

- of lornoxicam and morphine hydrochloride in 0.9% sodium chloride [J]. Med Her(医药导报), 2012, 31(4): 518-521.
- [11] 方宝霞, 陈富超, 时晓亚, 等. 盐酸曲马多注射液与注射用氯诺昔康在 0.9%氯化钠注射液中稳定性考察[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(33): 3723-3725.
- [12] 陈富超, 张滔, 李鹏, 等. 注射用氯诺昔康与芬太尼注射液配伍的稳定性[J]. 医药导报, 2011, 30(9): 1233-1234.
- [13] MIN P, CHEN F C, YANG X M, et al. Stability of lornoxicam for injection combined with tropisetron hydrochloride injection in patient controlled analgesia solution [J]. Drugs Clin(现代药物与临床), 2015, 30(1): 95-98.
- [14] 中国药典. 二部[S]. 2010: 71, 76.
- [15] CHEN F C, FANG B X, LI P. Compatibility and stability of lornoxicam with morphine, tramadol or fentanyl in infusion solutions [J]. African J Pharm Pharmacol, 2012, 6(27): 2055-2060.
- [16] CAO H Z, CHEN X H. Adsorption of fentanyl in different materials of analgesia pump reservoir [J]. J Clin Anesthesiol (临床麻醉学杂志), 2010, 26(12): 1065-1066.
- 收稿日期: 2015-12-03

HPLC 测定毛叶香茶菜中迷迭香酸和冬凌草甲素含量

毛思浩¹, 陈碧莲^{2*}, 李文庭², 唐登峰² (1.浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定毛叶香茶菜中迷迭香酸和冬凌草甲素含量的方法。方法 采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.1%磷酸为流动相, 梯度洗脱, 流速: 1 mL·min⁻¹, 检测波长: 239 nm, 柱温 30 ℃。结果 迷迭香酸和冬凌草甲素的线性范围分别为 9.53~4 765 ng 和 13.66~6 830 ng, 平均加样回收率分别为 103.3%和 95.8%, RSD%分别为 1.4%和 1.9%。结论 该法简便、稳定、可靠、耐用性良好, 可用于毛叶香茶菜的质量控制。

关键词: 毛叶香茶菜; 迷迭香酸; 冬凌草甲素

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)07-0922-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.07.021

Determination of Rosmarinic Acid and Oridonin in *Rabdosia Japonica* (Burm.f.) Hara by HPLC

MAO Sihao¹, CHEN Bilian^{2*}, LI Wenting², TANG Dengfeng² (1.College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China; 2.Zhejiang Provincial Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a reversed phase high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of rosmarinic acid and oridonin in *Rabdosia japonica* (Burm.f.) Hara. **METHODS** The separation of rosmarinic acid and oridonin were performed on a Kromasil C₁₈ analytical column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with methanol(A)-0.1% phosphoric acid(B) as mobile phase in a gradient elution program at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. The column temperature was maintained at 30 ℃. The detection wavelength was 239 nm. **RESULTS** Rosmarinic acid and oridonin had a good linearity ranging in 9.53–4 765 ng and 13.66–6 830 ng, respectively. The average recoveries of were 103.3% and 95.8%, RSDs were 1.4% and 1.9%, respectively. **CONCLUSION** The developed method is accurate with high simplify, stability, and reliability which is helpful to the quality control of *Rabdosia japonica* (Burm.f.) Hara.

KEY WORDS: *Rabdosia japonica* (Burm.f.) Hara; rosmarinic acid; oridonin

毛叶香茶菜[*Rabdosia japonica* (Burm. f.) Hara] 为唇形科(Labiatae)香茶菜属植物, 主要产地为江苏、河南、山西南部、陕西南部、甘肃南部及四川北部等地区, 民间称四棱杆、山苏子、猛一撒(河南)^[1], 主要有抗菌消炎、抗氧化、细胞毒活性、

抗肿瘤等作用^[2-3], 日本传统用作健胃药^[1]。关于毛叶香茶菜化学成分的研究已有许多报道, 毛叶香茶菜中主要的活性成分为二萜和酚酸类^[4-6], 其中冬凌草甲素和迷迭香酸含量较高, 是其指标性成分, 两者均具有良好的清热解毒、抗氧化、抑

作者简介: 毛思浩, 男, 硕士生 Tel: (0571)87180345 E-mail: 154650804@qq.com
(0571)86459402 E-mail: zsyonly@hotmail.com

*通信作者: 陈碧莲, 女, 主任中药师 Tel:

