

### 3.4 有机溶剂残留的限度要求

本实验参照中国药典和 ICH Q3C 残留溶剂指导原则<sup>[8-9]</sup>, 应对本品合成工艺过程中所使用的未能完全去除的有机溶剂进行严格控制。5 种溶剂中二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯为限制使用的第二类溶剂, 其他为药品 GMP 或其他质量要求限制使用的第三类溶剂, 根据限度要求, 规定二氯甲烷不得过 0.06%, 四氢呋喃不得过 0.072%, 甲苯不得过 0.089%, 乙醇、乙酸乙酯不得过 0.5%。经测定, 合成的 4 批样品均符合规定。

### REFERENCES

- [1] COREY R, HOPKINS. ACS chemical neuroscience molecule spotlight on valdoxen [J]. ACS Chem Neurosci, 2010, 1(12): 772-773.
- [2] BODINAT C D, BÉATRICE G L, MOCAER E, et al. Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development [J]. Nat Rev Drug Discov, 2010, 25(6): 1-15.

- [3] SHI J F, CHEN Y J, SHI Y, et al. Determination of residual organic solvents in rosuvastatin calcium by capillary GC [J]. China Pharm(中国药师), 2012, 15(5): 621-623.
- [4] WANG J, WANG H B, WANG Z J. Determination of nine residual organic solvent in clindamycin palmitate hydrochloride by GC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(9): 829-833.
- [5] TENG J J, LI Q, JI W, et al. Determination of residual organic solvents in naltrexone methylbromide by capillary gas chromatography [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(2): 153-156.
- [6] DIAO Y Z, YI M J, JIA J, et al. Determination of residual organic solvents in nelarabine by GC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(10): 956-958.
- [7] GAO R Y, WEI F R, SHAN M Q, et al. Determination of residual solvents in pirfenidone by GC [J]. Qilu Pharm Aff(齐鲁药事), 2011, 30(7): 383-384.
- [8] Ch.P(2010)Vol II (中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: Appendix 61.
- [9] ZHOU H J. Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals For Human Use Quality Section (药品注册的国际技术要求·质量部分) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001.

收稿日期: 2012-10-16

## HPLC 同时测定西归中阿魏酸和佛手柑内酯的含量

张海珠, 李齐贤, 孙帮燕, 周萍\* (大理学院药学与化学学院, 云南 大理 671000)

**摘要:**目的 建立同时测定西归药材中阿魏酸和佛手柑内酯含量的方法。方法 采用色谱柱为 PhenomeneX Gemini-NX C<sub>18</sub> 110A 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.05%磷酸水溶液, 梯度洗脱; 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长为 322 nm; 柱温为 30 °C。结果 阿魏酸在 0.020 1~0.603 μg、佛手柑内酯在 0.020 3~0.609 μg 内线性关系良好; 阿魏酸和佛手柑内酯的平均回收率分别为 96.8%(RSD=2.0%)和 98.7%(RSD=2.9%)。结论 本方法首次建立了同时测定西归中阿魏酸和佛手柑内酯的 HPLC 分析方法, 结果准确, 重复性好, 可作为西归药材的质量评价方法。

**关键词:** 西归; 阿魏酸; 佛手柑内酯; 含量测定; 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(2013)06-0648-04

### Simultaneous Determination of Bergapten and Ferulic Acid in Seselopsis by HPLC

ZHANG Haizhu, LI Qixian, SUN Bangyan, ZHOU Ping\* (College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To simultaneous determine the content of ferulic acid and bergapten in Seselopsis. **METHODS** The chromatographic separation was performed on a PhenomeneX Gemini-NX C<sub>18</sub> 110A (250 mm×4.60 mm, 5μm). The mobile phase was consisted of methanol-0.05% phosphoric acid with gradient elute, the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was 322 nm and the column temperature was 30 °C. **RESULTS** Good linear relationship between the peak area and content of ferulic acid and bergapten was achieved when the amount was within 0.020 1-0.603 μg, 0.020 3-0.609 μg; the

基金项目: 大理学院应用开发研究基金(YYKF2006-1-1)

作者简介: 张海珠, 女, 硕士, 讲师 Tel: (0872)2257417 E-mail: zhouping725@126.com

E-mail: hzningjing@163.com

\*通信作者: 周萍, 女, 硕士, 教授 Tel:

(0872)2257417 E-mail: zhouping725@126.com

recoveries were 96.8% and 98.7%; RSD were 2.0% and 2.9%. **CONCLUSION** This is the first time to simultaneous determine ferulic acid and bergapten in *Seselopsis*. The method is accurate, reproducible and suitable to be used for quality assessment of *Seselopsis*.

