

表 1 6-姜酚加样回收率试验结果

Table 1 Results of recovery test of 6-gingerol

序号	称样量 /mg	样品含量 /mg	对照品加 入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD/ %
1	49.49	1.78	1.578	3.378	100.60	100.80	1.33
2	51.29	1.84	1.578	3.454	101.05		
3	49.54	1.78	1.578	3.362	100.12		
4	52.02	1.87	1.578	3.428	99.42		
5	51.25	1.84	1.578	3.428	100.29		
6	52.40	1.88	1.578	3.572	103.30		

表 2 每粒陈皮姜软胶囊中 6-姜酚含量测定结果

Table 2 Results of 6-gingerol determinationg

样品批号	6-姜酚 /%	6-姜酚 /mg
20120726	3.63	14.52
20120728	3.56	14.22
20120730	3.55	14.18
平均值	3.58	14.31
RSD/%	1.22	1.30

平均含量为 14.31 mg，以平均含量的 80 %作为含量下限，则规定每粒胶囊中 6-姜酚含量不低于 11.45 mg。

3 讨论

在对制剂中陈皮进行 TLC 鉴别研究时发现，以陈皮药材和陈皮挥发油为阳性对照，分别采用石油醚-乙醚、石油醚-乙酸乙酯、石油醚-乙醚-乙酸乙酯等为展开系统，采用 5 %香草醛硫酸溶液加热或碘缸中显色，均未发现制剂中陈皮的特征性斑点。

在 6-姜酚含量测定试验中，曾选用不同比例的甲醇-水、乙腈-甲醇-水等系统为流动相做了系

统的比较，结果表明，以乙腈-甲醇-水(40：5：55)作为流动相时，6-姜酚的分离度更好，且阴性无干扰。另外对样品的超声处理时间进行了考察，最终确定超声 10 min 以上即可。另外陈皮药材中的主要成分如橙皮苷、川陈皮素等在制剂 HPLC 色谱图未发现，这可能与陈皮的提取方法有关。

本实验建立了该制剂的鉴别和含量测定项目。含量测定项选择干姜的主要有效成分 6-姜酚作为指标成分，建立了可靠准确、专属性强的测定方法，为本制剂的质量控制提供了依据。

参考文献：

[1] 李伟荣, 赵威, 杨蕾, 等. 陈皮干姜油对疲劳大鼠血液生化、血气分析及肌糖元的影响[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(1): 57-59.

[2] 欧立娟, 孙晓萍, 刘启德, 等. 干姜、陈皮提取物对大鼠心肌缺血的影响[J]. 中药材, 2009, 32(11): 1723-1726.

[3] 付小六. HPLC 测定妇炎康片中盐酸小檗碱的含量[J]. 中成药, 2007, 29(2): 298-299.

[4] 徐晓梅, 谭本仁, 朱兴保, 等. 复方叶下珠滴丸质量标准及稳定性研究[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(4): 483-487.

[5] 吕渭升, 徐美丽, 刘昌辉, 等. 双丹胶囊质量标准研究[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(1): 55-61.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (I 部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 70.

[7] 王航宇, 李国玉, 张珂, 等. HPLC 法测定干姜经微波炮制后 6-姜酚的含量[J]. 中国药师, 2013, 16(1): 17-19.

[8] 王健英, 杨骏, 张彤, 等. 陈皮挥发油的质量控制方法研究[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(1): 139-141.

[9] 聂继红, 王萍, 刘兆龙, 等. 益气强心胶囊的质量标准研究[J]. 中国药房, 2014, 25(7): 644-646.

