

各色谱峰拖尾严重,且各峰之间分离效果较差,而以甲醇-醋酸水溶液系统做流动相后,各色谱峰峰形良好且能良好的分离。

结果证明,本方法简便可行,重现性良好,适用于冠心V号颗粒的质量控制。

参考文献:

- [1] 瞿媛. 冠心V号合剂改善冠心病患者心功能及对模型大鼠心室重构超微结构的影响[D]. 南京: 南京中医药大学, 2009.
- [2] 舒菁菁, 李菲, 董雅芬, 等. 丹参素药理作用及机制的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2012, 30(4): 266-268.
- [3] 叶剑. 丹参的药用成分与药理作用探析[J]. 陕西中医学院学报, 2012, 35(5): 71-73.

- [4] 张民, 张骅, 徐鹏, 等. 丹参酮II A的药理作用研究进展[J]. 医药导报, 2008, 27(10): 1237-1239.
- [5] 魏惠珍, 王跃生, 吴有根, 等. HPLC同时测定冠心丹参胶囊中丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B和丹参酮II A的含量[J]. 中成药, 2009, 31(1): 64-68.
- [6] 张筱芳, 王莉. HPLC法测定养心活血片中丹参素的含量[J]. 西北药学杂志, 2012, 27(5): 409-411.
- [7] 郑晓珂, 董三丽, 冯卫生. HPLC法测定丹参中丹参素、丹参酮II A、二氢丹参酮I、隐丹参酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(6): 12-15.

(编辑: 宋威)

溪黄草的定性定量方法研究

王 婴¹, 廖远忠², 林玉婷³, 林伟鑫³, 王 岩³ (1. 广东药学院医药化工学院, 广东 中山 528458; 2. 广东豪爽天然保健食品有限公司, 广东 连州 513400; 3. 广东药学院中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 完善溪黄草的定性定量方法, 对药品质量进行有效控制。 **方法** 采用薄层鉴别法, 对溪黄草中迷迭香酸、齐墩果酸和芦丁进行鉴别。采用高效液相色谱(HPLC法)测定迷迭香酸的含量, 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以乙腈-0.1%磷酸溶液(30:70)为流动相; 流速为1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为330 nm; 柱温为25℃; 理论塔板数按迷迭香酸峰计算不低于4000。 **结果** TLC斑点清晰, 分离度高, 方法耐用性好; HPLC方法简便、专属性强, 迷迭香酸线性范围为1.2 μg~12 μg($r=0.9999$), 平均回收率为98.37%, RSD为1.20% ($n=6$)。 **结论** 所建立的定性、定量方法可用于溪黄草的质量控制。

关键词: 溪黄草; 薄层色谱; 高效液相色谱; 迷迭香酸

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)02-0212-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.02.025

Studies on Qualitative and Quantitative Methods for Herba Rabdosiae Serrae

WANG Ying¹, LIAO Yuanzhong², LING Yuting³, LIN Weixin³, WANG Yan³ (1. School of Pharmaceutical and Chemical Engineering, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458 Guangdong, China; 2. Guangdong Haoshuang Natural Healthy Food Co., Ltd, Lianzhou 513400 Guangdong, China; 3. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To optimize the qualitative and quantitative methods for Herba Rabdosiae Serrae, thus to improve its quality standard. **Methods** Thin layer chromatography(TLC) was performed for identifying rosmarinci acid, oleanolic acid and rutin. Rosmarinci acid was determined by high performance liquid chromatography(HPLC). The HPLC was conducted with octadecylsilane chemically bonded silica as loading agent, acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution(30:70) as mobile phase, and the detection wavelength was 330 nm, flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and column temperature was 25℃. The number of theoretical plates for rosmarinci acid was not less than 4000. **Results** The

收稿日期: 2013-10-29

作者简介: 王婴, 女, 实验师, 研究方向: 药物新剂型与质量控制。Email: 1248322680@qq.com。通讯作者: 王岩, 男, 教授, 研究方向: 药物新剂型与质量控制。Email: gdpwuy@126.com。

TLC spots were clear and can be well separated, indicating that the method had good ruggedness. The HPLC method was simple and specific. The calibration curve showed good linear relationship in the range of 1.2 μg ~ 12 μg ($r=0.9999$). The average recovery was 98.37 % and RSD was 1.20 % ($n=6$). **Conclusion** The developed qualitative and quantitative methods can be used for the quality control of *Herba Rabdosiae Serrae*.

