唑出峰时间分别为 3，9 和 12 min，杂质峰分离良好，因此本实验选择甲醇∶水为 60∶40。同时，在流动相中加入三乙胺并使用磷酸调节 pH 值，可改善醋酸氯己定和克霉唑峰的拖尾现象。在此条件下，替硝唑、克霉唑、醋酸氯己定的理论板数均>2 000，3 者之间的分离度均>1.5。

3.4 栓剂提取溶剂的选择

在中国药典 2010 年版中经常使用甲醇作为栓剂中主药的提取溶剂，但在本处方中，当使用甲醇[4]作为提取溶剂，对甲醇提取液过滤后用流动相稀释时发现由于流动相中水比例较高，稀释时出现混浊系由于克霉唑溶于甲醇溶液中达饱和，再用含水的流动相稀释溶质呈过饱和状态而析出。当使用流动相作为提取溶剂时，由于克霉唑在流动相中已经达到溶解饱和，因此在加入相同浓度的流动相也不会析出，因此选用流动相作为提取溶剂。

REFERENCES

[1] LI B, LI H Y, TONG W, et al. *In vitro* antibiotic activity of compound tinidazole carrier suppositories [J]. China Public Health(中国公共卫生), 2010, 26(4): 490-491.

[2] ZAN X M, YOU W, GAO Z N. Electrocatalytic reduction of tinidazole at room temperature ionic liquid-multi-wall carbon nanotubes modified electrode and its electrochemcal determination [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(5): 445-449.

[3] YE T T, LIN Z. Simultaneous determination of tetracaine hydrochloride and clotrimazole in compound neomycin sulfate pellicles by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(6): 536-539.

[4] Ch.P(2010)VolⅡ(中国药典 2010 年版，二部) [S]. 2010: 235, 682, 852, Appendix 7.

收稿日期：2011-11-26

HPLC 测定野马追中野马追内酯 A，B 和金丝桃苷的含量

罗敏敏[1]，李春华[1*]，王易芬[2](1.中南大学化学化工学院，长沙 410083；2.中国科学院昆明植物所，昆明 650201)

摘要：目的 采用高效液相色谱法对不同产地的 6 批野马追药材中野马追内酯 A，B 和金丝桃苷进行了定性定量分析。**方法** 野马追内酯 A，B 的测定采用 Agilent Extend-C_{18}(4.6 mm×150 mm，5 μm)为分析柱，乙腈-水(27∶73)为流动相，流速为 1.0 mL·min^{-1}，等度洗脱，检测波长为 220 nm，柱温为 30 ℃。金丝桃苷的测定以 SB-C_{18} 为分析柱，乙腈-1%醋酸水溶液(12∶88)为流动相，流速为 1.0 mL·min^{-1}，等度洗脱，检测波长为 255 nm。**结果** 野马追内酯 A 在 0.02~1.88 μg，野马追内酯 B 在 0.44~4.44 μg 内与峰面积呈良好的线性关系。金丝桃苷在 0.101~1.414 μg 内与峰面积呈良好的线性关系。**结论** 本实验方法准确、快速、灵敏、重复性好，在该色谱条件及样品处理方法下，可以准确测定野马追中野马追内酯 A，B 和金丝桃苷的含量。

关键词：野马追；野马追内酯 A；野马追内酯 B；金丝桃苷；高效液相色谱法

中图分类号：R917.101 **文献标志码：**B **文章编号：**1007-7693(2012)11-1018-05

Determination of Eupalinolide A, B and Hyperin in *Eupatorium Lindleyanum* DC by HPLC

LUO Minmin[1], LI Chunhua[1*], WANG Yifen[2](*1.School of Pharmaceutical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China; 2.Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Science, Kunming 650201, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the determination of the content of eupalinolide A, B and hyperin in *Eupatorium lindleyanum* DC from 6 different areas by HPLC. **METHODS** For eupalinolide A, B, Agilent Extend-C_{18} column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) was used under the mobile phase of acetonitrile-water(27∶73) at the flow rate of 1.0 mL·min^{-1}. The detection wavelength was 220 nm and the column temperature was maintained at 30 ℃. For hyperin, SB-C_{18} column was used under the mobile phase of acetonitrile-1% Acetic acid(12∶88) at a flow of 1.0 mL·min^{-1}. The detection wavelength was 255 nm and the column temperature was maintained at 30 ℃. **RESULTS** The standard curve of eupalinolide A was linear in the range of 0.02–1.88 μg and eupalinolide B was linear in the range of 0.44–4.44 μg. The standard curve of hyperin was linear in the

