

# HPLC 测定脱脂紫苏子中迷迭香酸和木犀草素的含量

安杉杉, 陈燕忠\*, 林世源, 陈卉, 方小爱, 吕竹芬

(广东药学院 药物研究所, 广东省药物新制剂重点实验室, 广州 510006)

**[摘要]** 目的:建立 HPLC 同时测定脱脂紫苏子中迷迭香酸和木犀草素含量的方法。方法:采用 Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1% 磷酸溶液 (55:45), 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 330, 350 nm, 柱温 30 °C。结果:迷迭香酸在 9.91 ~ 158.55 mg·L<sup>-1</sup> 回归方程为  $Y = 108.83X + 0.14$  ( $r = 0.9999$ ), 平均回收率为 99.68%, RSD 2.01%; 木犀草素在 0.997 ~ 15.952 mg·L<sup>-1</sup> 回归方程为  $Y = 119.63X - 3.68$  ( $r = 0.9999$ ), 平均回收率为 100.34%, RSD 2.86%。结果:该方法操作简便、准确, 重复性良好, 可用于测定脱脂紫苏子中迷迭香酸和木犀草素的含量。

**[关键词]** 脱脂紫苏子; 迷迭香酸; 木犀草素

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0066-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220066

## Determination of Rosemary Acid and Luteolin in Defatted *Perillae fructus* by HPLC

AN Shan-shan, CHEN Yan-zhong\*, LIN Shi-yuan, CHEN Hui, FANG Xiao-ai, LV Zhu-fen  
(Institute of Material Medica/Guangdong Provincial Key Laboratory of Advanced Drug Delivery, Guangzhou College, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** The aim of this study was to establish an HPLC method for simultaneous determination of the contents of Rosemary acid and Luteolin in defatted *Perilla*. **Method:** Diamonsil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used, with methanol-0.1% phosphoric acid (55:45) as mobile phase. The flow rate was set at 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the detection wavelength was set at 330 and 350 nm, with the column temperature at 30 °C. **Result:** The linear response ranges were 9.91-158.55 mg·L<sup>-1</sup> with regression curve  $Y = 108.83X + 0.1368$  ( $r = 0.9999$ ) for rosemary acid, and 0.997-15.952 mg·L<sup>-1</sup> with regression curve  $Y = 119.63X - 3.6778$  ( $r = 0.9999$ ) for luteolin. The average recovery of rosemary acid and luteolin were 99.68% and 100.34%, respectively (RSD 2.01%, 2.86%). **Conclusion:** A simple, accurate and reproducible HPLC method has been provided for simultaneous determination of rosemary acid and luteolin in defatted *Perilla*.

**[Key words]** defatted *Perillae fructus*; rosemary acid; luteolin

紫苏是国家卫生部首批颁布的药食两用的 60 种中药之一<sup>[1]</sup>, 具有降气化痰、止咳平喘、润肠通便的功效, 用于治疗痰壅气逆、咳嗽气喘、肠燥便秘<sup>[2]</sup>。

迷迭香酸和木犀草素是紫苏子中两种具有重要生理活性的化合物。研究表明迷迭香酸具有明显的抗炎、抗氧化、免疫抑制等作用<sup>[3]</sup>, 还有文献报道其具

有抑制 HIV 整合酶作用<sup>[4]</sup>。木犀草素在植物中广泛存在, 是一种天然的黄酮类化合物, 研究表明木犀草素具有抗炎、抗细菌、抗氧化、抗癌等药理作用<sup>[5-7]</sup>。

本文采用高相液相色谱法对脱脂紫苏子药材中的迷迭香酸、木犀草素进行了含量测定, 为脱脂紫苏子药材及其制剂质量标准的研究提供了数据。

**[收稿日期]** 20140502(002)

**[第一作者]** 安杉杉, 在读硕士, 从事药物缓控释制剂研究, Tel:13632241160, E-mail:an19891226@126.com

**[通讯作者]** \* 陈燕忠, 教授, 从事药物缓控释制剂研究, Tel:020-39352501, E-mail:doctor\_c@163.com

## 1 仪器与试剂

1260 系列高效液相色谱仪(光电二极管阵列检测器,美国 Agilent),BS224S 型电子天平、CP225D 型电子天平(Sartorius),JuLabo TW-20 型恒温水浴锅[优莱博技术(北京)有限公司],紫苏子市售(批号 20120901,广州至信医药有限公司);迷迭香酸(批号 111871-201203)、木犀草素(批号 111520-200504)对照品均购自中国食品药品检定研究院;甲醇(色谱纯,广州市铨能色谱材料有限公司),其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1% 磷酸溶液(55:45),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,迷迭香酸检测波长 330 nm,木犀草素检测波长 350 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液** 精密称取迷迭香酸对照品 10.03 mg,置 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀。精密量取 1 mL 至 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇定容至刻度,即得 99.096 mg·L<sup>-1</sup>的迷迭香酸对照品贮备溶液。