菌消炎、健胃活血、抗肿瘤等作用^[7-14]。目前未见有关于对毛叶香茶菜中迷迭香酸和冬凌草甲素含量测定的报道。本实验采用 HPLC 同时测定毛叶香茶菜中迷迭香酸和冬凌草甲素含量,为毛叶香茶菜质量标准的控制提供一定的依据。

1 药材、试剂与仪器

1.1 药材

毛叶香茶菜药材(编号: my023、my007、my024 等 11 批),采自安徽、浙江、河南、陕西等地,经浙江省食品药品检验研究院中药所郭增喜主任中药师鉴定为毛叶香茶菜 *Rabdosia japonica* (Burm. f.) Hara, 取其地上阴干部分,粉碎,过 4 号筛,备用。

1.2 试剂与试药

对照品:冬凌草甲素(含量:99.5%,批号:111721-201403)、迷迭香酸(含量:98.6%,批号:111871-201404)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯、水为自制超纯水、其余试剂均为分析纯。

1.3 仪器

LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津, DGU-20A5 在线脱气机, LC-20AT 泵, SIL-20AC 自动进样器, SPD-M20A 检测器, CTD-20AC 柱温箱, 色谱工作站 LC Solution); XPE-205 电子天平(METTLER TOLEDO); Milli Q Advantage A10 超纯水仪(Millipore 公司); USC-802 超声波清洗器(上海波龙); 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司)、TU1901 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)等。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0~30 min, 20%→50% A, 30~55 min, 50%→100% A; 流速: 1 mL·min⁻¹, 检测波长: 239 nm, 柱温: 30 ℃。在此色谱条件下,混合对照品和样品中的目标峰均能达到良好分离,对照品色谱图和样品色谱图见图 1。

2.2 混合对照品溶液的制备

取迷迭香酸、冬凌草甲素对照品适量,加含 0.2%甲酸的 70%甲醇溶液制成浓度分别为 95.3 和 136.6 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液,即得。

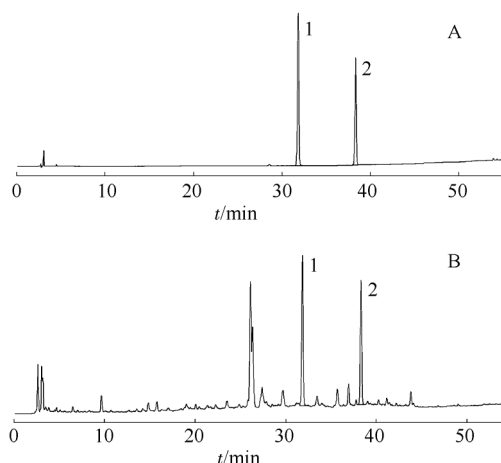


图 1 对照品和样品 HPLC 色谱图

A-对照品; B-样品; 1-迷迭香酸; 2-冬凌草甲素。

Fig. 1 HPLC chromatograms of the substances and sample
A-control; B-sample; 1-rosmarinic acid; 2-oridonin.

2.3 供试品溶液的制备

取编号为 my023 的样品地上部分粉末 0.8 g, 精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 20 mL 含 0.2%甲酸的 70%甲醇,密塞,称定重量,超声处理 30 min,冷却,称定重量,用含 0.2%甲酸的 70%甲醇补足损失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 测定方法

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液 5 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算结果,即得。

2.5 线性关系考察

分别精密量取迷迭香酸和冬凌草甲素对照品适量,加含 0.2%甲酸的 70%甲醇制成含迷迭香酸浓度分别为 0.953, 1.91, 4.77, 9.53, 19.06, 47.65, 95.30, 238.25, 476.5 μg·mL⁻¹ 和冬凌草甲素浓度分别为 1.366, 2.73, 6.83, 13.66, 27.32, 68.30, 136.6, 341.5, 683.0 μg·mL⁻¹ 的混合溶液,精密吸取以上各混合溶液 10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,以进样量(X)为横坐标,色谱峰峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程。所得结果表明迷迭香酸和冬凌草甲素在 9.53~4 765 ng 和 13.66~6 830 ng 内线性关系良好,线性曲线分别为 $Y=1\,471.97X-26.766\,15$ 和 $Y=1\,337.16X+18\,699.7$, r^2 分别为 0.999 8 和 0.999 9。

2.6 仪器精密度试验

取“2.2”项下的迷迭香酸、冬凌草甲素混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样 6

针, 进样量 5 μL , 记录两者的色谱峰面积, 计算得迷迭香酸和冬凌草甲素峰面积的 RSD 分别为 0.108% 和 0.065%, 表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验

称取 my023 地上部分粉末 0.8 g, 共 6 份, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样, 计算迷迭香酸和冬凌草甲素含量, 结果两者含量 RSD 分别为 1.14% 和 0.56%, 表明本方法重复性良好。