作者简介：罗敏敏，女，硕士生 Tel: 15273175164 E-mail: shuilianz@163.com *通信作者：李春华，男，博士，副教授 Tel: 13187021782 E-mail: 1033727728@qq.com

range of 0.101−1.414 μg. **CONCLUSION** This method was simple, accurate and reproducible for the determination of eupalinolide A, B and hyperin in *Eupatorium lindleyanum* DC.
KEY WORDS: *Eupatorium lindleanum* DC.; eupalinolide A; eupalinolide B; hyperin; HPLC

野马追为菊科植物轮叶泽兰(*Eupatorium lindleanum* DC.)的干燥地上部分，味苦，性平，归肺经，有化痰止咳平喘的功能，用于痰多咳嗽气喘。据文献报道[1]，野马追地上部分含挥发油0.024%，茎、叶为0.025%，花为0.078%。此外，还含黄酮类、生物碱、香豆素及萜类成分等。黄酮中分得的金丝桃苷为其主要活性物质，具有抗脑缺血、抗心肌缺血的作用以及对消化性溃疡的保护作用[2]。1979 年，Kazuo 等[3]从本植物中分离到 4 种倍半萜内酯单体，对人体鼻咽癌(KB)细胞具有细胞毒活性。但是目前对野马追药材的研究还不深入。中国药典 2010 版一部中只规定了野马追中金丝桃苷和野马追内酯 A 的定性鉴别，而无定量的控制方法[4]，且野马追内酯 A 和 B 为同分异构体，2 者有可能共存于野马追中，用薄层色谱很难分开。本实验建立了高效液相色谱法(HPLC)同时测定不同产地 6 批次野马追中野马追内酯 A，B 和金丝桃苷的含量。

1 仪器与试剂

1.1 试剂

乙腈为色谱纯(Amethyst Chemicals)；水为娃哈哈纯净水，其余试剂均为分析纯。金丝桃苷对照品(中国药品生物制品检定所，批号：111521-201004，纯度>98%)；野马追内酯 A 和野马追内酯 B 对照品(批号：01-201009，02-201009，中科院昆明植物所天然产物化学实验室制备，通过研究其理化性质和光谱数据解析，并与参考文献对照，野马追内酯 A 和野马追内酯 B 纯度>98%，供含量测定用)。

1.2 仪器

SK2200H 型超声波清洗器(上海垒固仪器有限公司)；DF-101S 型电热恒温水浴锅(上海羌强仪器设备有限公司)；RE-52A 型旋转蒸发仪(上海硕光电子科技有限公司)； XS105DU 十万分之一电子天平(METTLER TOLEDO)； SIL-20A 高效液相色谱仪(SHIMADZU)，包括 SPD-20A 检测器，LC-20A 洗脱泵。

1.3 药材样品

6 批野马追药材分别采自安徽亳州、安徽阜阳、湖北蕲州、江苏盱眙野马追药材种植示范基地、江苏宜兴、江苏盱眙野生，分别编号为 01，02，03，04，05，06。由中国科学院昆明植物所植物化学实验室王易芬副研究员鉴定为野马追 *Eupatorium lindleanum* DC.。

2 方法与结果

2.1 野马追内酯 A，B 的含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱：Agilent Extend-C_{18} (4.6 mm×150 mm，5 μm)，流动相：乙腈-水(27∶73)，柱温：30 ℃，流速：1.0 mL·min^{-1} 等度洗脱 45 min，检测波长：220 nm，进样量：10 μL。色谱图见图 1。

