

HPLC 测定九节茶肿痛宁乳膏中异嗪皮啉与迷迭香酸的含量

欧余航, 李杰, 陈强*
(福建中医药大学, 福州 350122)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 测定九节茶肿痛宁乳膏中异嗪皮啉与迷迭香酸含量。方法: 采用 Hypersil ODS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱, 以 0.1% 甲酸乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相, 检测波长 330 nm, 柱温 30 °C, 流速 1 mL·min⁻¹。结果: 异嗪皮啉在 4.06 ~ 64.96 mg·L⁻¹ 线性关系良好 (r = 0.999 9), 平均回收率 100.48%, RSD 0.73%; 迷迭香酸在 12.3 ~ 196.8 mg·L⁻¹ 线性关系良好 (r = 0.999 3), 平均回收率 101.98%, RSD 1.5%。结论: 方法简单、准确、重复性好, 能有效的控制该制剂的质量。

[关键词] 九节茶肿痛宁乳膏; 异嗪皮啉; 迷迭香酸;

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0098-04

[doi] 10.11653/syjf2013150098

Determination of Isofraxidin and Rosmarinic Acid in *Sarcandra Zhongtongning* Cream by HPLC

OU Yu-hang, LI Jie, CHEN Qiang*

(Department of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

[Abstract] **Objective:** To develop the HPLC method for the determination of isofraxidin and rosmarinic acid in *Sarcandra Zhongtongning* cream. **Method:** The chromatographic separation was performed on Hypersil ODS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column. Acetonitrile with 0.1% formic acid-0.1% formic acid was used as mobile phase. Detection wavelength was at 330 nm, column temperature was maintained at 30 °C, the flow rate was

[收稿日期] 20121109(003)

[基金项目] 福建省科技厅重点项目(201110003)

[第一作者] 欧余航, 硕士研究生, 从事天然药物有效成分的分离和分析研究, Tel: 15980273947, E-mail: 68279441@qq.com

[通讯作者] * 陈强, 研究员, 从事中药制剂和新药研究, Tel: 0591-22861043, E-mail: cq@fjtc.edu.cn

- [5] Ogiwara T, Satoh K, Kadoma Y, et al. Radical scavenging activity and cytotoxicity of ferulic acid [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22 (5):2711.
- [6] Zhouen Z, Side Y, Weizhen L, et al. Mechanism of reaction of nitrogen dioxide radical with hydroxycinnamic acid derivatives; a pulse radiolysis study [J]. *Free Radic Res*, 1998, 29 (1):13.
- [7] 靳通收, 赵瑞巧, 王爱卿, 等. 水中“一锅”合成 7,7-二甲基-4-(3-氯苯基)-5-氧代-3,4,5,6,7,8-六氢香豆素的洁净方法 [J]. *化学试剂*, 2006, 28 (10):621.
- [8] Davidson D, Bernhard S A. The structure of medrulum's supposed B-lactonic acid [J]. *J Am Chem Soc*, 1948, 70:3426.
- [9] Youngha Ryu, A Ian Scott. Self-condensation of activated malonic acid half esters; a model for the decarboxylative Claisen condensation in polyketide biosynthesis [J]. *Tetrahedron Letters*, 2003(44):7499.
- [10] 赵亚军, 焦玉国. 3,5-二甲氧基苯乙醛和丙二酸单乙酯的 Knoevenagel 缩合 [J]. *高等学校化学学报*, 1997, 18(8):1312.
- [11] 胡惟孝, 夏春年. 一种一锅法咖啡酸衍生物的方法. 中国; CN 1730460A [P]. 2010-06-18.
- [12] Benzie I F F, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power' the FRAP assay [J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239 (3):70.

[责任编辑 邹晓翠]

1.0 mL·min⁻¹. **Result:** Isofraxidin was linear in the range of 4.06-64.96 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$). The average recovery and relative standard deviation were 100.48% and 0.73% respectively. Rosmarinic acid was linear in the range of 12.3-196.8 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$). The average recovery and relative standard deviation were 101.98% and 0.15% respectively. **Conclusion:** This method was simple, accurate and specific with good reproducibility. It can be effectively used for the quality control of *Sarcandra Zhongtongning* cream.

