

HPLC法测定溪黄草药材中迷迭香酸的含量

吴桂凡*,黄清泉,谢培德,罗 轶(广西壮族自治区食品药品检验所,南宁 530021)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)24-3422-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.24.34

摘要 目的:建立测定溪黄草药材中迷迭香酸含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Inertsil ODS-SP C₁₈,流动相为乙腈-0.4%磷酸(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为327 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μl。结果:迷迭香酸的检测质量浓度线性范围为5.039~100.776 μg/ml($r=0.999\ 6$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<3%;迷迭香酸的加样回收率为99.53%~104.86%(RSD=2.06%, $n=9$)。结论:该方法操作简单、重复性好、准确度高,可用于测定溪黄草药材中迷迭香酸的含量。

关键词 溪黄草;高效液相色谱法;迷迭香酸

Determination of Rosmarinic Acid in Herba Rabdosiae Serrae by HPLC

WU Guifan, HUANG Qingquan, XIE Peide, LUO Yi (Institute for Food and Drug Control in Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for rosmarinic acid in Herba Rabdosiae Serrae. METHODS: HPLC method was performed on the column of Inertsil ODS-SP C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.4% phosphoric acid (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 327 nm, column temperature was 25 ℃, and injection volume 10 μl. RESULTS: The linear range of rosmarinic acid was 5.039-100.776 μg/ml($r=0.999\ 6$), RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3%; recovery was 99.53-104.38% (RSD=2.06%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple with good reproducibility and high accuracy, and can be used for the content determination of rosmarinic acid in Herba Rabdosiae Serrae.

KEYWORDS Herba Rabdosiae Serrae; HPLC; Rosmarinic acid

溪黄草俗称熊胆草、血风草、黄汁草、香茶菜、手擦黄等,生长于山谷溪旁潮湿处,新鲜叶片揉搓有棕黄色液汁而得名。其主要分布于长江以南的湖南、湖北、广东、广西、江西、福建等地。溪黄草在南方各地临床应用普遍,具有清热利湿、退黄、凉血散瘀的功效,可用于治疗湿热黄疸、湿热泻痢、急性胆炎、急性胆囊炎、痢疾、肠炎、癃闭、跌打瘀肿等疾病^[1]。但溪黄草来源复杂,《中华本草》中溪黄草来源为唇形科植物溪黄草和线纹香茶菜的全草^[2];《广西中药材标准》(第二册)中溪黄草植物来源为唇形科植物线纹香茶菜的干燥地上部分^[3];而《广西中药材标准》(第二册)将来源为溪黄草的药材命名为蓝花柴胡^[4],分为线纹香茶菜和溪黄草两个不同的药材来源;《广东中药材标准》(第二册)将溪黄草来源分为线纹香茶菜以及其变种纤花香茶菜或溪黄草^[5]。现主要栽培的品种为线纹香茶菜 *Isodon lophanthoides* (Buch.-Ham. ex D. Don) H. Hara、纤花香茶菜 *I. lophanthoides* (Buch.-Ham. ex D. Don) H. Hara var. gra-

ciliflorus (Benth.) H. Hara 和溪黄草 *I. serra* Maxim., 此3个品种在野外也有分布。随着中药发展及中成药生产规模的不断扩大,溪黄草的应用也越来越广泛,但地方标准只有显微鉴别和薄层鉴别,未制定含量测定指标。为此,笔者以溪黄草主要栽培的3个品种为对象,采用高效液相色谱法(HPLC)测定其迷迭香酸的含量,以期对溪黄草药材的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括二极管阵列(DAD)检测器、G1329B型自动进样器(美国Agilent公司);CP224S型万分之一分析天平(德国Sartorius公司);XP205型十万分之一分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);MILLI-QA10型超纯水仪(美国Millipore公司)

1.2 试剂

迷迭香酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:

益亦具有重要意义。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:1 234.
- [2] 朱静毅, 应忠良, 闻俐毓. 近红外光谱分析技术在药品质量控制中的应用[J]. 中国药房, 2009, 20(7): 550.
- [3] 陆婉珍. 现代近红外光谱分析技术[M]. 北京:中国石化出版社, 2006: 11.

- [4] 耿仲乐, 王静, 张瑞. 利用近红外图谱比对法及一致性检验模型鉴别健胃消食片[J]. 中国药事, 2012, 26(3): 279.
- [5] 池文杰, 张勋, 陈海滨, 等. 近红外特征谱段相关系数法测定降压类中成药中添加氢氯噻嗪[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(2): 310.
- [6] 马晓青, 蔡皓, 刘晓, 等. 近红外光谱在中药鉴别和质量控制中的应用[J]. 中国药房, 2012, 23(7): 661.

