HPLC 同时测定大青叶中 2 个专属性酚酸的含量

袁铭铭，熊晓丽，代敏，钟瑞建*，吴良发*(江西省药品检验检测研究院，国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室，江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心，南昌 330029)

摘要：目的 建立同时测定大青叶中 1,2,2′-tri-*O*-*E*-sinapoyl-*β*-gentiobiose 和 1,2,6′-tri-*O*-*E*-sinapoylgentiobiose 2 个专属性酚酸的含量方法。**方法** 采用依利特 C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm，5 μm)，以乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相，梯度洗脱，流速为 1.0 mL·min^{-1}，检测波长 328 nm，柱温 30 ℃。**结果** 1,2,2′-tri-*O*-*E*-sinapoyl-*β*-gentiobiose 和 1,2,6′-tri-*O*-*E*-sinapoylgentiobiose 分别在 2.092~104.6 μg·mL^{-1}(R^2=0.999 6)和 2.996~149.8 μg·mL^{-1}(R^2=0.999 5)内呈现出良好的线性关系；精密度、稳定性和重复性的 RSD 均<2%；平均加样回收率(n=6)分别为 99.05%，99.60%，RSD 分别为 0.34%，0.65%。**结论** 该方法简便，专属性、重复性好，可用于测定大青叶 2 个专属性酚酸的含量测定方法。

关键词：大青叶；高效液相色谱法；酚酸类；含量测定

中图分类号：R917.101 **文献标志码：**B **文章编号：**1007-7693(2023)14-1963-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222333

引用本文：袁铭铭，熊晓丽，代敏，等. HPLC 同时测定大青叶中 2 个专属性酚酸的含量[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(14): 1963-1966.

Simultaneous Determination of 2 Specific Phenolic Acid in Isatidis Folium by HPLC

YUAN Mingming, XIONG Xiaoli, DAI Min, ZHONG Ruijian*, WU Liangfa*(*Jiangxi Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory of Quality Evaluation of Traditional Chinese Patent Medicine, Jiangxi Province Engineering Research Center of Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the simultaneous determination of 2 specific phenolic acids glycosides 1,2,2′-tri-*O*-*E*-sinapoyl-*β*-gentiobiose and 1,2,6′-tri-*O*-*E*-sinapoylgentiobiose in Isatidis Folium. **METHODS** The HPLC analysis was carried on Elite C_{18} column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution(gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL·min^{-1}. The detection wavelength was 328 nm, and the column temperature was set at 30 ℃. **RESULTS** 1,2,2′-tri-*O*-*E*-sinapoyl-*β*-gentiobiose and 1,2,6′-tri-*O*-*E*-sinapoylgentiobiose were showed good linear relationships within the ranges of 2.092–104.6 μg·mL^{-1}(R^2=0.999 6) and 2.996–149.8 μg·mL^{-1}(R^2=0.999 5). The average recovery (n=6) were 99.05% and 99.60%, RSDs were 0.34% and 0.65%, respectively. **CONCLUSION** The established method is simple, reliable and specific, and suitable for simultaneous determination of two components of phenolic acids glycosides in Isatidis Folium.

KEYWORDS: Isatidis Folium; HPLC; phenolic acids; content determination

大青叶为十字花科植物菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.)的干燥叶，现行标准收载于中国药典 2020 年版一部，气微，味微苦、涩、酸[1]；临床主要用于治疗温病高热、丹毒、痄腮、神昏、喉痹、痈肿、发斑发疹[2]；具有抗菌、抗氧化、抗内毒素、抗病毒、抗肿瘤等药理活性[3-18]。目前中国药典 2020 年版仅以测定靛玉红的含量作为大青叶的成分质量评价标准，由于靛玉红不易溶于水，经水煎后含量极低，酚酸类成分水溶性较好，大多溶于热水。而以大青叶入药的清火胶囊、复方瓜子金、小儿感冒颗粒等中成药的处方工艺均采用水煎，有必要采用更合适的成分作为其质控指标。研究表明，酚酸类成分具有抗菌、抗氧化和抗炎等药理作用[19-22]，这些药理活性与大青叶的药理作用类似，推断酚酸类化合物也可能是大青叶发挥功效的有效成分。前期课题组通过对大青叶的化学成分研究，从大青叶中分离得到大量的酚酸类化合物，其中以 1,2,2′-tri-*O*-*E*-sinapoyl-*β*-gentiobiose 和 1,2,6′-tri-*O*-*E*-sinapoylgentiobiose 这 2 个酚酸成分的含量最高，且这 2 个酚酸类成分在同植物菘蓝的不同药用部位根(板蓝根)中未检测出，考虑可作为大青叶专属性含量测定成分，目前未发现有关于这 2 个酚酸含量测定的相关报道。为此，本研究采用 HPLC 同时测定 2 个酚酸的含量，为大

