

## ·质量分析研究·

## 异芹菜脑在隔山香药材中的含量测定及其对心肌细胞缺氧/复氧损伤保护作用

邓丽红<sup>1</sup>, 陈建南<sup>1</sup>, 强 皎<sup>2</sup>, 李润美<sup>1</sup>, 汪 芳<sup>1</sup>, 朱 莉<sup>3</sup>, 张 军<sup>1</sup>(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 深圳致君制药有限公司, 广东 深圳 518110; 3. 广东药学院, 广东 广州 510006)

**摘要:** **目的** 建立隔山香药材中异芹菜脑(Isoapide, Iso)的高效液相色谱法(HPLC), 测定方法并初步探讨异芹菜脑对体外培养乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用。**方法** 采用高效液相色谱法, 色谱柱: Kromasil C<sub>18</sub>柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 以甲醇-水(70:30)洗脱, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 280 nm, 柱温室温, 进样量: 10 μL。并用原代培养的乳鼠心肌细胞建立缺氧复/氧损伤模型, 异芹菜脑在建模前进行干预, 心肌细胞随机分为 5 组, 空白对照组(Control, CON), 缺氧/复氧组(hypoxia/reoxygenation, H/R), 异芹菜脑低、中、高剂量干预组 (IsoL、IsoM、IsoH)。缺氧 4 h/复氧 4 h 后, 采用 CCK-8 法检测心肌细胞存活率。**结果** 异芹菜脑在 0.02096~0.2096 mg·mL<sup>-1</sup> 线性关系良好( $r=0.9999$ ), 平均回收率为 98.09%, RSD=1.25%。与空白对照组比较, 缺氧/复氧组心肌细胞存活率显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与缺氧/复氧组比较, IsoL、IsoM、IsoH 剂量干预组心肌细胞存活率均显著升高。**结论** 异芹菜脑对体外培养乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤具有一定的保护作用, 隔山香药材中异芹菜脑的 HPLC 测定方法准确、简便、重现性好, 有助于完善隔山香药材的质量控制。

**关键词:** 异芹菜脑; 含量测定; 高效液相色谱法; 心肌细胞; 缺氧/复氧损伤

**中图分类号:** R284.1; 285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)04-0472-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.04.020

### Content Determination of Isoapiole in Lemonfragrant Angelica Root by HPLC and Its Protective Effects on Neonatal Rat Cardiomyocytes with Hypoxia/Reoxygenation Injury

DENG Lihong<sup>1</sup>, CHEN Jiannan<sup>1</sup>, QIANG Jiao<sup>2</sup>, LI Runmei<sup>1</sup>, WANG Fang<sup>1</sup>, ZHU Li<sup>3</sup>, ZHANG Jun<sup>1</sup> (1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Shenzhen Zhijun Pharmaceutial Corporation, Shenzhen 518110 Guangdong, China; 3. Guangdong Pharmacological University, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

**Abstract: Objective** To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) method for the determination of isoapiole in Lemonfragrant Angelica root and to investigate the protective effect of isoapiole on cultured neonatal rat cardiomyocytes with hypoxia/reoxygenation injury. **Methods** HPLC method was performed on Kromasil C<sub>18</sub> column (4.60 mm×250 mm, 5 μm) with a mobile phase of methanol-water (70:30) at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and at room temperature. The detective wavelength was set at 280 nm and the injection volume was 10 μL. Primary cultured neonatal rat cardiomyocytes were exposed to hypoxia/reoxygenation and then were randomly divided into 5 groups, namely blank control group, hypoxia/reoxygenation(H/R) group, and low-, middle-and high-dose of isoapiole groups. After hypoxia for 4h and reoxygenation for 4 h, the survival rate of cardiomyocytes was detected by CCK-8 method. **Result** The calibration curve of isoapiole showed a good linearity relationship in the range of 0.02096~0.2096 mg·mL<sup>-1</sup> ( $r=0.9999$ ). The average recovery was 98.09% ( $n=6$ ), and the relative standard deviation was 1.25%. Compared with the blank control group, cardiomyocytes survival rate in H/R group was decreased significantly

收稿日期: 2014-03-04

作者简介: 邓丽红, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药新药药理学研究。Email: dengliuli890214@163.com。通讯作者: 张军, 研究员, 研究方向: 中药新药药理学研究。Email: zhjxsh@aliyun.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81274191)。

(45.41 ± 9.73 % vs 100.00 ± 10.05 % ,  $P < 0.01$ ) . Compared with H/R group, cardiomyocytes viability in isoapiole groups was increased significantly. **Conclusion** Isoapiole has protective effect on hypoxia/reoxygenation injured cardiomyocytes in vitro. The developed method is accurate, simple, and reproducible, which can be used for the quality control of Lemonfragrant Angelica root.

