

对提取时间进行筛选,选择提取时间 45、60、75 min 进行考察,结果处理 45 min 所得的盐酸麻黄碱峰的量最低,60、75 min 时的量无差异,考虑到超声处理 60 min 提取时间较短,故最终选择超声处理 60 min。

参考文献:

- [1] 屈颖. 麻黄及其复方制剂中麻黄碱含量测定方法研究进展[J]. 天津药学, 2001, 13(6): 28-29.
- [2] 李霞, 贾晓斌, 陈彦, 等. 高效液相色谱法测定鼻舒宁喷雾剂中盐酸麻黄碱含量[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(4): 494-496.

RP-HPLC 法测定肿节风饮片中异嗪皮啉和迷迭香酸

张小娟¹, 冯育林^{1,2*}, 刘海燕¹, 王跃生^{1,2}, 杨世林^{1,2}, 刘红宁²

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006; 2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 建立 RP-HPLC 法测定肿节风饮片中异嗪皮啉和迷迭香酸的方法。方法 采用 RP-HPLC 法, 迪马 Diamonsil™(钻石) C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸水溶液(23:77); 检测波长: 330 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温 25 ℃; 进样量: 10 μL。结果 异嗪皮啉在 0.015 9~0.796 2 μg 线性关系良好($r=0.999\ 9$), 平均回收率为 100.06%(RSD 为 1.52%); 迷迭香酸在 0.031 0~0.621 0 μg 线性关系良好($r=0.999\ 8$), 平均回收率为 99.99%(RSD 为 2.13%)。结论 该定量分析方法简便、准确、重复性好, 在同一色谱条件下可同时测定肿节风饮片中异嗪皮啉和迷迭香酸。

关键词: 肿节风; 异嗪皮啉; 迷迭香酸; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2009)12-1917-03

肿节风为金粟兰科植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 的干燥全株, 主产于江西、浙江、安徽、广东、广西、四川、云南等地, 收载于《中国药典》2005 年版一部, 味苦、辛, 平, 具有清热凉血、活血消斑、祛风通络的功效, 用于血热紫斑、紫癜、风湿痹痛、跌打损伤等。肿节风资源丰富、功效显著, 其药材和饮片是许多《中国药典》及部颁成方制剂的处方药物, 被列入医保甲类品种和国家中药保护品种。肿节风主要含有香豆素(异嗪皮啉等)、有机酸(迷迭香酸、延胡索酸等)、倍半萜、黄酮和挥发油等类成分, 肿节风浸膏及其制剂具有抗菌、抗炎、止痛、抗肿瘤、对免疫功能的影响、对白细胞和血小板的影响、促进骨骼愈合等作用^[1~3]。其中异嗪皮啉具有抗菌、抗癌等作用^[3], 迷迭香酸具有明显的抗炎、抗氧化、免疫抑制、抗癌、抗血栓和抗血小板聚集等作用^[4]。因此本实验建立高效液相色谱法同时测定肿节风饮片中异嗪皮啉和迷迭香酸的方法, 为提高肿节风饮片的质量控制标准, 促进肿节风饮片进一步开发利用提供参考。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 Series 液相色谱仪, DAD 检测

器; AUW220D 十万分之一分析天平(日本岛津公司); KQ-250 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

异嗪皮啉对照品(批号: 110837-200304, 中国药品生物制品检定所); 迷迭香酸对照品(批号: 1189-071015, 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心对照品室); 甲醇、磷酸均为分析纯; 乙腈为色谱纯。

肿节风饮片(江西新干产, 批号: 080703; 广东产, 批号: 080726; 广西产, 批号: 080704)均由浙江中医药大学中药饮片厂提供, 经江西中医学院杨世林教授鉴定为金粟兰科植物草珊瑚 *S. glabra* (Thunb.) Nakai 的饮片。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验: 迪马 Diamonsil™(钻石) C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸水溶液(23:77); 检测波长: 330 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温 25 ℃; 进样量: 10 μL。理论塔板数按异嗪皮啉计算不低于 6 000, 两个成分与相邻色谱峰的分离度均大于 1.5, 见图 1。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取异嗪皮啉和迷迭

