

RP-HPLC法测定香加皮中异香草醛、 杠柳毒苷和 4-甲氧基水杨醛的含量

佟玲, 谭晓杰, 林景瑞, 陈晓辉, 毕开顺*

(沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

摘要 目的: 建立同时测定香加皮中异香草醛、杠柳毒苷和 4-甲氧基水杨醛含量的方法。方法: 采用 RP-HPLC 法, Hypersil ODS₂ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 大连依利特); 流动相为乙腈 (A) - 0.02% 磷酸水溶液 (B) 系统, 梯度洗脱 [0~10 min, 85% B; 10~40 min, 85% B → 70% B; 40~60 min, 70% B → 50% B]; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长为 230 nm。结果: 异香草醛、杠柳毒苷和 4-甲氧基水杨醛进样浓度分别在 1.65~13.7, 5.91~49.2, 4.97~99.4 μg · mL⁻¹ 范围内与峰面积呈良好的线性关系 (r 分别为 0.9996, 0.9994, 0.9996); 方法回收率 ($n=9$) 分别为 101.7%, 99.5%, 99.9%。结论: 该方法简便、准确, 重复性好, 适用于香加皮中异香草醛、杠柳毒苷和 4-甲氧基水杨醛的定量分析。

关键词: 香加皮; 反相高效液相色谱法; 异香草醛; 杠柳毒苷; 4-甲氧基水杨醛

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)06-0961-03

RP-HPLC determination of isovanillin, periplocin and 4-methoxy salicylaldehyde in root bark of Cortex Periplocae

TONG Ling TAN Xiao-jie LIN Jing-rui CHEN Xiao-hui BIKai-shun*

(Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016 China)

Abstract Objective To establish a method for simultaneous determination of isovanillin, periplocin and 4-methoxy salicylaldehyde in Cortex Periplocae. **Methods** The analysis was performed on a Hypersil ODS₂ column (250 mm 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile (A) and 0.02% aqueous phosphoric acid (B), with gradient program adopted as follows: 0~10 min, 85% B; 10~40 min, 85% B → 70% B; 40~60 min, 70% → 50% B. The flow rate was maintained at 1.0 mL · min⁻¹ and the detection wavelength was set at 230 nm. **Results** The linear response ranges were 1.65~13.7 μg · mL⁻¹ for isovanillin ($r=0.9996$), 5.91~49.2 μg · mL⁻¹ for periplocin ($r=0.9994$) and 4.97~99.4 μg · mL⁻¹ for 4-methoxy salicylaldehyde ($r=0.9996$). The recoveries ($n=9$) of these compounds were 101.7%, 99.5% and 99.9%, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible for quality control of Cortex Periplocae.

Key word: Cortex Periplocae; RP-HPLC; isovanillin; periplocin; 4-methoxy salicylaldehyde

香加皮又名北五加皮、杠柳皮, 为萝藦科植物杠柳 *Periploca sepium* Bge. 的干燥根皮。香加皮味辛、苦、温; 有毒, 归肝、肾、心经, 可祛风湿、强筋骨, 用于治疗风湿痹痛、腰膝酸软、心悸气短、下肢浮肿。现代临床用于治疗风湿性关节炎、乳癌等; 其总皂苷治疗慢性充血性心力衰竭效果显著。香加皮的主要化学成分包括皂苷类、强心苷类以及香气成分^[1]。中国药典 2005 年版中只有 4-甲氧基水杨醛的 HPLC 含量测定方法^[2], 文献亦有报道药材中杠柳毒苷的

含量测定方法^[3], 但未见有关香加皮中异香草醛及异香草醛、杠柳毒苷、4-甲氧基水杨醛这 3 种成分同时定量分析方法的报道。本文首次建立了同时测定香加皮中异香草醛、杠柳毒苷和 4-甲氧基水杨醛含量的 RP-HPLC 法, 为评价香加皮药材质量提供了可靠依据。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10AD 高效液相色谱仪; SPD-10A 紫外检测器; CLASS-LC10 AT 色谱工作站。

* 通讯作者 Tel: (024) 23986016 E-mail: bikaishun@yahoo.com.cn

对照品异香草醛、杠柳毒苷和 4-甲氧基水杨醛均为沈阳药科大学药物分析教研室自制, ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 图谱经文献^[4,5]确证, HPLC 峰面积归一化法计算纯度均大于 98.5%。香加皮由江西、黑龙江和山东等地购得, 经沈阳药科大学孙启时教授鉴定。乙腈和磷酸均为色谱纯, 提取用甲醇为分析纯, 水为二次蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品储备液配制 取对照品异香草醛、杠柳毒苷和 4-甲氧基水杨醛适量, 精密称定, 分别加甲醇溶解并稀释成浓度为 0.055, 0.197, 0.497 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单一对照品储备液。