Keywords: *Herba Rabdosiae Serrae*; TLC; HPLC; Rosmarinci acid

溪黄草别名香茶菜、溪沟草、手擦黄等，在南方各省分布广泛，在广东民间作为清肝利胆药物，用于治疗急性肝炎、急性胆囊炎、痢疾、肠炎、跌打瘀肿等^[1]。溪黄草质量标准原载于《广东省中药材标准》(第一册)，只有性状检查和薄层鉴别项^[2]。《广东省中药材标准》(第二册)对其重新作了修订，增加了药材粉末显微鉴别项和水分、总灰分、浸出物等检查项，较原标准有了一定程度的提高^[3]。但在薄层鉴别项中，仍仅采用对照药材作为对照物，成分专属性不强，且未建立其有效成分的含量测定。本研究增加了迷迭香酸、齐墩果酸和芦丁的薄层鉴别，同时建立了迷迭香酸的 HPLC 含量测定方法，提高了溪黄草的质量控制标准。

1 仪器与试药

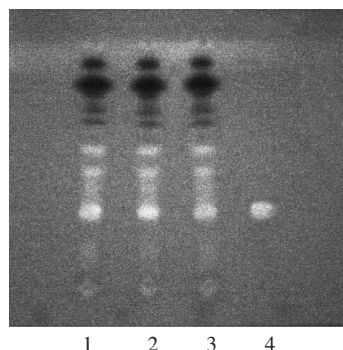
LC-20AT 高效液相色谱仪、SPD-20A 紫外检测器，日本岛津公司；BP211D 型电子天平，北京赛多利斯公司；SK3300LH 超声波清洗器，上海科导超声波仪器有限公司；薄层层析硅胶 G，青岛海洋化工有限公司；迷迭香酸，含量 $\geq 98.8\%$ ，齐墩果酸，芦丁，均由中国药品生物制品检定所提供，批号分别为：111871-201001，110709-200505，100080-200707。乙腈为色谱纯，其他试剂均为分析纯；溪黄草药材 7 批，分别来源于广东清远、广西玉林和安徽亳州，经广东药学院王岩教授鉴定为唇形科植物狭基线纹香茶菜 *Rabdosia lophanthoides* var. *gerardiana* (Benth.) H. Hara 的干燥地上部分。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别 据现有资料显示，溪黄草中所含化学成分种类多样，具有多种药理活性，主要含有酚酸类、萜类、黄酮类等成分^[4]。对应的代表成分为迷迭香酸、齐墩果酸和芦丁。本研究采用薄层色谱法，对 3 批溪黄草分别进行了这 3 种成分的鉴别。

2.1.1 迷迭香酸 TLC 鉴别 取本品粉末 1 g，加入甲醇 30 mL，超声处理 30 min，滤过，滤液蒸干，

残渣加乙醇 2 mL 使溶解，作为供试品溶液。另取迷迭香酸对照品，加乙醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液，作为对照品溶液。按照薄层色谱法(《中国药典》2010 版一部附录 VI B) 试验，吸取上述溶液各 5 μL ，分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上，以环己烷-乙酸乙酯-异丙醇-甲酸(15:3:3.5:0.2)为展开剂^[5]，展开，取出，晾干，置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点，结果见图 1。



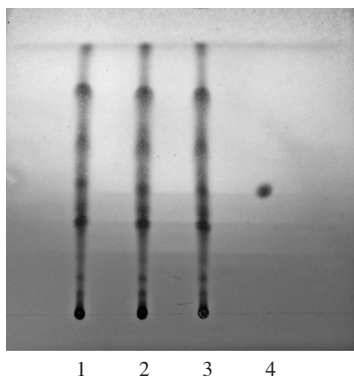
1~3. 供试品；4. 迷迭香酸对照品

图 1 迷迭香酸 TLC 图

Figure 1 TLC chromatogram of rosmarinci acid

2.1.2 齐墩果酸TLC 鉴别 取本品粉末 1 g，加甲醇 30 mL，超声处理 30 min，滤过，滤液蒸干，残渣加水 10 mL 使溶解，用三氯甲烷提取 2 次，每次 10 mL，合并三氯甲烷液，蒸干，残渣加甲醇 2 mL 使溶解，作为供试品溶液。另取齐墩果酸对照品，加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液，作为对照品溶液。按照薄层色谱法(《中国药典》2010 版一部附录 VI B)试验，吸取供试品溶液 4 μL ，对照品溶液 2 μL ，分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上，以三氯甲烷-甲醇-甲酸(40:2:1)为展开剂^[6]，展开，取出，晾干，喷以 10 %硫酸乙醇溶液，105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰。结果供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上显相同颜色的斑点，结