2.1.2 样品溶液的制备 取野马追干燥样品，粉碎后精密称取 20 g，置于锥形瓶中，加入 400 mL 90%甲醇，超声提取 3 次，每次 30 min。过滤，残渣用甲醇洗涤，合并浓缩滤液蒸干得浸膏，将其用甲醇定容至 25 mL 量瓶，摇匀并静置，抽取上清液经 0.45 μm 滤膜过滤后作为样品溶液待用。

2.1.3 对照品溶液的制备 取野马追内酯 A，B 对照品适量，精密称定并置于 25 mL 量瓶内，加甲醇制成浓度为 0.094，0.222 mg·mL^{-1} 的对照品溶液。

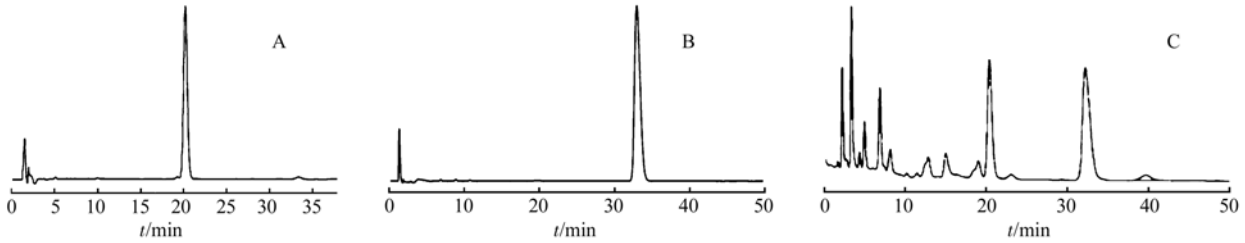

图 1 HPLC 色谱图

A−野马追内酯 A；B−野马追内酯 B；C−样品

Fig 1 HPLC chromatograms

A−eupalinolide A; B−eupalinolide B; C−sample

2.1.4 标准曲线的绘制　分别自动进样吸取野马追内酯 A，B 对照品溶液 1，2，4，6，8，10，12，14，16，20，24 μL，记录峰面积。以野马追内酯 A，B 的峰面积吸收度积分值为纵坐标，其含量(μg)为横坐标，绘制标准曲线，计算得线形回归方程。野马追内酯 A：Y=15 165X−21 932，r=0.999 8；野马追内酯 B：Y=9 902.3X+3 453.5，r=0.999 6；野马追内酯 A 在 0.02~1.88 μg，野马追内酯 B 在 0.44~4.44 μg 内呈良好的线性关系。

2.1.5 仪器精密度试验　精密吸取对照品溶液 10 μL，平行进样 5 次，以峰面积计算仪器精密度，结果野马追内酯 A，B 峰面积的 RSD 值分别为 0.76%，2.22%。表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验　取野马追样品 6 份，每份精密称取 20 g，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，精密吸取 10 μL 进样，测定峰面积积分值，计算得野马追内酯 A，B 的 RSD 分别为 1.23%，1.33%，表明样品处理方法重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验　取已知含量的同一药材粉末约 1.0 g(干燥后)，精密称定 9 份，分别精密加入一定量的野马追内酯 A，B 对照品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.2”项下色谱条件测定，计算回收率，其平均回收率分别为 99.0%，98.0%，RSD 为 2.57%，1.94%。结果见表 1。

表 1　加样回收率结果(n=3)

Tab 1　Results of recovery (n=3)

进样量/mg		加标量/mg		检出量/mg		回收率/%		平均回收率/%		RSD/%	
野马追内酯 A	野马追内酯 B	野马追内酯 A	野马追内酯 B	野马追内酯 A	野马追内酯 B	野马追内酯 A	野马追内酯 B	野马追内酯 A	野马追内酯 B	野马追内酯 A	野马追内酯 B
0.182 4	0.421 4	0.145 9	0.336 8	0.327 2	0.758 8	99.25	100.18				
0.184 6	0.421 3	0.145 9	0.336 8	0.332 1	0.758 4	101.10	100.09				
0.182 8	0.421 0	0.145 9	0.336 8	0.328 9	0.749 3	100.14	97.48				
0.182 2	0.421 7	0.182 4	0.421 0	0.363 7	0.824 5	99.51	95.68				
0.183 0	0.421 4	0.182 4	0.421 0	0.364 4	0.823 6	99.45	95.53	99.0	98.0	2.57	1.94
0.184 3	0.419 8	0.182 4	0.421 0	0.352 8	0.823 0	92.38	99.57				
0.182 7	0.421 2	0.218 8	0.505 2	0.402 2	0.921 5	100.32	99.03				
0.182 4	0.421 1	0.218 8	0.505 2	0.400 2	0.920 9	98.95	98.93				
0.182 7	0.421 2	0.218 8	0.505 2	0.400 4	0.922 2	99.50	99.17				

