

HPLC 测定留兰香中橙皮苷和迷迭香酸的含量

王桂红¹, 张群^{2,3}, 谭永霞², 吴勇², 吴宁³, 顾承刚³, 郑国华^{2*}, 何建华^{2,3}

(1. 湖北中医药大学 国医堂, 武汉 430061; 2. 湖北中医药大学 药学院, 武汉 430065;
3. 武汉药谷科技开发有限公司, 武汉 430075)

[摘要] 目的:建立留兰香药材中橙皮苷、迷迭香酸的 HPLC 含量测定方法。方法:采用戴安高效液相色谱仪,对供试品溶液的制备方法、流动相等分析条件进行了优化筛选,并对分析方法的线性范围、重复性、加样回收率等进行考察,建立分别测定橙皮苷、迷迭香酸的留兰香药材质量控制方法。结果:采用 Inertsil ODS-3 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.2% 磷酸溶液(18:82)等度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,测定留兰香中橙皮苷和迷迭香酸的检测波长分别为 283, 330 nm,柱温分别为 30, 35 °C。回归方程橙皮苷为 $Y = 27.61X + 0.0402$ ($r = 0.9999, 0.008434 \sim 1.687 \mu\text{g}$),平均加样回收率为 96.43% (RSD 1.4%);迷迭香酸为 $Y = 51.44X - 0.1723$ ($r = 0.9999, 0.01891 \sim 1.891 \mu\text{g}$),平均加样回收率为 99.99% (RSD 1.7%)。结论:该方法简便准确、分离度好、重复性好,可用于留兰香中橙皮苷和迷迭香酸的含量测定。

[关键词] 留兰香; 橙皮苷; 迷迭香酸; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)06-0038-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016060038

Content Determination of Hesperidin and Rosmarinic Acid in Menthae Spicatae Herba by HPLC

WANG Gui-hong¹, ZHANG Qun^{2,3}, TAN Yong-xia², WU Yong², WU Ning³,
GU Cheng-gang³, ZHENG Guo-hua^{2*}, HE Jian-hua^{2,3}

(1. Guoyitang, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China;
2. School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;
3. Wuhan Yaogu Science and Technology Development Co. Ltd., Wuhan 430075, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for determining the content of hesperidin and rosmarinic acid in Menthae Spicatae Herba. **Method:** The conditions of sample preparation, chromatography column and mobile phase were optimized. The linear ranges, reproducibility and recovery rate were evaluated based on a Thermo Scientific HPLC system to establish the method of quality control for determining the content of hesperidin and rosmarinic acid in Menthae Spicatae Herba. **Result:** HPLC analysis was conducted on a Inertsil ODS-3 C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), which was eluted with the mobile phase of acetonitrile-0.2% phosphoric acid (18:82), at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ under the temperature of 30 °C, and the detection wavelength was set at 283 nm for hesperidin, and that of rosmarinic acid was under temperature of 35 °C, and the detection wavelength was set at 330 nm. The regression equation of hesperidin was $Y = 27.61X + 0.0402$ ($r = 0.9999, 0.008434 \sim 1.687 \mu\text{g}$) and that of rosmarinic acid was $Y = 51.44X - 0.1723$ ($r = 0.9999, 0.01891 \sim 1.891 \mu\text{g}$); the average recovery of hesperidin was 96.43% (RSD 1.4%), for rosmarinic acid it was 99.99% (RSD 1.7%). **Conclusion:** The method is simple, accurate, and repeatable, and so can be used for determining

[收稿日期] 20150720(004)

[第一作者] 王桂红, 主任药师, 硕士生导师, 从事中药新制剂、新剂型的研究工作, Tel:18986026269, E-mail:843773585@qq.com

[通讯作者] * 郑国华, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药新制剂、新剂型的研究工作, Tel:027-68890113, E-mail:zgh1227@sina.com

the content of hesperidin and rosmarinic acid in *Menthae Spicatae Herba*.

[Key words] *Menthae Spicatae Herba*; hesperidin; rosmarinic acid; HPLC

留兰香^[1]具有和中理气、祛风散寒、消肿止痛之功效,用于伤风感冒、胃气痛、鼻衄、目赤、疔疮热疥等^[2]。现代研究表明,留兰香主要化学成分为黄酮类、酚酸类、挥发油类成分等。其中橙皮苷具有明显的抑菌能力,此外还具有抗炎、抑制氧化自由基、促进胃肠道平滑肌运动的作用^[3-4];迷迭香酸抗炎活性强,还具有清除自由基及抗氧化作用^[5-7]。留兰香药材收载于《贵州省中药材、民族药材质量标准》2003 年版,原标准只有性状鉴别,未对药效成分进行定量检测。本文建立采用高效液相色谱法留兰香中橙皮苷和迷迭香酸的含量测定方法,为留兰香的品质选择和质量控制提供试验数据。

