

杏香兔耳风提取物质量标准研究*

★ 杜艳龙** 魏惠珍 饶毅*** 王跃生 罗晓健 冯育林 (中药固体制剂制造技术国家工程研究中心 南昌 330006)

摘要:目的:建立杏香兔耳风提取物的质量控制方法。方法:通过薄层色谱(TLC)法和高效液相色谱(HPLC)法对杏香兔耳风提取物进行质量控制。结果:杏香兔耳风提取物中3,5-二咖啡酰基奎宁酸线性范围为0.083~0.830 μg , $r=0.9999$,表明线性关系良好,平均加样回收率为98.55%, RSD 为0.85%($n=6$)。结论:TLC和HPLC两法合用,可定性、定量控制杏香兔耳风提取物中3,5-二咖啡酰基奎宁酸的含量,准确度高,重现性好,操作便捷。

关键词:杏香兔耳风提取物;质量标准;3,5-二咖啡酰基奎宁酸;TLC;HPLC

中图分类号:R 284.1 文献标识码:A

Studies on Quality Standard of *Ainsliaea fragrans* Champ. extrac

DU Yan-long, WEI Hui-zhen, RAO Yi, WANG Yue-sheng, LUO Xiao-jian, FENG Yu-lin

脉粥样硬化的防治机制可能是多方面的^[10]。本研究结果也发现银杏叶提取物 EGB761 可以有效减少高胆固醇血症引起的动脉粥样硬化斑块,与模型组相比斑块明显减少,光镜下泡沫细胞也明显少于模型组。说明银杏叶提取物 EGB761 可有效改善高胆固醇血症引起的动脉粥样硬化,可见其在防治动脉粥样硬化方面值得深入研究和推广。

参考文献

- [1] D. Larry Sparks. Coronary Artery Disease, Hypertension, ApoE, and Cholesterol; A Link to Alzheimer's Disease [J]. Ann N Y Acad Sci. 1997;826(13):128-46.
- [2] C. M. C. Dupasquier, A. -M. Weber, B. P. Ander, et al. Effects of dietary flaxseed on vascular contractile function and atherosclerosis during prolonged hypercholesterolemia in rabbits [M]. AJP-Heart and Circulatory Physiology, 2006, 291: H2987-H2996.
- [3] 陈立伟, 蔺洁. 高胆固醇血症和炎症共同作用导致动脉粥样硬化形成[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(3): 253.
- [4] 苗贵华, 杨丽霞, 齐峰, 等. 低密度脂蛋白胆固醇水平与冠状动脉病变的关系[J]. 岭南心血管病杂志, 2008, 14(1): 34-36.
- [5] Anna Tavridou, Loukas Kaklamanis, Apostolos Papalois, et al.

EP2306 [2-(4-Biphenyl)-4-methyl-octahydro-1, 4-benzoxazin-2-ol, hydrobromide], A Novel Squalene Synthase Inhibitor, Reduces Atherosclerosis in the Cholesterol-Fed Rabbit [J]. The journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2007, 323(3): 794-804.

- [6] Toshio Hayashi, Packiasamy A. R. Juliet, Hisako Matsui-Hirai, et al. L-citrulline and L-arginine supplementation retards the progression of high-cholesterol-diet-induced atherosclerosis in rabbits. PNAS, 2005, 102(38): 13 681-13 686.
- [7] Stephen J. Nicholls, Belinda Cutri, Stephen G. Worthley, et al. Impact of Short-Term Administration of High-Density Lipoproteins and Atorvastatin on Atherosclerosis in Rabbits [J]. Journal of the American heart association, 2005, 25: 2416-2421.
- [8] 张露, 谢作权, 宋怀光. 银杏叶提取物 GBE50 对培养细胞内胆固醇代谢的影响[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(3): 313-317.
- [9] 王立杰, 刘艳梅, 石勇, 等. 银杏叶提取物对动脉粥样硬化血管内皮的保护作用研究[J]. 中药材, 2006, 29(8): 831-832.
- [10] 李欣, 廖新学, 廖晓星, 等. 银杏叶提取物对动脉粥样硬化的防治作用[J]. 中华急诊医学杂志, 2004, 13(9): 609-611.

(收稿日期: 2009-11-13)

* 项目基金:“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-352);江西省科技支撑计划项目(赣科发计字[2007]189号);国家“十一五”科技支撑计划课题(2006BAI06A01-01)

** 作者简介:杜艳龙,助理工程师,主要从事中药质量控制研究, Tel:13576940063, E-mail: dyl0730@hotmail.com

*** 通讯作者:饶毅, Tel: (0791) 7119609, E-mail: raoyi99@126.com

The National Pharmaceutical Engineering Center(NPEC) for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006

Abstract: Objective: To establish the methods for the determination of *Ainsliaea fragrans* Champ. extract. Methods: TLC and HPLC were used to control the quality of *Ainsliaea fragrans* Champ. extract. Results: The calibration curves were linear within the range of 0.083 ~ 0.830 μg ($r = 0.9999$) for 3,5-dicaffeoylquinic acid in *Ainsliaea fragrans* Champ. extract. The average recovery rate was 98.55%, RSD of 0.85% ($n = 6$). Conclusion: The methods of uniting TLC and HPLC are simple, accurate and repeatable for controlling the 3,5-dicaffeoylquinic acid content in *Ainsliaea fragrans* Champ. extract qualitatively and quantitatively.