**Keywords:** Isoapiole; Content determination; High performance liquid chromatography; Cardiomyocytes; Hypoxia/reoxygenation injury

隔山香为伞形科山芹属植物隔山香 *Ostericum citriodorum*(Hance)Yuan et Shan 的根及全株, 其味辛、微苦, 性平, 有疏风清热、祛痰止咳、活血散瘀、行气止痛的功效, 用于治疗腹痛、心绞痛、胃痛、跌打损伤等疾病, 分布于两广、闽湘等地<sup>[1]</sup>。隔山香是我国特有物种, 文献记载最早见于清代《植物名实图考》<sup>[2]</sup>。《中药大辞典》、《全国中草药汇编》及地方本草著作如《广西实用中草药新选》亦有收载隔山香药材的功效与应用<sup>[3-5]</sup>。而且还有含隔山香药材的成方制剂收载于国家中药部颁标准, 如护心胶囊<sup>[6]</sup>。现代药理研究<sup>[7-8]</sup>表明, 隔山香具有镇咳、祛痰、抗炎、抑菌等药效, 但未见隔山香药材及其成分对心血管药理的研究。目前关于隔山香药材质量控制的研究基础薄弱, 仅见 TLC 鉴别报道和挥发油的气质测定<sup>[9-12]</sup>。故本研究在从隔山香中分离鉴定挥发性主成分异芹菜脑(Isoapide, Iso)基础上, 采用高效液相色谱(HPLC)法, 建立 Iso 的含量测定方法, 并评价其对心肌细胞缺氧/复氧损伤模型的保护效果, 为隔山香药材的质量控制提供方法和依据。

## 1 仪器与试药

**1.1 仪器** LC-20A 高效液相色谱仪(包括 UV 检测器, LC-20AT 泵, SIL-20A 自动进样器, Labsolution 色谱工作站), 日本岛津公司; KQ-400KDE 型高功率数控超声波清洗器, 江苏昆山超声仪器有限公司; CP225D 型电子分析天平(十万分之一), 美国 Mettler Toledo 公司; AB204-N 型电子分析天平(万分之一), 美国 Mettler Toledo 公司; 超净工作台, SW-CJ-JF 型, 苏州安泰空气技术有限公司; 倒置相差显微镜, AE21 型, 麦克奥迪公司(Motic); 台式离心机, TDL80-2B 型, 上海安亭科学仪器厂; 加热磁力搅拌器, MYP11-2 型, 上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司; 酶标仪, Bio-RAD 型, BMG LABTECH 公司; Modular Incubator Chamber, MIC-101 型, 美国比卢普斯罗森堡公司(Billups-Rothenberg); Single Flow

Meter, SFM 3001 型, 美国比卢普斯罗森堡公司(Billups-Rothenberg)。

**1.2 试药** 对照品异芹菜脑(Iso), 为广州中医药大学新药开发研究中心分离、鉴定, 经面积归一化法确定纯度大于 99.0%; 甲醇、乙醇为色谱纯; 液相用水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。隔山香药材, 购于广西玉林药材市场, 经赖小平教授鉴定为隔山香植物 *Ostericum citriodorum*(Hance)Yuan et Shan 的根。胎牛血清(批号: 16000-044)、新生小牛血清(批号: 1076962)、达尔伯克(氏)改良伊格尔(氏)培养基(DMEM)(批号: R10013686)、不含钙和镁离子平衡盐溶液(D-Hank's, 批号: 8113239)、胰蛋白酶(批号: P0013B), 均为美国 Gibco 公司产品; 磷酸缓冲液 PBS(批号: 79803-73-9)为 HyClone 公司产品; II 型胶原酶(批号: 17100-017)、3, 5- 溴脱氧尿苷(批号: B5002)均为美国 Sigma 公司产品; 牛血清白蛋白(批号: 9048-46-8)为 Roche 公司分装产品; CCK-8 细胞活力检测试剂盒(批号: 20131009), 南京建成生物工程研究所。

