

•质量分析研究•

HPLC 法同时测定肿节风提取物中绿原酸、异嗪皮啶、迷迭香酸的含量

张启云, 邹云香, 徐国良, 尚广彬, 徐 镜, 孔 越, 李 洋, 严增明, 汤喜兰(江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004)

摘要: **目的** 建立运用 HPLC 法同时测定肿节风提取物中绿原酸、异嗪皮啶和迷迭香酸含量的方法。**方法** 采用 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱; 流动相: 乙腈(A)-0.1 % 甲酸(B), 梯度洗脱 0~30 min, 5 %→20 %A; 30~40 min, 20 %→25 %A; 40~60 min, 25 %→29 %A; 60~65 min, 29 %→32 %A; 流速: 1 mL·min⁻¹; 检测波长: 330 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 20 μL。**结果** 绿原酸、异嗪皮啶、迷迭香酸分别在 0.0280~0.448 μg($r=0.9998$)、0.0164~0.262 μg($r=0.9999$)、0.113~1.81 μg($r=0.9999$)范围内呈良好的线性关系; 平均回收率($n=6$) 分别为 103.4 % (RSD=2.77 %)、98.3 % (RSD=2.58 %)、95.2 % (RSD=2.49 %)。**结论** 该法简便快速, 重复性好, 准确可靠, 可用于同时测定肿节风提取物中绿原酸、异嗪皮啶、迷迭香酸的含量。

关键词: 肿节风提取物; 绿原酸; 异嗪皮啶; 迷迭香酸; 含量测定

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2013)03-0294-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.023

Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Isofraxidin and Rosmarinic Acid in Extract of *Sarcandra glabra*(Thunb.) Nakai by HPLC

ZHANG Qiyun, ZOU Yunxiang, XU Guoliang, SHANG Guangbin, XU Jing, KONG Yue, LI Yang, YAN Zeng-ming, TANG Xilan(Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China)

Abstract: Objective To establish a method for simultaneous determination of chlorogenic acid, isofraxidin and rosmarinic acid in the extract of *Sarcandra glabra*(Thunb.) Nakai. **Methods** The three components were separated on a Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) with a flow-rate of 1 mL·min⁻¹ at 30 ℃. The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1 % formic acid. The gradient condition was A: 5 %→20 % from 0 to 30 min, A: 20 %→25 % from 30 to 40min, A: 25 %→29 % from 40 to 60 min, A: 29 %→32 % from 60 ~ 65min. The detection wavelength was set at 330 nm and the injection volume was 20 μL. **Results** The linear ranges of chlorogenic acid, isofraxidin and rosmarinic acid were 0.0280~0.448 μg($r=0.9998$), 0.0164~0.262 μg ($r=0.9999$), 0.113~1.81 μg($r=0.9999$), respectively. The mean recoveries ($n=6$) of chlorogenic acid, isofraxidin and rosmarinic acid were 103.4 % (RSD=2.77 %), 98.3 % (RSD=2.58 %), 95.2 % (RSD=2.49 %), respectively. **Conclusion** The established method is simple, reproducible, and accurate, and can be used for the simultaneous determination of chlorogenic acid, isofraxidin and rosmarinic acid in the extract of *Sarcandrae glabra*.

Keywords: Extract of *Sarcandrae glabra*; Chlorogenic acid; Isofraxidin; Rosmarinic acid; Assay

收稿日期: 2012-11-16

作者简介: 张启云, 女, 讲师, 主要从事中药药代动力学与代谢组学的研究。Email: zhangqiyun1982@163.com。通讯作者: 汤喜兰, 女, 讲师, 主要从事中药药理学研究。Email: tangxilan1983@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81001662); 国家重点基础研究发展计划(973 计划)基金资助项目(2010CB530603); 江西省自然科学基金项目(2009GQY0109); 江西省卫生厅基金项目(2010A099); 江西省教育厅基金项目(GJJ11187)。

