

HPLC 测定回心草中对羟基桂皮酸的含量

蔡鹰, 赵宁志, 陆瑜, 纪永章*
(解放军第四五四医院, 南京 210002)

[摘要] 目的: 采用 HPLC 测定 5 个不同批号回心草药材中对羟基桂皮酸的含量。方法: 采用 DIKMA Platisil ODS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相乙腈-1% 乙酸水 (20:80), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 310 nm, 柱温 30 °C。结果: 对羟基桂皮酸在 0.08 ~ 0.4 μg 线性关系良好 ($r=0.9999$), 平均回收率为 95.7% ~ 104.0%; 5 个不同批号回心草中对羟基桂皮酸的平均含量为 0.1115 mg·g⁻¹。结论: 该方法简便快速, 分离效果好, 灵敏度高, 重复性好, 可用于回心草药材的质量控制。

[关键词] 对羟基桂皮酸; 回心草; HPLC

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0075-03

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1746.039.html>

[网络出版时间] 2012-07-04 17:46

Determination of *p*-Hydroxycinnamic in Slices of *Rhodobryum giganteum* by HPLC

CAI Ying, ZHAO Ning-zhi, LU Yu, JI Yong-zhang*
(No. 454 Hospital of PLA, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the content of *p*-hydroxycinnamic in 5 batch Slices of *Rhodobryum giganteum* by HPLC. **Method:** DIKMA Platisil ODS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with the mobile phase of acetonitrile-1% acetic acid water (20:80). Flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 310 nm. Column temperature was maintained at 30 °C. **Result:** *p*-Hydroxycinnamic had a good linear relationship ($r=0.9999$) in the 0.08-0.4 μg range, the average recovery was 95.7%-104.0%. The average content of *p*-hydroxycinnamic in 5 batch slices of *R. giganteum* determined was 0.1115 mg·g⁻¹. **Conclusion:** The method was simple, fast, and had a good separation, high sensitivity, good reproducibility and could be used for the quality control of *R. giganteum*.

[Key words] *p*-hydroxycinnamic; *Rhodobryum giganteum*; HPLC

回心草为真藓科植物大叶藓 *Rhodobryum roseum* (Hedw.) Limp. 以及暖地大叶藓 *R. giganteum* (Schwaegr.) Par. 的干燥或新鲜全草^[1], 《中药大辞典》、《云南中草药选》等均对其进行了收录, 具有清热明目、养心安神、镇咳祛痰的功效, 主治心悸怔忡, 神经衰弱, 目赤肿痛等。回心草分布于东

北、华北、华东和西南地区, 其中云南省为主要产地。雷秀玲等人^[2-4]发现回心草片对结扎大鼠冠脉所致的心肌缺血、心肌梗死均有一定的保护作用。王东晓等^[5]对回心草乙酸乙酯部位和正丁醇部位的实验研究表明, 它们可拮抗氯仿所致室颤的发生, 延缓心律失常出现时间; 显著提高小鼠耐缺氧能力, 延长特异性心肌缺血缺氧小鼠的存活时间, 可能是回心草的有效活性部位。戴畅^[6]对回心草全草的乙酸乙酯部位分离鉴定了 23 个化合物: 齐墩果酸、乌苏酸、芹菜素、槲皮素、咖啡酸、原儿茶醛、对羟基苯甲酸、对羟基桂皮酸等。我们曾对回心草药材进行

[收稿日期] 20120424(012)

[基金项目] 中国博士后科学基金项目(20080441337)

[第一作者] 蔡鹰, 副主任药师, E-mail: caiying1967@126.com

[通讯作者] * 纪永章, 主管药师, Tel: 025-80865566, E-mail: jy454@soho.com

HPLC 指纹图谱研究^[7],并用胡椒碱、熊果酸、齐墩果酸、咖啡酸、原儿茶酸、槲皮素、芹菜素为对照品,结果指纹谱色谱峰中未发现相应的对照品峰,可能由于在药材中含量低所致。

我们前期工作发现回心草 60% 醇提物能明显延长小鼠存活时间,具有抗缺氧作用;从活性部位分离和鉴定了 12 个化合物,细胞实验研究表明得到的对羟基桂皮酸和 7,8-二羟基香豆素能够不同程度增加缺氧再给氧心肌细胞存活率,增加超氧化物歧化酶(SOD)和三磷酸腺苷(ATP)活性,降低心肌细胞乳酸脱氢酶(LDH)的释放,降低培养液中丙二醛(MDA)的含量,是回心草抗心肌缺血的活性成分^[8]。由于对羟基桂皮酸在药材中含量较大,又是活性成分,故本实验测定其含量作为药材的质控方法。

