

HPLC 同时测定夏桑菊颗粒中 迷迭香酸与异迷迭香酸苷的含量

花汝凤, 姚江雄*, 黎志坚, 方铁铮, 蒋丽娟, 许招懂
(广州白云山星群(药业)股份有限公司, 广州 510288)

[摘要] 目的: 建立夏桑菊颗粒中迷迭香酸、异迷迭香酸苷 2 成分含量测定方法。方法: 采用 HPLC 同时测定夏桑菊颗粒中迷迭香酸、异迷迭香酸含量, Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 319 nm, 柱温 30 °C。结果: 迷迭香酸、异迷迭香酸苷线性范围分别为 0.036 4 ~ 0.364 μg ($R^2 = 0.999 8$), 0.004 98 ~ 0.049 8 μg ($R^2 = 0.999 7$); 迷迭香酸平均回收率为 99.16%, RSD 1.32%, 异迷迭香酸苷平均回收率为 98.40%, RSD 0.78% ($n = 6$)。结论: 该方法操作简单, 可靠, 重复性好, 可用于控制夏桑菊颗粒质量控制。

[关键词] 夏桑菊颗粒; 迷迭香酸; 异迷迭香酸苷; 高效液相色谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0075-03

[doi] 10.11653/syjf2013240075

Simultaneous Determination of Rosmarinic Acid and Salviaflaside in Xiasangju Granules of by HPLC

HUA Ru-feng, YAO Jiang-xiong*, LI Zhi-jian, FANG Tie-zheng, JIANG Li-juan, XU Zhao-dong
(Guangzhou Baiyunshan Xingqun Medicine Co. Ltd., Guangzhou 510288, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC method for simultaneous determination of rosmarinic acid and salviaflaside in Xiasangju Granules. **Method:** An Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was applied with gradient elution using acetonitrile and 0.1% phosphoric acid as mobile phase, and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The UV detector was set at 319 nm. **Result:** The linear range of rosmarinic acid was 0.036 4-0.364 μg, and the average recovery was 99.16%. The linear range of salviaflaside was 0.004 98-0.049 8 μg and the average recovery was 98.40% ($n = 6$). **Conclusion:** The method is accurate and repeatable. It can be used for quality evaluation of Xiasangju Granules.

[Key words] Xiasangju Granules; rosmarinic acid; salviaflaside; HPLC; content determination

夏桑菊制剂由夏枯草、桑叶、野菊花为原料制成, 具有清肝明目、疏风散热、除湿痹、解疮毒的功能, 用于风热感冒、目赤头痛、高血压、头晕耳鸣、咽喉肿痛、疔疮肿毒等症^[1]。夏枯草为夏桑菊处方中的君药, 迷迭香酸是夏枯草的主要活性成分之一; 异迷迭香酸苷^[2]是夏枯草果穗中的特有成分。迷迭

香酸及异迷迭香酸苷具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抗炎活性和免疫抑制活性、抗血栓、等作用^[3]。夏桑菊颗粒的生产厂家较多, 质量参差不齐, 文献^[4-7]对夏桑菊颗粒进行指标成分含量测定及指纹图谱研究中未见夏桑菊颗粒中异迷迭香酸苷及迷迭香酸含量测定, 在文献研究^[4]的基础上, 本实验进一步优化实验条件, 采用 HPLC 同时测定制剂中迷迭香酸、异迷迭香酸苷含量, 为评价夏桑菊颗粒的质量提供参考。

1 材料

Waters2487-2996 型高效液相色谱仪 (包括四元梯度泵, 紫外检测器, 保温箱, 自动进样器, Empower 工作站), Millipore Simplicity 185 型超纯水仪 (上海人和科学仪器有限公司), BP211D 型电子天平 (德国赛多利斯公司), HN-1006 型超声清洗仪 (广州华

[收稿日期] 20121129(017)

[基金项目] 国家科技部重大新药创制项目 (2011ZX09401-404-02)

[第一作者] 花汝凤, 硕士研究生, 制药工程师, 从事药物质量与工艺研究, Tel: 020-84051762, E-mail: huarufeng@126.com

[通讯作者] *姚江雄, 制药工程师, 从事药物生产与质量管理, Tel: 020-84051636, E-mail: rekey@vip.163.com

南超声设备厂)等。

迷迭香酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 11871-201102,含量 99.8%),异迷迭香酸苷对照品(课题组自制,含量 98%),醋酸(分析纯,北京化工厂),甲醇(色谱纯, TEDIA 公司),乙腈(色谱纯, Fisher 公司),水为超纯净水;夏桑菊颗粒样品广州白云山星群(药业)股份有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸, 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 319 nm, 柱温 30 °C, 样品温度 25 °C, 进样体积 10 μL, 理论板数按迷迭香酸计算不低于 5 000。