2.1.8 样品含量测定　取 6 批野马追药材，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，精密吸取供试品溶液和对照品溶液各 10 μL，各平行进样 5 次，记录色谱图并测定峰面积，计算野马追内酯 A，B 的平均百分含量，结果见表 2。

表 2　样品中野马追内酯 A，B 的含量测定(n=5)

Tab 2　Results of the sample determination(n=5)

批次	野马追内酯 A		野马追内酯 B	
	含量/%	RSD/%	含量/%	RSD/%
1	0.001 9	0.98	0.009 8	0.02
2	0.006 1	0.04	0.013 0	0.02
3	0.015 9	0.87	0.039 7	0.09
4	0.000 6	0.04	0.006 3	0.05
5	0.002 5	0.03	0.010 3	0.01
6	0.018 2	0.03	0.042 1	0.04

2.2　金丝桃苷含量测定

2.2.1 色谱条件　色谱柱：SB-C_{18}(4.6 mm×150 mm，5 μm)，流动相：乙腈-1%醋酸水溶液(12∶88)，流速：1.0 mL·min^{-1}，等度洗脱 35 min，检测波长：255 nm，进样量：15 μL，对照品、样品色谱图见图 2。

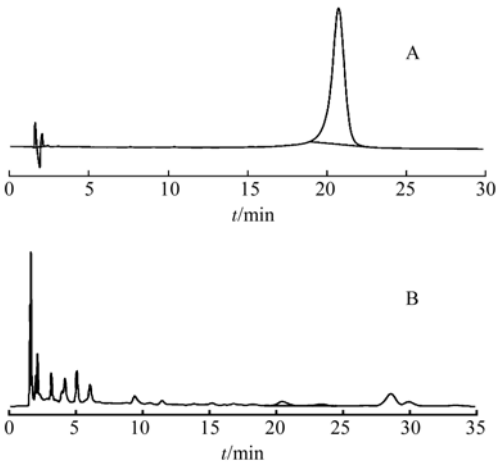

图 2　对照品和样品色谱图

A–金丝桃苷标准品；B–待测样品

Fig 2　HPLC chromatograms of reference and sample

A–reference substance; B–sample

2.2.2 样品溶液的制备　取野马追干燥样品，粉碎后精密称取 20 g，置于锥形瓶中，加入 500 mL 甲醇，80 ℃水浴加热回流提取 2 次，每次 40 min，提取完毕后过滤，用甲醇清洗滤渣数次，合并浓

缩蒸干得浸膏，并且计算得率。用甲醇定容至 25 mL 量瓶，摇匀静置，抽取上清液经 0.45 μm 滤膜过滤后作为样品溶液待用。

2.2.3 对照品溶液的制备 取金丝桃苷对照品适量，精密称定并置于 25 mL 量瓶内，加甲醇制成浓度为 0.101 mg·mL^{-1} 的对照品溶液。

2.2.4 标准曲线的绘制 分别自动进样吸取金丝桃苷对照品溶液 1，2，4，6，8，10，12，14，16，20，24 μL，记录峰面积。以其峰面积吸收度积分值为纵坐标，其含量(μg)为横坐标，绘制标准曲线，计算得线形回归方程：Y=35 182X–28 832，r=0.999 2，金丝桃苷在 0.101~1.414 μg 内呈良好的线性关系。

2.2.5 仪器精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL，平行进样 5 次，以峰面积计算，实验结果显示金丝桃苷峰面积的 RSD 为 2.22%。表明进样方法和仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取野马追样品 6 份，每份精密称取 20 g，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，精密吸取 10 μL 进样，测定峰面积积分值，计算得其 RSD 为 0.87%，表明样品处理方法重复性良好。