1 材料

1.1 仪器 LC-10AT VP SHIMADZU 型高效液相色谱仪,SPD-10A VP 紫外检测器,N2000 色谱工作站(日本岛津)。CPA225D Sartorius 万分级电子分析天平,KH-300P 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 乙腈(色谱纯,迪马公司),甲醇(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司),蒸馏水(自制)。

1.3 药材 对羟基桂皮酸(批号 120106,含量 98.96%)购自上海融禾医药科技发展有限公司。回心草药材购自亳州维涛中药饮片厂,经南京中医药大学植物鉴定教研室乐魏教授鉴定为真藓科植物大叶藓暖地大叶藓 *R. Giganteum* (Schwaegr.) Par. 的干燥全草。

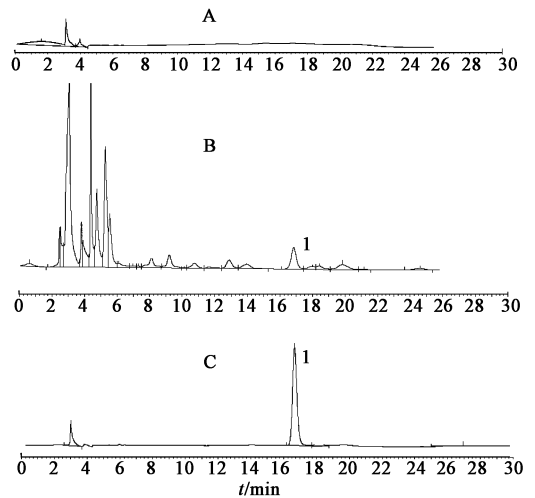
2 方法与结果^[9-12]

2.1 色谱条件 色谱柱为 Dikma Platisil ODS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-1% 乙酸水溶液(20:80),柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 310 nm。见图 1。

2.2 对照品溶液制备 精密称取对羟基桂皮酸对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 0.01 mg 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液制备 取本品粉末(过四号筛) 2 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇溶液 25 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 50 kHz) 30 min,再称定质量,不足用 50% 甲醇补足质量,滤过,残渣再加 50% 甲醇 20 mL,同前处理,滤过,合并 2 次滤液,水浴蒸干,甲醇 20 mL 溶解,滤过,取续滤

液,即得。



A. 阴性; B. 回心草药材; C. 对照品; 1. 对羟基桂皮酸

图 1 回心草药材 HPLC

2.4 线性关系考察 精密称取对羟基桂皮酸对照品 2.00 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取 1 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含 0.02 mg 的对照品溶液,精密吸取 4.0, 8.0, 12.0, 16.0, 20.0 μL 注入高效液相色谱仪中,测定色谱峰面积,以进样量(μg)为横坐标(X),色谱峰面积为纵坐标(Y),得回归方程 $X = 0.000\ 000\ 118Y - 0.006\ 82$ ($r = 0.999\ 9$),对羟基桂皮酸进样量在 0.08 ~ 0.40 μg 线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 20.0 μL(批号 120203),连续进样 6 次,测定色谱峰面积 RSD 2.13%。精密度试验符合有关规定。

2.6 稳定性试验 取本品(批号 120203)适量,按前述方法操作,制成供试品溶液。精密吸取供试品溶液 20.0 μL,于 0, 4, 8, 12, 24, 48 h,分别进样分析,测定色谱峰面积 RSD 3.01%。供试品溶液制备后 48 h 内测定,对羟基桂皮酸的峰面积无明显变化,说明在此时间内供试品溶液化学性质稳定。

2.7 重复性试验 取本品 6 份(批号 120203),每份 2 g,按前述方法测定对羟基桂皮酸的质量分数,结果样品中对羟基桂皮酸的平均质量分数为 0.092 7 mg·g⁻¹,RSD 2.54%,重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取本品 6 份(批号 120203),对羟基桂皮酸质量分数为 0.092 7 mg·g⁻¹,每份 1 g,精密称定,置锥形瓶中,加入对羟基桂皮酸对照品溶液 1 mL(质量浓度 0.101 g·L⁻¹),按