1 材料

Ultimate3000 型高效液相色谱系统(LPG-3400SD 泵, WPS-3000SL Analytical 自动进样器, TCC-3000RS 柱温箱, VWD-3100 检测器, Chromeleon 色谱工作站, 赛默飞), HH-4 型数显恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司), AB135-S 型和 AL204 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多), 613T 型便携式超声波清洗机(深圳市浩拓电子科技有限公司)。

橙皮苷(批号 110721-201316, 纯度 95.3%)、迷迭香酸(批号 111871-201404)对照品均购自中国食品药品检定研究院。10 批留兰香药材经湖北中医药大学药教研室鉴定为唇形科植物留兰香 *Mentha spicata* 的全草。甲醇、乙腈为色谱纯, 无水乙醇、磷酸为分析纯, 实验用水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Inertsil ODS-3 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.2% 磷酸(18:82), 流速 1 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL, 橙皮苷检测波长 283 nm, 柱温 30 °C; 迷迭香酸检测波长 330 nm, 柱温 35 °C。

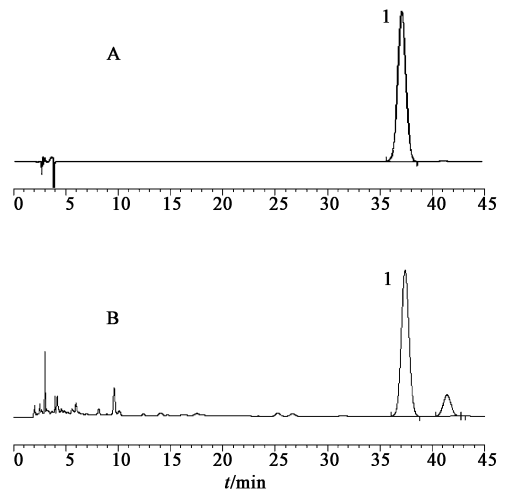
2.2 对照品溶液的制备 精密称取橙皮苷对照品 8.85 mg, 用甲醇超声溶解定容至 50 mL 量瓶中, 得质量浓度为 168.7 mg·L⁻¹ 的橙皮苷对照品溶液。精密称取迷迭香酸对照品 9.59 mg, 用 60% 乙醇超声溶解定容至 50 mL 量瓶中, 得质量浓度为 189.1 mg·L⁻¹ 的迷迭香酸对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 称取留兰香粉末(过三号筛)约 0.3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精

密加入 60% 乙醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 置水浴中回流 3 h, 冷却至室温, 用 60% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得橙皮苷供试品溶液。

称取留兰香粉末(过三号筛)约 0.3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入 60% 乙醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 置水浴中回流 5 h, 冷却至室温, 用 60% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得迷迭香酸供试品溶液。

2.4 系统适应性考察 分别取橙皮苷和迷迭香酸的对照品溶液和供试品溶液, 按照 2.1 项下色谱条件进行分析, 结果供试品中橙皮苷和迷迭香酸的色谱峰与其他峰之间得到了很好的分离, 色谱分离度均 > 1.5; 按橙皮苷和迷迭香酸的色谱峰计算得出的理论塔板数均 > 4 000; 拖尾因子在 0.95 ~ 1.05。见图 1, 2。



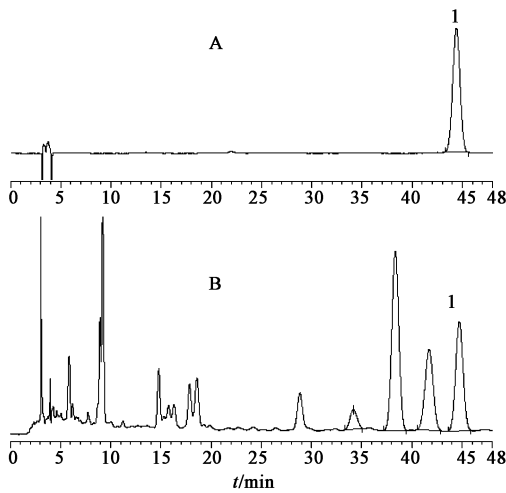
A. 对照品; B. 供试品; 1. 橙皮苷

图 1 留兰香中橙皮苷的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of hesperidin in *Menthae Spicatae Herba*

2.5 精密度试验 分别取橙皮苷和迷迭香酸对照品溶液, 按照 2.1 项下色谱条件, 连续进样 6 次。测得橙皮苷和迷迭香酸峰面积的 RSD 分别为 0.3% 和 0.5%, 表明仪器精密度良好。分别精密称取同一个批次的样品(批号 20140928)6 份, 按 2.3 项下方法制备橙皮苷供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件分别进行测定, 得到橙皮苷的平均质量分数为 1.198%, RSD 1.9%, 表明该方法的重复性良好。