Key words: *Ainsliaea fragrans* Champ. extract; Quality standard; 3,5-dicaffeoylquinic acid; TLC; HPLC

中药提取物是一类新兴的天然药物产品,被广泛用于医疗保健。中药提取物的质量规范对中药产业的发展至关重要,但是目前绝大多数的中药提取物没有国家标准或行业标准^[1]。杏香兔耳风为菊科兔耳风属植物杏香兔耳风 *Ainsliaea fragrans* Champ. 的干燥全草,具有清热解毒、舒筋活血、发表祛风等功效,主治妇女崩漏,痈疽肿毒,毒蛇咬伤^[2]。临床上用于治疗湿热下注之带下病、慢性宫颈炎等诸多病症^[3]。杏香兔耳风提取物是通过一系列分离纯化工艺得到杏香兔耳风有效成分的精制产品,富集了大量的酚酸类成分,尤其是 3,5-二咖啡酰基等二咖啡酰基奎宁酸类化合物含量较高,且具有较强的生物活性^[4]。为全面控制杏香兔耳风提取物的质量,本研究通过 TLC 和 HPLC 建立了杏香兔耳风提取物的质量控制方法,为杏香兔耳风提取物的质量评价提供科学依据,也为研究杏香兔耳风药材的鉴别和含量测定方法提供了一定的参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters 2695 型高效液相色谱仪, Waters 2996 型二极管阵列检测器,中文版 Empower 色谱工作站; AB104-N 型电子分析天平(梅特勒-托利多(上海)有限公司); AUW-220D 型电子分析天平(日本岛津公司); KQ-250DB 型超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 杏香兔耳风提取物(自制,批号为 20080908、20081006、20081119)。对照品 3,5-二咖啡酰基奎宁酸(购自中山康之源生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$)。色谱纯乙腈(山东禹王实业有限公司化工分公司),其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 薄层定性鉴别

取杏香兔耳风提取物 30 mg 置于 25 ml 量瓶中,加 50% 乙醇溶解,并稀释至 25 ml,作为供试品溶液。另取 3,5-二咖啡酰基奎宁酸对照品适量,加 50% 乙醇溶解配成每毫升含 40 μg 3,5-二咖啡酰基

奎宁酸的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(中国药典 2005 年版一部附录 VIB)试验,吸取上述样品溶液 10 μl ,对照品溶液 5 μl ,分别点于同一块硅胶 G 薄层板上,以乙酸丁酯-甲酸-水(7:2.5:2.5)的上层液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% FeCl_3 试液,105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件与专属性试验 色谱柱为 Waters 柱 Symmetry[®] C₁₈ (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.2% 磷酸梯度洗脱(B), (0 min: 15: 85, 10 min: 18: 82, 25 min: 18: 82, 26 min: 20: 80); 流速为 1 ml/min; 检测波长为 328 nm; 色谱柱温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

在上述色谱条件下,分别精密吸取对照品溶液、杏香兔耳风药材供试品溶液 10 μl ,注入色谱仪,记录色谱图。结果见图 1,结果表明 3,5-二咖啡酰基奎宁酸谱峰与周围的杂质峰分离良好。

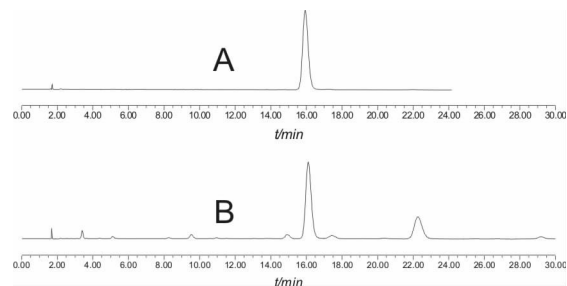


图 1 对照品及样品 HPLC 图

A. 对照品; B. 样品

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取 3,5-二咖啡酰基奎宁酸对照品适量,加 50% 乙醇制成每 1 ml 含 3,5-二咖啡酰基奎宁酸 0.042 mg 的混合对照品溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 称取样品约 30 mg,精密称定,置 25 ml 容量瓶中,加 50% 乙醇加适量,超声 30 min 溶解后,放冷,定容,摇匀,过滤,并定容至刻度,用 1 ml 的移液管移取 1 ml 到 10 ml 容量瓶