基金项目：江西省重点研发计划项目(20203BBGL73215)

作者简介：袁铭铭，男，硕士，主管药师 E-mail: 972988606@qq.com *__通信作者：__钟瑞建，男，主任中药师 E-mail: zhongrj@mpa.jiangxi.gov.cn 吴良发，男，硕士，副主任中药师 E-mail: 757497260@qq.com

青叶药材质量控制方法提供参考。

1 仪器与试剂

LC-2030C 3D Plus 高效液相色谱仪；BSA124S-CW 万分之一电子天平、BT25S 十万分之一电子天平均来自 Sartorius；KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1,2,2′-tri-*O*-*E*-sinapoyl-*β*-gentiobiose(化合物 A，纯度：98.2%)和 1,2,6′-tri-*O*-*E*-sinapoylgentiobiose(化合物 B，纯度：90.5%)对照品均由笔者所在课题组从大青叶中分离精制得到，通过 ^{1}H-NMR、^{13}C-NMR 等手段并与参考文献[23]对比，最终鉴定化合物结构，其结构式见图 1；板蓝根对照药材(中国食品药品检定研究院，批号：121386-201302)；磷酸(分析纯，西陇科学股份有限公司)；乙腈(色谱纯，Sigma 公司)；水为超纯化水。9 批大青叶药材均由江西药都仁和制药有限公司提供，样品产地和批号分别为甘肃民乐(批号：2013352，2101198)、黑龙江大庆(批号：210105)、河北安国(批号：210104)、安徽(批号：20042711)、安徽(批号：20121708)、内蒙古(批号：2103001)、甘肃(批号：202110)、山西新绛(批号：210106)，经江西省药品检验检测研究院万林春主任中药师鉴定均为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotic* Fort.的干燥叶。

2 方法与结果

2.1 测定方法

2.1.1 色谱条件 色谱柱为依利特 C_{18}(250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B)，梯度洗脱(0~25 min，23%A；25~25.1 min，23%→25%A；25.1~55 min，25%A)；柱温为 30 ℃；流速为 1.0 mL·min^{-1}；检测波长为 328 nm；进样量为 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称取化合物 A 和 B 对照品适量，用 70%甲醇制成浓度分别为 0.020 2，0.028 1 mg·mL^{-1}的混合对照品溶液，即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取大青叶药材细粉(过四号筛)约 0.5 g，称定质量，倒入锥形瓶中，加入 70%甲醇 50 mL，密塞，称量，超声提取 1 h 后，冷却至室温并称重。用 70%甲醇补足减失的量，摇匀后滤过，即得。

2.1.4 板蓝根样品溶液的制备 取板蓝根对照药材 0.5 g，按“2.1.3”项下方法制成板蓝根样品溶液。

2.2 方法学考察

2.2.1 系统适应性试验 吸取“2.1”项下供试品溶液、板蓝根样品溶液以及混合对照品溶液各 10 μL，采用“2.1.1”项下色谱条件测定，记录色谱峰，各色谱峰的分离度均>2，具有良好的分离效果，且板蓝根样品中未检测出这 2 个成分，表明专属性好，结果见图 2。

