

HPLC 法同时测定草珊瑚中富马酸、异嗪皮啶和迷迭香酸的含量*

曾建伟¹ 林培玲² 谢勇² 蔡巧燕¹ 郑燕芳² 梁一池^{1,2**}

(1. 福建中医药大学中西医结合研究院 福州 350108; 2. 福建中医药大学药学院 福州 350108)

摘要 目的: 建立 HPLC 法同时测定草珊瑚中富马酸、异嗪皮啶和迷迭香酸含量。方法: 采用 Ultimate XB C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈(A) - 0.1% 磷酸溶液(B) 梯度洗脱(0~10 min 2% A→20% A; 10~35 min 保持 20% A) 流速 1.0 mL·min⁻¹ 检测波长为 208 nm 柱温为 30 ℃。结果: 富马酸、异嗪皮啶和迷迭香酸的线性范围分别为 0.0190~0.133 ($r=0.9999$)、0.0204~0.143 ($r=0.9999$)、0.0212~0.148 μg ($r=0.9999$); 平均回收率 ($n=6$) 分别为 101.3% (RSD = 1.4%)、99.1% (RSD = 1.1%)、98.2% (RSD = 1.9%)。结论: 该方法简便、快速、准确, 适用于草珊瑚中富马酸、异嗪皮啶和迷迭香酸的含量测定。

关键词: 肿节风; 草珊瑚; 富马酸; 异嗪皮啶; 迷迭香酸; 高效液相色谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)07-1417-03

HPLC simultaneous determination of fumaric acid, isofraxidin and rosmarinci acid in *Sarcandra glabra**ZENG Jian-wei¹, LIN Pei-ling², XIE Yong², CAI Qiao-yan¹,
ZHENG Yan-fang², LIANG Yi-chi^{1,2**}

(1. Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China;

2. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

Abstract Objective: To develop an HPLC method for simultaneous determination of fumaric acid, isofraxidin and rosmarinci acid in *Sarcandra glabra*. **Methods:** An Ultimate XB C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted at 30 ℃. The mobile phases was acetonitrile (A) and 0.1% phosphoric acid water solution (B) with a gradient elution mode (0-10 min 2% A→20% A; 10-35 min 20% A) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. And the detection wavelength was 208 nm. **Results:** Fumaric acid, isofraxidin and rosmarinci acid were well separated with a linear range of 0.0190-0.133 ($r=0.9999$), 0.0204-0.143 ($r=0.9999$), 0.0212-0.148 μg ($r=0.9999$), respectively. The average recoveries were 101.3% with RSD 1.4%, 99.1% with RSD 1.1%, 98.2% with RSD 1.9% respectively. **Conclusion:** The method is simple, rapid and reliable, and is suitable for content determination of fumaric acid, isofraxidin and rosmarinci acid in *Sarcandra glabra*.

Key words: Herba Sarcandrae; *Sarcandra glabra*; fumaric acid; isofraxidin; rosmarinci acid; HPLC

草珊瑚, 又名肿节风, 为金粟兰科植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 的干燥全草, 具有清热凉血、活血消斑、祛风通络的功能, 主治血热发斑、风湿痹痛、跌打损伤^[1]。现代药理学研究表明, 草珊瑚具有抗肿瘤、抗菌消炎、抑制流感病毒、促进骨折愈合及镇痛等多种生物活性^[2~4]。草珊瑚含有的富马酸、异嗪皮啶和迷迭香酸等化学成分, 常作为药材及制剂标准的质控成分, 亦见富马酸和异

嗪皮啶含量测定的研究报道^[5~9], 但未见有对草珊瑚中富马酸、异嗪皮啶和迷迭香酸进行同时测定的文献。本文建立的 HPLC 法简单、准确、可靠, 适合同时测定草珊瑚中上述 3 种成分的含量。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪 (包括 G1311A 四元泵, G1329A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1315D 二极管阵列检测器, Agilent ChemStation 化学工作

* 福建省卫生厅中医重点项目 (编号: wzzd0903)