果见图 2。

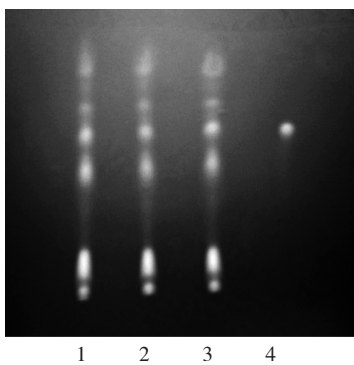


1~3. 供试品; 4. 齐墩果酸对照品

图 2 齐墩果酸 TLC 图

Figure 2 TLC chromatogram of oleanic acid

2.1.3 芦丁 TLC 鉴别 取本品粉末 1 g, 加甲醇 30 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 加水 10 mL 使溶解, 移至分液漏斗中, 用乙酸乙酯萃取 2 次, 每次 10 mL, 合并乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣加甲醇 2 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取芦丁对照品, 加乙醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。按照薄层色谱法(《中国药典》2010 版一部附录 VI B) 试验, 吸取上述溶液各 1 μ L, 分别点于同一聚酰胺薄膜上, 以乙醇:水:甲酸(7:2:1)为展开剂^[7], 展开, 取出, 晾干, 喷以 1%三氯化铝乙醇溶液, 置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上显相同颜色的荧光斑点, 结果见图 3。



1~3. 供试品; 4. 芦丁对照品

图 3 芦丁 TLC 图

Figure 3 TLC chromatogram of rutin

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以乙腈-0.1%磷酸溶液(30:70)为流动相; 流速为 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹; 检测波长为 330 nm;

柱温为 25 $^{\circ}$ C^[8-9]; 理论塔板数按迷迭香酸峰计算不低于 4000。HPLC 色谱图见图 4。

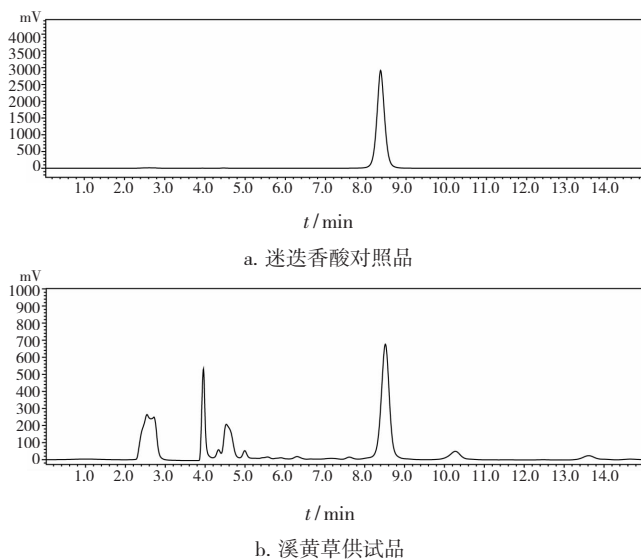


图 4 溪黄草 HPLC 色谱图

Figure 4 HPLC chromatograms of Herba Rabdosiae serrae

2.2.2 对照品溶液的制备 取迷迭香酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.2 mg 的溶液, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品粉末(过 3 号筛)约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz)45 min, 放冷, 加甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 线性关系考察 精密称取迷迭香酸对照品 15.0 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为贮备液。精密量取 1, 2, 4, 6, 8 mL, 至 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 精密吸取 20 μ L 续滤液进样测定。以峰面积对进样量(μ g)进行回归, 得线性方程 $Y=3323723X-310986$ ($r=0.9999$), 迷迭香酸在 1.2~12 μ g 范围内呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密吸取浓度为 0.24 mg $\cdot$ mL⁻¹ 迷迭香酸对照品溶液 20 μ L, 按照上述色谱条件连续重复进样 6 次, 测定峰面积, RSD 为 0.27%, 表明本法具有良好的精密度。

2.2.6 重复性试验 精密称取同一批溪黄草粉末(批号: 121105)6 份, 按供试品溶液的制备方法处理, 照上述色谱条件进样测定, 结果迷迭香酸平均含量为 0.503%, RSD 为 1.09%。

2.2.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 20 μ L,

于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样测定, 结果迷迭香酸平均峰面积为 13078938, RSD 为 1.02 %, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.8 加样回收率试验 取 6 份已知含量的溪黄草粉末(批号: 121105, 含量 0.503 %)约 0.5 g, 精密称定, 分别加入浓度为 2.580 mg·mL⁻¹ 的迷迭香酸对照品溶液 1 mL, 按供试品溶液的制备方法同法处理, 并进样测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果(n=6)

