

时间)三个水平间对实验结果影响都是实验误差所致,煎煮次数(C)是提取工艺的主要影响因素。由表2可选出最佳工艺为A₂B₂C₃;从表3的方差分析结果可以得知:A、B、C三个因素各水平对实验结果均无显著性差异。因此,确定最佳工艺为A₂B₂C₃,即:加14倍量的水,煎煮3次,每次煎30 min为最优提取工艺。

2.1.5 最佳提取工艺验证实验 按筛选出的最佳提取工艺A₂B₂C₃,在相同条件下进行3次平行验证实验,所得实验结果详见表4。验证实验结果中的芍药苷含量与正交表最好的结果(5号实验)比较接近,表明优选出的提取工艺稳定可靠。

表4 最佳工艺验证结果

Tab 4 Results of the verification of the best technology

编号	干膏率/%	芍药苷含量 /mg·g ⁻¹
1	19.0	18.3
2	18.7	18.8
3	19.2	18.6

2.2 洗面奶成型工艺的研究

2.2.1 中药液的制备 按上面筛选出的最佳提取工艺来提取药液,然后,浓缩提取液至1:2.5。

2.2.2 最佳乳化条件的研究 经预试,乳化温度、载药量及乳化剂对洗面奶的制备影响较大,但考虑到乳化剂的用量已经较大,故在初步选出的洗面奶配方的基础上分别对温度和载药量进行单因素试验。结果见表5和表6。

表5 乳化温度单因素试验结果

Tab 5 Results of single factor experiments of emulsifying temperature

温度/℃	含药液量/%	结果
70~75	65	乳化效果稍差,产品乳化不匀、粗糙,离心分层
75~80	65	乳化效果一般,离心轻微分层
80~85	65	乳化效果较理想,均匀细腻,离心轻微分层

表6 载药量单因素试验结果

Tab 6 Results of single factor experiments of drug loading

药液含量/%	温度/℃	结果
70	80~85	乳化效果一般,产品的稠度太低,离心分层
65	80~85	乳化效果较好,离心轻微分层
60	80~85	乳化效果好,离心不分层

从表5与表6得知,制备洗面奶的最佳温度为80℃~85℃左右,最佳的载药量为60%。

2.3 最佳乳化条件的验证实验

按选出的制备洗面奶的最佳乳化条件进行3次平行实验,按QB/T 1645-2004标准,对洗面奶进行感观和理化指标方面的检查,结果均符合规定,详见表7。

表7 最佳乳化条件的验证实验结果

Tab 7 Results of the verification of the optimum emulsifying condition

项目	1	2	3
感观指标			
色泽	淡黄棕色	淡黄棕色	淡黄棕色
香气	清香气	清香气	清香气
质感	均匀	均匀	均匀
理化指标			
耐热	无油水分离现象	有轻微油水分离现象	无油水分离现象
耐寒	无油水分离现象	无油水分离现象	无油水分离现象
pH	5.31	5.30	5.41
离心分离	无油水分离现象	无油水分离现象	无油水分离现象

3 讨论

本消痘洗面奶制剂工艺稳定、合理可行。

为了使所得产品洗面奶的外观色泽较浅些,曾尝试用活性炭对中药煎出液进行脱色,但结果发现:脱色后药液中的芍药苷含量明显减少。表明活性炭在吸附色素的同时,也吸附了药液中的有效成分。因此,中药液的脱色问题有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] YANG L, QIAN J, CHEN Y Y. Research on treating acne vulgaris by Qing Fei Yu Zhuo Wan [J]. Chin J Pract Chin Modem med (中华实用中西医杂志), 2004, 17 (4): 3189-3191.
- [2] SHU T. Advance of modern study on acne vulgaris [J]. Mod Tradit Chin Med (现代中医药), 2006, 26 (1): 56-57.
- [3] Guangxi zhuang minority Autonomous region Board of Health Selected Materia Medica of Guangxi (广西本草选修) [M]. Nanning: Guangxi People Press, 1974: 940.
- [4] Ch. P (2005) Vol II (中国药典 2005年版, 一部) [S]. 2005: 109.

收稿日期: 2007-07-18

不同产地白花蛇舌草中对香豆酸含量测定的快速方法

唐旭利¹, 刘静², 李国强^{1*}, 邱培菊¹, 钟惠民² (1. 中国海洋大学, 山东 青岛 266003; 2. 青岛科技大学, 山东 青岛 266042)

摘要: 目的 建立实用的不同产地白花蛇舌草中对香豆酸的高效液相色谱含量测定方法。方法 采用 Agilent Eclipse×DB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 230 nm, 柱温 30℃, 进样量 20 μL, 测定了 6 批不同来源的白花蛇舌草药材。结果 线性范围 4~64 μg·mL⁻¹, r=0.9998, 平均回收率 (n=6) 为

基金项目: 863 科技计划 (2004AA621020) 和青岛市自然科学基金 (05-2-JC-56) 资助

作者简介: 唐旭利, 女, 高级工程师 * 通讯作者: 李国强, 男, 教授, 博士生导师 Tel: (0532) 52032323 E-mail: liquoqian@ouc.edu.cn