(收稿日期:2016-01-14 修回日期:2016-06-16)

(编辑:申琳琳)

* 主管药师, 硕士。研究方向: 药物标准及质量控制。电话: 0771-5828498。E-mail: 26785128@qq.com

111871-201203,纯度>98.8%);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为高纯水。

1.3 药材

溪黄草药材经笔者实地采集,以及自广东、广西、福建、河南、河北等地购买,经广西食品药品检验所中药民族药室主管药师黄清泉鉴定分别为线纹香茶菜 *I. lophanthoides* (Buch.-Ham. ex D. Don) H. Hara(编号:XW-1~10)(10份)、纤花香茶菜 *I. lophanthoides* (Buch.-Ham. ex D. Don) H. Hara var. *graciliflorus* (Benth.) H. Hara.(编号:XH-1~10)(10份)和溪黄草 *I. serra* Maxim. (编号:XHC-1~10)(10份)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Inertsil ODS-SP C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.4%磷酸(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;检测波长:327 nm;柱温:25 ℃;进样量:10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间,min	A,%	B,%
0~10	15	85
10~50	15~20	85~80
50~70	20	80
70~71	20~15	80~85
71~80	15	85

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取迷迭香酸对照品适量,置于50 ml量瓶中,加50%甲醇定容,摇匀,制成每1 ml含迷迭香酸0.2016 mg的溶液,作为对照品贮备液;精密量取上述对照品贮备液适量,加50%甲醇制成每1 ml含迷迭香酸40 μg的对照品溶液,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品粉末适量,过2号筛,取约1 g,精密称定,置于150 ml具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇50 ml,称定质量,水浴加热回流60 min,放冷,再次称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5,理论板数以迷迭香酸峰计为18 842,保留时间为54.029 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

精密称取“2.2.1”项下对照品贮备液0.25、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml,各分别置于10 ml量瓶中,用50%甲醇定容,摇匀,即得不同质量浓度的系列对照品溶液。分别精密量取上述系列对照溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,以迷迭香酸的质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得迷迭香酸的回归方程为 $y=27.976x-14.797$ ($r=0.9996$)。结果表明,迷迭香酸的检测质量浓度线性范围为5.039~100.776 μg/ml。

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,迷迭香酸峰面积的RSD=0.68%($n=6$),表明仪器精密度良好。

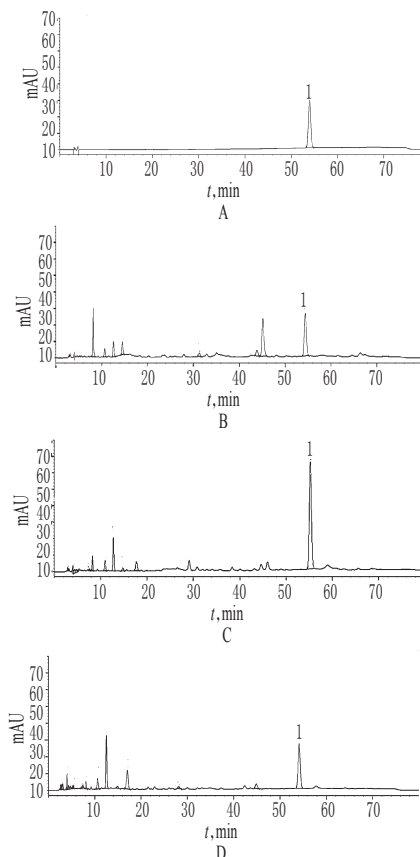


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.溪黄草供试品;C.线纹香茶菜供试品;D.纤花香茶菜供试品;1.迷迭香酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance of rosmarinic acid;B.test sample of *I. lophanthoides*;C.test sample of *I. lophanthoides*;D.test sample of *I. lophanthoides*; 1.rosmarinic acid

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0、4、10、16、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,迷迭香酸峰面积的RSD=0.84%($n=6$),表明供试品溶液在室温下24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取样品(编号:XW-10)适量,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,迷迭香酸峰面积的RSD=2.39%($n=5$),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的样品(编号:XW-10)0.5 g,共9份,分别加入低、中、高质量的迷迭香酸对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

2.9 样品含量测定

取不同编号的样品粉末各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算迷迭香酸的含量(按干燥品计),结果见表3。

3 讨论

3.1 含量指标的选择

溪黄草主要含酚类、酸类、萜类等^[5],3种来源的溪黄草均

表2 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery test(n=9)

取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.506 7	0.679 2	0.380 9	1.072 6	103.28		
0.512 7	0.687 3	0.380 9	1.084 9	104.38		
0.516 1	0.678 4	0.380 9	1.057 8	99.61		
0.510 4	0.684 2	0.761 7	1.474 2	103.72		
0.521 4	0.698 9	0.761 7	1.472 6	101.58	102.16	2.06
0.509 4	0.682 8	0.761 7	1.481 5	104.86		
0.503 1	0.674 4	1.142 6	1.847 4	102.66		
0.501 3	0.672 0	1.142 6	1.812 4	99.81		
0.509 8	0.683 4	1.142 6	1.820 6	99.53		

表3 样品含量测定结果(n=3)

Tab 3 Results of content determination of sample(n=3)