前述方法测定,本方法回收率在 95.7% ~ 104.0%, RSD 2.26%,符合有关规定,结果见表 1。

表 1 对羟基桂皮酸回收率试验考察

No.	取样量 /g	样品 含量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	1.012 1	0.093 8	0.101	0.198 8	104.0	100.2	2.26
2	1.124 3	0.104 2	0.101	0.208 2	103.0		
3	0.978 1	0.090 7	0.101	0.194 6	102.9		
4	0.929 4	0.086 2	0.101	0.185 2	98.0		
5	1.056 3	0.097 9	0.101	0.196 4	97.5		
6	1.074 5	0.099 6	0.101	0.196 3	95.7		

2.9 样品测定 分别测定了 5 个批号丽江产回心草药材对羟基桂皮酸含量。结果见表 2。

表 2 不同批号回心草药材对羟基桂皮酸的含量测定($n=2$)

药材批号	对羟基桂皮酸/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
120203	0.092 7
120211	0.086 0
120315	0.125 3
120328	0.104 7
120402	0.148 9

3 讨论

考察了流动相乙腈-1% 乙酸水 (15:85), (20:80), (25:75), 以 20:80 为好,对羟基桂皮酸的峰与其他峰得到了很好的分离;考察了样品提取方法,用甲醇提取含有大量叶绿素,干扰测定,用水提取对羟基桂皮酸没有出峰,50% 甲醇是比较好的提取溶剂,但 50% 甲醇提取物含水溶性杂质较多,影响测定,故用甲醇纯化。

朱丽萍^[13]系统研究了回心草的质量标准,明确其基源植物为真藓科植物暖地大叶藓 *R. giganteum* (Hook.) Par.,并对药材名、生药性状、鉴别、检查、热水浸出物等质量标准项目进行了全面的对比研究和归纳,研究结果已经为云南省中药材标准采用,但由于没确定有效成分,故没有含量测定项。本文测定了 5 个不同批号的回心草药材中对羟基桂皮酸的

含量为 $0.111 5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。该方法简便快速,分离效果好,灵敏度高,重复性好,可用于回心草药材的质量控制。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局. 中华本草[M]. 第 4 卷. 上海:上海科学技术出版社,1998:15.
- [2] 雷秀玲,张荣平,董雪峰,等. 滇产回心草及回心康对异内肾上腺素诱导大鼠急性心肌缺血的保护作用[J]. 中国民族民间医药杂志,2002(3):49.
- [3] 雷秀玲,张荣平,董雪峰,等. 民族药滇产回心草对大鼠实验性心肌缺血的保护作用[J]. 中草药,2001,32(12):1103.
- [4] 雷秀玲,张荣平,董雪峰,等. 滇产回心草及回心康抗缺血心肌脂质过氧化作用及对前列环素/血栓素的影响[J]. 天然产物研究与开发,2001,13(6):43.
- [5] 王东晓,刘屏,王波,等. 回心草心脏保护作用的活性部位筛选[J]. 中草药,2006,37(10):1536.
- [6] 戴畅. 藓类植物回心草的化学成分和生物活性研究[C]. 北京:解放军总医院军医进修学院,2006
- [7] 蔡鹰,陆晓和,魏群利. 回心草药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药,2009,40(1):123
- [8] Ying Cai, Yu Lu, Xiaohe Lu, et al. Anti-hypoxia activity and related components of *Rhodobryum giganteum* Par. [J]. Phytomedicine, 2011(18):224.
- [9] 熊科元,陈石生,刘荣华. 白茅根中两种主要酚酸类成分的含量比较[J]. 中国医药指南,2012,10(2):55.
- [10] 周德刚,何诚,孙志文. 反相高效液相色谱法测定对羟基肉桂酸口服液中羟基肉桂酸的含量[J]. 中国畜牧兽医,2011,11(2):111.
- [11] 刘玉强,甄毕贤,才谦. 不同地区白术药材及饮片中白术内酯 II 的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(4):122.
- [12] 杨艳,周健,陈晓,等. 圆果化香树中没食子酸的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17,(13):96.
- [13] 朱丽萍,蒋晖,房秀艳,等. 云南习用药材回心草的质量标准研究[J]. 云南中医学院学报,2006,9(6):22.

[责任编辑 邹晓翠]