

UPLC 测定不同粒度肿节风有效成分的含量

程 会, 汤庆发, 陈飞龙, 邢学锋(南方医科大学 中医药学院, 广东 广州 510515)

摘要: 目的 建立超高效液相色谱(UPLC)法同时测定肿节风超微粉中异嗪皮啶和迷迭香酸的含量, 并比较不同粒度肿节风有效成分溶出率差异。方法 采用 UPLC 法, Eclipse Plus C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm), 流动相为甲醇(A)-0.1%磷酸(B), 梯度洗脱, 流速为 0.4 mL·min⁻¹, 柱温为 35 ℃, 紫外检测波长为 342 nm。结果 异嗪皮啶和迷迭香酸分别在 9.97~59.84 μg·mL⁻¹(*r*=0.99995), 10.90~60.14 μg·mL⁻¹(*r*=0.99935) 范围内线性关系良好, 平均回收率(*n*=6)分别为 95.16%(RSD=2.15%), 100.31%(RSD=2.29%)。结论 所建立的 UPLC 法操作简便快捷、经济、准确可靠、分离度好, 可为肿节风药材有效成分分析和质量控制提供新的方法。

关键词: 肿节风; 异嗪皮啶; 迷迭香酸; 微粒; 超高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)04-0480-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.04.022

Determination of Active Ingredients of Herba Sarcandrae Glabrae with Different Particle Sizes by Ultra Performance Liquid Chromatography

CHENG Hui, TANG Qingfa, CHEN Feilong, XING Xuefeng(College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515 Guangdong, China)

Abstract: Objective To establish an ultra performance liquid chromatography (UPLC) method for the simultaneous determination of isofraxidin and rosmarinci acid in Herba Sarcandrae Glabrae, and to compare the dissolution rate of the active ingredients with different particle sizes. **Methods** UPLC was performed on Eclipse Plus C₁₈ (2.1×50 mm, RRHD 1.8 μm) with the mobile phase being methanol-0.1% phosphoric acid by gradient elution. The flow rate was 0.4 mL·min⁻¹, the column temperature was 35 ℃, and UV wave-length was 342 nm. **Results** Isofraxidin and marinci acid showed good linearity in 9.97 ~ 59.84 μg·mL⁻¹(*r*=0.99995), 10.90 ~ 60.14 μg·mL⁻¹(*r*=0.99935), respectively. The mean recovery(*n*=6) was 95.16%(RSD = 2.15%), 100.31%(RSD = 2.29%), respectively.

Conclusion The established UPLC method is simple, rapid, economical, accurate and reliable with good separation for analysis of the active ingredients of Herba Sarcandrae Glabrae and its quality control.

Keywords: Herba Sarcandrae Glabrae, Isofraxidin; Rosmarinci acid; Microparticle; Ultra performance liquid chromatography

肿节风是金粟兰科植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 的干燥全草, 又名草珊瑚、九节茶、接骨木、骨风消等, 收载于 2010 版《中华人民共和国药典》一部。本品具有清热凉血、活血消斑、祛风通络等功效^[1]。现代药理学研究表明肿节风具有抑制肿

瘤、抗菌消炎、抑制免疫、抗疲劳、镇痛等作用^[2]。对中药材进行细胞级超微粉碎可使生药材粒径降低至微米, 从而大大提高生物利用度, 有效成分得以充分吸收与利用^[3], 在中药的研究中显示出特有的优势。肿节风主要含有酚类、倍半萜类、黄酮类和香

收稿日期: 2014-03-04

作者简介: 程会, 女, 本科在读学生。Email: 15521112193@163.com。通讯作者: 邢学锋, 讲师, 研究方向: 中药新药研发及中药复方配伍规律研究。Email: xxf@fimmu.com。

基金项目: 广东省教育厅面上项目(LYM10046); 广东省中医药局项目(201121660)。

豆素类，是体现其药理活性的主要成分^[4-6]，黄明菊等^[7]从肿节风中成功分离得到含量较高的酚酸类成分迷迭香酸、香豆素类成分异秦皮啶及其他 5 个化合物，异秦皮啶在体外活性实验中显示出一定的肿瘤细胞抑制作用^[6]。而迷迭香酸具有免疫调节、抗血栓、抗血小板凝集、抗炎抗菌、抗病毒、抗肿瘤等生理活性功能^[8-11]。《中华人民共和国药典》采用 HPLC 法测定肿节风中异秦皮啶和迷迭香酸的含量^[1]。而本研究首次采用超高效液相色谱(UPLC)法建立了同时测定异秦皮啶和迷迭香酸这两种有效成分的方法，并且结合超微粉碎技术比较不同粒度肿节风有效成分的溶出率。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1290 Infinity 超高压液相色谱仪，安捷伦科技有限公司；紫外检测器，G1315A(DAD)检测器，安捷伦科技有限公司；CP225D 电子分析天平，德国 Saytonus 公司；JP-10 超声提取仪，深圳市洁盟清洗设备有限公司；HM-701B 型超微粉碎机，北京环亚天元机械公司。