**1.3 动物** 1~3 d 天 SD 大鼠乳鼠, 雌雄不限, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK(粤)2013-0020)。

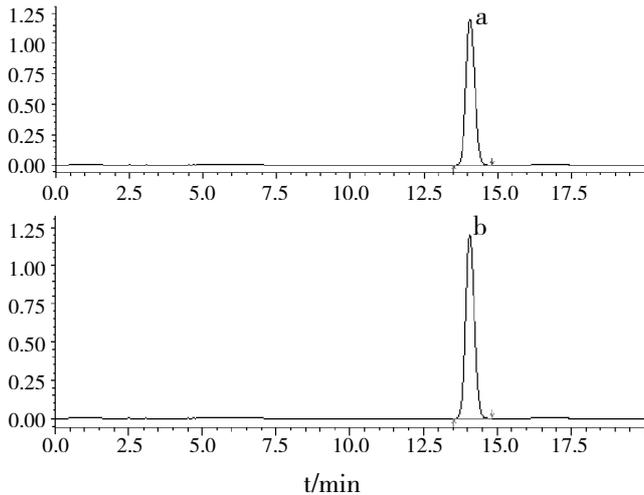
## 2 方法与结果

### 2.1 含量测定方法的建立

**2.1.1 色谱条件** 经优选色谱条件, 以 Kromasil C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)为固定相, 以甲醇-水(70:30)为流动相, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 280 nm, 柱温为室温, 进样量: 10 μL, 结果显示, 色谱峰分离良好。见图 1。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 取 Iso 对照品 5.0 mg, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 Iso 对照品溶液。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 取隔山香药材粗粉 0.5 g, 精密称定, 精密加入 50 mL 甲醇, 称定质量, 超声



a. 隔山香药材; b. 异芹菜脑对照品

图 1 隔山香 HPLC 色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of Lemonfragrant Angelica

处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 滤过, 取续滤液, 即得。

**2.1.4 供试品溶液测定** 取上述供试品溶液适量, 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 精密吸取 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 结果显示隔山香药材平均含量为 7.77 mg·g<sup>-1</sup>。

**2.1.5 线性关系的考察** 精密吸取 2.1.2 项下的 Iso 对照品溶液 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 mL 置于 10 mL 量瓶中, 分别加甲醇至刻度, 稀释成 0.020960, 0.041920, 0.062880, 0.083840, 0.12576, 0.16768, 0.20960 mg·mL<sup>-1</sup> 的外标液, 再分别吸取各稀释后的对照品溶液 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 按 2.1 项下色谱条件测定峰面积, 以 Iso 对照品溶液浓度(mg·mL<sup>-1</sup>)对峰面积绘制标准曲线, Iso 回归方程为:  $Y=26094244.9X+50521.4$  ( $r=0.9999$ )。结果表明, 在上述色谱条件下, Iso 在 0.02096~ 0.2096 mg·mL<sup>-1</sup> 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

**2.1.6 精密度试验** 精密吸取浓度为 0.2096 mg·mL<sup>-1</sup> 的 Iso 对照品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, Iso 峰面积的 RSD 为 0.31 %, 表明仪器精密度良好。

**2.1.7 重复性试验** 精密称取同一批次的隔山香药材粉末(广西玉林)共 6 份, 按照 2.1.3 项下方法分别制备供试品溶液, 精密吸取 10 μL, 按 2.1.4 项下方法测定并计算 Iso 的含量, 测得其平均含量为 7.77 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 为 0.97 %, 表明本方法重复性良好。

**2.1.8 稳定性试验** 精密称取同一批次的隔山香药材粉末(广西玉林)共 6 份, 按照 2.1.3 项下方法分别

制备供试品溶液, 精密吸取 10 μL, 按 2.1.4 项下方法, 分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样测定, 异芹菜脑峰面积的 RSD 为 0.87 %, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.1.9 加样回收率试验** 见表 1。取同一批已知含量(7.77 mg·g<sup>-1</sup>)的隔山香药材粉末(广西玉林)各 6 份, 分别精密加入 Iso 对照品适量, 按 2.1.3 项下制备方法操作, 测定并计算 Iso 的回收率。Iso 的平均回收率为 98.09 %, RSD=1.25 %, 表明该法具有良好的回收率, 适合本品的含量测定。

表 1 加样回收率试验结果(n=6)