Table 1 Recovery of rosmarinci acid in the samples						
取样量 /g	含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD/%
0.5088	2.559	2.580	5.148	100.3	98.37	1.20
0.5086	2.558	2.580	5.106	98.76		
0.5060	2.545	2.580	5.063	97.60		
0.5012	2.521	2.580	5.052	98.10		
0.5065	2.548	2.580	5.089	98.49		
0.5034	2.532	2.580	5.032	96.90		

2.2.9 样品测定 按上述测定方法, 取不同来源溪黄草样品各 1 g, 精密称定, 按上述方法制成供试品溶液, 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μ L, 注入液相色谱仪, 测定, 计算迷迭香酸的含量(按干燥品计), 结果见表 2。

表 2 不同来源溪黄草含量测定结果(n=3)

Table 2 Quantitative determination results of 3 batches of samples (n=3)			
批号	药材来源	迷迭香酸 /%	RSD/%
121105	广东清远	0.542	1.32
121110	广东清远	0.514	1.56
121117	广东清远	0.529	2.14
121209	广西玉林	0.354	1.01
121211	广西玉林	0.397	2.69
130102	安徽亳州	0.485	1.14
130110	安徽亳州	0.401	2.22

3 讨论

在 TLC 鉴别中, 进行了方法耐用性考察。结果表明, 在不同温度(4 $^{\circ}$ C~35 $^{\circ}$ C)、不同相对湿度(32 %~80 %) 对主斑点的分离无明显影响, R_f 值随着温度和湿度的升高略有增加。在迷迭香酸、齐墩果酸的鉴别中, 以硅胶 G 为吸附剂的分离效果优于硅胶 H, 且自制板与预制板的展开效果无明显差别。芦丁的鉴别以聚酰胺板分离为佳。

在 HPLC 测定中, 色谱条件优化时, 曾以甲醇 -0.1 %磷酸, 甲醇 -0.1 %甲酸, 乙腈 -0.1 %磷酸, 乙腈 -0.1 %甲酸作为流动相进行对比, 结果以乙腈 -0.1 %磷酸作为流动相时, 保留时间短, 峰高较高, 峰面积较大, 分离效果最好, 故选定乙腈 -0.1 %磷酸作为流动相; 试验中对样品的提取条件进行了优化, 包括提取方法、提取时间、溶剂用量等。分别对比了甲醇超声处理和加热回流 30, 45, 60 min 的提取效果, 结果以超声处理 45 min 迷迭香酸含量最高; 溶剂选择时, 考察了 50 %甲醇、甲醇、50 %乙醇、乙醇的提取效果, 结果用甲醇提取时迷迭香酸含量最高; 此外, 还考察了溶剂用量, 分别为 10, 25, 50 mL, 结果加入 25 与 50 mL 提取时迷迭香酸含量无明显差异, 故甲醇用量选择为 25 mL。

关于溪黄草中迷迭香酸的含量测定此前曾有文献报道^[10], 但该文献系采用梯度洗脱, 方法繁琐, 分析时间长, 且迷迭香酸与其他组分分离不佳, 影响了结果的准确性。本文所采用的方法简便、重复性好, 结果准确可靠, 建立的质量标准可用于该药材的质量控制。

参考文献:

[1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(上册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 886.

[2] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准(第一册)[M]. 广州: 广东科技出版社, 2004: 204-205.

[3] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准(第二册)[M]. 广州: 广东科技出版社, 2011: 347-353.

[4] 谢兴亮, 盛艳梅. 溪黄草的研究进展[J]. 医药导报, 2011, 30(4): 494-497.

[5] 李灼全, 梁华伦. 薄层扫描法测定丹参中的迷迭香酸[J]. 内蒙古中医药, 2009, 28(16): 29-30.

[6] 谢新, 狄留庆, 赵晓莉, 等. 不同产地刺五加叶的质量比较[J]. 医药导报, 2009, 28(4): 507-508.

[7] 常瑛, 王四旺, 张超, 等. 辣蓼中芦丁的薄层及紫外光谱鉴别[J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(10): 46-51.

[8] 尹培培, 卢楠, 谢汝根, 等. 肿节风野生与栽培品不同部位迷迭香酸含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 11(21): 97-99.

[9] 陈丽, 敬应春, 周银, 等. HPLC 法测定五淋化石颗粒中迷迭香酸[J]. 国际药学研究杂志, 2013, 40(1): 105-107.

[10] 朱德全, 黄松, 陈建南, 等. 不同品种、不同产地溪黄草咖啡酸与迷迭香酸的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 114-117.

(编辑: 宋威)