1.2 药品及试剂 肿节风，安徽广印堂中药股份有限公司，批号：121101；异秦皮啶，深圳市辉鹏科技开发有限公司，批号：110837-201206；迷迭香酸，深圳市辉鹏科技开发有限公司，批号：110837-201206；乙腈、甲醇为色谱纯，德国 Merck 公司。

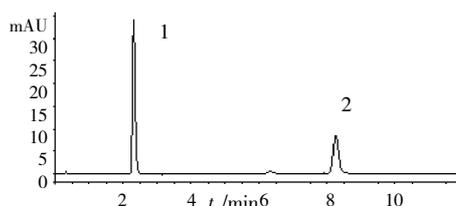
2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱：Eclipse Plus C₁₈(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm)；流动相及梯度洗脱程序，见表 1；流速：0.4 mL·min⁻¹；柱温：35℃；紫外检测波长：342 nm；进样量：1 μL。该色谱条件下，异秦皮啶和迷迭香酸两个成分与相邻峰的分度度均大于 1.5，理论塔板数均不低于 5000，对称因子均在 0.8 ~ 1.0 之间，对照品和样品的色谱图见图 1 ~ 图 2。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

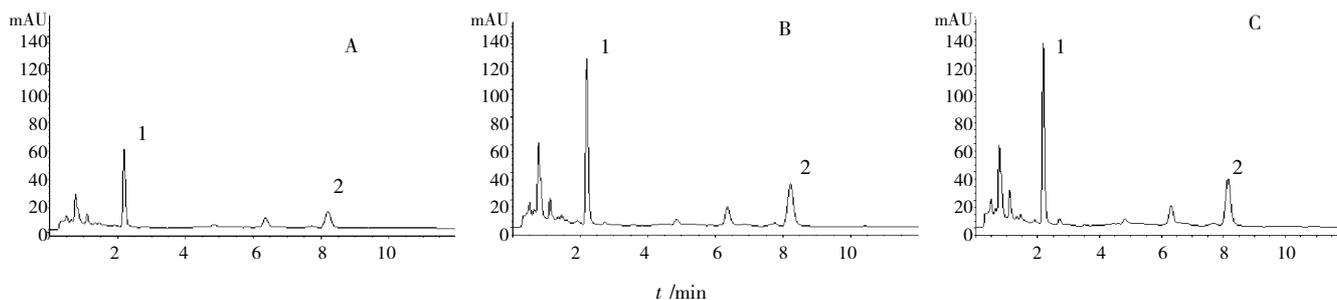
t /min	甲醇 /%	0.1% 磷酸 /%
0 ~ 3	26	74
3 ~ 4	26 ~ 29	74 ~ 71
4 ~ 15	29	71



1. 异秦皮啶；2. 迷迭香酸

图 1 对照品的 UPLC 色谱图

Figure 1 UPLC chromatograms of reference substance



1. 异秦皮啶；2. 迷迭香酸。A. 饮片；B. 粗粉；C. 超微粉

图 2 肿节风 UPLC 色谱图

Figure 2 UPLC chromatograms of Herba Sarcandrae Glabrae Pieces

2.2 对照品溶液的制备 精密称取异秦皮啶、迷迭香酸适量，分别加甲醇制成浓度为 100 μg·mL⁻¹ 的标准品溶液，备用。

2.3 超微粉的制备 将肿节风饮片干燥 24 h 后取 2.0 kg，经超微粉碎，得肿节风的超微粉。超微粉碎条件：温度 0 ~ 5℃，15 min。所得超微粉经扫描电镜测定粒径为 20 μm，备用。

2.4 供试品溶液的制备 精密称取肿节风饮片、粗粉和超微粉各 2.0 g 置于具塞玻璃瓶中，分别加入 25.0 mL 50% 甲醇溶液（分析纯），称质量，记录数据，超声提取 60 min，冷却后再称质量，然后用 50% 甲醇补足减少的质量，抽滤取滤液，再用 0.22 μm 超微滤膜过滤，备用。

2.5 线性关系考察 分别精密吸取 100 μg·mL⁻¹ 的对

照品溶液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL, 用甲醇定容至 5 mL 容量瓶中, 在 2.1 色谱条件下以对照品浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。结果表明异嗪皮啶在 9.97 ~ 59.84 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内与色谱峰面积呈良好的线性关系, 线性回归方程为: $Y=20.856X-14.611$, $r=0.99995$; 迷迭香酸在 10.90 ~ 60.14 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内与色谱峰面积呈良好的线性关系, 线性回归方程为: $Y=16.783X-28.457$, $r=0.99935$ 。