药材品种	编号	来源	迷迭香酸含量, %
溪黄草	XHC-1	河北	0.190
溪黄草	XHC-2	河北	0.181
溪黄草	XHC-3	河南	0.338
溪黄草	XHC-4	河南	0.626
溪黄草	XHC-5	广东翁源	0.067
溪黄草	XHC-6	广东英德	0.155
溪黄草	XHC-7	广东英德	0.163
溪黄草	XHC-8	广东英德	0.165
溪黄草	XHC-9	广东英德	0.185
溪黄草	XHC-10	广西南宁	0.055
线纹香茶菜	XW-1	福建武平	0.442
线纹香茶菜	XW-2	广东潮州	0.417
线纹香茶菜	XW-3	广东开平	1.800
线纹香茶菜	XW-4	广东清远	0.533
线纹香茶菜	XW-5	福建下坝	0.394
线纹香茶菜	XW-6	福建下坝	0.491
线纹香茶菜	XW-7	福建龙岩	0.880
线纹香茶菜	XW-8	福建龙岩	0.914
线纹香茶菜	XW-9	福建武平	0.522
线纹香茶菜	XW-10	福建武平	0.601
纤花香茶菜	XH-1	福建武平	0.299
纤花香茶菜	XH-2	福建武平	0.525
纤花香茶菜	XH-3	广东清远	0.299
纤花香茶菜	XH-4	广东清远	0.381
纤花香茶菜	XH-5	广东饶平	0.150
纤花香茶菜	XH-6	广东饶平	0.226
纤花香茶菜	XH-7	福建下坝	0.579
纤花香茶菜	XH-8	福建下坝	0.311
纤花香茶菜	XH-9	广东台山	0.163
纤花香茶菜	XH-10	广东清远	0.152

含有酚类化合物迷迭香酸和咖啡酸^[9],这两种成分均具有抗氧化作用,与溪黄草的抗氧化抗炎作用一致^[7]。因在溪黄草中迷迭香酸的相对含量较大,咖啡酸含量太小,故本试验选择迷迭香酸为含量控制指标。

3.2 检测波长的选择

选择检测波长时,笔者参考相关文献^[6,8]通过DAD检测器考察,发现在327 nm波长处迷迭香酸有最大吸收,特征图谱所得的色谱信息也较多,故选择327 nm为本试验的检测波长。

3.3 对测定结果的分析

由于溪黄草来源分为3个种,各地方习用药材也不统一^[9],不同种间成分差异也较大^[10-12],即使同种药材不同产地间成分也存在差异;另外采收季节不同和干燥方法不同也对迷迭香酸的含量有较大影响^[13]。从测定的30批溪黄草中迷迭香酸含量结果来看,线纹香茶菜含量较高(为0.394%~1.80%),纤花香茶菜次之(为0.150%~0.579%),溪黄草含量最低(为0.055%~0.626%)。表明溪黄草的3个来源之间有明显差异。

综上所述,本方法操作简单、重复性好、准确度高,可用于测定溪黄草药材中迷迭香酸的含量。

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,1997:2 511.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会:中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:154-156.
- [3] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准:第二册[S]. 南宁:广西科学技术出版社,1996:268、278.
- [4] 广东省食品药品监督管理局. 广东中药材标准:第二册[S]. 广州:广东科学技术出版社,2011:347.
- [5] 谢兴亮,盛艳梅. 溪黄草研究进展[J]. 医药导报,2011,30(4):494.
- [6] 鲁芹飞,唐海明,陈玲玲,等. 狭基线纹香茶菜(溪黄草)咖啡酸和迷迭香酸的薄层鉴别与含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(22):114.
- [7] 周丹,刘艾琳,杜冠华. 迷迭香酸的药理作用研究进展[J]. 中国新药杂志,2011,20(7):594.
- [8] 陈向东,朱德全,张光大,等. HPLC测定溪黄草配方颗粒中咖啡酸、牡荆苷、迷迭香酸的含量[J]. 中药材,2013,36(9):1 530.
- [9] 邓乔华,张为良,王德勤,等. 《中国药典》2010年版成方制剂中溪黄草基原的探讨[J]. 中国药品标准,2013,14(1):5.
- [10] 刘方乐,陈德金,冯秀丽,等. 溪黄草的化学成分研究[J]. 中药新药与临床药理,2016,27(2):242.
- [11] Zhou WT, Xie HH, Wu P, et al. Abietane diterpenoids from *Isodon lophanthoides* var. *graciliflorus* and their cytotoxicity [J]. *Food Chem*, 2013(136):1 110.
- [12] 唐海明,陈建南,张扬,等. HPLC法同时测定不同来源溪黄草药材中8个水溶性成分的含量[J]. 药物分析杂志,2015,35(2):228.
- [13] 冯泓瑞,朱德全,黄松,等. 不同采收期、加工方法对溪黄草中咖啡酸和迷迭香酸含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(22):71.

(收稿日期:2015-08-30 修回日期:2016-06-16)

(编辑:刘柳)