表 1 流动相梯度洗脱程序

t/min	乙腈/%	0.1% 磷酸水/%
0	17	83
26	22	78
30	50	50
33	17	83
40	17	73

2.2 溶液的制备

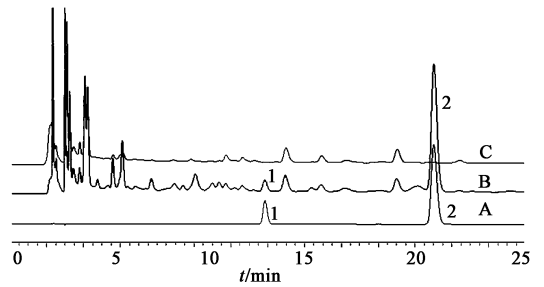
2.2.1 对照品溶液制备 精密称取迷迭香酸及异迷迭香酸苷对照品, 加甲醇溶解得质量浓度为迷迭香酸 0.018 2 g·L⁻¹, 异迷迭香酸苷 0.002 49 g·L⁻¹ 的混合对照液。

2.2.2 供试品溶液制备 夏桑菊颗粒研磨成细粉, 取约 2.5 g, 精密称定置具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 甲醇 50 mL, 称重, 超声处理 30 min(功率 250 W, 频率 40 kHz), 放凉, 补足量, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液制备 按处方组成, 取除夏桔草的其余药材, 按工艺要求制成夏桑菊颗粒阴性样品, 按 2.2.2 项下的方法制备, 即得阴性对照液。

2.3 专属性 精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液, 分别进样 10 μL, 按 2.1 项色谱条件测定, 结果供试品中迷迭香酸、异迷迭香酸与相邻成分分离度良好, 阴性对照液在迷迭香酸、异迷迭香酸对应位置上未见相同色谱峰, 表明阴性对照无干扰, 见图 1。

2.4 线性关系考察 精密吸取 2.2.1 项下 2 种对照品混合溶液(迷迭香酸 0.018 2 g·L⁻¹, 异迷迭香酸苷 0.002 49 g·L⁻¹), 分别进样 2, 5, 10, 15, 20 μL,



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性; 1. 异迷迭香酸; 2. 迷迭香酸

图 1 夏桑菊颗粒 HPLC

按拟定色谱条件测定, 以迷迭香酸、异迷迭香酸苷的进样量(μg)为横坐标(X), 迷迭香酸、异迷迭香酸苷的峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y_{\text{迷迭香酸}} = 3\ 006\ 974X - 10\ 101.83 (R^2 = 0.999\ 8)$, $Y_{\text{异迷迭香酸苷}} = 2\ 017\ 165X - 20.53 (R^2 = 0.999\ 7)$, 表明迷迭香酸在 0.036 4 ~ 0.364 μg, 异迷迭香酸苷在 0.004 98 ~ 0.049 8 μg 呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取同一夏桑菊颗粒(批号 JA10125)供试品溶液, 重复进样测定 6 次。结果迷迭香酸峰面积 RSD 0.73%, 异迷迭香酸苷峰面积 RSD 1.04%, 表明该方法仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批夏桑菊颗粒(批号 JA10125), 按供试品溶液配制方法配制 6 份, 并依法测定。测得迷迭香酸平均含量为 0.53 mg·g⁻¹, RSD 0.97%, 异迷迭香酸苷平均含量为 0.061 mg·g⁻¹, RSD 1.04%, 表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一夏桑菊颗粒(批号 JA10125)供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 16 h 进样检测, 测得迷迭香酸平均含量为 0.53 mg·g⁻¹, RSD 1.38%; 异迷迭香酸苷平均含量为 0.061 mg·g⁻¹, RSD 1.19%, 表明在 16 h 内供试品溶液稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 取夏桑菊颗粒(批号 JA10125), 分别取 1.25 g, 精密称定, 置 6 个具塞锥形瓶中, 分别精密加入适量迷迭香酸、异迷迭香酸苷对照品, 按供试品溶液配制方法配制, 依法测定, 计算回收率。见表 2。

2.9 样品测定 按 2.1 项处理样品, 按拟定色谱方法测定样品, 结果见表 3。10 批夏桑菊颗粒中异迷迭香酸苷含量分布在 0.03 ~ 0.07 mg·g⁻¹, 迷迭香酸含量分布在 0.2 ~ 0.7 mg·g⁻¹。

2.10 制剂中两成分含量稳定性 在上述含量测定方法建立的基础上, 取上市包装夏桑菊颗粒 2 批, 分别置室温(25 ± 2) °C, (65 ± 5)% RH 和加速