2.8 稳定性试验

取同一供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别在 0, 2, 4, 8, 16, 24, 36, 48, 60, 72 h 进样, 分别测定迷迭香酸和冬凌草甲素的峰面积, 计算两者的 RSD 分别为 0.61% 和 1.43%, 表明供试品溶液在 72 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验

分别取已知含量的 my023 地上部分样品粉末 9 份, 每份 0.4 g 左右, 精密称定, 按高、中、低 3 种浓度分别准确加入一定量的对照品, 使高、中、低浓度对照品加入量与所取供试品中待测定成分量之比控制在 1.5 : 1、1 : 1、0.5 : 1 左右, 按“2.3”项下方法制备 9 份供试液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果

Tab. 1 Result of recovery test

被测成分	称样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
迷迭香酸	0.401 6	1.197	0.575	1.784	102.2	103.3	1.39
	0.401 7	1.197	0.575	1.805	105.8		
	0.403 3	1.202	0.575	1.804	104.8		
	0.402 0	1.198	1.149	2.380	102.8		
	0.401 4	1.196	1.149	2.374	102.5		
	0.402 5	1.199	1.149	2.379	102.7		
	0.403 8	1.203	1.724	2.954	101.6		
	0.400 8	1.194	1.724	2.969	103.0		
	0.402 0	1.198	1.724	2.993	104.1		
冬凌草甲素	0.401 6	1.324	0.704	1.976	92.7	95.8	1.94
	0.401 7	1.324	0.704	1.990	94.6		
	0.403 3	1.329	0.704	1.985	93.2		
	0.402 0	1.325	1.408	2.683	96.5		
	0.401 4	1.323	1.408	2.686	96.8		
	0.402 5	1.327	1.408	2.684	96.4		
	0.403 8	1.331	2.122	3.373	96.3		
	0.400 8	1.321	2.122	3.383	97.2		
	0.402 0	1.325	2.122	3.415	98.5		

2.10 样品测定

将不同来源的毛叶香茶菜按叶、茎、根分开粉碎, 过 4 号筛, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定。分别测定了 10 批不同来源的毛叶香茶菜的根、茎、叶中迷迭香酸和冬凌草甲素的含量。结果见表 2。

表 2 毛叶香茶菜含量测定结果

Tab. 2 The results of the determination of *Rabdosia japonica* (Burm.f.) Hara

批次 编号	来源	部位	迷迭香酸		冬凌草甲素	
			含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD/%	含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD/%
my007	河南	叶	0.706	0.161	2.645	0.183
		茎	0.230	2.091	—	—
		根	1.022	0.418	—	—
my024	河南	叶	2.801	0.065	2.577	0.351
		茎	3.387	0.485	—	—
		根	1.667	0.171	—	—
my025	陕西	叶	0.178	1.006	2.165	0.159
		茎	2.686	0.102	—	—
		根	2.055	0.360	—	—
my026	安徽	叶	9.583	0.067	0.987	0.409
		茎	0.759	0.599	—	—
		根	2.107	2.090	—	—
my027	河南	叶	9.355	0.942	0.262	1.577
		茎	2.633	0.444	—	—
		根	1.007	0.252	—	—
my028	河南	叶	28.651	0.013	0.891	0.277
		茎	1.327	0.203	—	—
		根	2.050	0.053	—	—
my029	安徽	叶	20.556	0.364	2.087	0.397
		茎	1.288	0.179	—	—
		根	—	—	—	—
my030	安徽	叶	13.154	1.237	0.655	1.697
		茎	0.811	1.807	—	—
		根	—	—	—	—
my031	安徽	叶	3.589	0.044	1.006	0.184
		茎	0.683	0.272	—	—
		根	—	—	—	—
my033	河南	叶	20.682	0.676	2.536	0.120
		茎	2.002	0.255	—	—
		根	—	—	—	—

3 讨论

3.1 提取方法比较

实验中考察了加热回流法和超声提取法对毛叶香茶菜中迷迭香酸和冬凌草甲素提取效果的影响, 结果表明超声提取法提取效果明显优于加热

回流法；考察了 70%甲醇、甲醇、70%乙醇、乙醇以及含 0.2%甲酸的 70%甲醇等溶剂的提取效果，结果以含 0.2%甲酸的 70%甲醇提取效果最好；考察超声提取 15, 30, 45 和 60 min, 结果显示 15 min 时，迷迭香酸和冬凌草甲素未提取完全，而 30, 45 和 60 min 的提取效果相差不大，因此选择超声 30 min。