Table 1 Recovery of isoapiole in the samples

试验序号	供试品 取量/g	供试品 含量/mg	对照品加 入量/mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	0.2345	1.8477	1.6768	3.5002	98.55		
2	0.2417	1.9044	1.6768	3.5207	96.39		
3	0.2363	1.8619	1.6768	3.5249	99.18	98.09	1.25
4	0.2385	1.8792	1.6768	3.5043	96.92		
5	0.2368	1.8658	1.6768	3.5101	98.06		
6	0.2348	1.8500	1.6768	3.5173	99.43		

**2.2 对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用**

**2.2.1 大鼠乳鼠心肌细胞原代培养** 取 1~3 d SD 大鼠乳鼠 10 只, 用 75 %乙醇消毒后放入无菌操作台上, 无菌条件下开胸取心, 立即放入盛有预冷的无 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> PBS 液平皿中漂洗, 吸取血凝块和红细胞, 剪去大血管、心房组织(心脏上部约 2/3), 把心肌组织放入盛有 3 mL 0.25 % EDTA 胰酶的离心管中, 4 ℃过夜。在浸泡心脏的胰酶中加入新生牛血清 5 mL, 37 ℃水浴 5 min, 弃去上清液, 加入 3 mL 含 5 mg·mL<sup>-1</sup> BSA 的 0.08 % II 型胶原酶溶液, 37 ℃水浴不超过 1 min, 弃去上清液, 在盛有心脏组织的离心管中放入磁珠, 加入 4 mL 上述 II 型胶原酶溶液, 37 ℃水浴中磁力搅拌 15 min, 收集上清细胞悬液, 立即加入 4 mL 新生小牛血清(newborn calf serum, NCS), 1000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 沉淀用 4 mL NCS 重悬, 于 37 ℃, 5 %CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育。并且重复上述步骤, 直至组织团块全部消化。合并所有细胞悬液, 1000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 细胞沉淀重悬浮于含 20 %胎牛血清和 100 μmol·L<sup>-1</sup> 5- 溴 -2- 脱氧尿苷的 DMEM 培养基中。细胞悬液接种于培养瓶, 37℃, 5 %CO<sub>2</sub> 孵育 2 h, 使成纤维细胞贴壁, 然后翻转培养瓶, 使心肌细胞在培养面贴壁生长。细胞培养 24 h 后换液, 此时可见心肌细胞搏动。续培养 2~3 d 后, 重新接种于 96 孔板中进行实验, 种板密度约 4 ×

$10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ , 每孔  $100 \mu\text{L}$ 。

**2.2.2 缺氧 / 复氧损伤模型的建立** 用 (KRB 液 ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ): NaCl 115, KCl 4.7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$  24,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{CaCl}_2$  2.5, HEPS 10) 漂洗细胞 2 次, 用含 0.01 % ( $w/v$ ) BSA 的 KRB 作为培养液 (缺氧液)。细胞放置于气密的 Billups-Rothenberg 培养盒中, 向培养盒以  $20 \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  的速率通入氮气 15 min。关闭所有的连接阀后, 将培养盒放入培养箱中, 使细胞在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  的条件下进行缺氧培养, 在缺氧 4 h 后, 打开培养盒, 用新鲜的 DMEM 置换 KRB 液, 将细胞放入  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  培养箱中进行复氧培养 4 h。

**2.2.3 实验分组及给药** 把原代培养的大鼠心肌细胞随机分成 5 组: 空白对照组 (Control, CON), 缺氧 / 复氧组 (hypoxia/ reoxygenation, H/R), Iso 低、中、高剂量干预组 (IsoL、IsoM、IsoH, 剂量分别为 0.002, 0.020,  $0.200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。各组在实验前均给予无糖、无酚红的 DMEM 高糖培养液孵育 24 h, 使其同步化。空白对照组细胞正常培养, 其给药组细胞在建模前 24 h 用 Iso 进行干预, 然后进行缺氧 / 复氧处理。

**2.2.4 CCK-8 法检测细胞存活率** 复氧后的 96 孔板的细胞, 每孔加入  $10 \mu\text{L}$  (培养液体积的 1/10) CCK-8 溶液, 以不含细胞的培养液做本底对照, 每组设 8 复孔, 培养箱中孵育 3 h 后, 酶标仪 450 nm 处检测各孔的吸光度 (A) 值, 根据所测 A 值计算各组细胞存活率。模型组存活率 = (模型组 ( $A_i$ ) 值 - 模型本底对照组 ( $A_{i0}$ ) 值) / (空白对照组 ( $A_n$ ) 值 - 空白对照本底对照组 ( $A_{n0}$ ) 值)  $\times 100 \%$ , 给药组存活率计算同上。