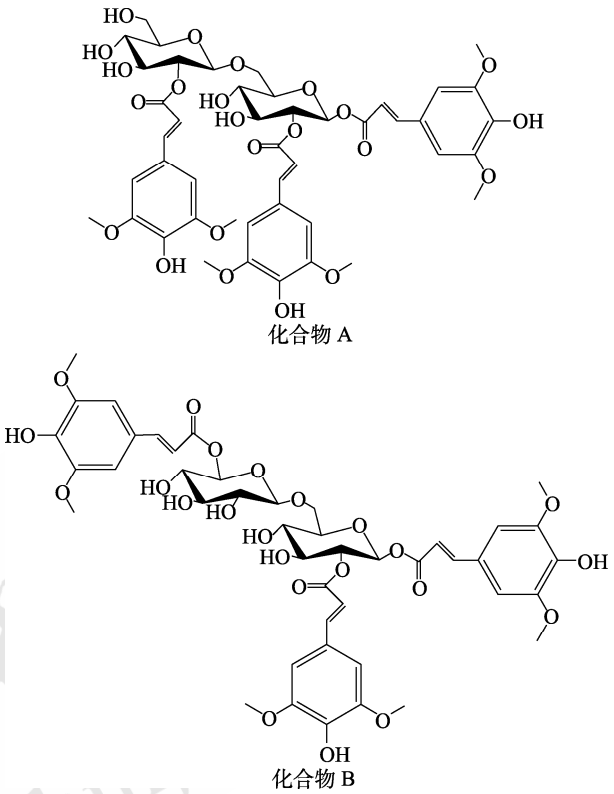

图 1 化合物结构图

Fig. 1 Structure diagram of compound

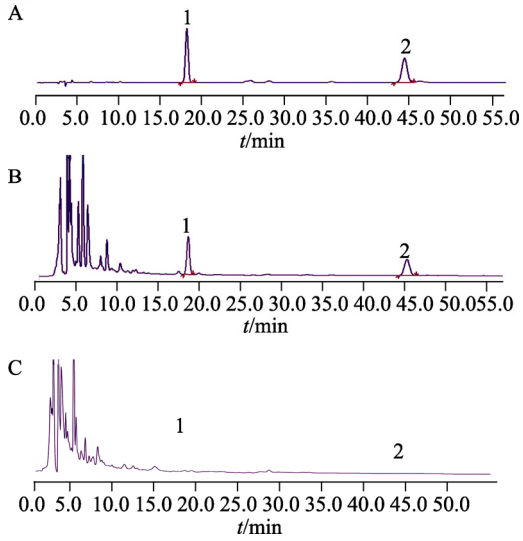

图 2 高效液相色谱图

A–混合对照品；B–大青叶药材；C–板蓝根药材；1–化合物 A；2–化合物 B。

Fig. 2 High performance liquid chromatography

A–mixed control solution; B–Isatidis Folium; C–Isatidis Radix; 1–compound A; 2–compound B.

2.2.2 线性关系考察　精密称取化合物 A 和 B 对照品适量，用 70%甲醇制成浓度分别为 0.209 2，0.299 6 mg·mL^{-1} 的混合对照品储备液，精密吸取上述储备液 0.2，0.5，1.0，2.0，5.0，10.0 mL，分别置 20 mL 量瓶中，加 70%甲醇至刻度，按“2.1.1”项下色谱条件进样分析，以浓度 X(μg·mL^{-1})为横坐标，峰面积 Y 为纵坐标，绘制标准曲线并进行回归计算，化合物 A、B 的回归方程分别为 Y=20.438X+3.846 9(R^2=0.999 6)、Y=14.392X+7.225 4 (R^2=0.999 5)，结果表明 2 个化合物分别在 2.092~104.6 μg·mL^{-1}、2.996~149.8 μg·mL^{-1} 内呈现良好的线性关系。

2.2.3 精密度试验　吸取“2.1.2”项下的混合对照溶液 10 μL，按“2.1.1”色谱条件，连续测定 6 次对照品峰面积，计算化合物 A、B 峰面积的 RSD(n=6)分别为 0.29%，0.31%，表明仪器精密度较好。

2.2.4 重复性试验　取同一批(批号：2013352)大青叶药材细粉(过四号筛)6 份，每份约 0.5 g，称定重量，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，并按“2.1.1”项下色谱条件测定，测得化合物 A、B 平均含量(n=6)分别为 2.114，2.666 9 mg·g^{-1}，RSD 分别为 0.26%和 0.29%。

2.2.5 稳定性试验　吸取同一份供试品溶液(批号：2013352)10 μL，按“2.1.1”项下色谱条件分别于 0，1，2，4，8，12，24 h 测定，结果化合物 A、B 峰面积的 RSD(n=7)分别为 0.28%，0.19%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.6 加样回收率试验　取“2.2.4”项下已测含量的大青叶药材细粉(过四号筛)6 份，每份约 0.25 g，称定质量，每份分别精密加入含化合物 A(0.010 1 mg·mL^{-1})、化合物 B(0.014 1 mg·mL^{-1})的混合对照品溶液 50 mL，按“2.1.3”方法制备供试品溶液，并按“2.1.1”项下色谱条件测定，计算样品的加样回收率，结果见表 1。

2.2.7 色谱柱耐用性试验　取同一批(批号：2013352)大青叶药材细粉(过四号筛)约 0.5 g，精密称定，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，分别采用依利特 C_{18}(4.6 mm×250 mm，5 μm)(色谱柱 A)、ACE Excel C_{18}-AR(4.6 mm×250 mm，5 μm)(色谱柱 B)、Thermo Syncronis C_{18}(4.6 mm×250 mm，5 μm)(色谱柱 C)3 个品牌的色谱柱，按“2.1.1”项下色谱条件分别测定，结果无明显差别，峰分离度均>2，表明该方法耐用性良好。