(编辑：邓响潮)

HPLC 法测定溪黄草不同部位中 5 个二萜的含量

吴 冲, 林朝展, 祝晨蒨(广州中医药大学临床药理研究所, 广东 广州 510405)

摘要：目的 建立反相高效液相层析(RP-HPLC)法同时测定溪黄草不同部位中 5 个对映-贝壳杉烷型二萜类延命素[enmein, (1)], 黄花香茶菜甲素[sculponeatin A, (2)], 诺多星[nodosin, (3)], 毛果青茶菜素[isodocarpin, (4)]和毛柞利素[lasiokaurin, (5)]含量的方法, 并进行多批次药材成分分析, 为溪黄草质量评价提供依据。**方法** 采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1 %甲酸, 梯度洗脱, 流速 0.7 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm。**结果** 5 个二萜的标准曲线及线性范围依次为：(1)Y=5246.4X+13.86(0.075 ~ 1.50 μg,

收稿日期：2014-10-24
作者简介：吴冲, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药与天然药物化学成分及质量评价研究。Email: 1021387636@qq.com。通讯作者: 林朝展, 博士, 副教授, 研究方向: 中药有效成分及质量评价研究。Email: linceaozhan@sina.com; 祝晨蒨, 博士, 研究员, 研究方向: 中药与天然药物化学成分及质量评价和作用机制研究。Email: 976392178@qq.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目(81173535)。

$r=0.9999$); (2) $Y=4673.4X+78.09(0.121 \sim 2.43 \mu\text{g}, r=0.9999)$; (3) $Y=3459.4X+22.33(0.372 \sim 7.43 \mu\text{g}, r=1)$; (4) $Y=4432.8X+14.71(0.144 \sim 2.88 \mu\text{g}, r=1)$; (5) $Y=2434.1X+0.69(0.010 \sim 1.960 \mu\text{g}, r=0.9999)$ 。平均加样回收率为 99.14 % ~ 100.7 %, RSD 为 0.48 % ~ 2.53 %。结论 经过系统的方法学考察, 该法简便, 准确, 重复性好, 可用于溪黄草药材的质量分析及控制。

关键词: 溪黄草; 不同部位; 对映-贝壳杉烷型二萜; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2015)01-0098-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.024

Simultaneous Determination of Five Diterpenoids in Different Parts of Herba Rabdosiae Serrae by Reverse Phase HPLC

WU Chong¹, LIN Chaozhan¹, ZHU Chenchen¹(Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To develop a reverse phase HPLC method for the simultaneous determination of five ent-kauranes diterpenoids of enmein(1), sculponeatinA(2), nodosin(3), isodocarpin(4) and lasiokaurin(5) in Herba Rabdosiae Serrae and to assess their quality. **Methods** The samples were separated on a Kromasil RP-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column eluted with methanol and 0.1 % formic acid as mobile phase in gradient elution. The flow rate was 0.7 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was set at 254 nm. **Results** The calibration curves and linear range of the above five diterpenoids were determined as (1) $Y=5246.4X+13.86(0.075 \sim 1.50 \mu\text{g}, r=0.9999)$, (2) $Y=4673.4X+78.09(0.121 \sim 2.43 \mu\text{g}, r=0.9999)$, (3) $Y=3459.4X+22.33(0.372 \sim 7.43 \mu\text{g}, r=1)$, (4) $Y=4432.8X+14.71(0.144 \sim 2.88 \mu\text{g}, r=1)$, (5) $Y=2434.1X+0.69(0.010 \sim 1.960 \mu\text{g}, r=0.9999)$, respectively. The average recovery of the analytes were from 99.14 % to 100.7 % and the RSD values were from 0.48 % to 2.53 %. **Conclusion** The method is simple, accurate and repeatable, and can be used for the quality assessment of Herba Rabdosiae Serrae.

Keywords: Herba Rabdosiae Serrae; Different parts; Ent-kauranes diterpenoids; RP-HPLC

溪黄草[*Rabdosia serra*(Maxim)Hara]是岭南特色药材, 为唇形科(*Labiatae*)植物香茶菜(*Rabdosia*)的干燥全草^[1], 又名黄汁草、手擦黄、熊胆草等。溪黄草具有清热解毒、活血破瘀、抗菌消炎、抗肿瘤和治疗各种肝炎等功效^[2-4], 在广东各地临床应用普遍, 并出现以之为主要原料的保健产品, 如溪黄草茶、溪黄草颗粒等, 溪黄草在保健品开发方面具有较大潜力^[5], 但尚无较全面的相关质量标准对其药材及产品进行规范。溪黄草含二萜类、三萜类、黄酮类、酚类、氨基酸等多种化学成分, 已证实香茶菜属所含的贝壳杉烷型二萜具有抗肿瘤活性^[6-7], 目前香茶菜属已分离鉴定了 800 多个二萜类化合物, 对映-贝壳杉烷型为香茶菜属二萜的主要类型, 已报道的二萜中约 93 % 属于该类^[8-11]。目前对溪黄草含量测定的文献报道多集中在三萜类成分如熊果酸、齐墩果酸等^[12-13]。然而对其所含成分种类众多、具有抗肿瘤活性作用的二萜