**KEY WORDS:** *Seselopsis*; ferulic acid; bergapten; content determination; HPLC

西归是伞形科植物西藏凹乳芹 (*Vicatia tibetica de Boiss*) 的根, 在云南大理民间被称为西归 (*Seselopsis*), 也称独脚当归 (弥康)、加哇 (藏语)。野生西归分布于云南西北部的鹤庆、德钦、中甸、丽江等县以及四川西部、西藏等地海拔 2 700~4 000 m 的高山草石坡。西归具有补血、补气、调经等功效, 用于面色萎黄、眩晕心悸、血虚所致的月经不调、痛经等症<sup>[1]</sup>。据报道, 西归对小鼠具有与人参类似的抗疲劳作用, 可以明显提高小鼠的耐缺氧和耐热能力<sup>[2]</sup>。西归黄酮具有较好的体外抗氧化活性<sup>[3]</sup>。西归乙醇提取物具有一定的抗痛经作用<sup>[4]</sup>。在化学成分上, 西归含有伞形花内酯、佛手柑内酯、阿魏酸、芹菜素、谷甾醇、胡萝卜苷、d-甘露醇、蔗糖<sup>[5]</sup>。药理学研究表明, 佛手柑内酯主要用于杀灭钉螺, 有一定抗凝血作用, 能止血、降压和抗微生物活性。阿魏酸具有抗血栓、抗炎镇痛、抗氧化、抗自由基等作用<sup>[6-8]</sup>。西归中阿魏酸的含量测定已有相关报道<sup>[9]</sup>, 本实验采用 HPLC 同时测定西归中阿魏酸与佛手柑内酯的含量, 以期为进一步提取分离、探讨其药理作用提供理论基础, 为西归的综合利用和开发提供依据, 为进一步建立西归药材的质量标准奠定基础。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); 梅特勒电子分析天平 AE240 (瑞士梅特勒-托利多公司); 超纯水机 (艾柯 DZG-303A); SSY 电热恒温水浴锅 (北京泰克仪器有限公司); SK5200H 超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司); 200 克摇摆式高速万能粉碎机 DFY-200 (温岭市林大机械有限公司)。

### 1.2 试剂

阿魏酸对照品 (批号: 110773-201012, 中国食品药品检定研究院, 纯度 >99.6%); 佛手柑内酯对照品 (南京泽朗医药科技有限公司, 批号: 201104, 纯度 >98%); 1 号西归样品购自云南省鹤庆县马厂乡; 2 号西归样购自云南省鹤庆县三家村; 3 号西归样购自云南省鹤庆县营盘村; 4 号西归样购自云南省鹤庆县东坡村, 洗净, 自然晾干, 由大理学

院生药教研室周浓老师鉴定为西藏凹乳芹 *Vicatia tibetica de Boiss* 的根。甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Phenomenex Gemini-NX C<sub>18</sub> 110A 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相: 甲醇 (A)-0.05% 磷酸溶液 (B)。梯度洗脱程序: 0~3 min, A 35%; 3~10 min, A 35% → 40%; 10~15 min, A 40% → 45%; 15~20 min, A 45% → 55%。检测波长: 322 nm; 柱温: 30 °C; 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 进样量: 10 μL。在该色谱条件下阿魏酸和佛手柑内酯对照品及西归样品的色谱图见图 1。

