有峰的相对保留时间和相对峰面积，结果显示，主要共有峰 6 个，1~6 号峰相对保留时间的 RSD 均<0.2%，相对峰面积均<0.5%，说明该方法精密度良好。

**2.4.2** 重复性试验　取同一供试品溶液(G05)6份，按“2.1”项下方法进样测定，记录色谱图，测定主要共有峰的相对保留时间和相对峰面积，结果显示，主要共有峰 6 个，1~6 号峰相对保留时间的 RSD 均<0.3%，相对峰面积均<0.9%，说明本法具有较好的重复性。

**2.4.3** 稳定性试验　取同一供试品溶液(G05)，分别于 0，4，8，12，16，20，24 h 进样分析，依法测定，记录色谱图，测定主要共有峰的相对保留时间和相对峰面积，结果 1~6 号峰相对保留时间的 RSD 均<0.3%，相对峰面积均<0.8%。表明样品在 24 h 内稳定。

**2.5** 指纹图谱相似性评价

按“2.1”项下色谱条件，“2.3”项下提取条件，对 6 批益母草流浸膏样品进样分析，记录色谱图。将图谱导入国家药典委员会开发的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2.0 版中，生成对照谱峰 R，并进行相似度计算。结果发现 6 批供试品共有 6 个特征峰(见图 2)。通过对照品定位，指认其中 1 号峰为对羟基苯甲酸，3 号峰为丁香酸，5 号峰为盐酸益母草碱，其中盐酸益母草碱为益母草最为熟知的活性成分，且保留时间较均匀的分布于整个图谱，对于不同实验室、不同仪器、不同实验环境等造成的保留时间差异可以得到有效的修正，故选择盐酸益母草碱作为参照峰。所收集的 6 批样品均有良好的匹配度，相似度均>0.95，说明该指纹图谱方法具有较好的适用性，同时也显示不同生产企业产品的成分一致性较好。各特征图谱与共有特征图谱 R 相似度见表 2；6 批样品相似度比较图谱见图 3。以选定的 5 号峰盐酸益母草碱为参比峰，设定其相对保留时间和峰面积为 1，计算各共有峰相对它的保留时间和峰面积，结果见表 3 和表 4。

**表 2** 指纹图谱相似度结果

**Tab. 2** Fingerprint similarity of results

| | G01 | G02 | G03 | G04 | G05 | G06 | R |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| G01 | 1 | 0.999 | 1 | 0.985 | 0.976 | 0.911 | 0.987 |
| G02 | 0.999 | 1 | 1 | 0.986 | 0.976 | 0.907 | 0.986 |
| G03 | 1 | 1 | 1 | 0.985 | 0.976 | 0.908 | 0.987 |
| G04 | 0.985 | 0.986 | 0.985 | 1 | 0.974 | 0.872 | 0.973 |
| G05 | 0.976 | 0.976 | 0.976 | 0.974 | 1 | 0.956 | 0.996 |
| G06 | 0.911 | 0.907 | 0.908 | 0.872 | 0.956 | 1 | 0.960 |
| R | 0.987 | 0.986 | 0.987 | 0.973 | 0.996 | 0.960 | 1 |