表2 夏桑菊颗粒中迷迭香酸、异迷迭香酸苷加样回收试验

对照品	称样量 /g	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD %
迷迭香酸	1.266 1	0.671 0	0.652 7	1.320 1	99.44	99.16	1.32
	1.263 8	0.669 8	0.652 7	1.318 4	99.37		
	1.256 4	0.665 9	0.652 7	1.311 9	98.97		
	1.258 2	0.666 8	0.652 7	1.304 1	97.63		
	1.260 0	0.667 8	0.652 7	1.329 7	101.41		
	1.254 7	0.665 0	0.652 7	1.305 6	98.15		
异迷迭香	1.266 1	0.077 2	0.070 9	0.147 8	99.53	98.40	0.78
酸苷	1.263 8	0.077 1	0.070 9	0.146 6	98.04		
	1.256 4	0.076 6	0.070 9	0.146 7	98.81		
	1.258 2	0.076 8	0.070 9	0.146 2	97.95		
	1.260 0	0.076 9	0.070 9	0.145 9	97.38		
	1.254 7	0.076 5	0.070 9	0.146 5	98.68		

表3 夏桑菊颗粒迷迭香酸及迷迭香酸苷含量 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

No.	批号	异迷迭香酸苷	迷迭香酸
1	FA10304	0.071	0.22
2	FA10499	0.051	0.24
3	GA10102	0.053	0.28
4	GA10247	0.057	0.37
5	HA10194	0.062	0.49
6	HA10666	0.059	0.36
7	IA10280	0.062	0.44
8	IA10686	0.038	0.48
9	JA10120	0.050	0.65
10	JA10125	0.061	0.53

(40 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、(75 ± 5)% RH 下放置,于0,1,2,3,6,9,12月取样测定,考察样品质量稳定性,测定结果见表4。

3 讨论

曾尝试采用文献^[4]中方法测定样品,结果样品中迷迭香酸、异迷迭香酸峰阴性干扰较大,色谱峰分离度不理想。考察了 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈, Diamonsil C₁₈, Welchrom-C₁₈, Hypersil ODS-2 C₁₈ 等色谱柱,甲醇-1%醋酸,甲醇-0.1%磷酸,乙腈-0.1%磷酸等流动相溶剂系统,结果使用 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱,采用乙腈-0.1%磷酸梯度洗脱,迷迭香酸、异迷迭香酸峰形较好,分离度理想,阴性无干扰,经系统适应性试验和方法学考察,实验条件达到定量要求。

表4 样品在常温及加速条件下稳定性 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

样品批号	常温条件			加速条件		
	时间	异迷迭香 酸苷	迷迭 香酸	时间	异迷迭香 酸苷	迷迭 香酸
JA10120	0月	0.050	0.652	0月	0.050	0.652
JA10125		0.061	0.534		0.061	0.534
JA10120	3月	0.049	0.648	1月	0.049	0.647
JA10125		0.060	0.534		0.059	0.530
JA10120	6月	0.049	0.643	2月	0.049	0.637
JA10125		0.059	0.529		0.059	0.525
JA10120	9月	0.049	0.645	3月	0.05	0.635
JA10125		0.061	0.525		0.061	0.521
JA10120	12月	0.047	0.640	6月	0.05	0.622
JA10125		0.059	0.524		0.061	0.508

在含量测定方法建立的基础上,本课题组以夏桑菊颗粒中迷迭香酸、异迷迭香酸苷含量为指标,考察夏桑菊颗粒在常温及加速条件下的稳定性,结果制剂中迷迭香酸、异迷迭香酸苷含量在室温[(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, (65 ± 5)% RH]下放置12个月基本稳定,两成含量变化在2%以内;在加速[(40 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, (75 ± 5)% RH]条件下放置6个月,两成分含量均有降低,含量变化在5%的范围内,表明夏桑菊颗粒常温条件存放质量稳定。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部. 中药成方制剂第15册[M]. 北京:中国医药科技出版社,1997:164.
- [2] 许招懂,王智民,刘菊妍,等. 夏枯草中异迷迭香酸苷 TLC 鉴别和 HPLC 含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,21(8):116.
- [3] 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):68.
- [4] 林丽美,许招懂,姚江雄,等. 夏枯草中异迷迭香酸苷和迷迭香酸的含量测定[J]. 中国药学杂志,2012,47(15):1204.
- [5] 柯雪红,孙维广,姚江雄,等. 夏桑菊颗粒指纹图谱的建立及其在质量控制中的应用[J]. 中成药,2008,30(9):937.
- [6] 姚江雄,柯雪红,花汝凤. 不同品牌夏桑菊颗粒指纹图谱的对比研究[J]. 中药新药与临床药理,2012,23(4):460.
- [7] 柯雪红,孙维广,姚江雄,等. 夏桑菊颗粒中氨基酸类成分指纹图谱研究[J]. 中成药,2007,29(6):785.

[责任编辑 顾雪竹]