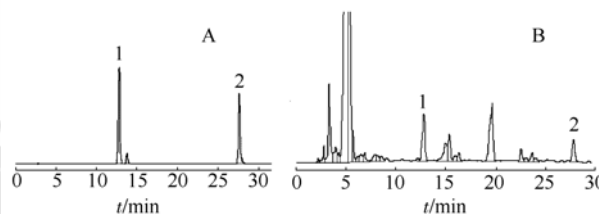


图 1 高效液相色谱图

A-混合对照品; B-西归供试品; 1-阿魏酸; 2-佛手柑内酯

Fig 1 HPLC chromatograms

A-mixed standard; B-Seselopsis sample; 1-ferulic; 2-bergapten

### 2.2 溶液的配制

**2.2.1 对照品溶液的制备** 精密称取阿魏酸 2.01 mg、佛手柑内酯对照品 2.03 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为储备液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取药材粉末 (过 2 号筛) 1.0 g, 精密称定, 置 50 mL 圆底烧瓶中, 精密加入 75% 乙醇 10 mL, 称定质量, 置沸水浴回流提取 2 h, 取出, 放冷, 用 75% 甲醇补足质量, 摇匀, 微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 即得。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 线性关系考察** 分别精密吸取不同体积对照品储备液, 将其定量混合, 用甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 精密吸取对照品储备液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mL, 用甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 各取 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样, 测定峰面积。以峰面积 (Y) 为纵坐标, 对照品质量 (X) 为横坐标, 进行线性回归。阿魏酸回归方程:  $Y=$

5 948.3X-1.065 8,  $r=0.999 7$ ; 佛手柑内酯回归方程:  $Y=3 650.1X+2.373 2$ ,  $r=0.999 9$ ; 结果表明阿魏酸在 0.020 1~0.603  $\mu\text{g}$ 、佛手柑内酯在 0.020 3~ 0.609  $\mu\text{g}$  内, 与峰面积呈良好的线性关系。

**2.3.2 仪器精密度试验** 取同一批供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录色谱峰峰面积。结果表明, 阿魏酸峰面积的 RSD 为 0.62%, 佛手柑内酯峰面积的 RSD 为 0.14%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.3 稳定性试验** 取同一批供试品溶液分别于 0, 1, 4, 8, 12, 24 h 进样分析, 记录色谱峰峰面积。结果表明, 阿魏酸峰面积的 RSD 为 1.0%, 佛手柑内酯峰面积的 RSD 为 2.2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.3.4 重复性试验** 取同一批供试品药材粉末 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 记录色谱峰峰面积, 测得阿魏酸的平均含量为 0.092 50  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , RSD 为 2.2%, 佛手柑内酯平均含量为 0.021 812  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , RSD 为 3.3%, 表明该方法重复性良好。

**2.3.5 加样回收率试验** 精密称取同一批已知阿魏酸和佛手柑内酯含量的西归药材 6 份, 分别精密加入一定量对照品, 按“2.1”项下色谱条件, 进样测定, 计算回收率。结果见表 1~2。

表 1 阿魏酸加样回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 1 Results of recovery test of ferulic acid( $n=6$ )

取样量/ g	样品量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
0.500 4	0.046 29	0.050 25	0.094 03	95.0	96.8	2.0
0.500 2	0.046 27	0.050 25	0.094 41	95.8		
0.500 2	0.046 27	0.050 25	0.096 39	99.8		
0.500 3	0.04628	0.050 25	0.094 17	95.3		
0.500 2	0.046 27	0.050 25	0.094 78	96.5		
0.500 2	0.046 27	0.050 25	0.095 83	98.6		

表 2 佛手柑内酯加样回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 2 Results of recovery test of bergapten( $n=6$ )

取样量/ g	样品量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
0.500 4	0.010 91	0.010 15	0.021 31	102.4	98.7	2.9
0.500 2	0.010 91	0.010 15	0.021 20	101.4		
0.500 2	0.010 91	0.010 15	0.020 60	95.4		
0.500 3	0.010 91	0.010 15	0.020 63	95.8		
0.500 2	0.010 91	0.010 15	0.020 92	98.6		
0.500 2	0.010 91	0.010 15	0.020 92	98.6		