中,加 50% 乙醇定容至刻度,即得。

2.2.4 标准曲线的考察 取 3,5-二咖啡酰基奎宁酸浓度为 0.0416 mg/ml 的对照品溶液分别进样 2, 5, 8, 10, 15, 20 μl 。按上述的色谱条件进行测定,以 3,5-二咖啡酰基奎宁酸进样量(μg)为横坐标,峰面积值为纵坐标,求得 3,5-二咖啡酰基奎宁酸回归方程: $Y=4 \times 10^6 X - 2\ 307$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明: 3,5-二咖啡酰基奎宁酸进样量分别在 0.083 ~ 0.830 μg 范围内与峰面积值呈良好线性关系。

2.2.5 精密度试验 取同一供试品溶液,连续进样 6 针,测得 3,5-二咖啡酰基奎宁酸峰面积值的 RSD 为 1.31 % ($n=6$),实验结果表明,仪器的精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取同一批号(20080908)样品,共 6 份,研细,取约 15 mg,精密称定,按“2.2.3”项下方法平行制备供试品溶液,进样,记录色谱图。结果测得,3,5-二咖啡酰基奎宁酸平均含量为 335.983 mg/g, RSD 为 1.71 % ($n=6$),实验结果表明,该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一批号(20080908)供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 18 h 进样,记录色谱峰,测得 3,5-二咖啡酰基奎宁酸峰面积值的 RSD 分别为 1.51%, 实验结果表明,样品溶液稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取已知含量的样品 15 mg(6 份),精密称定,按 100% 的比例各精密加入对照品一定量,按照“2.2.3”项下方法分别制得供试品溶液,进样,记录色谱图,并计算回收率。结果 3, 5-二咖啡酰基奎宁酸平均回收率为 98.55%, RSD 为 0.85% ($n=6$)。结果见表 1。

表 1 3,5-二咖啡酰基奎宁酸加样回收试验结果

序号	样品取样量 /mg	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	15.03	5.050	5.040	10.083	99.86		
2	15.25	5.124	5.040	10.062	97.98		
3	15.33	5.151	5.040	10.079	97.78	98.55	0.85
4	15.04	5.053	5.040	10.054	99.23		
5	15.07	5.063	5.040	10.031	98.57		
6	15.14	5.087	5.040	10.021	97.9		

2.2.9 样品含量测定 取三批(20080908、20081006、20081119)杏香兔耳风提取物,每批提取三份样品,按照“2.2.3”项下方法分别制得供试品

溶液,进样,记录色谱图,测定样品中 3,5-二咖啡酰基奎宁酸的含量,结果见表 2。

表 2 3 批样品含量测定结果

批号	3,5-二咖啡酰基奎宁酸 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
20080908	335.983
20081006	329.073
20081119	332.076

3 讨论

在试验过程中,本研究曾使用过乙酸丁酯-甲酸-水(7:2.5:2.5)的上层液、氯仿-丙酮-甲酸-水(6:5:0.5:0.5)、乙酸乙酯-丁酮-醋酸-水(10:1:1.5:0.5)的上层液为展开剂,结果表明以乙酸丁酯-甲酸-水(7:2.5:2.5)的上层液为展开剂,一次展开就可以使 3,5-二咖啡酰基奎宁酸斑点分离较好,且斑点显色清晰。

由于 3,5-二咖啡酰基奎宁酸分子结构中存在酚羟基,可与 FeCl_3 溶液发生显色,故本研究选择 5% FeCl_3 试液作为 3,5-二咖啡酰基奎宁酸薄层鉴别的显色剂。

本次试验对 3,5-二咖啡酰基奎宁酸进行紫外全波长扫描,在 328 nm 处有最大吸收,样品主峰分离度较好,且阴性样品无干扰,故选择 328 nm 作为检测波长。

杏香兔耳风药材目前的标准只有简单的理化鉴别,还未建立薄层鉴别和有效成分的含量测定标准。3,5-二咖啡酰基奎宁酸为杏香兔耳风中主要的药效成分,故本研究所建立的杏香兔耳风提取植物的质量标准方法可为杏香兔耳风药材质量标准的完善提供科学依据。

参考文献

- [1] 徐为公,徐鹏. 中药提取物的国际化策略[J]. 中药研究与信息, 2005,7(10):34.
- [2] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志 79 卷[M]. 北京:科学出版社,1996:23.
- [3] 中华本草编委会. 中华本草[M]. 国家中医药管理局,上海:科学技术出版社 1999:6 682.
- [4] 李祖晨,朱志安. 二咖啡酰基奎宁酸药理实验研究进展[J]. 医学综述,2004,10(4):249-250.

(收稿日期:2009-09-09)

专题征稿

《江西中医药》为中医药核心期刊,新设重点栏目《明医心鉴》,以介绍名老中医经验和中医临证心得为主,重点刊载中医关于疑难病的诊疗经验,要求观点、方法新,经验独到。涉及的病种主要有:小儿麻痹后遗症、红斑狼疮、类风湿性关节炎、慢性肾炎、哮喘、糖尿病、老年痴呆、高血压、中风、盆腔炎、萎缩性胃炎、癌症疼痛。欢迎广大中西医临床工作者不吝赐稿。