2.6 线性关系的考察 取 2.2 项下 168.7 mg·L⁻¹ 的橙皮苷对照品溶液, 189.1 mg·L⁻¹ 的迷迭香酸对



A. 对照品; B. 供试品; 1. 迷迭香酸

图 2 留兰香中迷迭香酸的 HPLC

Fig. 2 HPLC chromatograms of rosmarinic acid in *Menthae Spicatae Herba*

照品溶液稀释为系列对照品溶液。按照 2.1 项下色谱条件,进样分析,以各自的进样量(μg)为横坐标 X,峰面积为纵坐标 Y,绘制标准曲线,得到橙皮苷回归方程为 $Y = 27.61X + 0.0402$ ($r = 0.9999$),表明橙皮苷在 $0.008434 \sim 1.687 \mu\text{g}$ 与峰面积呈良好的线性关系;迷迭香酸回归方程为 $Y = 51.44X - 0.1723$ ($r = 0.9999$),表明迷迭香酸在 $0.01891 \sim 1.891 \mu\text{g}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.7 稳定性试验 取新制备的橙皮苷供试品溶液,在室温下放置 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 后,按照 2.1 项下色谱条件来进行测定,记算峰面积, RSD 0.4%。表明橙皮苷的供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

取新制备的迷迭香酸供试品溶液,在室温下放置 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48 h 后,按照 2.1 项下色谱条件来进行测定,结果峰面积 RSD 1.0%。表明迷迭香酸的供试品溶液在 48 h 内基本稳定。

2.8 重复性试验 分别精密称取同一个批次的样品(批号 20140928)6 份,按 2.3 项下方法制备橙皮苷供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,得到橙皮苷的平均质量分数为 1.21%, RSD 1.7%,表明该方法的重复性良好。

分别精密称取同一个批次的样品(批号 20141217)6 份,按 2.3 项下方法制备迷迭香酸供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,得到迷迭香酸的平均质量分数为 0.110%, RSD 1.9%,表明该方法的重复性良好。

2.9 回收率试验 精密称取同一批已知含量的留兰香样品(批号 20140928,橙皮苷质量分数为 1.204%)6 份,每份约 0.15 g,分别精密加入橙皮苷对照品溶液适量,按照 2.3 项下方法制备橙皮苷供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定。结果见表 1。

表 1 橙皮苷的加样回收率试验

Table 1 Results of recovery test of hesperidin in *Menthae Spicatae Herba*

No.	称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.151 1	1.819 2	3.513 8	97.93	96.41	1.4
2	0.151 8	1.827 7	3.478 7	95.40		
3	0.151 1	1.819 2	3.521 7	98.38		
4	0.152 2	1.832 5	3.483 6	95.41		
5	0.150 4	1.810 8	3.460 7	95.34		
6	0.151 0	1.818 0	3.479 1	95.98		

注:加入量均为 1.730 5 mg。

精密称取同一批已知含量的留兰香样品(批号 20141217,迷迭香酸的质量分数为 0.110%)6 份,每份约 0.15 g,分别精密加入迷迭香酸对照品溶液适量,按照 2.3 项下方法制备迷迭香酸供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件分别进行测定。结果见表 2。

表 2 迷迭香酸的加样回收率试验

Table 2 Results of recovery test of rosmarinic acid in *Menthae Spicatae Herba*

No.	称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.150 1	0.165 1	0.354 2	100.00	99.99	1.7
2	0.150 7	0.165 8	0.358 1	101.69		
3	0.150 8	0.165 9	0.359 3	102.27		
4	0.150 9	0.166 0	0.353 7	99.25		
5	0.150 5	0.165 6	0.351 3	98.20		
6	0.150 4	0.165 4	0.351 8	98.57		

注:加入量均为 0.189 1 mg。

2.10 样品含量测定 取 10 批不同产地留兰香,分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按照 2.1 项下色谱条件进样测定。结果见表 3。

3 讨论

比较留兰香粉末过三号筛和过二号筛 2 个品种(由于留兰香药材纤维性强,不易打粉,故在此不考虑筛孔更小的筛子),发现过二号筛的提取率低于过三号筛的留兰香粉末。

供试品提取方法采用单因素考察法,以橙皮苷、迷迭香酸的含量为检测指标,对提取方法(索氏提取、超声、回流)进行了考察,发现加热回流法的提

表 3 10 批不同来源留兰香中橙皮苷、迷迭香酸的含量测定
Table 3 Determination results of hesperidin and rosmarinic acid in
Menthae Spicatae Herba from ten cultivated sources %