## 2.4 样品含量测定

取 4 批西归药材粗粉各约 1.0 g, 分别精密称

定, 按“2.2.2”项下方法制成供试液, 按“2.1”项下色谱条件测定样品中阿魏酸、佛手柑内酯的含量, 每个批次平行操作 3 份, 结果见表 3。

表 3 西归中阿魏酸和佛手柑内酯成分的含量测定结果( $n=3$ )

Tab 3 Results of content determination of bergapten and ferulic acid in Seselopsis( $n=3$ )

样品名称	阿魏酸含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	佛手柑内酯 含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	阿魏酸 RSD/%	佛手柑内酯 RSD/%
1 号西归	0.092 50	0.021 81	2.2	3.3
2 号西归	0.006 00	0.001 43	2.5	3.0
3 号西归	0.007 40	0.007 72	2.4	3.5
4 号西归	0.009 10	0.006 49	2.0	2.8

## 3 讨论

对于西归中阿魏酸的含量测定已有相关报道, 但对于同时测定西归中阿魏酸和佛手柑内酯的含量尚未见报道, 监控其 2 个指标成分能更有效控制其质量。

本实验考察了不同提取溶剂(甲醇、乙醇、乙酸乙酯)对两指标成分含量的影响, 结果甲醇与乙醇提取方法对所测成分的提取效率较高, 但甲醇毒性较大, 综合考虑后使用乙醇提取。对提取方式、乙醇浓度、提取时间进行了单因素考察, 最后确定 75%乙醇回流提取 2 h, 所测成分的提取效率较高。

考察了色谱的洗脱方式, 发现等度洗脱阿魏酸分离效果不好, 而梯度洗脱时, 逐渐增加有机相比例可使阿魏酸获得较好的分离, 最终确定以甲醇-0.05%磷酸为流动相进行梯度洗脱。

## REFERENCES

- [1] ZHOU N, DUAN Y M, CHEN Q, et al. Study on pharmacognosy of Xigui [J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业学报), 2007, 35(8): 2307-2307, 2425.
- [2] HUANG B, SUN Y L, ZHANG B F, et al. A study on pharmacological effects of Seselopsis on mice [J]. J Dali Univ(大理学院学报), 2006, 5(6): 78-80.
- [3] ZHOU P, WANG L P, DENG L, et al. Study on antioxidative activity of flavonoidse extracted from Seselopsis *in vitro* [J].Cana Met Quarterly, 2011, 39(3): 1359-1360.
- [4] DONG S T, WANG C J, GUO P, et al. Study on the effect of ethanol extract of Xigui on anti-dysmenorrhea [J]. Chin J Pharm(中国药物警戒), 2011, 8(5): 263-266.
- [5] ZHANG W M, DUAN Z H, SUN F, et al. The chemical constituents from the roots of *Vicatia thibetica* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2004, 16(3): 218-219.
- [6] WANG F, LIU M, YANG L C, et al. Hypotensive effects of caffeic acid and ferulic acid in Doca-salt hypertensive rats [J]. Pharm J PLA(解放军药学报), 1999, 15(5): 1-4.

- [7] JIANG L, XU X Q, CHEN L, et al. Study on dynamic changes of ferulic acid in *Ferula sinkiangensis* in different phenological period [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(8): 705-707.
- [8] WANG G, ZHANG X H, YANG J X, et al. Protective effects of ferulic acid on human keratinocyte [J]. Her Med(医药导报),

2011, 30(8): 982-984.

- [9] XIAO P Y, YANG Y S, LIU G M. Determination of ferulic acid in Seselopsis of Bai people's medicine [J]. Yunnan J Tradit Chin Mater Med(云南中医中药杂志), 2007, 28(12): 29-30.