A Rapid Method for the Quantitative Determination of p-Coumaric Acid in *Hedyotis diffusa* from Different Sources

TANG Xu-li¹, LU Jing², LI Guo-qiang^{1*}, QU Pei-ju¹, ZHONG Huimin² (1. Ocean University of China, Qingdao 266003 China; 2. Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish a practical HPLC method for the determination of p-coumaric acid in *Hedyotis diffusa* Willd. **METHODS** The chromatographic conditions included Agilent Eclipse DB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphate solution, column temperature of 30 °C, flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, wavelength of 230 nm, and inject volume of 20 μL. **RESULTS** The linear range was 4-64 μg·mL⁻¹ (r=0.9998), the average recovery (n=6) was 96.8%, and the relative standard deviation (RSD) was 0.22%. **CONCLUSION** The method is rapid and simple with good precision and reproducibility. It can be used for quality control of *Hedyotis diffusa* Willd.

KEY WORDS *Hedyotis diffusa* Willd.; p-coumaric acid; HPLC

白花蛇舌草为茜草科 (Rubiaceae) 植物白花蛇舌草 (*Hedyotis diffusa* Willd) 的干燥或新鲜全草, 别名蛇舌草、蛇针草、二叶律、白花十字草、龙舌草、鹤舌草等, 一般生长于亚热带地区, 我国主要分布在广东、广西、云南、福建、江苏、浙江等省。具有清热解毒、活血化痰、利湿通淋之功效, 民间和临床常用于治疗肿瘤、黄疸性肝炎、肠炎、肺炎等疾病^[1]。白花蛇舌草主要含蒽醌、黄酮、三萜、环烯醚、苷类、甾醇等化学成分^[2,3], 一般认为其有机酸成分齐墩果酸、熊果酸和对香豆酸为其主要有效成分。文献关于白花蛇舌草药材和制剂质量控制研究, 多选择齐墩果酸和熊果酸为指标成分, 而利用对香豆酸做为含量测定指标的报道相对较少, 且流动相中多采用有机盐调节峰形, 易造成仪器故障^[4-6]。为了建立方便快捷实用的对香豆酸含量测定方法, 笔者运用 Agilent 1100 高效液相色谱仪, 采用乙腈-磷酸溶液体系, 优化了色谱条件, 指标成分对香豆酸出峰时间短, 分离度好。本方法方便实用、准确、快速, 可作为药材白花蛇舌草水溶性成分的质量控制方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (配备 G1379A 脱气机, G1311A 四元泵, G1313A 自动进样仪, G1316A 柱温箱, G1315B DAD), BS124S 电子天平, 德国 Heidolph 旋转蒸发仪。

乙腈 (色谱纯, Fisher); 甲醇 (色谱纯, Burdick & Jackson); 磷酸 (色谱纯, 天津科密欧化学开发中心); 水, 娃娃哈纯净水。

对香豆酸对照品 (p-coumaric acid 购自 Sigma 公司, 批号 065K1298, 纯度 ≥ 98.0%)。

6批白花蛇舌草药材分别购自于广东、江苏、浙江等不同省区, 经山东中医药大学中药鉴定室周凤琴教授鉴定均为正品白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd.

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Zorbax XDB C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 230 nm, 进样量 20 μL, 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液梯度洗脱, 洗脱程序见表 1。

表 1 乙腈-0.1% 磷酸水梯度洗脱程序

时间 /min	乙腈 - 0.1% 磷酸水
5	5:95
20	10:90
25	15:85
30	95:5

2.2 提取工艺优化

采用均匀设计法, 以对香豆酸峰面积、干浸膏得率为指标, 考察了药材的提取溶剂、料液比、提取温度、提取时间等因素对提取工艺的影响。确定白花蛇舌草优化的提取工艺条件为: 水为提取溶剂, 料液比 1:100, 提取温度 95 °C, 提取时间 4 h。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取 0.5 g 粉碎过 40 目筛的白花蛇舌草药材, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 加水 50 mL, 在 95 °C 下回流提取 4 h 过滤, 浓缩, 加水定容至 25 mL, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 备用。

2.4 对照品溶液的制备

取经五氧化二磷真空干燥 24 h 的对香豆酸 10 mg 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解, 定容至刻度, 配成 0.2 mg·mL⁻¹ 的溶液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 备用。

2.5 标准曲线的制备

分别精密吸取上述浓度为 0.2 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液

0.5, 2, 4, 6, 8, 10 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 配置成浓度为 4, 16, 32, 48, 64 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 系列浓度溶液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 分别进样 20 μL 。以对照品溶液质量浓度 C ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 峰面积 A 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程: $A = 21.619C - 1.6652$ ($r = 0.9998$), 表明对香豆酸在 4~64 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内, 呈良好线性关系。

2.6 重复进样精密度试验

将对香豆素对照品溶液 (8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 连续进样 6 次, 每次 20 μL , 其峰面积的 RSD 值为 1.2%, 表明仪器的精密度良好。