3.2 检测波长的确定

用紫外可见分光光度计对迷迭香酸和冬凌草甲素在 190~400 nm 波长下进行扫描，发现冬凌草甲素在 239 nm 附近有最大吸收，迷迭香酸在 239 nm 波长下也有较大吸收，因此选择 239 nm 作为检测波长。

3.3 流动相的选择

尝试以甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸、乙腈-0.1%磷酸等进行梯度洗脱，结果样品色谱峰峰型较差且杂质峰干扰严重，用甲醇-0.1%磷酸进行梯度洗脱，样品中迷迭香酸和冬凌草甲素能较好分离，峰型较好且杂质峰干扰较小，因此选择甲醇-0.1%磷酸系统作为流动相进行梯度洗脱。

3.4 耐用性考察

以 0.9 和 1.1 mL·min⁻¹ 等不同流速与该方法比较，柱温比较了 25 和 35 ℃ 等，结果除了在流速为 1.1 mL·min⁻¹ 下冬凌草甲素峰有杂峰干扰外，其余条件下都能较好分离，不同色谱条件下含量测定结果的 RSD 均<3.0%；将色谱柱换成了 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱、依利特 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱和 Boston BosChrom ODS C₁₈ 色谱柱，液相色谱仪比较了安捷伦 1200 和戴安 3000 RSLC，结果迷迭香酸和冬凌草甲素均能实现良好分离，且色谱峰干扰较小，不同的色谱仪、色谱柱含量测定结果差异的 RSD 均<3.0%，说明该方法耐用性良好。

通过对 10 批不同来源毛叶香茶菜的含量测定发现，该植物中迷迭香酸和冬凌草甲素含量均较高；冬凌草甲素几乎只存在于叶中；迷迭香酸在根、茎、叶中均有分布，且不同部位含量差异较大；不同来源的毛叶香茶菜，冬凌草甲素和迷迭香酸含量有较大差异。造成上述差异的因素与采收地、采收季节以及药材贮存时间有很大关系。

其中贮存时间对迷迭香酸含量影响最大，一般新鲜的毛叶香茶菜药材中迷迭香酸含量比干燥后贮存一定时间的毛叶香茶菜中迷迭香酸含量高很多；冬凌草甲素受此影响较小。迷迭香酸含量以安徽和河南的新鲜药材较高。该方法简便、可靠、稳定、耐用性良好，能准确地测定不同来源的毛叶香茶菜中迷迭香酸和冬凌草甲素的含量，可作为毛叶香茶菜质量控制的方法。

REFERENCES

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 第 66 卷. 北京: 科学出版社, 1977: 434.
- [2] 周文兰, 李永福. 香茶菜类药的研发[J]. 传统医药, 2010, 19(6): 58-59.
- [3] LI P Z. The studies on the chemical constituents from the *Isodon Japonica* (Burm. f.) Hara [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2011.
- [4] 孙汉董, 许云龙, 姜北. 香茶菜属植物二萜类化合物[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [5] DI X M, YAN F L. Chemical constituents of *Isodon japonica* [J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2013, 17(9): 1470--1472
- [6] 侯瑞杰. 毛叶香茶菜化学成分研究[D]. 新乡: 新乡医学院, 2012.
- [7] 海广范, 张慧, 郭兰青. 二萜类化合物药理学作用研究进展 [J]. 新乡医学院学报, 2015, 31(1): 77-80
- [8] ZHOU D, LIU A L, DU G H. Advance in pharmacological research of rosmarinic acid [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2011, 20(7): 594-597.
- [9] KE J. Experimental study on proliferation and invasion of A549 cells in lung carcinoma by inhibition of rosmarinic acid [J]. Gansu Med J(甘肃医药), 2015, 34(4): 255-258.
- [10] HU X M, HUANG F J, LIU J, et al. Protective effect of oridonin against the injuries in endothelial cells [J]. Chin J Diabetes Mellitus(中华糖尿病杂志), 2014, 6(10): 753-757.
- [11] LYU L L, XU L N, PENG J Y. Research progress of anti-glioma Chinese medicine [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(8): 1024-1026
- [12] LI N, JIN P, ZHANG C J. Pro-apoptotic effect and its mechanisms of oridonin on human ovarian cancer cell SKOV3 [J]. Cancer Res Prev Treat(肿瘤防治研究), 2013, 40(1): 36-41.
- [13] WU S, GU W L, FENG N P, et al. Study on the anti-tumor effect of oridonin self-microemulsifying drug delivery system on mouse H22 hepatocellular carcinoma *in vivo* [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2010, 21(6): 567-569.
- [14] DENG S S, LIU H X, WANG Q, et al. Study on screening of high quality *Sarcandra glabra* in different provenance [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(9): 1061-1066.

收稿日期: 2015-11-21