2.1.2 供试品溶液制备 取香加皮样品各约 0.5 g 精密称定, 过 40 目筛, 置 25 mL 锥形瓶中, 以甲醇溶液 5 mL 超声 (功率 28 W) 提取 3 次, 每次 20 min, 滤过, 合并滤液并回收溶剂, 残渣用甲醇溶解并定容于 25 mL 量瓶中, 摇匀, 即得。

2.2 色谱条件 色谱柱: Kromasil C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A) - 0.02% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱 [0~10 min 85% B; 10~40 min, 85% B $\rightarrow$ 70% B; 40~60 min 70% B $\rightarrow$ 50% B]; 流速: 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 紫外检测: 230 nm; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。对照品及样品色谱图见图 1。

2.3 线性关系考察 分别精密量取异香草醛对照品储备液 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL; 杠柳毒苷对照品储备液 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL; 4-甲氧基水杨醛对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 2.0 mL, 将上述溶液一一对应地置于同一 10 mL 量瓶中, 以甲醇定容至刻度, 摇匀。分别取上述系列对照品混合溶液 20 μL 进样, 在上述色谱条件下分析。以对照品溶液浓度 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线并进行回归分析, 得异香草醛、杠柳毒苷和 4-甲氧基水杨醛标准曲线回归方程分别为:

$$Y = 1.295 \times 10^5 X - 6.32 \times 10^2 \quad r = 0.9996$$

$$Y = 1.881 \times 10^4 X - 7.88 \times 10^2 \quad r = 0.9994$$

$$Y = 7.226 \times 10^4 X - 4.40 \times 10^2 \quad r = 0.9996$$

异香草醛、杠柳毒苷和 4-甲氧基水杨醛浓度分别在 1.65~13.7 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 5.91~49.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 4.97~99.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性良好。

2.4 精密度试验 精密吸取异香草醛 (8.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、杠柳毒苷 (29.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 4-甲氧基水杨醛 (39.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 混合对照品溶液 20 μL 注入

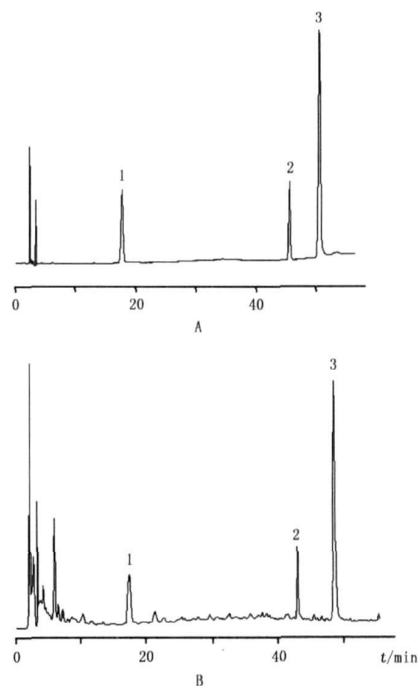


图 1 对照品 (A) 和山西榆次产地样品 (B) 色谱图

Fig 1 Chromatograms of reference substance (A) and sample from Yuci Shanxi (B)

1. 异香草醛 (isovanillin) 2. 杠柳毒苷 (periplocin) 3. 4-甲氧基水杨醛 (4-methoxy salicylaldehyde)

高效液相色谱仪, 重复 6 次, 测得峰面积, 计算异香草醛、杠柳毒苷和 4-甲氧基水杨醛的峰面积平均值分别为 748194, 539602, 2703358, RSD 分别为 1.9%, 1.1%, 1.7%。

2.5 重复性试验 取辽宁沈阳样品, 按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份溶液, 取 20 μL 进样分析, 异香草醛、杠柳毒苷和 4-甲氧基水杨醛含量平均值分别为 0.305, 1.085, 2.020 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD 分别为 3.0%, 3.4%, 2.7%。

2.6 回收率试验 取辽宁沈阳已知含量的香加皮样品约 0.25 g 精密称定, 共 9 份, 分别精密加入 139 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 异香草醛对照品溶液 0.3, 0.6, 0.9 mL; 258 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 杠柳毒苷对照品溶液 0.5, 1.0, 1.5 mL; 497 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 4-甲氧基水杨醛对照品溶液 0.5, 1.0, 1.5 mL。按“2.1.2”项下方法制备溶液并测定, 结果异香草醛低、中、高浓度回收率 ($n=3$) 分别为 101.4% (RSD = 0.7%), 102.3% (RSD = 1.1%), 101.4% (RSD = 2.1%), 平均值 ($n=9$) 为 101.7%; 杠柳毒苷低、中、高浓度回收率 ($n=3$) 分别为 101.6% (RSD = 2.1%), 100.0% (RSD = 0.8%), 96.8% (RSD = 1.5%), 平均值 ($n=9$) 为 99.5%; 4-甲氧基水杨醛低、中、高浓度回收率 ($n=3$) 分别为 101.4% (RSD = 0.7%), 102.3% (RSD = 1.1%), 101.4% (RSD = 2.1%), 平均值 ($n=9$) 为 101.7%。