** 通讯作者 Tel: (0591) 22861980; E-mail: fafule@126.com

站); CP225D 电子天平(德国 Sartorius 公司); Millipore 超纯水机(法国 Millipore 公司)。

富马酸(批号 111541-200001) 购自中国药品生物制品检定所, 异嗪皮啶(纯度 $\geq 99\%$, 批号 071001)、迷迭香酸(纯度 $\geq 98\%$, 批号 100209) 均购自上海顺勃生物工程技术有限公司。乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

草珊瑚药材共 12 批, 采自不同产地, 经福建中医药大学梁一池教授鉴定, 为金粟兰科植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 的全草。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取对照品富马酸 4.76 mg、异嗪皮啶 5.10 mg、迷迭香酸 5.30 mg, 分别置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 制成对照品母液; 再分别精密吸取各对照品母液 1 mL 于同一 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 制成每 1 mL 含富马酸 9.52 μg 、异嗪皮啶 10.2

μg 、迷迭香酸 10.6 μg 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 称取过 50 目筛的草珊瑚粉末 0.4 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密吸取续滤液 1 mL 于 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 即得供试品溶液。

2.3 色谱条件 采用 Ultimate XB C_{18} 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A) - 0.1% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 10 min 2% A \rightarrow 20% A; 10 ~ 35 min, 保持 20% A), 流速 1.0 mL \cdot min $^{-1}$, 检测波长 208 nm, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 8 μL 。在该色谱条件下, 富马酸、异嗪皮啶和迷迭香酸 3 个成分与相邻色谱峰的分度均大于 1.5, 理论塔板数均不低于 5000, 对称因子均在 0.90 ~ 1.10 之间, 色谱图见图 1。

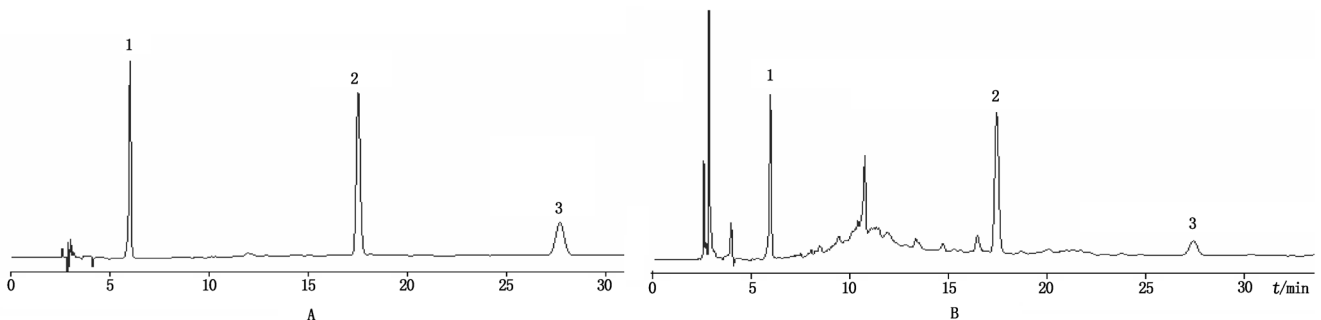


图 1 对照品(A)与福建永泰产样品(B)的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances(A) and sample from Yongtai, Fujian (B)

1. 富马酸(fumaric acid) 2. 异嗪皮啶(isofraxidin) 3. 迷迭香酸(rosmarinici acid)

2.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 2, 5, 8, 11, 14 μL , 分别按照“2.3”项下的色谱条件进样测定。以对照品进样量(μg)为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 求得富马酸、异嗪皮啶和迷迭香酸的回归方程分别为:

$$Y = 5.19 \times 10^3 X + 6.12 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 7.15 \times 10^3 X + 0.50 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 3.08 \times 10^3 X - 0.09 \quad r = 0.9999$$