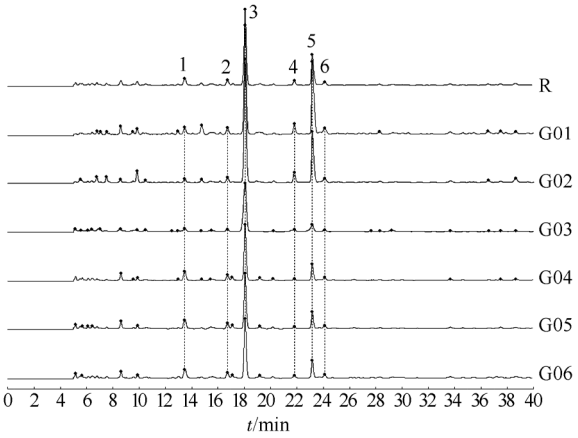


**图 3** 6 批益母草流浸膏相似度比较

**Fig. 3** Similarity comparison of 6 Leonurus liquid extracts

**表 3** 指纹图谱共有峰相对保留时间

**Tab. 3** Relative retention time of common peaks of HPLC fingerprints

| 峰号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| G01 | 0.581 | 0.722 | 0.780 | 0.941 | 1.00 | 1.041 |
| G02 | 0.580 | 0.721 | 0.779 | 0.940 | 1.00 | 1.040 |
| G03 | 0.580 | 0.721 | 0.779 | 0.940 | 1.00 | 1.039 |
| G04 | 0.579 | 0.718 | 0.776 | 0.938 | 1.00 | 1.036 |
| G05 | 0.584 | 0.723 | 0.782 | 0.943 | 1.00 | 1.043 |
| G06 | 0.583 | 0.724 | 0.783 | 0.945 | 1.00 | 1.046 |
| RSD/% | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.0 | 0.3 |

**表 4** 指纹图谱共有峰相对峰面积

**Tab. 4** Relative peak area of common peaks of HPLC fingerprints

| 峰号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| G01 | 0.804 | 0.415 | 3.669 | 0.166 | 1.00 | 0.203 |
| G02 | 0.810 | 0.413 | 3.641 | 0.165 | 1.00 | 0.193 |
| G03 | 0.811 | 0.409 | 3.627 | 0.160 | 1.00 | 0.201 |
| G04 | 0.805 | 0.405 | 3.542 | 0.169 | 1.00 | 0.196 |
| G05 | 0.815 | 0.414 | 3.630 | 0.162 | 1.00 | 0.194 |
| G06 | 0.811 | 0.403 | 3.532 | 0.168 | 1.00 | 0.195 |
| RSD/% | 0.5 | 1.2 | 1.6 | 2.1 | 0.0 | 2.0 |

**2.6** 多指标含量测定方法学考察

**2.6.1** 线性关系　分别依次精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液 0.1，0.5，1，2，5，10，20 μL 注入液相色谱仪；以峰面积($Y$)对进样量($X$)进行回归，计算回归方程，对羟基苯甲酸、丁香酸和盐酸益母草碱的线性方程分别为 $Y$=3.412 0$X$+2.810 1 ($r$=1.000 0)，$Y$=2.390 1$X$+4.893 7($r$=1.000 0)，$Y$=2.011 5$X$+1.064 3($r$=0.999 9)，进样量分别在 3.952~790.4 ng，10.427~2 085.4 ng 和 6.983~1 396.6 ng 内呈良好的线性关系。

**2.6.2** 重复性试验　按“2.4.2”项下方法，记录对羟基苯甲酸、丁香酸、盐酸益母草碱的峰面积，结果显示，RSD 分别为 1.2%，1.2%和 1.4%($n$=6)，表明本含量测定方法的重复性良好。

**2.6.3** 稳定性试验　按“2.4.3”项下方法记录对羟基苯甲酸、丁香酸、盐酸益母草碱的峰面积，结果显示，RSD 分别为 1.5%，0.6%和 0.8%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.6.4** 回收率试验　精密量取已知含量的 G05 益母草流浸膏 9 份，分别按低、中、高 3 个梯度加入一定量的混合对照品溶液(另配，3 种成分大致按样品中所含的量的 50%，100%，150%)，制备供试品溶液，按已确定的色谱条件测定峰面积，计算平均回收率和 RSD。结果表明，对羟基苯甲酸、丁香酸、盐酸益母草碱的平均回收率分别为 98.6%，97.8%和 97.9%，RSD 分别为 1.5%，2.0%和 1.8%，结果见表 5。