肿节风为金粟兰科植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 的干燥全株, 又名草珊瑚、接骨金粟兰、见肿消等^[1], 具有清热凉血、活血祛瘀、祛风通络等功效, 其浸膏制剂血康口服液^[2]具有升高血小板, 提高骨髓巨核细胞数的药理作用。研究表明肿节风升高白细胞和血小板作用的主要活性成分为黄酮类^[3]、酚酸类^[4-6]及香豆素类^[7]成分。肿节风提取物为大孔树脂制备的抗免疫性血小板减少性紫癜的有效活性部位^[8]。目前, 肿节风药材及市售的中成药制剂血康口服液质量控制的指标成分主要是异嗪皮啶和迷迭香酸, 异嗪皮啶虽为主要活性成分之一, 但在提取物中含量较低, 而绿原酸虽为非专属性成分, 但在提取物中含量较高, 且具有重要药理活性。绿原酸、异嗪皮啶和迷迭香酸 3 个成分更适宜作为肿节风提取物及其制剂的质控指标。但目前尚未见采用 HPLC 同时测定肿节风及其制剂中 3 个成分的文献报道。本研究采用高效液相色谱法, 同时测定肿节风提取物中绿原酸、异嗪皮啶和迷迭香酸的含量, 为评价肿节风提取物及其中成药的质量提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器 BT225-S 电子分析天平(十万分之一, 德国 Sartorius 公司), KQ-250VDB 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), XW-80A 涡旋混合器(上海医科大学仪器厂), Agilent 1200 高效液相色谱仪, 配有四元泵、柱温箱、VWD 检测器和 Agilent 1200 色谱工作站(美国 Agilent 公司), U-3000 紫外分光光度计(日本岛津公司)。

1.2 试药 肿节风提取物由肿节风浸膏按文献方法^[9]自制, 浸膏由江中药业股份有限公司提供, 批号: 0304001; 绿原酸、异嗪皮啶、迷迭香酸对照品, 均购于南京泽朗医药科技有限公司, 纯度 $\geq 98\%$, 批号分别为 ZL20120422LYS、ZL20120701YQD、ZL20120215MDX。甲醇为色谱纯, 山东禹王实业有限公司化工分公司; 乙腈为色谱纯, 美国 TEDIA 公司, 水为三蒸水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液配制 取肿节风提取物粉末 0.10 g, 准确称定, 置具塞锥形瓶中, 加入 50 % 甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 45 kHz)30 min, 放冷, 再称定质量, 用 50 % 甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2 对照品母液的配制 精密称取各对照品绿原酸

8.00 mg、异嗪皮啶 8.20 mg、迷迭香酸 8.00 mg, 分别置于 25 mL 的容量瓶中, 用 50 % 甲醇溶解并定容至刻度, 配制各对照品母液。

2.3 混合对照品标准溶液的配制 精密移取各对照品母液适量置于 25 mL 容量瓶中, 加 50 % 甲醇定容至刻度, 配制混合对照品储备液, 其中, 含有绿原酸 $28.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、异嗪皮啶 $16.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、迷迭香酸 $113.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4 波长的选择 应用 U-3000 紫外分光光度计对绿原酸、异嗪皮啶和迷迭香酸在 200 ~ 400 nm 进行紫外扫描, 发现异嗪皮啶在 340.5 nm 和 209 nm 处有最大吸收, 而绿原酸在 329 nm 处有最大吸收, 迷迭香酸在 329.5 nm 处有最大吸收, 综合三者的紫外吸收特征, 选择检测波长为 330 nm。在此波长下检测基线平稳, 灵敏度高, 见图 1。