[**Key words**] *Sarcandra Zhongtongning* cream; isofraxidin; rosmarinic acid

九节茶系金粟兰科植物草珊瑚的干燥地上部分(肿节风^[1]为其全株),收载于《广东省中药材标准》(第一册),具有清热解毒、凉血、消斑、祛风除湿、通络止痛的功用。临床主要用于治疗各类感染炎症性疾病,如口腔咽喉疾患、治疗老年肺炎、小儿病毒性心肌炎、小儿急性上呼吸道感染、细菌性痢疾、消化道溃疡、急性乳腺炎、鼻咽癌等恶性肿瘤及所致疼痛,以及血小板减少性紫癜^[2-4]。常见的剂型有片剂、胶囊、口服液和注射剂等^[5]。九节茶肿痛宁乳膏剂是应用大孔吸附树脂分离富集九节茶药材的香豆素类和酚酸类成分部位,配以乳膏基质制成的具有消肿镇痛作用的外用制剂。现以异嗪皮啉与迷迭香酸来为指标成分^[1],建立该制剂的含量测定方法和标准,旨在为该制剂的质量控制提供更加简便有效的方法。

1 材料

Waters E2695 Separations Module HPLC 系统, Waters2998 二级管阵列检测器和 Empower 软件[沃特世科技(上海)有限公司], METTLER AE240 型(1/万)天平[奥豪斯仪器(上海)有限公司], METTLER TOLEDO XS105 型(1/10 万)天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司], BFX5-320 型低速离心机(上海安亭科学仪器厂), DK-S24 型电热恒温水浴锅(郑州长城科工贸有限公司), KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

九节茶肿痛宁乳膏(规格 15 g/支,实验室自制,批号 20120807, 20120808, 20120809),空白基质(实验室自制),迷迭香酸对照品(批号 111871-201001,中国药品生物制品检定所,含量以 98.8%计),异嗪皮啉对照品(批号 110837-201005,中国药品生物制品检定所,含量以 99.9%计),乙腈为色谱纯(Fisher 公司),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,均为国药集团化学试剂有限公司,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[6-9] Hypersil ODS 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相 A 为 0.1% 的甲酸乙腈溶液, B 为 0.1% 的甲酸溶液,梯度洗脱,柱

温 30 ℃,检测波长 330 nm,进样量 20 μL,流速 1.0 mL·min⁻¹。在上述条件下,流动相梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

t/min	A/%	B/%
0	5	95
10	25	75
17	25	75
22	5	95
25	5	95

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取异嗪皮啉对照品 8.12 mg 置 50 mL 量瓶,加甲醇适量,超声溶解,定容至刻度,摇匀,制成 162.4 mg·L⁻¹ 的对照品母液。

精密称取迷迭香酸对照品 19.68 mg 置 50 mL 量瓶,加甲醇适量,超声溶解,定容至刻度,摇匀,制成 393.6 mg·L⁻¹ 的对照品母液。

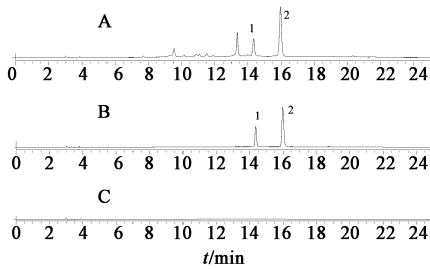
分别精密量取异嗪皮啉与迷迭香酸对照母液 4, 5 mL 置同一 10 mL 量瓶,加甲醇定容至刻度,配制成混合对照溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取九节茶肿痛宁乳膏 0.15 g 左右置 15 mL 离心管中,精密加入甲醇 10 mL,称重,记录,超声提取 30 min,加甲醇补足质量,置冰浴中 30 min,取出离心(4 000 r·min⁻¹, 20 min),取上清液,过 0.45 μm 微孔滤膜取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按照该制剂处方中的比例和制备工艺,配制不含九节茶的乳膏剂(空白样品),根据 2.2.2 项下方法制备成阴性对照液。

分别取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照液按 2.1 项下方法进行测定。结果供试品色谱图中,在与对照品相应的保留时间上有对应的色谱峰;阴性对照液在对照品相应的保留时间处未出现色谱峰,阴性对照液对样品测定无干扰。结果见图 1。