类^[14-16]成分的测定, 国内外文献报道极少。我们通过前期系统的化学成分研究, 分离纯化了 5 个对映-贝壳杉烷型二萜类化合物延命素(enmein), 黄花香茶菜甲素(sculponeatinA), 诺多星(nodosin), 毛果青茶菜素(isodocarpin)and 毛栲利素(lasiokaurin), 并收集了广东地区不同产地溪黄草药材, 测定这 5 个二萜化合物在茎、叶、全草中的含量, 以为溪黄草质量体系的建立和完善提供科学依据。

1 仪器与试剂

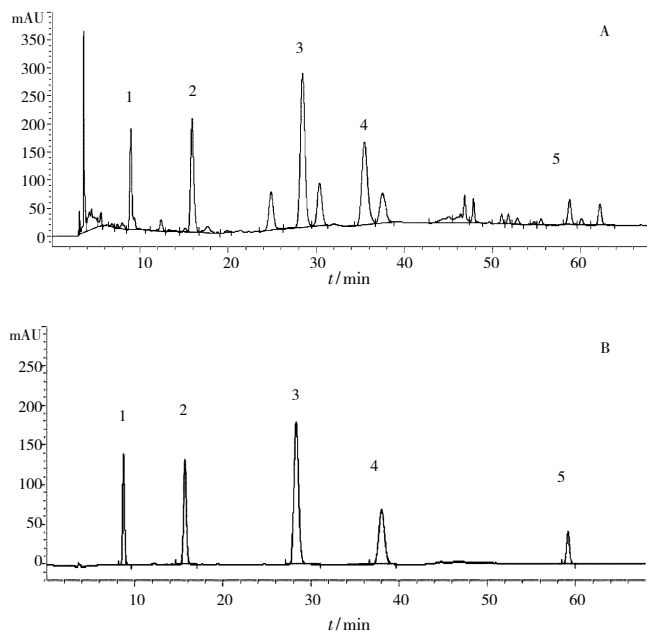
1.1 仪器 安捷伦 (Agilent)1260 高效液相色谱仪、G4212B 二极管阵列检测器、G1330B 自动进样器、G1316A 柱温箱、LC-1260 色谱工作站, 美国安捷伦公司; MODEL HN1006 超声清洗机, 中国华南超声设备厂; 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; Satorius 电子天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司。

1.2 药品及试剂 enmein(1), sculponeatin A(2), nodosin(3), isodocarpin(4)和 lasiokaurin(5)均为自制,经光谱学鉴定结构,色谱法检测其纯度均为98%以上。溪黄草测试样品共12批,经广州中医药大学药用植物学教研室潘超美教授鉴定为唇形科香茶菜植物溪黄草(*Rabdosia serra*),凭证标本现保存于广州中医药大学临床药理研究所。甲醇,色谱纯,美国Honeywell公司;水为超纯水,其他试剂均为国产分析纯,汕头市光华化学厂有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适应性 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相为甲醇(A)-0.1%甲酸(B),梯度洗脱(0~38 min, 40%A; 38~42 min, 40%~55%A; 42~63 min, 55%~60%A);流速0.7 mL·min⁻¹;检测波长254 nm。对照品和样品进样量均为10 μL,色谱图见图1。理论塔板数 enmein, sculponeatin A, nodosin, lasiokaurin 不低于9000, isodocarpin 不低于5000。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取对照品1~5各适量,用甲醇充分溶解并定容,即得混合标准品储备液,其中1~5的质量浓度分别为75, 121, 372, 144, 75 mg·L⁻¹。



1. enmein; 2. sculponeatin A; 3. nodosin; 4. isodocarpin; 5. lasiokaurin;
A. 溪黄草样品; B. 对照品