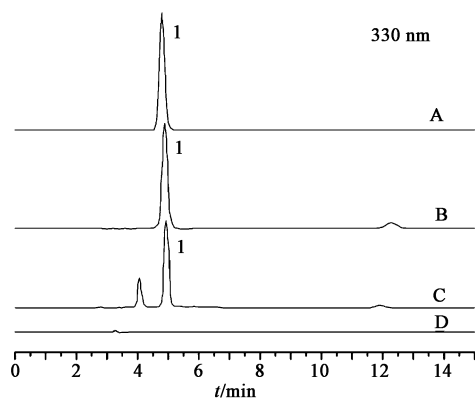
精密称取木犀草素对照品 9.97 mg,置 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀。精密量取 1 mL 至 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀。再精密量取 1 mL 至 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇定容至刻度,即得 9.97 mg·L<sup>-1</sup>的木犀草素对照品贮备溶液。

分别精密吸取迷迭香酸对照品贮备溶液与木犀草素对照品贮备溶液各 1 mL,置 10 mL 量瓶中,甲醇定容,即得混合对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液** 准确称取 2 g 已粉碎的脱脂紫苏子,加 70% 的乙醇溶液 32 mL,在 90 ℃ 水浴加热回流提取 1 h。将提取液趁热过滤至 50 mL 量瓶中,滤渣用少量 70% 乙醇溶液清洗 2~3 次,放冷后用 70% 乙醇溶液定容至刻度,摇匀。取 10 mL 于离心管中,在 5 000 r·min<sup>-1</sup> 下离心 5 min,取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

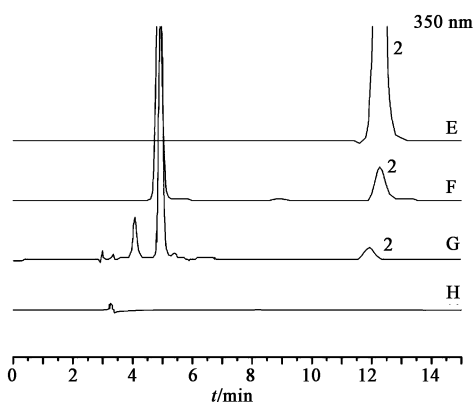
**2.3 专属性试验** 取混合对照品溶液、供试品溶液、空白溶剂按 2.1 项下色谱条件分别进样测定。空白溶剂在迷迭香酸、木犀草素对照品相应位置无色谱峰,对测定没有干扰,见图 1,2。

**2.4 线性关系考察** 分别精密吸取 2.2.1 项下的混合对照品溶液 1,2,4,8,12,16 μL 注入高效液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件进行测定。以对照品溶液浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲



A. 对照品;B. 混合对照品;C. 供试品;  
D. 空白溶剂;1. 迷迭香酸

图 1 紫苏子中迷迭香酸 HPLC



E. 对照品;F. 混合对照品;G. 供试品;  
H. 空白溶剂;2. 木犀草素

图 2 紫苏子中木犀草素的 HPLC

线。结果迷迭香酸在 9.91 ~ 158.55 mg·L<sup>-1</sup> 回归方程为  $Y = 108.83X + 0.1368$  ( $r = 0.9999$ ),木犀草素在 0.997 ~ 15.952 mg·L<sup>-1</sup> 的回归方程为  $Y = 119.63X - 3.6778$  ( $r = 0.9999$ ),两者在相应范围内都呈现了良好的线性关系。

**2.5 精密度试验** 取迷迭香酸、木犀草素的混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,测得迷迭香酸、木犀草素峰面积的 RSD 分别为 0.69%, 0.70%,结果表明仪器精密度良好。

**2.6 稳定性试验** 取 2.2.2 项下同一供试品溶液,分别在 1,2,4,6,8,12 h 进样测定,计算迷迭香酸、木犀草素峰面积的 RSD 分别为 0.94%, 2.54%。结果表明供试品溶液室温放置 12 h 稳定。

**2.7 重复性试验** 取同一批脱脂紫苏子药材,按 2.2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定。测得该批脱脂紫苏子中迷迭香酸、木犀草素含量的 RSD 分别为 1.78%, 1.90%,结果表明该方法重复性良好。

**2.8 加样回收率试验** 取已知含量的同一批脱脂紫苏子药材,每份约 1 g,精密称定,分别精密加入 990.96 mg·L<sup>-1</sup>迷迭香酸对照品溶液 3 mL,99.7 mg·L<sup>-1</sup>木犀草素对照品溶液 2 mL。按 2.2.2 项下制备供试品溶液,按 2.1 项下方法进样测定,结果见表 1,2,迷迭香酸、木犀草素的平均回收率分别为 99.68%,100.34%,RSD 分别为 2.01%,2.86%。