= 3) 分别为 102.1% (RSD = 1.2%), 99.7% (RSD = 1.3%), 98.0% (RSD = 2%), 平均值 ($n = 9$) 为 99.9%。

2.7 样品测定 取香加皮样品 0.5 g 精密称定, 按“2.1.2”项下方法制得供试品溶液, 在上述色谱条件下进行 HPLC 分析, 按标准曲线计算 11 个产地香加皮药材中异香草醛、杠柳毒苷和 4-甲氧基水杨醛的含量, 测定结果见表 1。

表 1 香加皮中异香草醛、杠柳毒苷和 4-甲氧基水杨醛的含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab 1 Determination of isovanillin, periplocin and 4-methoxy salicylaldehyde in Cortex Periplocae

产地 (origin)	异香草醛 (isovanillin)	杠柳毒苷 (periplocin)	4-甲氧基水杨醛 (4-methoxy salicylaldehyde)
山西榆次 (Yuci Shanxi)	0.307	1.547	3.353
河南焦作 (Jiaozuo Henan)	0.294	0.794	1.719
陕西西安 (Xi'an Shaanxi)	0.184	0.725	1.857
河北保定 (Baoding Hebei)	0.269	1.435	3.093
吉林延吉 (Yanji Jilin)	0.279	1.144	2.384
甘肃兰州 (Lanzhou Gansu)	0.307	1.412	3.231
浙江宁波 (Ningbo Zhejiang)	0.253	0.655	2.421
山东青岛 (Qingdao Shandong)	0.303	1.429	2.772
黑龙江哈尔滨 (Harbin Heilongjiang)	0.325	0.699	3.059
辽宁沈阳 (Shenyang Liaoning)	0.281	1.147	2.382
辽宁丹东 (Dandong Liaoning)	0.272	0.651	2.098

3 讨论

3.1 本实验采用超声提取法考察了水、不同浓度甲醇和乙醇的提取效率, 结果表明甲醇提取效率最高。以甲醇为提取溶剂, 考察了超声、回流、冷浸以及索式提取 4 种提取方法, 每种方法平行做 2 份。结果表明超声提取效率最高。

3.2 采用正交实验设计, 以异香草醛、杠柳毒苷和 4-甲氧基水杨醛的含量为检测指标, 选择溶剂用量 (A)、提取时间 (B) 和提取次数 (C) 3 个因素, 每个

因素 3 水平建立 $L_9(3^4)$ 正交表进行考察, 其中 A 因素各水平分别为 10、15、20 倍; B 因素各水平分别为 5、10、20 min; C 因素各水平分别为 1、2、3 次。正交实验结果表明提取次数和提取时间对异香草醛和 4-甲氧基水杨醛有显著影响, 溶剂倍数对异香草醛和 4-甲氧基水杨醛均无显著影响。根据方差分析结果, 参考直观分析结果, 确定最佳提取工艺为 10 倍量 90% 甲醇为溶剂超声提取 3 次, 每次 20 min, 通过验证实验判断最佳提取工艺的可靠性和合理性。

3.3 经紫外扫描, 异香草醛、杠柳毒苷和 4-甲氧基水杨醛的最大吸收波长分别为 230、227、276 nm。由于药材中异香草醛含量最低, 且杠柳毒苷和 4-甲氧基水杨醛在 230 nm 波长处仍有较强的吸收, 为保证检测的灵敏度, 选择 230 nm 作为测定波长。

3.4 本实验首次建立了采用高效液相色谱同时测定香加皮中异香草醛、杠柳毒苷和 4-甲氧基水杨醛的分析方法, 方法简便、准确, 重复性好, 可以为香加皮药材的质量控制提供依据。

参考文献

- 1 ZHANG Yuan-hu (张援虎), WANG Feng-peng (王锋鹏). Recent advances of chemical constituents of *Periploca* plants (杠柳属植物化学成分研究进展). *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2003, 15(2): 157
- 2 ChP (中国药典). 2005. Vol I (一部): 181
- 3 LIU Hong (刘虹), PAN Gui-xiang (潘桂湘), GAO Xiu-mei (高秀梅), et al. Determination of content of periplocin in Cortex Periplocae by HPLC (HPLC 法测定香加皮中杠柳毒苷的含量). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(5): 578
- 4 WANG Qi-zhi (王奇志), LIANG Jing-yu (梁敬钰), CHEN Jun (陈军). Chemical constituents of *Evodia rutecarpa* II (吴茱萸化学成分研究 II). *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2005, 36(6): 520
- 5 XU Jun-ping, Takeya Koichi, Itokawa Hideji. Pregnanes and cardenolides from *Periploca spium*. *Phytochemistry*, 1990, 29(1): 344

(本文于 2008 年 8 月 20 日修改回)