2.3 标准曲线考察 精密量取混合对照品溶液 5,



A. 样品; B. 混合对照品; C. 空白样品;
1. 为异嗪皮啶; 2. 为迷迭香酸

图 1 九节茶肿痛宁高效液相色谱

2.5, 2.5, 1.25 mL 分别置于 10, 10, 20, 20 mL 量瓶中, 加甲醇稀释定容至刻度, 摇匀。取混合对照品溶液和 4 份稀释液分别按照 2.1 项下方法进样。以峰面积 (Y) 为纵坐标, 对照液的浓度 (X) 为横坐标, 进行回归分析, 得异嗪皮啶的回归方程 $Y = 55\ 839X - 23\ 906$ ($r = 0.999\ 9$), 线性范围为 4.06 ~ 64.96 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 迷迭香酸的回归方程 $Y = 53\ 499X - 267\ 502$ ($r = 0.999\ 3$), 线性范围为 12.3 ~ 196.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 稳定性考察 精密称取一份供试品 (批号 20120807) 0.1549 g, 按 2.2 项下的方法进行制备, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h, 依法测定, 结果异嗪皮啶含量 RSD 0.09% ($n = 6$), 迷迭香酸含量 RSD 0.07%。表明供试品溶液在 12 h 稳定性良好。

2.5 精密度考察 取同一份对照品溶液 (迷迭香酸 49.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、异嗪皮啶 16.24 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 按照上述方法连续进样 6 次, 测定峰面积, 异嗪皮啶 RSD 0.24%, 迷迭香酸 RSD 0.29% ($n = 6$)。

2.6 重复性考察 精密称取取同一批样品 (批号 20120808) 6 份, 按 2.2.2 项下方法制备 6 份供试品溶液, 依法测定含量, 异嗪皮啶的含量分别为 1.13, 1.12, 1.12, 1.12, 1.12, 1.12 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 0.32% ($n = 6$); 迷迭香酸的含量分别为 4.49, 4.51, 4.52, 4.53, 4.47, 4.53 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 0.55% ($n = 6$), 表明重复性良好。

2.7 回收率考察 精密称取不含目标成分的空白基质 9 份, 向其中添加低、中、高 3 种不同浓度的对照品溶液, 加甲醇至 10 mL, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 依法测定。结果见表 2。

2.8 含量测定 取供试品 3 批 (批号 20120807, 20120808, 20120809), 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 依法测定含量。结果如表 3。

3 讨论与结论

3.1 供试品溶液制备方法的研究 能否将有效成

表 2 九节茶肿痛宁乳膏剂加样回收率测定

成分	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
异嗪皮啶	0.129 9	0.132 1	101.67	101.23	0.73
	0.129 9	0.131 5	101.21		
	0.129 9	0.133 7	102.91		
	0.162 4	0.164 3	101.18		
	0.162 4	0.164 6	101.35		
	0.162 4	0.163 9	100.92		
	0.194 9	0.196 4	100.78		
	0.194 9	0.196 0	100.58		
	0.194 9	0.195 8	100.48		
	迷迭香酸	0.629 8	0.645 8		
0.629 8		0.644 8	102.39		
0.629 8		0.642 8	103.66		
0.787 2		0.752 8	102.39		
0.787 2		0.811 8	103.13		
0.787 2		0.811 2	103.18		
0.944 6		0.953 8	100.97		
0.944 6		0.897 9	98.81		
0.944 6		0.952 0	100.78		

表 3 九节茶肿痛宁乳膏剂含量测定

批号	异嗪皮啶		平均值	迷迭香酸		平均值
20120807	1.12	1.12	1.12	4.54	4.41	4.48
20120808	1.12	1.13	1.13	4.56	4.58	4.57
20120809	1.13	1.11	1.12	4.55	4.55	4.55

分从乳膏基质中充分提出, 是乳膏剂定量的关键。因此对提取溶剂、用量及提取时间等因素进行了考察。

3.1.1 提取溶剂的考察 精密称取样品 2 份, 分别精密加入 10 mL 甲醇、乙醇, 按 2.2.2 项下方法制备, 依法测定。结果发现用甲醇提取样品所得色谱峰峰型好, 分离度好, 故选择甲醇作为提取溶剂。

3.1.2 溶剂用量考察 精密称取样品 3 份, 分别精密加入 5, 10, 15 mL 甲醇, 按 2.2.2 项下方法制备, 依法测定。结果表明 10 mL 甲醇即可将成分提取完全, 故确定甲醇用量为 10 mL。

3.1.3 甲醇比例的考察 精密称取样品 3 份, 分别精密加入 70%, 90%, 100% 甲醇溶液 10 mL, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 依法测定, 结果 100% 甲醇提取效果略好于其他两种, 且实验中发现