2.2.7 加样回收率试验 取已知含量的同一药材粉末约 1.0 g(干燥后)，精密称定 9 份，分别精密加入一定量的金丝桃苷标准品，按供试品溶液制备方法和色谱条件操作，计算回收率，并计算其平均回收率为 98.2%，RSD 为 1.72%。结果见表 3。

表 3 加样回收率结果(n=3)

Tab 3 Results of recovery(n=3)

进样量/mg	加标量/mg	检出量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.079 2	0.065 0	0.142 3	97.08		
0.083 1	0.065 0	0.146 9	98.15		
0.081 3	0.065 0	0.145 3	98.46		
0.083 2	0.081 0	0.166 1	102.35		
0.079 2	0.081 0	0.159 1	98.64	98.2	1.72
0.082 6	0.081 0	0.162 1	98.15		
0.081 3	0.096 0	0.174 1	96.67		
0.079 5	0.096 0	0.173 4	97.81		
0.081 2	0.096 0	0.174 2	96.88		

2.2.8 定量测定 取 6 批野马追药材，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，精密吸取供试品溶液和对照品溶液各 10 μL，各平行进样 5 次，记录色谱图并测定峰面积，计算其平均含量，结果见表 4。

表 4 样品中金丝桃苷含量的测定

Tab 4 Results of sample determination

批次	金丝桃苷	
	含量/%	RSD/%
1	0.0019	0.12
2	0.0041	0.56
3	0.0081	0.02
4	0.0023	0.20
5	0.0015	0.92
6	0.0057	0.53

3 讨论

目前没有对野马追药材进行深入系统的研究，而中国药典中又以野马追内酯 A 作为质量标准评价指标之一，因此对野马追中内酯 A 成分的测定具有重要的意义。关于野马追内酯 A 的文献报道很少，因此通过 HPLC 建立完整正确快速的测试方法对于野马追药材质量标准评价具有实践意义。由于野马追内酯 A，B 同为倍半萜内酯且为顺反异构，极性几乎无差别，用薄层色谱法无法对其定性分离。选择 HPLC 对其分离定量，2 组份分离度>1.5，分离良好，对控制中药野马追的质量有重要意义。方法准确，快速，灵敏，重复性好，可用于野马追质量评控的依据。

本实验中对野马追内酯 A，B 和金丝桃苷的提取方式、提取溶剂、料液比、提取时间等影响因素进行了实验研究，在此基础上建立了正交实验表得到各自提取的最优化条件。实验结果显示，野马追内酯 A，B 的最佳提取条件是 90%的甲醇，料液比 20 倍，超声提取 3 次，每次 30 min。而在 80 ℃纯甲醇为提取溶剂，料液比 25 倍回流提取 2 次，每次 40 min 的条件下金丝桃苷的提取效果最佳。经初步分析判断，由于野马追内酯属于吉马烷型倍半萜内酯类化合物，其性质极其不稳定，在光照、加热、酸碱等条件下易发生结构的变化。由于回流提取时长时间加热，有可能导致野马追内脂 A，B 发生结构上的变化，导致含量低于超声提取。金丝桃苷含量分析中，可以看出总体趋势为回流提取得到的含量高于超声提取，可能与金丝桃苷的提取率和提取时间有关。

本研究首次用反相高效液相色谱法测定了不同产地 6 批次野马追中野马追内酯 A，B 和金丝桃苷的含量，结果表明产地和样品处理方法对于野

马追中野马追内酯 A，B 和金丝桃苷的含量影响较大。6 批药材中以江苏盱眙野生野马追中野马追内脂 A，B 的含量最高，以湖北蕲州产区野马追中的金丝桃苷含量最高。目前野马追药材主要靠人工栽培，在产业化建设中发现野马追人工栽培后药材质量很不稳定，江苏野马追药材种植示范基地所产的野马追药材中，无论是野马追内酯的含量还是金丝桃苷的含量都很低，经研究得出初步结论，其原因主要是因为人工栽培后的品种混杂。

REFERENCES

[1] QIAN S H, YANG N Y, DUAN J A, et al. Studies on the chemical constituents of eupa torium lindleyanum [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2004, 29(1): 50-52.