收稿日期: 2009-04-12

基金项目: 《中国药典》2010 版一部标准研究项目

作者简介: 张小娟(1979—), 女, 陕西杨凌人, 助理研究员, 主要从事中药新药研发工作。E-mail: xiaoxiao3333@sohu.com

* 通讯作者 冯育林 Tel: (0791) 7119631 E-mail: fengyulin2003@hotmail.com

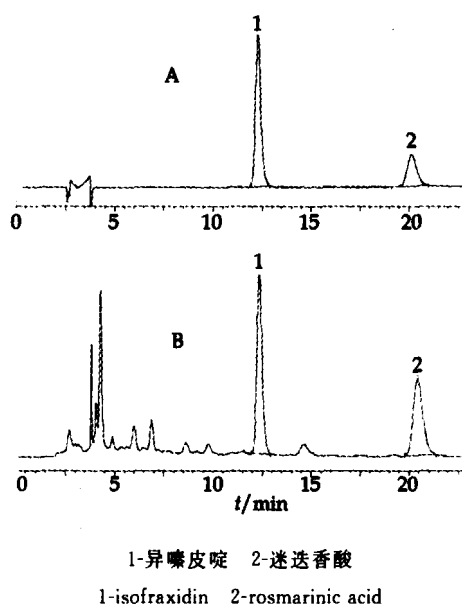


图 1 对照品(A)和肿节风饮片(B)的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substances (A)
and Herba Sarcandrae Praeparata (B)

香酸对照品适量,加甲醇制成含异嗪皮啶 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、迷迭香酸 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合溶液(避光操作)。

2.3 供试品溶液的制备:取肿节风饮片粉末(过 3 号筛)约 0.9 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,加热回流 1 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得(避光操作)。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察:精密吸取混合对照品溶液 1、2、5、10、15、25、50 μL 注入液相色谱仪,测定峰面积。以进样质量为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,分别得回归方程,异嗪皮啶: $Y = 2527.8X + 10.184$ ($r = 0.9999$),迷迭香酸: $Y = 2308.1X + 3.3921$ ($r = 0.9998$),结果表明:异嗪皮啶在 15.9~796.2 ng、迷迭香酸在 31.0~621.0 ng 与峰面积的线性关系良好。

2.4.2 精密度试验:精密吸取含异嗪皮啶 15.925 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、迷迭香酸 31.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液 10 μL 进样,测定峰面积,重复 6 次,结果异嗪皮啶和迷迭香酸峰面积的 RSD 分别为 0.21%、2.02%。

2.4.3 稳定性试验:取样品(江西新干产,批号:080703),制备供试品溶液 1 份,分别于 0、0.5、2、4、6、9 h 各取 10 μL 进样,测定峰面积,结果异嗪皮啶和迷迭香酸峰面积的 RSD 分别为 0.91%、1.61%,表明在供试品溶液在室温避光条件下 9 h 内稳定。

2.4.4 重现性试验:取同一批(江西新干产,批号:080703)样品,平行制备供试品溶液 6 份,各取 10 μL 进样,测定峰面积,计算各成分的质量分数,结果

异嗪皮啶和迷迭香酸质量分数的 RSD 分别为 1.28%、1.54%。

2.4.5 加样回收率试验:分别称取江西新干产,(批号:080703)样品约 0.38 g,6 份,精密称定,置具塞锥形瓶中,每两份分别平行精密加入含异嗪皮啶 0.1274 mg/mL、迷迭香酸 0.162 mg/mL 的混合对照品溶液 0.8、1、1.2 mL,制备供试品溶液,进样测定峰面积,计算回收率,结果异嗪皮啶平均回收率为 100.06%(RSD 为 1.52%),迷迭香酸平均回收率为 99.99%(RSD 为 2.13%)。