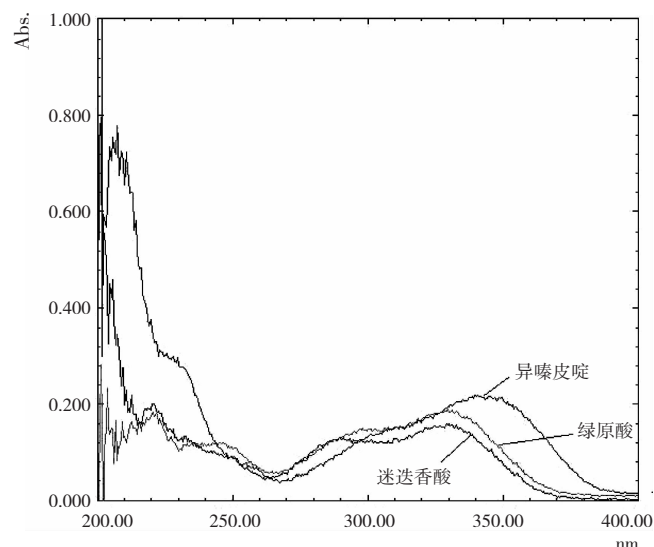


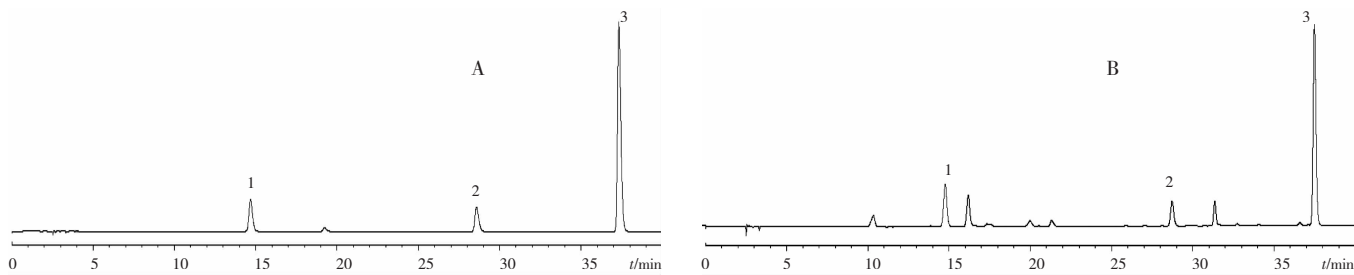
图 1 紫外全波长扫描图

Figure 1 The results of UV wavelength scan

2.5 色谱条件与方法学考察

2.5.1 色谱条件 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A) - 0.1 % 甲酸(B), 梯度洗脱条件: 0 ~ 30 min, 5 % → 20 % A; 30 ~ 40 min, 20 % → 25 % A; 40 ~ 60 min, 25 % → 29 % A; 60 ~ 65 min, 29 % → 32 % A; 流速: $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长: 330 nm, 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量: 20 μL 。在上述条件下, 理论塔板数按绿原酸峰计算不低于 20000, 按异嗪皮啶峰计算不低于 60000, 按迷迭香酸峰计算不低于 150000, 绿原酸、异嗪皮啶、迷迭香酸分离良好, 见图 2。

2.5.2 回归方程及线性范围 取适量混合对照品储备液, 按 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 倍比例稀释成



1. 绿原酸; 2. 异嗪皮啶; 3. 迷迭香酸

图2 3种对照品(A)与肿节风提取物样品(B)的HPLC图谱

Figure 2 HPLC chromatogram of three kinds of reference(A)and the extract of Sarcandrae Glabra

不同浓度的一系列混合对照品溶液, 取 20 μL 进样, 以峰面积积分值(Y)对相应的混合标准溶液浓度(X, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)进行回归, 得到各对照品的回归方程及线性范围, 各对照品在相应线性范围内线性关系良好, 见表 1。

表1 各对照品的回归方程及线性范围

Table 1 The regression equation and linear range of each component

成分	回归方程	线性范围/ μg
绿原酸	$Y=39.080X-7.7491(r=0.9998)$	0.0280~0.448
异嗪皮啶	$Y=54.105X+1.0432(r=0.9999)$	0.0164~0.262
迷迭香酸	$Y=58.975X-7.3978(r=0.9999)$	0.113~1.81

2.5.3 精密度试验 取混合对照品溶液, 按照以上色谱条件, 连续进样 6 针, 分别记录 3 种化合物的峰面积, 计算绿原酸、异嗪皮啶、迷迭香酸对照品峰面积的 RSD 分别为 2.53 %、1.74 %、1.80 %, 表明仪器精密度良好。