**表 5**　回收率试验结果

**Tab. 5**　Results of recovery test

| 成分名称 | 原有量/μg | 加入量/μg | 测得量/μg | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 对羟基苯甲酸 | 4.504 | 1.976 | 6.473 | 99.84 | 98.6 | 1.5 |
| | 4.504 | 1.976 | 6.462 | 99.60 | | |
| | 4.504 | 1.976 | 6.398 | 98.18 | | |
| | 4.504 | 3.952 | 8.503 | 101.04 | | |
| | 4.504 | 3.952 | 8.433 | 99.49 | | |
| | 4.504 | 3.952 | 8.365 | 97.98 | | |
| | 4.504 | 5.928 | 10.298 | 97.02 | | |
| | 4.504 | 5.928 | 10.269 | 96.38 | | |
| | 4.504 | 5.928 | 10.320 | 97.51 | | |
| 丁香酸 | 181.728 | 104.27 | 284.37 | 99.10 | 97.8 | 2.0 |
| | 181.728 | 104.27 | 288.91 | 101.60 | | |
| | 181.728 | 104.27 | 279.90 | 96.64 | | |
| | 181.728 | 208.54 | 382.44 | 95.69 | | |
| | 181.728 | 208.54 | 387.15 | 98.28 | | |
| | 181.728 | 208.54 | 384.13 | 96.62 | | |
| | 181.728 | 312.82 | 486.12 | 95.37 | | |
| | 181.728 | 312.82 | 490.7 | 97.89 | | |
| | 181.728 | 312.82 | 492.12 | 98.67 | | |
| 盐酸益母草碱 | 110.472 | 52.369 | 158.84 | 96.38 | 97.9 | 1.8 |
| | 110.472 | 52.369 | 164.20 | 101.23 | | |
| | 110.472 | 52.369 | 160.99 | 98.32 | | |
| | 110.472 | 104.74 | 210.33 | 95.59 | | |
| | 110.472 | 104.74 | 212.77 | 97.79 | | |
| | 110.472 | 104.74 | 215.10 | 99.90 | | |
| | 110.472 | 157.11 | 265.80 | 98.39 | | |
| | 110.472 | 157.11 | 263.45 | 96.27 | | |
| | 110.472 | 157.11 | 264.71 | 97.40 | | |

**2.7**　样品含量测定

取“2.2”项下混合对照品溶液 5 μL 和 6 批益母草流浸膏样品溶液各 5 μL，按“2.1”项下色谱条件进样，按外标法以峰面积计算含量，结果见表 6。

**表 6**　6 批样品含量测定结果

**Tab. 6**　Determination results of 6 samples

| 编号 | 对羟基苯甲酸/μg·mL$^{-1}$ | 丁香酸/μg·mL$^{-1}$ | 盐酸益母草碱/μg·mL$^{-1}$ |
|---|---|---|---|
| G01 | 25.45 | 215.77 | 85.32 |
| G02 | 26.46 | 204.10 | 77.08 |
| G03 | 26.04 | 204.99 | 75.73 |
| G04 | 9.74 | 241.72 | 48.40 |
| G05 | 11.22 | 456.53 | 279.49 |
| G06 | 20.58 | 807.12 | 186.81 |

## 3　讨论

由于益母草流浸膏中主要含有的酚酸类成分和生物碱类成分的化学性质相差较大，采用等度洗脱难以使各成分得到分离，不能使指纹图谱获得尽可能多的信息量。为了使这两类主要成分在一张图谱上反映出来，并能有效分离，故采用了梯度洗脱。

笔者曾比较了直接蒸干法、醇沉法、过柱纯化法、有机溶剂分段萃取法等方法提取益母草流浸膏中的主要成分，发现醇沉后峰较杂，与直接蒸干定容相比无大区别，过柱纯化法和有机溶剂分段萃取法可以一定程度上纯化样品，最后选择水饱和正丁醇萃取为最佳方法。且比较了 310，275，230 nm 3 个波长，发现 275 nm 波长处基线较平稳，获得的信息量较大，色谱峰分离较好，杂质干扰较少，故选择 275 nm 为测定波长。

本实验建立的益母草流浸膏指纹图谱有 6 个共有峰，所收集的 6 批样品均有良好的匹配度，相似度均>0.95，说明该指纹图谱方法具有较好的适用性，同时也显示不同生产企业产品的成分一致性良较好。经方法学研究表明，本方法重现性良好，操作简便。可作为益母草流浸膏质量鉴定的依据。

本实验在所建立的指纹图谱方法的基础上，对益母草流浸膏中 3 个成分进行了含量测定，可同时控制特征图谱中多成分的含量。对所收集的 6 批益母草流浸膏样品进行含量测定，发现对羟基苯甲酸的含量差异范围相对较小，丁香酸和盐酸

益母草碱的含量差异范围较大，最低的与最高的均可相差 4 倍左右。

**REFERENCES**


[1] CONG Y. Studies on the Chemical Compounds and Biological Activities of *Leonurus Heterophyllus* Sweet [D]. Shenyang Pharmaceutical University, 2004.