线性范围分别为 0.0190 ~ 0.133, 0.0204 ~ 0.143, 0.0212 ~ 0.148 μg 。

2.5 精密度试验 取混合对照品溶液 8 μL , 连续进样 6 次, 测定峰面积值。计算富马酸、异嗪皮啶和迷迭香酸峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 0.54%, 0.93%, 1.5%。说明仪器性能良好。

2.6 稳定性试验 取供试品溶液, 室温放置, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样测定, 计算富马酸、异嗪皮

啶和迷迭香酸峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 0.54%, 1.9%, 1.2%。表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.7 重复性试验 精密称取同一批草珊瑚样品 6 份, 按照“2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算富马酸、异嗪皮啶和迷迭香酸含量平均值 ($n = 6$) 分别为 0.13%, 0.26%, 0.14%; RSD 分别为 1.6%, 1.9%, 2.1%。表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取含富马酸 0.13%, 异嗪皮啶 0.26% 和迷迭香酸 0.14% 的草珊瑚样品 6 份, 每份 0.2 g 精密称定, 分别精密加入各对照品适量 (与 0.2 g 样品中各待测成分的量相当), 按照“2.2”项下方法制备供试溶液, 进样测定, 计算回收率。结果富马酸、异嗪皮啶和迷迭香酸的平均回收率 ($n = 6$) 分别为 101.3%, 99.1%, 98.2%; RSD 分别为 1.4%, 1.1%, 1.9%。

2.9 样品含量测定 分别精密称取不同产地的草

珊瑚样品约 0.4 g,按照“2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.3”项下的色谱条件进样测定,以外标法计算含量,结果见表 1。

表 1 不同产地草珊瑚中富马酸,异嗪皮啶和迷迭香酸的含量(%)

Tab 1 Contents of fumaric acid, isofraxidin, rosmarinic acid in *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai from different area

产地 (area)	富马酸 (fumaric acid)	异嗪皮啶 (isofraxidin)	迷迭香酸 (rosmarinic acid)
福建永泰(Yongtai, Fujian)	0.130	0.261	0.135
福建邵武(Shaowu, Fujian)	0.076	0.351	0.399
福建长汀(Changting, Fujian)	0.215	0.211	0.214
福建三元(Sanyuan, Fujian)	0.109	0.470	0.471
广东梅州(Meizhou, Guangdong)	0.110	0.207	0.172
广东河源(Heyuan, Guangdong)	0.128	0.232	0.167
浙江衢州(Quzhou, Zhejiang)	0.121	0.209	0.106
浙江龙泉(Longquan, Zhejiang)	0.096	0.176	0.145
江西赣州(Ganzhou, Jiangxi)	0.232	0.101	0.147
江西九江(Jiujiang, Jiangxi)	0.093	0.439	0.483
安徽亳州(Bozhou, Anhui)	0.182	0.093	0.108
广西梧州(Wuzhou, Guangxi)	0.266	0.138	0.151

3 讨论

3.1 药材提取方法 比较回流提取、超声波提取和索氏提取发现,回流提取对富马酸、异嗪皮啶和迷迭香酸提取率均为最高,其次为索氏提取、超声波提取,故选择回流提取作为药材的提取方法;考察甲醇、乙醇和水 3 种提取溶剂发现,甲醇对异嗪皮啶和迷迭香酸的提取率最高,而水对富马酸的提取率最高,但水提液杂质多,分离度差,故选择甲醇作为提取溶剂;分别用 40, 50, 60 mL 甲醇回流提取发现,50 mL 甲醇即能达到最佳提取率,故甲醇用量定为 50 mL;又比较回流提取 0.5, 1, 2 h, 结果提取 1 h 即能达到最佳效果。综上,药材提取方法定为:用 50 mL 甲醇回流提取 1 h。