图1 溪黄草样品(A)及对照品(B)的HPLC色谱图

Figure 1 Chromatograms of five compounds (B) and the sample of *Herba Rabdosia Serra*

2.3 溪黄草供试品溶液的制备 取干燥至恒质量的溪黄草粉末(过3号筛)约1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,密塞,称定质量,超声50 min,放冷,再称定质量,用甲醇弥补减失的质量,摇匀,过滤,取续滤液过0.45 μm滤膜,即得。

2.4 检测波长的确定 采用DAD检测器在190~600 nm波长范围内扫描,对照品溶液中五个二萜在流动相中的最大吸收波长在238~245 nm,但由于在低波长处流动相有较强的末端吸收,为减少干扰,提高信噪比,提取不同波长的色谱进行比较,并积分计算了对应的峰面积响应值,选择254 nm为检测波长,其信噪比高、噪音低、峰形对称,可在消除背景干扰时保证基线平稳和检测的灵敏度。

2.5 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液1, 3, 5, 10, 15, 20 μL,进样测定,以峰面积积分值(Y)对进样质量(X)进行线性回归,得回归方程,结果见表1。

表1 回归方程与线性范围

Table 1 Linear equation and linear range of five components

对照品	回归方程	线性范围/μg	相关系数(r)
1	$Y=5246.4X+13.86$	0.075 ~ 1.50	0.9999
2	$Y=4673.4X+78.09$	0.121 ~ 2.43	0.9999
3	$Y=3459.4X+22.33$	0.372 ~ 7.43	1
4	$Y=4432.8X+14.71$	0.144 ~ 2.88	1
5	$Y=2434.1X+0.69$	0.010 ~ 1.96	0.9999

2.6 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液连续进样6次,(1)~(5)的峰面积RSD(n=6)在0.38%~0.96%内,表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 精密吸取溪黄草供试品溶液,分别于0, 2, 4, 8, 18, 24 h依次进样,5个成分峰面积的RSD(n=6)<3.0%,表明供试品在24 h内稳定。

2.8 重复性试验 取同一批次样品6份,制备供试品溶液,测定5个化合物的含量,RSD(n=6)在0.71%~2.3%,表明该方法重复性良好。

2.9 加样回收率 称取已知5个二萜含量的同一批样品5份,分别加入5个对照品适量,制备供试品溶液,进样测定,结果见表2。

2.10 样品测定 取12批次溪黄草样品,制备供试品溶液,进样测定,每批样品平行制备3份,每份进样3次,见表3。

表 2 加样回收试验结果

Table 2 Recovery of the five components

化合物	样品量 /g	样品中 量 /mg	加入量 /mg	测得值 /mg	回收率 /%	平均回收 率 /%	RSD /%
1	0.5000	0.9641	0.9600	1.920	99.58	99.4	0.48
	0.5001	0.9618	0.9600	1.924	100.2		
	0.5004	0.9675	0.9600	1.920	99.25		
	0.5001	0.9607	0.9600	1.912	99.14		
	0.5002	0.9603	0.9600	1.911	98.98		
2	0.5000	1.105	1.000	2.083	97.80	100.7	2.53
	0.5001	1.001	1.000	2.030	102.9		
	0.5004	0.972	1.000	2.003	103.1		
	0.5001	0.963	1.000	1.946	98.35		
	0.5002	0.953	1.000	1.967	101.4		
3	0.5000	2.883	2.800	5.675	99.71	100.2	0.64
	0.5001	2.881	2.800	5.690	100.3		
	0.5004	2.880	2.800	5.689	100.3		
	0.5001	2.882	2.800	5.665	99.39		
	0.5002	2.882	2.800	5.711	101.0		
4	0.5000	0.5930	0.6000	1.201	101.4	100.3	0.95
	0.5001	0.5932	0.6000	1.190	99.58		
	0.5004	0.5929	0.6000	1.192	99.85		
	0.5001	0.5933	0.6000	1.190	99.46		
	0.5002	0.5932	0.6000	1.201	101.3		
5	0.5000	0.5305	0.5000	1.031	100.1	99.1	0.83
	0.5001	0.5301	0.5000	1.023	99.58		
	0.5004	0.5300	0.5000	1.021	98.25		
	0.5001	0.5302	0.5000	1.025	98.96		
	0.5002	0.5296	0.5000	1.029	99.88		