**2.2.5 统计学处理方法** 采用 SPSS17.0 统计软件, 数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 对数据进行单因素方差分析 (one way-ANOVA) 和 LSD (Least significant difference) 多重比较分析。

**2.3 异芹菜脑对缺氧/复氧损伤心肌细胞存活率的影响** 见表 2。利用 CCK-8 法检测细胞存活率显示, 在正常培养条件下, 以空白对照组心肌细胞的存活率为 100 %, 单独使用 Iso 低、中、高剂量进行干预后, 其存活率分别为  $(95.14 \pm 4.30)\%$ 、 $(95.38 \pm 11.92)\%$ 、 $(93.25 \pm 13.58)\%$ , 可见 Iso 在本实验剂量范围内, 对心肌细胞无明显的毒性作用。

缺氧 / 复氧条件下, 空白对照组心肌细胞存活率  $(100.00 \pm 10.05)\%$  与缺氧 / 复氧组心肌细胞存活率  $(45.41 \pm 9.73)\%$  比较, 两组差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 说明缺氧 / 复氧损伤导致心肌细胞存活率明

表 2 各组心肌细胞存活率的比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Table 2 Comparison of myocardial viability in each group

组别	浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	OD	存活率 / %
CON	-	$0.2483 \pm 0.0250$	$100.00 \pm 10.05$
H/R 组	-	$0.1128 \pm 0.0242$	$45.41 \pm 9.73^{**}$
IsoL 组	$2 \times 10^{-3}$	$0.1515 \pm 0.0242$	$60.99 \pm 9.73^{\#}$
IsoM 组	$2 \times 10^{-2}$	$0.1577 \pm 0.0110$	$63.50 \pm 4.44^{\#\#}$
IsoH 组	$2 \times 10^{-1}$	$0.1617 \pm 0.0159$	$65.09 \pm 6.40^{\#\#\#}$

注: 与空白对照组比较,  $^{**}P < 0.01$ ; 与 H/R 组比较,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{\#\#}P < 0.01$ 。

显降低。Iso 低、中、高剂量干预 24 h 后, 可不同程度地提高缺氧 / 复氧心肌细胞的存活率, 且随着给药剂量的升高而增加。其值依次为:  $(60.99 \pm 9.73)\%$ 、 $(63.50 \pm 4.44)\%$ 、 $(65.09 \pm 6.40)\%$ , 与缺氧 / 复氧组比较, 差异有统计学意义 (均  $P < 0.01$ )。从而证实了 Iso 具有增强缺氧 / 复氧心肌细胞活力及提高存活率的作用。

### 3 讨论

隔山香作为我国的特有物种, 在中药材市场属于冷背品种, 关于其化学、药理的研究不多, 本课题组对隔山香药材的化学成分进行研究, 分离得到多种苯丙素类化合物<sup>[1]</sup>, 并建立了苯丙素类化合物中挥发性成分异芹菜脑和水溶性成分芹菜脑醛的薄层色谱鉴别方法<sup>[9]</sup>, 还建立了隔山香挥发油的 GS/MS 分析方法<sup>[12]</sup>, 确定隔山香挥发油中质量分数较高的成分包括异芹菜脑、人参炔醇、肉豆蔻醚、异榄香脂素等<sup>[13]</sup>。

本研究在从隔山香中分离鉴定挥发性成分 Iso 基础上, 采用高效液相色谱 (HPLC) 法, 建立了 Iso 的含量测定方法, 还证明了该成分的心肌保护效果。以指标成分药效活性支持的药材含量测定具有一定的科学性, 本研究为完善隔山香药材的质量控制提供了方法。

### 参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 (下册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 2425.
- [2] 吴其睿. 植物名实图考[M]. 北京: 商务印书馆, 1957: 620.
- [3] 江苏新医学院编. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 2425.
- [4] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1976: 826.
- [5] 广西实用中草药新选编辑部. 广西实用中草药新选[M]. 广西: 广西人民出版社, 1969: 212.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国卫生部药品标准 (中药成