No.	产地	批号	橙皮苷	迷迭香酸
1	江苏南京	20140928	1.204	0.036
2	湖北黄冈	20141121	0.154	0.845
3	贵州遵义	20141217	0.106	0.110
4	云南曲靖	20150112	0.066	0.068
5	安徽亳州	20150119	0.083	0.076
6	重庆万州	20150326	0.093	0.075
7	湖南怀化	20150429	0.323	0.414
8	广西桂林	20150504	0.241	0.066
9	广东河源	20150512	1.090	0.034
10	湖北恩施	20150710	0.256	0.141

取效果最好;然后比较了提取溶剂(水、乙醇、甲醇),相比之下,乙醇的提取效果明显较好;在此基础上考察了乙醇浓度的影响,结果 60% 乙醇提取效果最好;再对不同回流时间(0.5,1,2,3,4,5,6 h)进行比较,结果发现 60% 乙醇为溶剂回流提取 3 h 时橙皮苷的提取基本完全(随着时间的增加,橙皮苷的含量呈先增加后降低的趋势,回流 3 h 时含量达到顶峰),确定该工艺参数为橙皮苷的供试品制备方法;发现 60% 乙醇为溶剂回流提取 5 h 时迷迭香酸的提取基本完全(随着时间的增加,橙皮苷的含量呈先增加后降低的趋势,回流 5 h 时含量达到顶峰),确定该工艺参数为迷迭香酸的供试品制备方法。

参考《中国药典》2010 年版一部中陈皮项下测定橙皮苷和夏枯草项下测定迷迭香酸^[8]的检测波长分别为 283 nm 和 330 nm,此波长可避免杂质干扰且可较好的检测该 2 种成分。

考察了乙腈和不同浓度磷酸水溶液在等度洗脱条件下,以及 2 者的不同比例,另外还考察了不同柱温,结果橙皮苷和迷迭香酸分别在 2.1 项色谱条件下色谱峰的出峰时间、峰形和分离度情况均达到了很好的状态。

供试品的提取方法不同(提取溶剂相同,但提取时间不同,供试品无法采用相同的制样方法),再者,橙皮苷和迷迭香酸的含量测定时检测波长、柱温均不同,故最终确定将橙皮苷和迷迭香酸的含量测定方法分开研究。

为了保证在色谱条件有小的变动时,不影响留兰香中橙皮苷和迷迭香酸的含量测定结果,以使方法便于常规检验,对其色谱条件进行了耐用性研究。橙皮苷考察柱温(30 ± 2) °C,流速(1.0 ± 0.2) mL·min,检测波长(283 ± 2) nm,磷酸浓度(0.2 ±

0.02)%,流动相比比例变化 ± 1% 以及不同品牌和同一品牌不同柱号的色谱柱,测定橙皮苷含量;结果柱温、流速、检测波长、磷酸浓度、流动性比例对测定结果无显著影响;不同品牌的色谱柱对含量测定影响很大,需适当改变色谱条件才能达到较好的分离效果,而使用同一品牌(Inertsil ODS-3 C₁₈)不同批号的色谱柱,对含量的测定结果无影响;橙皮苷的含量测定时应注意色谱柱这一影响因素。迷迭香酸考察柱温(35 ± 2) °C,流速(1.0 ± 0.2) mL·min⁻¹,检测波长(330 ± 2) nm,磷酸浓度(0.2 ± 0.02)%,流动相比比例变化 ± 1% 以及不同品牌的色谱柱,测定橙皮苷供试品溶液含量;结果柱温、流速、检测波长、磷酸浓度、色谱柱对测定结果无显著影响;流动相比比例变化对结果有一定的影响;迷迭香酸的含量测定时应注意流动相比比例这一影响因素。

留兰香主要为南方部分地区用药,北方市场较少见。本文通过对 10 个产地 10 批留兰香样品进行测定,结果显示,不同产地之间的含量差异较大,造成差异的原因可能是采收期和产地不同等,但其是否具有规律性有待进一步深入研究。

本文建立了留兰香中橙皮苷和迷迭香酸高效液相含量测定方法,该方法简便准确、分离度和重复性好,专属性强,为留兰香质量标准及资源开发利用奠定了一定的基础和依据。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 7 卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:86.
- [2] 宋妍. 留兰香水溶性部分化学成分的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2008:1-13.
- [3] 钱俊臻,王伯初. 橙皮苷的药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2010,22(1):176-180.
- [4] 李玉山. 橙皮苷研究新进展[J]. 科技导报,2009,27(22):108-115.
- [5] 曾建伟,吴锦忠,林忠宁,等. HPLC 测定不同产地佛手中橙皮苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(19):97-99.
- [6] 周丹,刘艾林,杜冠华. 迷迭香酸的药理学研究进展[J]. 中国新药杂志,2011,20(7):594-598.
- [7] 张玉杰,徐文清,沈秀. 迷迭香酸的提取分离及药理学新发现[J]. 中国新药杂志,2013,22(4):433-437.
- [8] 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,2010:176-177,263.

[责任编辑 顾雪竹]