

# 一测多评法同时测定冬凌草片中冬凌草甲素、冬凌草乙素和迷迭香酸的含量

刘亚楠\* (河南省食品药品检验所, 郑州 450003)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)09-1267-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.09.36

**摘要** 目的:建立同时测定冬凌草片中冬凌草甲素、冬凌草乙素和迷迭香酸含量的方法。方法:采用高效液相色谱切换波长法,以冬凌草甲素为基准峰,分别计算冬凌草乙素和迷迭香酸与冬凌草甲素的相对校正因子,用校正因子计算冬凌草乙素和迷迭香酸的含量。色谱柱为Phenomenex C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.2%磷酸(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为239(0~20 min,冬凌草乙素)、329(20~25 min,迷迭香酸)、239 nm(25~49 min,冬凌草甲素),柱温为40℃,进样量为10 μl。结果:冬凌草甲素、冬凌草乙素和迷迭香酸检测进样量线性范围分别为41.6~623.4( $r=0.999\ 9$ )、13.8~207.2( $r=0.999\ 9$ )、36.8~552.0 ng( $r=0.999\ 9$ );精密性、稳定性、重复性试验的RSD<3%;加样回收率分别为99.6%~102.5%(RSD=1.1%, $n=6$ )、98.8%~101.4%(RSD=1.0%, $n=6$ )、99.0%~102.5%(RSD=1.5%, $n=6$ )。结论:该方法操作简便、稳定、重复性好,可用于同时测定冬凌草片中冬凌草甲素、冬凌草乙素和迷迭香酸的含量。

**关键词** 冬凌草片;切换波长;一测多评;冬凌草甲素;冬凌草乙素;迷迭香酸

## Simultaneous Determination of Oridonin, Ponicedin and Rosemary Acid in Donglingcao Tablet by Multi-components Quantitative Analysis by One Marker

LIU Ya'nan(Henan Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou, 450003, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of oridonin, ponicedin and rosemary acid in Donglingcao tablet. METHODS: With the reference peak of oridonin, HPLC with changewavelength method was conducted to calculate the relative correction factors of ponicedin and rosemary acid, which were used to calculate the contents of ponicedin and rosemary acid. The column was Phenomenex C<sub>18</sub> with mobile phase of acetonitrile - 0.2% phosphoric acid (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 239 nm (0-20 min, ponicedin), 329 nm (20-25 min, rosemary acid), 239 nm (25-49 min, oridonin), the column temperature was 40℃, and the injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 41.6-623.4 ng ( $r=0.999\ 9$ ) for oridonin, 13.8-207.2 ng ( $r=0.999\ 9$ ) for ponicedin, 36.8-552.0 ng ( $r=0.999\ 9$ ) for rosemary acid. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3%, recovery was 99.6%-102.5% (RSD=1.1%,  $n=6$ ), 98.8%-101.4% (RSD=1.0%,  $n=6$ ), 99.0%-102.5% (RSD=1.5%,  $n=6$ ). CONCLUSIONS: The method is simple, stable and reproducible, and can be used for the simultaneous determination of oridonin, ponicedin and rosemary acid in Donglingcao tablet.

**KEYWORDS** Donglingcao tablets; Changewavelength; Multi-components quantitative analysis by one marker; Oridonin; Ponicedin; Rosemary acid

冬凌草片为冬凌草的单方制剂,具有清热解毒的作用,临床常用于急、慢性扁桃腺炎和咽炎、喉炎及口腔炎的治疗。冬凌草中的主要有效成分为二萜类成分冬凌草甲素、冬凌草乙素和水溶性成分迷迭香酸等<sup>[1]</sup>。现行法定标准收载于2010年版《中国药典》(一部)<sup>[2]</sup>,以单一指标成分冬凌草甲素进行含量测定;另多有文献记载了外标法测定冬凌草片中冬凌草甲素和迷迭香酸等多种成分含量<sup>[3-4]</sup>。从现今研究水平来看,单一指标成分的控制已不能全面反映药品的质量和疗效。多成分测定是发展趋势,一测多评是进行多成分含量测定的有效途径。因此,本试验建立了基于冬凌草片指纹图谱<sup>[5]</sup>的一测多评的定量方法,并对其准确性和可行性进行了评价。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1100型系列高效液相色谱仪,包括紫外检测器(美国Agilent公司);XR 205SM-DR型电子天平(瑞士Precisa公司);SK250H型超声清洗仪(上海科导超声仪器有限公司)。