[2] CHEN J, YAO C H. Determination of total flavonoids from *Lindleyanum* DC [J]. J Nanjing Norm Univ(Eng Tech)(南京师范大学学报：工程技术版), 2004, 4(2): 16-18

[3] KAZUO I, YOSHIHISA S, MITSUMASA H, et al. Four new germacranolides from *Eupatorium lindleyanum* DC [J]. Chem Lett, 1979(12): 1469-1472.

[4] Ch.P(2010)Vol I(中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 310.

收稿日期：2011-12-17

近红外光谱技术快速测定香砂养胃丸中厚朴酚与和厚朴酚的含量

白雁，郭艳利，雷敬卫*(河南中医学院，郑州 450008)

摘要：目的 采用近红外光谱技术对香砂养胃丸(浓缩丸)中厚朴酚与和厚朴酚的含量进行快速测定。**方法** 采集样品的近红外光谱图，以 HPLC 测量值为参考，运用偏最小二乘法(PLS)建立厚朴酚与和厚朴酚的定量模型。**结果** 定量模型的校正集内部交叉验证相关系数(R^2)、校正均方差(RMSEC)、内部交叉验证均方差(RMSECV)分别为 0.994 9，0.011 1，0.020 5；验证集的预测相关系数(r^2)、预测均方差(RMSEP)分别为 0.988 3，0.016 7。**结论** 此方法操作简单，测定结果准确，能快速、批量的对香砂养胃丸进行含量测定，节约了分析成本，提高了分析效率。

关键词：近红外光谱技术；香砂养胃丸；厚朴酚；和厚朴酚；快速测定

中图分类号：R917.101 **文献标志码：**B **文章编号：**1007-7693(2012)11-1022-04

Rapid Determination of Magnolol and Honokiol in Xiangshayangwei Pill by Near-infrared Spectroscopy

BAI Yan, GUO Yanli, LEI Jingwei* (*Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To fast determining the content of magnolol and honokiol in Xiangshayangwei pill by Near-infrared spectrum technology. **METHODS** The near infrared spectra of samples were collected, while take the HPLC value as a reference. The partial least squares (PLS) was used to establish the quantitative model of magnolol and honokiol. **RESULTS** The correlation coefficient of calibration (R^2), the root-mean-square error of calibration(RMSEC) and the root-mean-square error of cross-validation(RMSECV) of the calibration model were 0.994 9, 0.011 1 and 0.020 5, respectively. The correlation coefficients of prediction(r^2) of the validation and the root-mean-square error of prediction(RMSEP) were 0.988 3 and 0.016 7, respectively. **CONCLUSION** The method is simple and the result is accurate. It could be applied to determining the content of Xiangshayangwei pill in bulk and fast. It could save costs and improve efficiency.

KEY WORDS: near infrared spectroscopy technology; Xiangshayangwei pill; magnolol; honokiol; rapid determination

香砂养胃丸(浓缩丸)由木香、厚朴(姜制)、白术、香附(醋制)、陈皮、甘草等 14 味药组成[1]，该药收载于中药成方制剂第 11 册，为胃痛类非处方药，具有温中和胃的功效，用于胃阳不足、湿阻气滞的胃痛、痞满，症见胃痛隐隐、呕吐酸水、不思饮食、四肢倦怠等。对其指标性成分厚朴酚与和厚朴酚的含量测定，文献报道常用高效液相色谱法[2-3]，测定结果准确、稳定，重复性好，但是该法需对样品进行较为繁琐的化学前处理，分析速度慢，且损坏样品，不能满足中药大生产中大批量样品的快速测定。

近红外光谱分析技术是近年来新兴起的一种绿色分析技术，该技术利用样品近红外光谱信息量较大的谱区，依靠现代化的化学计量学方法和

作者简介：白雁，女，教授，博导 Tel: (0371)65962967 E-mail: white_yan@hotmail.com *__通信作者：__雷敬卫，博士，副教授 Tel: (0371)65575596 E-mail: ljwei@hactcm.edu.cn