2.6 方法学考察

2.6.1 仪器精密度试验 精密吸取标准品溶液 1 μL , 在 2.1 项下色谱条件下连续进样 6 次, 异嗪皮啶和迷迭香酸的峰面积的 RSD 分别为 1.05 %、1.09 %, 结果证明仪器精密度良好。

2.6.2 样品稳定性试验 取一份肿节风超微粉样品按供试品溶液的制备项下方法配制成供试品溶液, 2.1 项下色谱条件下, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h 等 7 个时间点进样测定, 进样量均为 1 μL , 异嗪皮啶和迷迭香酸峰面积的 RSD 分别为 0.58 %和 2.70 %, 结果表明样品溶液在 48 h 内稳定。

2.6.3 重复性试验 取同一批次肿节风超微粉样品 6 份, 按 2.4 项下方法配制成供试品溶液, 在 2.1 项下色谱条件下进样测定, 6 份样品异嗪皮啶和迷迭香酸浓度的 RSD 值分别为 0.52 %, 1.22 %, 结果表明此方法具有较好的重复性。

2.6.4 加样回收试验 见表 2 ~ 表 3。精密称取 6 份已知含量的肿节风超微粉, 加入相应量的异嗪皮啶和迷迭香酸标准品。然后进行色谱分析, 含量测定, 计算回收率。

2.7 样品的测定 [12-13] 见表 4 ~ 表 5。分别精密取 3 份肿节风饮片、粗粉、超微粉供试品溶液, 在“2.1”色谱条件下进样分析, 计算异嗪皮啶和迷迭香酸含量。数据显示, 肿节风超微粉的有效成分溶出率相对于饮片及粗粉有升高的趋势。

表 2 异嗪皮啶加样回收率试验结果

已知样品质量/ μg	加标准品质量/ μg	理论质量/ μg	实际测量值/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
18.1589	13.0000	31.1589	29.6495	95.16		
17.9240	13.0000	30.9240	31.3339	101.33		
17.2572	16.0000	33.2572	33.1849	99.78	95.16	2.15
17.8783	16.0000	33.8783	33.8831	100.01		
17.5783	20.0000	37.5783	37.6217	100.12		
17.5400	20.0000	37.5400	37.1999	99.09		

表 3 迷迭香酸加样回收率试验结果 (n=6)

已知样品质量/ μg	加标准品质量/ μg	理论质量/ μg	实际测量值/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
15.3567	11.0000	26.3567	26.0813	98.96		
14.9761	11.0000	25.9761	26.9249	103.65		
13.8672	13.0000	26.8672	27.3991	101.98	100.31	2.29
15.1817	13.0000	28.1817	27.3556	97.07		
15.0021	16.0000	31.0021	31.0424	100.13		
14.8809	16.0000	30.8809	30.9066	100.08		

表 4 不同粒度肿节风中异嗪皮啶溶出率测定结果 (n=6)

不同粒度肿节风药材	样品中异嗪皮啶含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	平均含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%		
药材	0.1752	0.1757	0.177	0.1760	0.59
粗粉	0.3736	0.3787	0.376	0.3761	0.68
超微粉	0.4000	0.4029	0.4024	0.4018	0.39

表 5 不同粒度肿节风中迷迭香酸溶出率测定结果 (n=6)

不同粒度肿节风药材	样品中迷迭香酸含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	平均含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%		
药材	0.1247	0.1257	0.1289	0.1265	1.73
粗粉	0.3126	0.2982	0.3054	0.3054	2.36
超微粉	0.3339	0.3375	0.3328	0.3347	0.74

3 讨论

本研究建立的 UPLC 法同时测定肿节风中两种有效成分含量的方法, 与传统 HPLC 法比较具有分析时间短、分离效率高、重复性好、准确简便等优势。同一样品用 HPLC 法分析一般不少于 30 min, 而 UPLC 法在 8 min 即可完全出峰; 其次进样量减少, UPLC 法进样只需 1 μL , 同时提高了分析效率。

本实验首次将 UPLC 法应用到肿节风的超微粉的研究中, 建立高效准确的分析方法, 可为含有异嗪皮啶和迷迭香酸的药材的质量控制提供参考。实验分别测定了肿节风饮片、粗粉、超微粉中两种有效成分的溶出率, 结果表明超微粉碎有利于肿节风有效成分的溶出, 而超微粉碎后能否增加药材的药理效应, 仍需进一步研究。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(1部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 207-208.
 [2] 李远, 赵中流. 肿节风化学成分、药理作用及质量控制的研究概况