2.7 稳定性试验

取新制备的同一份供试品溶液, 分别在放置 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 时进样分析, 计算的对香豆素的相对峰面积 RSD 为 0.8%, 表明供试品溶液在室温下放置 24 h 稳定。

2.8 回收率试验

分别精密称定粉碎过 40 目筛的 6 批白花蛇舌草药材各 0.5 g 加入精确质量的对香豆酸对照品, 按“2.3”项方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 对香豆酸平均回收率为 96.86%, RSD = 0.22% ($n = 6$)。

2.9 含量测定

取 6 份不同来源的白花蛇舌草药材, 按“2.3”项方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定。对香豆酸色谱峰与相邻色谱峰之间分离度大于 2.0 以对香豆酸计, 理论塔板数不小于 10 000。样品溶液及对照品的色谱图见图 1。结果见表 2。

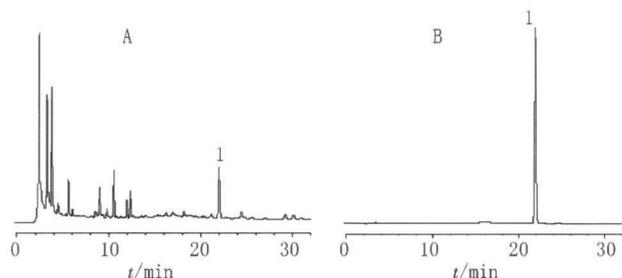


图 1 样品溶液 (A - 6 号样) 和对照品 (B - 对香豆酸) 的色谱图

Fig 1 Chromatograms of sample (A - No. 6) and standard (B - p-coumaric acid)

表 2 不同来源白花蛇舌草药材中对香豆酸含量测定结果

Tab 2 Contents of p-coumaric acid in different *Hedyotis diffusa* Willd. samples

样品号	样品来源	购买时间	对香豆酸含量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
1	广东广州国大药房	2005.11	1.441
2	湖南长沙同健大药房	2005.11	0.657
3	江苏苏州济世堂医药商店	2005.11	0.828
4	浙江杭州延寿堂药店	2005.11	1.524
5	四川成都九鼎药房	2005.11	0.698
6	山东青岛同仁堂大药房	2005.11	0.472

3 讨论

3.1 流动相的选择

对香豆酸属酚酸类成分, 在 HPLC 分析中色谱峰常形成脱尾, 影响含量测定精度。虽有文献报道^[6,8]采用 NH_4Ac 改善峰形, 但在实际运用中, 流动相中的盐类成分易造成仪器腐蚀损坏。采用磷酸抑制脱尾, 可收到同样效果, 并对仪器损害较小, 利于长时间分析测定。

3.2 提取工艺

药材的提取工艺是客观反映所测定成分含量的重要步骤之一。与正交设计相比, 均匀设计方法在多因素、多水平工艺考察中更具有优越性。均匀设计的实验点在实验范围内仅要求充分的“均匀分散”, 舍弃了实验点的整齐性, 同时可照顾到试验结果评判分析的多指标权重, 因此, 均匀设计法更适合精准的工艺条件优化研究。

3.3 含量测定

不同来源白花蛇舌草中对香豆酸的含量测定结果表明, 商品白花蛇舌草药材中对香豆酸含量差异较大, 以广东、浙江含量较高, 与道地野生药材的自然分布规律一致。

REFERENCES

- [1] HUANG H L, LUO G M, LU X W, *et al*. Progress in research of *Hedyotis diffusa* Willd [J]. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med* (世界科学技术 - 中医现代化), 2003, 5(6): 37-38
- [2] CUI J, SHI S S, WANG S C, *et al*. Recent development of studies on the chemical constituents and pharmacological functions of *Oldenlandia diffusa* Willd [J]. *Shanghai JT radit Chin Med* (上海中医药杂志), 2005, 39(7): 57-59
- [3] LU P, DAI Q H. Summarization on the chemical constituents of *Oldenlandia diffusa* Willd [J]. *J Beijing Univ Technol* (北京工业大学学报), 2000, 26(3): 68-72
- [4] ZHANG C H, GUO X J, LI F, *et al*. HPLC determination of the contents of oleanolic acid and ursolic acid in *Hedyotis diffusa* Willd [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2004, 21(5): 358-360
- [5] TAN N H, WANG S M, YANG Y B, *et al*. Anticancer activity and principles of *Hedyotis diffusa* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2002, 14(5): 33-36
- [6] ZHANG C H, GUO X J, BAO L D, *et al*. Determination of p-coumaric acid in *Hedyotis diffusa* Willd from different Sources by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2005, 23(2): 180-182
- [7] LIU S S, JIN X Q, GAO D. Study on extraction methods of p-coumaric acid in *oldenlandia diffusa* (willd) Roxb and determine the content by HPLC [J]. *Special Willd Economic Animal and Plant Research* (特产研究), 2006, (1): 21-24.
- [8] ZHANG C H, GUO X J, XUE X F, *et al*. Determination of p-coumaric acid in *Baihua Sheshcao* injection by HPLC [J]. *Chin J Pharm* (中国药学杂志), 2004, 39(11): 854-855

收稿日期: 2007-07-12