- 方制剂)第十九册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 82.
- [7] 田文艺, 兰芳, 李淑平, 等. 隔山香的初步药理研究[J]. 中国药理学通报, 1989, 5(4): 249.
- [8] 马允慰, 吴皓, 胡小鹰, 等. 隔山香成分-异苜蓿脑抑制平滑肌作用的初步实验研究[J]. 中成药研究, 1985, 9: 183.
- [9] 张军, 李润美, 李文周, 等. 隔山香药材的薄层色谱鉴别[J]. 中药材, 2009, 32(3): 359-360.
- [10] 冯枫. 止咳定喘片的薄层鉴别[J]. 广西医学, 2000, 22(5): 986-987.
- [11] 唐超, 谢小明. 隔山香药材性状及鉴别检查的研究[J]. 中医药导报, 2008, 14(5): 106-107.
- [12] 张军, 李润美, 卫罡, 等. 隔山香挥发油化学成分的研究[J]. 中草药, 2009, 40(8): 1221-1222.
- [13] 张军. 隔山香药效物质基础及其复方大孔吸附树脂精制工艺“谱效结合”的评价研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2008.

(编辑: 邓响潮)

## HPLC 法同时测定杏香兔耳风不同制剂中 8 种咖啡酰奎宁酸含量

黄 骏<sup>1</sup>, 冯育林<sup>1,2</sup>, 李志峰<sup>1,2</sup>, 宋永贵<sup>1,2</sup>, 陆兔林<sup>3</sup>, 毛春芹<sup>3</sup>, 苏 丹<sup>1,2</sup> (1. 江西中医药大学, 江西南昌 330006; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西南昌 330006; 3. 南京中医药大学, 江苏南京 210046)

**摘要:** **目的** 建立同时测定杏香兔耳风制剂中 8 种咖啡酰奎宁酸有效成分含量测定的方法, 并比较不同厂家生产的杏香兔耳风单方与复方制剂的含量差异。**方法** 采用 Cosmosil RP-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱; 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 328 nm; 柱温: 35 ℃; **结果** 8 种被测咖啡酰奎宁酸成分分离度良好; 各成分质量浓度与峰面积在测定范围内均呈良好的线性关系 ( $r > 0.9995$ ); 重复性良好; 平均加样回收率在 98.14%~101.73% (RSD 为 1.26%~2.73%) ( $n=9$ )。所收集的不同厂家杏香兔耳风制剂中, 酚酸含量相差较大; 杏香兔耳风胶囊(厂家 1) 中咖啡酰奎宁酸的含量相对较高, 其他厂家的杏香兔耳风制剂酚酸含量相近。**结论** 该方法准确、简单, 重复性良好, 可用于不同杏香兔耳风制剂中 8 种酚酸的含量测定。

**关键词:** 杏香兔耳风制剂; 咖啡酰奎宁酸; 含量测定; 高效液相色谱法

**中图分类号:** R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)04-0476-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.04.021

### Simultaneous Determination of Eight Caffeoylquinic Acids from Different *Ainsliaea fragrant* Champ Preparations by HPLC

HUANG Jun<sup>1</sup>, FENG Yulin<sup>1,2</sup>, LI Zhifeng<sup>1,2</sup>, SONG Yonggui<sup>1,2</sup>, LU Tulin<sup>3</sup>, MAO Chunqin<sup>3</sup>, SU Dan<sup>1,2</sup> (1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006 Jiangxi, China; 2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation of Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006 Jiangxi, China; 3. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210046 Jiangsu, China)

**Abstract: Objective** To establish a method for the simultaneous determination of eight kinds of caffeoylquinic acids in different preparations of *Ainsliaea fragrant* Champ, and to compare the content difference in single herb and compound preparations of *Ainsliaea fragrant* Champ from different producers. **Methods** HPLC was performed on Cosmosil RP - C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with gradient elution, and acetonitrile-0.1 % formic acid aqueous solution was used as the mobile phase. Flow rate was 1 mL·min<sup>-1</sup> and detection wavelength was set at 328 nm. The column temperature was 35 ℃. **Results** Good separation was shown in eight kinds of caffeoylquinic acids and

收稿日期: 2014-03-07

作者简介: 黄骏, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药活性成分研究。Email: hjnature@163.com。通讯作者: 苏丹, 副教授, 研究方向: 药物分析研究。Email: sudan\_nj@163.com。

基金项目: 国家自然青年科学基金项目(81102787); 江西省青年科学基金计划重点项目(2013ACB21005); 江西中医药大学博士启动基金(Y055); 江西省卫生厅中医药科研计划(2012A026, 2012A158); 江西中医药大学科研基金(ZX1001)。