收稿日期: 2012-08-29

## 微乳液相色谱法测定广东紫珠中 5 种黄酮成分

朱兰寸<sup>1</sup>, 刘志华<sup>1</sup>, 李高<sup>2</sup>, 杨光忠<sup>3</sup>, 马廷升<sup>1\*</sup> (1.怀化医学高等专科学校药系, 湖南 怀化 418000; 2.华中科技大学同济医学院药学院, 武汉 430030; 3.中南民族大学药学院, 武汉 430074)

**摘要:** 目的 建立微乳液相色谱法同时测定广东紫珠中 5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮、鼠李秦素、华良姜素、岳桦素、毡毛美洲茶素 5 种黄酮成分。方法 微乳体系组成的流动相为: 2.2%SDS -1.5%正辛烷-7.75%正丁醇-0.5%三乙胺-88%水(用 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 调节 pH3.7), 色谱柱为 Hypersil BDS C<sub>18</sub>(4.6 mm×150 mm, 5 μm)柱; 检测波长 350 nm; 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量 10 μL; 柱温为 30 °C。结果 广东紫珠中 5 种黄酮成分在 30 min 内达到完全分离, 在 1.520~72.25 μg·mL<sup>-1</sup> 内, 5 个黄酮成分的线性相关系数  $r \geq 0.999 5$ , 平均回收率 99.6%~100.5%。结论 本方法可应用于中广东紫珠中 5 种黄酮成分的含量分析。

**关键词:** 微乳液相色谱法; 广东紫珠; 黄酮

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)06-0651-04

### Simultaneous Determination of Five Flavonoids in *Callicarpa Kwangtungensis* Chun. by Microemulsion Liquid Chromatography

ZHU Lancun<sup>1</sup>, LIU Zhihua<sup>1</sup>, LI Gao<sup>2</sup>, YANG Guangzhong<sup>3</sup>, MA Tingsheng<sup>1\*</sup> (1. Pharmacology Department of Huaihua Medical College, Huaihua 418000, China; 2. Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 3. Pharmacology Department of South-central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish an efficient microemulsion liquid chromatography(MELC) method and validate for simultaneous determination of five flavonoids (5,4'-dihydroxy-3,7,3'-trimethoxyflavone, rhamnatin, kumatakenin, ermanine and velutin) in *Callicarpa kwangtungensis* Chun.. **METHODS** The MELC separation was performed on a Hypersil BDS C<sub>18</sub> column(4.6 mm×150 mm, 5 μm) with the mixture of 2.2% SDS-1.5% octane-7.75% *n*-butanol-0.5% triethylamine-88% water, the pH was adjusted to 3.7 with phosphoric acid as the mobile phase. The flow rate was set at 0.8 mL·min<sup>-1</sup> and the eluent was detected at 350 nm for the five flavonoids. **RESULTS** The calibration curves of the five flavonoids were linear ( $r \geq 0.999 5$ ) over the concentration range of 1.520–72.25 μg·mL<sup>-1</sup>. The mean recoveries were 99.6%–100.5%. **CONCLUSION** The results indicate that the optimized method is successfully applied to the analysis of five important flavonoids in *Callicarpa kwangtungensis* Chun..

**KEY WORDS:** microemulsion liquid chromatography; *Callicarpa kwangtungensis* Chun.; flavonoid

广东紫珠(*Callicarpa kwangtungensis* Chun.)为马鞭草科紫珠属植物, 具有止血、止痛之功效, 在民间主要用于治疗偏头痛、吐血、跌打肿痛、外伤出血等<sup>[1]</sup>, 药用部位为广东紫珠的干燥茎枝, 是抗宫炎片等中成药的主要原料药材。近年来,

广东紫珠的化学成分研究, 发现了众多的化合物和多方面的药理活性, 其主要化学成分为二萜类、三萜类、环烯醚萜苷、黄酮类等, 其中总黄酮类化合物主要为 5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮(5,4'-dihydroxy-3,7,3'- trimethoxyflavone, DT)、鼠

基金项目: 湖南省教育厅自然科学基金资助项目(11C1012)

作者简介: 朱兰寸, 女, 实验师 Tel: (0745)2381210 E-mail: zhulc111@163.com

E-mail: zhulc111@163.com

\*通信作者: 马廷升, 男, 硕士, 教授

Tel:

15274555695 E-mail: matingsheng1111@163.com