2.5 样品测定:取不同产地肿节风饮片,分别平行制备供试品溶液 2 份,每份进样 2 次,以回归方程计算各成分的质量分数,结果见表 1。从样品测定结果可以看出,不同产地的肿节风饮片中异嗪皮啶和迷迭香酸差异较大,可能因产地和采收期不同所致。

表 1 肿节风饮片中异嗪皮啶和迷迭香酸的测定结果

Table 1 Determination of isofraxidin and rosmarinic acid
in Herba Sarcandrae Praeparata

样品(批号)	异嗪皮啶/%	迷迭香酸/%
广东产(080726)	0.0594	0.0252
江西新干产(080703)	0.0573	0.0043
广西产(080704)	0.0409	0.0405

3 讨论

3.1 色谱条件选择^[4~7]:考察了迪马 Diamonsil™(钻石) C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 与依利特 Hyperdil ODS2 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 柱,结果发现迪马 Diamonsil™(钻石) C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 柱对肿节风饮片的分离效果较好。比较了流动相乙腈-0.1%磷酸水溶液(40:60)、乙腈-0.1%磷酸水溶液(20:80)、乙腈-0.1%磷酸水溶液(25:75)、乙腈-0.1%磷酸水溶液(22:78)、乙腈-0.1%磷酸水溶液(23:77),结果发现乙腈-0.1%磷酸水溶液(23:77)对肿节风饮片中异嗪皮啶和迷迭香酸的分离效果最好。

3.2 供试品制备方法的考察^[4~7]:分别比较了水超声提取、氯仿萃取;水超声提取、正丁醇萃取;水超声提取、醋酸乙酯萃取;甲醇超声提取;甲醇索氏提取;避光甲醇索氏提取;避光甲醇回流提取,结果避光甲醇索氏提取和避光甲醇回流提取提取率高,稳定性好。考虑操作的简便性,选择避光甲醇回流提取法制备供试品溶液。

参考文献:

- [1] 曾爱华,罗永明. 草珊瑚化学成分研究[J]. 中药材, 2005, 28(4): 292-293.
- [2] 罗永明,刘爱华,于邦伟,等. 中药草珊瑚化学成分的研究[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(17): 1296-1298.

- [3] 应国清,陆红娅,王 鸿,等. 中药肿节风的研究进展[J]. 上海中医药杂志,2007,41(6):85-87.
- [4] 田 萍,王道平,朱海燕,等. 高效液相色谱法测定连钱草中的迷迭香酸的含量[J]. 贵州大学学报,2008,25(2):169-171.
- [5] 王 砚,王钢力,姚令文,等. 肿节风药材中反丁烯二酸和异噁皮啶的含量测定[J]. 华西药学杂志,2005,20(1):60-62.
- [6] 王祝举,赵玉英,王 邻,等. 夏枯草中迷迭香酸含量分析方法研究[J]. 药物分析杂志,2006,26(3):399-340.
- [7] 张继华,王跃生,柏 健,等. RP-HPLC法测定肾茶药材中迷迭香酸的含量[J]. 中药新药与临床药理,2006,17(1):43-44.

茶黄素复合物中单体对照品的制备研究

徐 懿¹,王 奕¹,屠幼英^{1,2*},蒋振华¹,吴媛媛¹

(1. 浙江大学 茶学系,浙江 杭州 310029;2. 杭州英仕利生物科技有限公司,浙江 杭州 310012)

摘 要:目的 研究茶黄素复合物和单体的对照品分离制备。方法 AB-8 树脂吸附茶黄素,乙醇梯度洗脱得茶黄素复合物,进一步用半制备液相色谱分离茶黄素单体。结果 AB-8 大孔树脂进行吸附,20%、30%、40%、50%、60%乙醇溶液梯度洗脱,洗脱速度为 2 BV/h,制得质量分数 80%的茶黄素复合物。以制备色谱进一步分离获得质量分数 90%以上茶黄素-3-没食子酸酯、茶黄素-3'-没食子酸酯和茶黄素-3,3'-双没食子酸酯,以及质量分数大于 70%的茶黄素的单体。结论 大孔吸附树脂和制备色谱结合可以从茶黄素复合物中获得比较理想的单体对照品。
关键词:茶黄素;茶黄素-3-没食子酸酯;茶黄素-3'-没食子酸酯;茶黄素-3,3'-双没食子酸酯;大孔吸附树脂;制备色谱
中图分类号:R284.2;R286.02 **文献标识码:**B **文章编号:**0253-2670(2009)12-1919-03