[2] ZHANG L, CAI X H, GAO H Y. Chemical constituents of the aerial parts of Leonurus heterophyllus [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2009, 26(1): 15-18, 26.

[3] DENG S, WANG T, WU C H. Isolation and identification of constituents from *Leonurus japonicus*[J]. Chin J Med Chem(中国药物化学杂志), 2013, 23(3): 209-212, 234.

[4] CONG Y, WANG Y, XIE X M. Determination of content of syringic acid and rutin in crude drugs and product wine-fried of *Leonurus heterophyllus* by HPLC-UV [J]. J Henan Univ(Nat Sci)(河南大学学报 自然科学版), 2010, 40(5): 4414-4416.

[5] YAN Y S. Comparison of different extraction methods of Herba Leonuri [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm(中医药导报), 2010, 16(5): 109-110.

[6] ZHANG X, PENG G P. Development of chenical constituents for Leonurus [J]. Nat Prod Res Develop(天然产物研究与开发), 2003, 15(2): 162-166.


收稿日期：2015-04-02

# 固相萃取-气相色谱-质谱法同时测定薄荷中 10 种农药残留

何鹏[1]，余莎莎[2](1.芜湖市食品药品检验所，安徽 芜湖 241006；2.安徽商贸职业技术学院，安徽 芜湖 241006)

**摘要：目的** 运用固相萃取法(SPE)净化、气相色谱-质谱(GC-MS)联用法分析，在选择离子监测模式(SIM)下建立了薄荷中 10 种农药同时测定的定性定量分析方法。**方法** 样品用乙腈提取，经 SPE 净化去除杂质后，直接进行 GC-MS 分析，内标法定量。**结果** 10 种农药在各自浓度范围内线性关系良好，相关系数均>0.99。10 种农药在 3 个加标水平下的回收率为 73.1%~112.8%，相对标准偏差均不超过 5%。**结论** 所用方法操作简单、分析快捷、灵敏准确，适用于薄荷中多种农药的同时分析检测。

**关键词：**固相萃取；气相色谱；质谱；农药残留；薄荷

**中图分类号：**R917；R284 **文献标志码：**A **文章编号：**1007-7693(2015)12-1471-06

**DOI:** 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.12.015

## Simultaneous Determination of 10 Pesticide Residues in Menthae Haplocalycis Herba by SPE and GC-MS

HE Peng[1], YU Shasha[2](*1.Wuhu Institute for Food and Drug Control, Wuhu 241006, China; 2.Anhui Business College, Wuhu 241006, China*)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a method of qualitative and quantitative analysis simultaneously for 10 pesticides residues in Menthae Haplocalycis Herba with SPE and GC-MS using the mode of selected ion monitoring. **METHODS** The pesticides residues were extracted from samples with acetonitrile, then the extract was purified by SPE column and ready for GC-MS analysis. Internal standard method was used for quantification. **RESULTS** The 10 pesticides were linear in the concentration range of themselves with correlation coefficients more than 0.99. The recoveries of 10 pesticides were from 73.1% to 112.8% at three spiked levels with RSDs no more than 5%. **CONCLUSION** The method is simple, feasible and sensitive with accurate results, which can be used for the simultaneous analysis of various pesticides residues in Menthae Haplocalycis Herba.

**KEY WORDS:** SPE; GC; MS; pesticides residues; Menthae Haplocalycis Herba

我国的中药材农药污染现象较为普遍，我国出口的中药在欧美、日韩等国市场上多次因农药残留超标等原因被查扣[1]，极大地损坏了中药的国际声誉。中药农药残留是我国中药研究领域亟待解决的重要问题。薄荷是临床上应用十分广泛的中药，而且作为药食同源的代表药物之一，它还经常出现在我国不少地区的餐桌上和饮料中，因此加强对其进行农药残留的检测和控制是非常有

**作者简介：**何鹏，男，硕士，主管中药师 Tel: (0553)5853053 E-mail: frankwade@126.com