2.2.8 样品含量测定　取不同批号的 9 批大青叶药材细粉(过四号筛)，各取 3 份，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，并按“2.1.1”项下色谱条件测定，分别计算 2 个成分的含量，结果见表 2。

表 1　加样回收率试验结果(n=6)

Tab. 1　Results of recovery test(n=6)

成分	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
化合物 A	0.534	0.505	1.036	99.41	99.05	0.34
	0.537	0.505	1.037	99.01		
	0.533	0.505	1.033	99.01		
	0.537	0.505	1.034	98.42		
	0.533	0.505	1.034	99.21		
	0.538	0.505	1.039	99.21		
化合物 B	0.674	0.703	1.380	100.43	99.60	0.65
	0.678	0.703	1.371	98.58		
	0.672	0.703	1.369	99.15		
	0.677	0.703	1.379	99.86		
	0.672	0.703	1.374	99.86		
	0.679	0.703	1.381	99.72		

表 2　样品含量测定结果(n=3)

Tab. 2　Results of content determination of samples(n=3)

mg·g^{-1}

批号	来源	化合物 A	化合物 B
2013352	甘肃民乐	2.123 7	2.676 6
2101198	甘肃民乐	1.927 3	2.590 2
210105	黑龙江大庆	0.338 1	0.395 7
210104	河北安国	0.708 2	0.751 7
20042711	安徽	0.514 9	0.766 2
20121708	安徽	0.396 5	0.454 0
2103001	内蒙古	3.086 3	0.113 5
202110	甘肃	0.300 7	0.231 1
210106	山西新绛	0.668 8	0.801 8

3　讨论

3.1　检测波长的选择

采用岛津 PDA 检测器在 200~400 nm 内对化合物 A 和 B 进行光谱扫描；结果表明，化合物 A、B 在 328 nm 处均有最大吸收，各色谱峰均分离度良好，无干扰，故本研究选用 328 nm 作为含量测定的波长。

3.2　供试品溶液制备方式的考察

考察了水浴加热回流提取法和超声波提取两种方法对化合物 A 和 B 含量测定的影响；结果表明，超声提取法和水浴加热回流提取无差别，故

选择超声提取法。提取溶剂考察了不同比例的甲醇溶液、乙醇溶液，结果显示，70%甲醇提取时 2 个化合物含量均较高。提取时间考察了 30，60，90 min，结果显示 60，90 min 无明显差别。考察了 25，50，100 mL 的提取体积，结果显示，50 mL 的结果高于 25 mL，但与 100 mL 的结果无明显差异，故选择 50 mL 为提取体积。

3.3 流动相的确定

考察了不同的溶剂系统(甲醇-水、乙腈-水和乙腈-0.1%磷酸溶液)，结果表明，乙腈-0.1%磷酸溶液作为流动相可以得到很好的色谱峰峰形，且色谱峰分离效果最好。

3.4 结论

本研究建立的同时测定大青叶中 1,2,2′-tri-*O*-*E*-sinapoyl-*β*-gentiobiose 和 1,2,6′-tri-*O*-*E*-sinapoylgentiobiose 含量方法，并对 9 个批次大青叶中 1,2,2′-tri-*O*-*E*-sinapoyl-*β*-gentiobiose 和 1,2,6′-tri-*O*-*E*-sinapoylgentiobiose 含量进行测定。发现①同一产地不同批次的大青叶 2 个成分的含量比较接近，差异小；②不同产地大青叶 2 个成分的含量差异较大，内蒙古大青叶中 1,2,2′-tri-*O*-*E*-sinapoyl-*β*-gentiobiose 含量最高，但是 1,2,6′-tri-*O*-*E*-sinapoylgentiobiose 的含量却最低；③甘肃民乐 2 批大青叶中 2 个成分含量均较高。本实验建立的大青叶中 2 个专属性酚酸类成分的含量测定方法色谱峰分离好，方法准确，重复性较好，且方法简便，为完善大青叶药材的质量评价方法提供参考。

REFERENCES

[1] 中国药典. 一部[S]. 2020: 21.

[2] YAN J, GU J, FENG S, et al. Study of chemical constituents and antioxidant activity of isatidis folium[J]. J Chin Mass Spectrom Soc(质谱学报), 2019, 40(4): 381-390.