2.5.4 重复性试验 精密称定肿节风提取物 0.10 g, 按照 2.1 项下方法制备 6 份供试品溶液, 依 2.5.1 项下的色谱条件进样分析, 求得绿原酸、异嗪皮啶、迷迭香酸 3 个成分含量的平均值为 2.11 %、0.87 %、5.55 %, RSD 分别为 0.55 %、0.81 %、0.86 %。

2.5.5 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时间点取 20 μL 进样, 测定绿原酸、异嗪皮啶、迷迭香酸的色谱峰峰面积, 以峰面积计算各被测成分 RSD 值 ($n=6$), 结果 RSD 分别为 2.04 %、0.64 %、0.84 %。

2.5.6 加样回收试验 取已知各成分含量的肿节风提取物 6 份, 分别精密加入混合对照品溶液各 2 mL, 按照 2.1 项下方法制备供试品溶液, 测定各成分含量, 计算回收率, 结果见表 2、表 3 和表 4。绿原酸、异嗪皮啶、迷迭香酸的平均回收率($n=6$)分别为 103.4 % (RSD=2.77 %)、98.3 % (RSD=2.58 %)、95.2 %

(RSD=2.49 %)。

表2 绿原酸回收率试验($n=6$)

Table 2 Result of recovery test of chlorogenic acid

序号	称样量 /g	样品中含 量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	0.0039	0.0823	0.0560	0.141	104.8	103.4	2.77
2	0.0041	0.0865	0.0560	0.144	102.7		
3	0.0039	0.0823	0.0560	0.139	101.2		
4	0.0040	0.0844	0.0560	0.140	99.3		
5	0.0040	0.0844	0.0560	0.144	106.4		
6	0.0041	0.0865	0.0560	0.147	106.2		

表3 异嗪皮啶回收率试验($n=6$)

Table 3 Result of recovery test of isofraxidin

序号	称样量 /g	样品中含 量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	0.0039	0.0339	0.033	0.0657	96.4	98.3	2.58
2	0.0041	0.0357	0.033	0.0676	96.7		
3	0.0039	0.0339	0.033	0.0656	96.1		
4	0.0040	0.0348	0.033	0.0670	97.6		
5	0.0040	0.0348	0.033	0.0682	101.2		
6	0.0041	0.0357	0.033	0.0693	101.8		

表4 迷迭香酸回收率试验($n=6$)

Table 4 Result of recovery test of rosmarinic acid

序号	称样量/ g	样品中含 量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	0.0039	0.216	0.226	0.429	94.2	95.2	2.49
2	0.0041	0.227	0.226	0.439	93.8		
3	0.0039	0.216	0.226	0.426	92.9		
4	0.0040	0.222	0.226	0.434	93.8		
5	0.0040	0.222	0.226	0.444	98.2		
6	0.0041	0.227	0.226	0.449	98.2		

2.6 样品测定 称取肿节风提取物适量, 按 2.1 项下制备供试品溶液, 在上述色谱条件下测定, 以外标法计算含量, 结果样品中绿原酸、异嗪皮啶、迷迭香酸的含量分别为 2.09 %、0.873 %、5.59 %。

3 讨论

本研究对多种流动相进行了考察,结果表明以乙腈洗脱,色谱峰的峰形较甲醇好,考虑到绿原酸、异嗪皮啶和迷迭香酸 3 种成分均带有酚羟基,具有一定的酸性,未解离的羟基与固定相作用较强,导致拖尾。在水相中加入 0.1 %甲酸,消除峰拖尾现象。确定流动相两相为乙腈(A)和 0.1 %甲酸溶液(B)。当乙腈(A)为 20 %, 0.1 %甲酸溶液(B)为 80 %等度洗脱时,结果表明异嗪皮啶和迷迭香酸与杂质峰能够较好的分离,但绿原酸与杂质无法分离,参考文献^[10]的研究设定上述梯度洗脱条件,能保证绿原酸、异嗪皮啶和迷迭香酸 3 种成分均能达到较好的分离效果。