3.2 流动相优化 考虑到富马酸、异嗪皮啶和迷迭香酸 3 种成分均具有一定的酸性,故在水相中加入 0.1% 磷酸,用于消除峰拖尾,由于乙腈较甲醇洗脱,色谱峰的峰形更好,故流动相两相确定为乙腈(A)和 0.1% 磷酸溶液(B)。当 A 为 20%, B 为 80% 等度洗脱时,异嗪皮啶和迷迭香酸与杂质峰的分度均较好,但富马酸与杂质无法分离,故在 0~10 min 增设 1 个梯度,即 A 从 2% 到 20%, 则能保证 3 种成分均能与杂质达到较好分离。

3.3 检测波长选择 对富马酸、异嗪皮啶和迷迭香酸在 190~400 nm 进行紫外扫描,结果富马酸仅

在 208 nm 处有最大吸收,而在 340 nm 处无吸收。异嗪皮啶和迷迭香酸既在 340 nm 处有吸收峰,又在 208 nm 处亦有吸收峰,且 208 nm 较 340 nm 的吸光度更大。故选择 208 nm 作为 3 种成分的共同检测波长。

3.4 结果分析 从表 1 知,草珊瑚中富马酸、异嗪皮啶和迷迭香酸的含量随产地的不同而变化较大。为保证临床用药的疗效稳定,制剂产品质量均一,宜对草珊瑚上述成分均予以检测。本文建立的 HPLC 法,适合同时检测草珊瑚上述 3 成分。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2010. Vol I (一部): 207
- 2 WANG Jin(王劲), YANG Feng(杨锋), SHEN Xiang(沈翔) *et al.* Anti-tumor experimental study on *Sarcandra glabra*(草珊瑚抗肿瘤的实验研究). *Zhejiang J Tradit Chin Med*(浙江中医杂志), 1999, 34(10): 450
- 3 JIANG Wei-zhe(蒋伟哲), SUN Xiao-long(孙晓龙), HUANG Ren-bin(黄仁彬) *et al.* Study on antibiosis and antiinflammatory action of Zhongjiefeng tablet(肿节风片的抗菌和抗炎作用研究). *J Guangxi Tradit Chin Med Univ*(广西中医学院学报), 2000, 17(1): 50
- 4 LIU Qian-jin(刘前进), LI Xue-mei(李雪梅). Curative effect observation on bone fracture body swelling of Zhongjiefeng injection(肿节风注射液治疗骨折肢体肿胀的疗效观察). *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2006, 28(8): 1156
- 5 HU Guo-xin(胡国新), QIU Xiang-jun(邱相君), CHEN Bing-bing(陈冰冰) *et al.* RP-HPLC determination of isopropiram Fumurate in human plasma(反相-高效液相色谱法检测血浆富马酸异丙吡仑). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2005, 25(3): 320
- 6 ZHANG Jin-lian(张金莲), LUO Wen-hua(罗文华), LI Wen-gui(李文贵) *et al.* HPLC determination of content of fumaric acid and isofraxidin in compound Caoshanhu buccal tablets (HPLC 法测定复方草珊瑚含片中反丁烯二酸与异秦皮啶的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2007, 27(9): 1470
- 7 TAN Xiao-hong(谭小鸿), ZHANG Yuan-hu(张援虎), ZHANG Rong-xiang(张荣祥). Research on the determination of fumaric acid in *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai by HPLC(HPLC 法测定草珊瑚中富马酸含量的方法学研究). *Asia Pacific Tradit Med*(亚太传统医药), 2009, 5(8): 43
- 8 ZHANG Ping(张萍), LI Jun(李军), MA Shuang-cheng(马双成) *et al.* Determination of isofraxidin in *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai by HPLC(HPLC 法测定肿节风中异秦皮啶含量). *Chin Pharm Affl*(中国药事), 2009, 23(6): 538
- 9 WANG Yan(王砚), WANG Gang-li(王钢力), YAO Ling-wen(姚令文) *et al.* Determination of fumaric acid and isofraxidin in *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai(草珊瑚药材中反丁烯二酸和异秦皮啶的含量测定). *West China J Pharm Sci*(华西药学杂志), 2005, 20(1): 60

(本文于 2010 年 7 月 4 日收到)