[3] HU Y J, QIAO J L, ZHU R J, et al. Study on antibacterial activity of *Arnebia euchroma*(Royle) johnst and *Isatis indigotica* Fort extracts *in vitro*[J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2010, 38(9): 4565-4567.

[4] BAO J. Study on combined bacteriostasis of *Houttuynia cordata*, coptidis rhizoma and folium isatidis *in vitro*[J]. Chin J Tradit Med Sci Technol(中国中医药科技), 2011, 18(3): 200-201.

[5] CHEN Y F, ZOU J X. *In vitro* antibacterial activity of 20 Chinese herbs to pathogenic *Edwardsiella tarda*[J]. J Hydroecology(水生态学杂志), 2011, 32(5): 110-113.

[6] LIU F K, FANG S Y, QU Y H. Study on extraction and antibacterial activity of crude flavonoids from folium isatidis[J]. Shandong Chem Ind(山东化工), 2018, 47(21): 34-35, 38.

[7] XU T, LIANG J P, YU S J, et al. Effects of 4(3H)quinazolinone from *Isatis indigotica* leaves against Influenza virus A *in vitro*[J]. J Tradit Chin Vet Med(中兽医医药杂志), 2008, 27(3): 7-9.

[8] YU S Q, CHEN X Y, YU L. Anti-herpes effects of the extract from indigowoad leaf *in vitro*[J]. Her Med(医药导报), 2008, 27(4): 394-396.

[9] LIU Z, YANG Z Q, XIAO H. Antiviral activity of the effective monomers from folium isatidis against coxackievirus B_3 virus *in vitro*[J]. J South Central Univ Natl Nat Sci Ed(中南民族大学学报: 自然科学版), 2009, 28(2): 41-45.

[10] GAO B, ZHANG J M, WANG Y P, et al. Inhibitory effect and mechanism of water-soluble extract of *Isatis indigotica* on dengue virus[J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2013, 25(7): 205-207.

[11] LUO F. Antiviral activity of Folium Isatidis aqueous extract on influenza A virus[J]. J Xinxiang Med Univ(新乡医学院学报), 2017, 34(10): 881-884.

[12] CUI X, LI H D. Enzyme-assisted extraction of total flavonoids from folium isatidis and study on antioxidant effects[J]. J Chuxiong Norm Univ(楚雄师范学院学报), 2014, 29(6): 46-52, 79.

[13] YU Y P, GONG D D, ZHU Y, et al. Quality consistency evaluation of Isatidis Folium combined with equal weight quantified ratio fingerprint method and determination of antioxidant activity[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2018(1095): 149-156.

[14] ZHU J J, XU J. Protective effect of *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz leaves extracts on alcohol-induced injury in HepG2 cells[J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2018, 39(15): 161-167.

[15] FANG J G, SHI C Y, TANG J, et al. Screening of active fraction of antiendotoxin from Folium Isatidis[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2004, 35(1): 60-62.

[16] HUANG J Q. Experimental study on anti-endotoxin effect of Folium Isatidis[J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med(江西中医学院学报), 2007, 19(2): 70-71.

[17] NAM S, SCUTO A, YANG F, et al. Indirubin derivatives induce apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells involving inhibition of Stat5 signaling[J]. Mol Oncol, 2012, 6(3): 276-283.

[18] JIAN X S, YIN Y Z, CHEN J Q, et al. Study on antitumor activity of serum containing ethanol extract of *Isatis indigotica in vitro*[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2013, 36(4): 633-635.

[19] XU W G, LIU Y, LIU D J, et al. Antimicrobial activity of galic acid[J]. Chin J Public Health(中国公共卫生), 2012, 28(10): 1329-1331.

[20] FAN J B, CAI X T, FENG X Q, et al. Studies on the antioxidant activity *in vitro* of caffeic acid[J]. J Chin Inst Food Sci Technol(中国食品学报), 2015, 15(3): 65-73.

[21] WU J L, SHEN M M, YANG S X, et al. Inhibitory effect of ferulic acid on neuroinflammation in LPS-activated microglia[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2015, 31(1): 97-102.

[22] YAN J, GU J, FENG S, et al. Study of chemical constituents and antioxidant activity of isatidis folium[J]. J Chin Mass Spectrom Soc(质谱学报), 2019, 40(4): 381-390.

[23] PRICE K R, CASUSCELLI F, COLQUHOUN I J, et al. Hydroxycinnamic acid esters from broccoli florets[J]. Phytochemistry, 1997, 45(8): 1683-1687.

收稿日期：2022-07-01

(本文责编：蔡珊珊)