分别考察了以水、甲醇、50 %甲醇为提取溶剂。结果表明以水为提取溶剂时杂质峰较多,未达基线分离;以甲醇为提取溶剂时各成分对称因子不佳,理论板数较低;以 50 %甲醇为提取溶剂时,能较好地分离各物质成分,基线噪音小,峰形好,故选择 50 %甲醇为提取溶剂。超声时间的选择,比较了 20, 30, 45, 60 min 的提取率,结果表明 30, 45, 60 min 的提取率基本不变。因此,最终选择采用 50 %甲醇超声提取 30 min 为本试验的提取条件。

本试验采用 HPLC 同时测定肿节风提取物中绿原酸、异嗪皮啶和迷迭香酸 3 个成分的含量,方法简便,结果准确可靠,可为本课题组肿节风提取物促

骨髓巨核细胞增殖的效应成分研究提供质控评价。同时,可作为肿节风提取物及其中成药质量控制的参考依据。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(20 卷 1 分册)[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 79-80.
- [2] 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, 2010: 486.
- [3] 连晓媛. 含有肿节风提取物黄酮有效部位的注射液及其用途[P]. 中国, 20061004920.9, 2006-10-04.
- [4] 张洁. 绿原酸在制备具有增加骨髓细胞功效的药物中的用途[P]. 中国, 200680024175.X. 2010-08-25.
- [5] 连晓媛. 迷迭香酸的制备方法和应用[P]. 中国, 200710067381.5. 2011-03-02.
- [6] 连晓媛. 一种植物肿节风有效部位总多酚及其制备方法和应用[P]. 200610050821.1. 2010-06-16.
- [7] 范催生. 肿节风黄酮类香豆素类总提取物及其药物组合物和用途[P]. 03100053.3. 2004-07-28.
- [8] 徐国良, 肖兵华, 陈奇. 肿节风及其分离部位对免疫性血小板减少性紫癜小鼠血小板的影响[J]. 中国实验方剂学, 2005, 11 (4): 33-36.
- [9] 徐国良, 肖兵华, 邹胡斌. 大孔吸附树脂分离肿节风中总黄酮的研究[J]. 中草药, 2006, 37(7): 1014-1017.
- [10] 曾建伟, 林培玲, 谢勇, 等. HPLC 法同时测定草珊瑚中富马酸、异嗪皮啶和迷迭香酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(7): 1417-1419.

(编辑: 宋威)

4 种含苍耳子的复方颗粒中毒性成分苍术苷的含量测定

陈璐璐, 朱雅玲, 杨柳, 曾星, 李玲玲, 许怡瑜 (广州中医药大学第二附属医院, 广东省中医药科学院, 广东 广州 510120)

摘要: **目的** 建立苍耳子复方颗粒剂中毒性成分苍术苷的快速高分离度液相色谱-串联质谱 (RRLC-MS/MS) 含量快速检测方法。**方法** 将处理后的样品中加入内标氯霉素, 运用超高效液相-质谱联用仪, 采用多反应离子监测(MRM)在负离子检测模式下测定苍术苷的含量。**结果** 苍术苷在 0.505~505 ng·mL⁻¹ 浓度范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系 ($r=0.9993$); 平均回收率为 95.38 %, RSD=6.265 % ($n=6$)。**结论** 本研究所建立的含量测定方法快速、准确、稳定, 可为苍耳子复方制剂中毒性成分苍术苷的检测提供快速准确的定量分析方法。

关键词: RRLC-MS/MS; 苍耳子; 复方颗粒; 毒性成分; 苍术苷

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)03-0297-04

收稿日期: 2012-12-31

作者简介: 陈璐璐, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药质量评价。Email: chenlulu871204@qq.com。通讯作者: 杨柳, 女, 研究员, 主要从事中药活性成分及质量评价研究。Email: yangliume@yahoo.com.cn。

基金项目: 科技部重大新药创制专项(2008ZX09312-021, 2012ZX09303009-003)。