3 讨论

3.1 色谱条件优选 比较了甲醇－水，乙腈－水，甲醇-0.1 %冰醋酸，甲醇-0.1 %三氯乙酸，甲醇-0.1 %

甲酸等溶剂系统，以甲醇 -0.1 %甲酸溶液进行梯度洗脱时，各待测成分的分离度好。

3.2 供试品溶液制备方法的优选 以从溪黄草中分离得到的 5 个对映－贝壳杉烷型二萜类成分含量为指标，比较了不同提取方法（超声波萃取，加热回流，索式提取法），不同提取溶媒种类（乙醇，乙酸乙酯，甲醇（60 %，80 %，100 % 甲醇，*v/v*），不同提取溶媒用量(*m/v*)(15，20，25，30，50 倍量)，提取时间（20，30，40，50，60 min），确定了 2.3 所述供试品制备方法。

3.3 溪黄草全草、茎、叶中二萜的质量评价 本文采用 RP-HPLC 法同时测定 6 批溪黄草全草中 5 个二萜的含量，结果 5 个指标成分的含量范围分别为：1.59~2.15 mg·g⁻¹(enmein)，2.32~2.86 mg·g⁻¹(sculponeatin A)，5.67~6.81 mg·g⁻¹(nodosin)，1.18~1.47 mg·g⁻¹(isodocarpin) 和 1.04 ~1.42 mg·g⁻¹(lasiokaurin)。溪黄草全草中(1)~(5)5 个二萜的平均含量分别为 1.85，2.54，6.34，1.34，1.27 mg·g⁻¹。可知不同产地溪黄草全草中 5 个二萜的含量有所差别但又呈现一定规律，即含量从高到底依次为 nodosin，sculponeatin A，enmein，isodocarpin，lasiokaurin；且 nodosin 的含量远高于其他 4 种二萜。

分别测定 3 批溪黄草叶，茎中 5 个二萜类的含量，溪黄草叶中(1)~(5)5 个二萜的平均含量分别为 1.78，3.95，9.16，1.82，1.54 mg·g⁻¹。溪黄草茎中(1)~(5) 五个二萜的平均含量分别为 1.29，0.69，1.68，0.36，0.41 mg·g⁻¹。测量结果表明溪黄草叶中 5 个二萜类的含量明显高于茎中，其中 sculponeatin A，nodosin，isodocarpin，lasiokaurin 在叶中含量约是茎

表 3 12 批溪黄草药材中 5 个成分的含量测定结果

Table 3 Contents of the five components in 12 batches of Herba Rabdosiae Serrae samples

编号	采集时间(地点)	enmein/mg·g ⁻¹	sculponeatinA/mg·g ⁻¹	nodosin/mg·g ⁻¹	isodocarpin/mg·g ⁻¹	lasiokaurin/mg·g ⁻¹
1	广州，广东(07. 2010)	1.588	2.856	6.810	1.393	1.279
2	连州，广东(07. 2010)	2.149	2.486	6.493	1.363	1.389
3	清远，广东(07. 2010)	2.037	2.541	6.793	1.466	1.423
4	广州，广东(08. 2011)	1.804	2.323	5.667	1.256	1.194
5	连州，广东(08. 2011)	1.879	2.497	5.829	1.359	1.039
6	清远，广东(07. 2011)	1.656	2.516	6.470	1.184	1.285
7	广州，广东(07. 2010)	1.804	3.930	9.167	1.826	1.686
8	连州，广东(07. 2010)	1.879	3.997	8.829	1.859	1.339
9	清远，广东(07. 2010)	1.656	3.916	9.470	1.784	1.585
10	广州，广东(07. 2010)	1.328	0.581	1.367	0.296	0.350
11	连州，广东(07. 2010)	1.335	0.682	1.698	0.360	0.418
12	清远，广东(07. 2010)	1.213	0.798	1.995	0.426	0.461

注：(1)每个测定值代表 3 份样品的平均值(*n*=3)；(2)* 编号 1~6 为溪黄草全草，7~9 为溪黄草叶，10~12 为溪黄草茎。