表 1 紫苏子中迷迭香酸的加样回收率测定

| 称样量 /g  | 样品中量/mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均值 /% | RSD /% |
|---------|---------|---------|--------|--------|--------|
| 1.012 1 | 2.948   | 5.989   | 102.28 |        |        |
| 1.009 6 | 2.936   | 5.936   | 100.91 |        |        |
| 1.003 3 | 2.976   | 5.889   | 97.99  | 99.68  | 2.01   |
| 1.001 7 | 2.865   | 5.765   | 97.53  |        |        |
| 1.009 1 | 2.856   | 5.864   | 101.18 |        |        |
| 1.002 5 | 2.917   | 5.837   | 98.21  |        |        |

注:加入量均为 2.973 mg。

表 2 紫苏子中木犀草素的加样回收率测定

| 称样量 /g  | 样品中量/μg | 测得量 /μg | 回收率 /% | 平均值 /% | RSD /% |
|---------|---------|---------|--------|--------|--------|
| 1.012 1 | 191.2   | 399.5   | 104.66 |        |        |
| 1.009 6 | 189.0   | 385.6   | 98.52  |        |        |
| 1.003 3 | 191.3   | 388.1   | 98.61  | 100.34 | 2.86   |
| 1.001 7 | 187.5   | 385.2   | 99.09  |        |        |
| 1.009 1 | 190.5   | 396.1   | 103.26 |        |        |
| 1.002 5 | 182.0   | 377.6   | 97.89  |        |        |

注:加入量均为 199.4 μg。

**2.9 样品含量测定** 取已粉碎的紫苏子,先用冷浸法对其进行脱脂处理,干燥后按 2.2.2 项下方法平行制备 3 份供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,结果见表 3。

表 3 紫苏子样品中 2 种成分含量测定 mg·g<sup>-1</sup>

| 批号       | 迷迭香酸 | 木犀草素 |
|----------|------|------|
| 20130706 | 3.08 | 0.20 |
| 20130721 | 3.10 | 0.19 |
| 20130726 | 3.02 | 0.19 |

### 3 讨论

**3.1 紫苏子药材的脱脂工艺** 通过预实验对脱脂前后的紫苏子中迷迭香酸和木犀草素两种成分的提取量进行了对比,结果发现与脱脂前相比,脱脂后两种有效成分的提取量增高了 10% 左右。分析是由于紫苏子中含有约 40% 的油脂类成分,限制了有效

成分的溶出,为了更有效的提取药效成分和便于后续的精制纯化处理、制剂成型等方面的考虑,本实验选择以石油醚为溶剂,3 倍量溶剂对紫苏子药材进行冷浸脱脂处理。

**3.2 提取条件的选择** 本试验对提取溶剂乙醇的比例、提取时间、提取温度、提取次数均进行了单因素考察,根据试验结果确定了最佳的提取工艺方案。

**3.3 流动相的优化** 分别对甲醇-0.1% 磷酸水溶液(40:60)、甲醇-0.1% 磷酸水溶液(45:55)和甲醇-0.1% 磷酸水溶液(55:45)比例流动相进行了考察,结果显示,选用甲醇-0.1% 磷酸水溶液(40:60),迷迭香酸对照大约在 25 min 出峰,出峰时间比较晚,而木犀草素对照不能出峰,混合对照也只体现了迷迭香酸峰形;选用甲醇-0.1% 磷酸水溶液(45:55)时,迷迭香酸对照大约在 14 min 出峰,而木犀草素对照不能形成完整峰形,混合对照则出现了 3 个峰;而选用甲醇-0.1% 磷酸水溶液(55:45)时,迷迭香酸对照大约在 5 min 能够出峰,木犀草素对照在 12 min 也能出峰,明显缩短了分离时间,且峰型也比较尖锐,能将迷迭香酸和木犀草素很好的分离,故选择甲醇-0.1% 磷酸水溶液(55:45)比例作为流动相。

2010 年版《中国药典》紫苏子药材的含量测定项下只收录了迷迭香酸作为指标性成分,而本试验建立了 HPLC 同时测定脱脂紫苏子中迷迭香酸和木犀草素两种活性成分的方法。研究表明,该方法简便、准确、重复性好。

### [参考文献]

- [1] 陈燕舞,肖坤,尹笃林. 正交试验优化紫苏中迷迭香酸的超声波提取法[J]. 食品科技,2007(6):122.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:318.
- [3] 黄亮辉,苏琪,赵婷婷,等. 白苏子和紫苏子生品及其炮制品中迷迭香酸的含量测定[J]. 中药材,2010,33(12):1856.
- [4] Tewtrakul S, Miyashiro H, Nakamura N, et al. HIV-1 integrase inhibitory substances from *Coleus parvifolius* [J]. *Phytother Res*,2003,17(3):232.
- [5] 张毅,王旭光. 木犀草素的体外抗炎机制研究[J]. 广州中医药大学学报,2007(3):231.
- [6] 方悦,黄芳,郑琦. 木犀草素对肿瘤作用的研究进展[J]. 浙江中西医结合杂志,2013,23(7):596.
- [7] 胡春萍,蔡雪婷,胡婷婷,等. 木犀草素诱导非小细胞肺癌细胞株 A549 凋亡和 G2 周期阻滞[J]. 中国中药杂志,2012,37(9):1259.

[责任编辑 顾雪竹]