茶黄素是多酚物质氧化形成的一类能溶于醋酸乙酯的、具有苯骞萘酚酮的化合物的总称。茶黄素有 28 种组分,其中茶黄素、茶黄素-3-没食子酸酯、茶黄素-3'-没食子酸酯和茶黄素-3,3'-双没食子酸酯是 4 种最主要的茶黄素^[1]。茶黄素具有良好的医药保健功能,如抗氧化、预防心脑血管疾病、预防龋齿、防癌抗癌、抗菌、抗病毒等。另外茶黄素还应用于食品着色剂^[2,3]。目前茶黄素单体分离方法主要有 Sephadex LH-20 柱色谱法和高效逆流色谱(HSC-CC)法。Sephadex LH-20 柱色谱法成本高,分离量少,分离时间长,并且多次使用时会造成不可逆吸附污染,分离效果变差。HSCCC 法分离时间较柱色谱法短,但是设备不易获得,粗品要具有一定的质量分数,而且分离量少,成本高^[4-8]。因此本实验先采用大孔吸附树脂优化条件得到质量分数 80%以上的茶黄素复合物,并进一步用于半制备液相色谱分离制备茶黄素等对照品。

1 材料与仪器

茶黄素粗品由杭州英仕利生物有限公司提供,质量分数为 50%;茶黄素混和对照品由 Sigma 公司提供;AB-8、NKA-9、三菱 SP-207 树脂;乙醇、冰乙酸(分析纯);乙腈(色谱纯)。

UV-2000 紫外分光光度计(尤尼科(上海)仪

器有限公司);BT-100 恒流泵(上海琪特分析仪器有限公司);AlpHa 1-2 LD 真空冷冻干燥(德国 Christ 公司);RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣仪器厂);LC2010 高效液相色谱(日本岛津公司);依利特 P270 半制备色谱,UV230+紫外可见检测器,EC2000 色谱数据处理工作站。

2 方法与结果

2.1 茶黄素粗品的大孔树脂静态吸附考察

2.1.1 吸附量的测定:称取经预处理的 AB-8、NKA-9、SP-207 树脂各 25 g,置于烧杯中,加入 10 mg/mL 茶黄素粗品水溶液 50 mL 搅拌 10 min,每隔 1 h 搅拌 1 次,24 h 充分吸附后,高效液相色谱法测定原溶液和吸附后溶液中茶黄素的质量浓度,计算吸附率,结果见表 1。

吸附率=(原溶液中茶黄素的质量浓度-吸附后溶液中茶黄素质量浓度)/原溶液中茶黄素质量浓度×100%

2.1.2 解吸量的测定:取吸附完全的 3 种树脂各 25 g,置烧杯中,加入 50 mL 70%乙醇溶液搅拌 10 min,每隔 1 h 搅拌 1 次,24 h 充分解吸后,高效液相色谱法测定解吸液中茶黄素的质量浓度,计算解吸率,结果见表 1。

解吸率=解吸液中茶黄素的质量浓度/(原溶液中茶黄素的质量浓度-吸附后溶液中茶黄素的质量浓度)×100%

收稿日期:2009-03-12

基金项目:国家中小型创新项目企业技术创新资金资助项目(07C26223301397);浙江省农业科技重大专项重点项目(2007C12068);浙江大学 SRTTP 项目支持

作者简介:徐 懿,浙江诸暨人,博士研究生,研究方向为茶叶化学与制茶工程。E-mail:cimaogengen@126.com

* 通讯作者 屠幼英 Tel:(0571)86971743 E-mail:youyutu@zju.edu.cn