甲醇比例越大,越有利于乳膏基质的分离,得到的供试品溶液也就越澄清,有利于液相的分析。故选择100%甲醇作为提取溶剂。

3.1.4 提取时间的考察 超声提取能使被测物质充分的溶解,实验对超声的时间进行了考察。精密称取样品3份,超声依次为20,30,40 min,其他按2.2.2项下的方法进行制备,依法测定。结果超声30 min与40 min结果比较相近,虽然20 min的异嗪皮啉提取效果略高于30 min的,但是对迷迭香酸提取效果较差。因此选择30 min作为超声提取的时间。

3.2 流动相的选择 选择了3种流动相^[6-9]:乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液、0.1%甲酸乙腈-0.1%甲酸水溶液。经多次测试发现,第一种流动相所得峰形较宽;第2种流动相所得峰形较第1种略有改善,但是随着流动相中溶液比例的变化,导致pH改变,基线不稳定,容易上漂,不利于含量测定;而采用第3种流动相所得样品峰形好,干扰少,因此选此为含量测定的流动相。

3.3 波长的选择 选择检测波长,取异嗪皮啉和迷迭香酸混合对照液,进样后经检测器在200~400 nm进行扫描,可得异嗪皮啉最大吸收波长为341.5 nm,迷迭香酸最大吸收波长为328.4 nm,与报道的情况相符合^[10-11]。因此选择330 nm作为他们共有的吸收波长。

综上所述,本文方法简单、稳定、可靠、有效,可用于测定复方肿痛宁乳膏中异嗪皮啉与迷迭香酸的含量,为该乳膏剂的质量控制提供科学的依据。

[参考文献]

- [1] 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,2010:384.
- [2] 周斌,刘可越,常军,等. 中药肿节风的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国现代应用药学,2009,26(12):982.
- [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.
- [4] 徐国良,肖兵华,陈奇,等. 肿节风及其分离部位对免疫性血小板减少性紫癜小鼠血小板的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2005,11(4):33.
- [5] 郭筱玲,曹晓天. 肿节风制剂的药理研究和临床应用[J]. 中药药业,2006,15(1):74.
- [6] 周国平,刘红宇,王汉章,等. 肿节风中异嗪皮啉含量的HPLC法测定[J]. 中国中药杂志,1999,24(8):481.
- [7] 姚志红,潘宇明,戴毅,等. 肿节风浸膏的质量标准研究[C]. 北京:《中国中药杂志》第九届编委会暨中药新药研发理论与技术创新论坛论文集,2009:207.
- [8] 邓思珊,刘洪旭,马振菁,等. HPLC法考察人工栽培草珊瑚中异嗪皮啉,迷迭香酸和落新妇苷含量[J]. 药学实践杂志,2011,29(3):200.
- [9] 牟大庆. 高效液相色谱同时测定肿节风中3种有效成分[J]. 三明学院学报,2010,27(4):383.
- [10] 邓思珊,胡明芳,刘洪旭,等. 草珊瑚野生品与栽培品中异嗪皮啉含量测定及品质比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(10):48.
- [11] 黎雄,杨柳,曾星,等. HPLC测定清热消炎宁胶囊中异嗪皮啉与迷迭香酸含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(11):53.

[责任编辑 顾雪竹]

欢迎订阅2014年《中国中医药信息杂志》

《中国中医药信息杂志》是由国家中医药管理局主管、中国中医科学院中医药信息研究所主办的中医药学术期刊。1994年创刊,2002年,被中国科学技术信息研究所的"中国科技论文统计源期刊"收录,成为中国科技核心期刊。随着期刊影响力的不断提升,已相继被《中国科学引文数据库》、波兰《哥白尼索引》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、《世界卫生组织西太平洋地区医学索引》及英国《农业与生物科学研究中心文摘》、英国《全球健康》等知名检索系统收录。

本刊是中医药行业一本独具特色的学术期刊,其内容较全面地反映了我国中医药发展水平。主要栏目有:中医动态、专题论坛、改革与管理、中医药信息学、流行病学调查、临床论著、实验研究、中药研究与开发、临床报道、专家经验、临证心得、思路与方法、中医教育、医院药学、综述等。

本刊为月刊,大16开国际开本,136页,国内外公开发行,每册定价10元,全年120元。国内邮发代号:82-670;国外代号:M4564。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。地址:北京市东直门内南小街16号《中国中医药信息杂志》编辑部,邮编:100700,电话:010-64014411-3278, E-mail:Lxx@mail.cintcm.ac.cn。