\* 主管中药师。研究方向:中药分析。电话:0371-63388285。E-mail: zyslyn@126.com

## 1.2 药品与试剂

冬凌草片[济源市济世药业有限公司,批号:20121118、1406005,剂型:薄膜衣片(0.26 g/片)、糖衣片(片芯质量:0.25 g/片)];安阳路德药业有限责任公司,批号:131005,剂型:薄膜衣片,规格:0.25 g/片];冬凌草甲素对照品(批号:111721-200602,纯度>98%)、迷迭香酸对照品(批号:111871-201203,纯度>98%)均购于中国食品药品检定研究院;冬凌草乙素对照品(南京泽郎医药科技有限公司,批号:20150202,纯度≥98%);乙腈为色谱纯,甲醇、磷酸均为分析纯,水为去离子纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 原理<sup>[6-8]</sup>

设样品中冬凌草甲素的峰面积为 $A_1$ ,质量浓度为 $c_1$ ,则 $f_1=A_1/c_1$ ;冬凌草乙素峰面积为 $A_Y$ ,质量浓度为 $c_Y$ ,则 $f_Y=A_Y/c_Y$ ;迷迭香酸峰面积为 $A_M$ ,质量浓度为 $c_M$ ,则 $f_M=A_M/c_M$ 。那么,冬凌草乙素与冬凌草甲素的相对校正因子 $f_{Y1}=f_Y/f_1=(A_Y \times c_1)/(c_Y \times A_1)$ ,由此可得冬凌草乙素 $c_Y=f_{Y1} \times c_1 \times A_1/A_Y$ 。同理,迷迭香酸与冬凌草甲素的相对校正因子 $f_{M1}=f_M/f_1=(A_M \times c_M)/(c_1 \times A_M)$ ,由此可得

冬凌草乙素  $C_M = f_{JM} \times C_J \times A_M / A_J$

## 2.2 色谱条件

色谱柱: Phenomenex C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.2%磷酸(B), 梯度洗脱(洗脱程序见表1); 流速: 1.0 ml/min。检测波长<sup>[8]</sup>: 0~20 min, 239 nm(冬凌草乙素); 20~25 min, 329 nm(迷迭香酸); 25~49 min, 239 nm(冬凌草甲素)。柱温: 40 °C; 进样量: 10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Relative correction factors of ponicedin and rosemary acid to oridonin

时间, min	A, %	B, %
0	12	88
5	16	84
27	26	74
35	40	60

## 2.3 溶液的制备

2.3.1 混合对照品溶液 分别精密称取冬凌草甲素对照品、冬凌草乙素对照品、迷迭香酸对照品适量, 加甲醇使溶解, 制成每1 ml分别含冬凌草甲素 40 μg、冬凌草乙素 10 μg、迷迭香酸 40 μg的混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液 取样品20片, 除去包衣后研细, 取约0.5 g, 精密称定, 精密加入甲醇50 ml, 称定质量, 超声(功率: 250 W, 频率: 40 kHz)提取40 min, 取出, 放冷, 用甲醇补足减失的质量, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.3 阴性对照溶液 按冬凌草片处方和制备工艺制备缺冬凌草的阴性样品, 并按“2.3.2”项下方法制成阴性对照溶液。

## 2.4 系统适用性试验和专属性试验

精密量取“2.3”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各10 μl, 分别按“2.2”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 详见图1。结果, 供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱对应保留时间处有相应色谱峰, 阴性对照溶液在此保留时间处无相应色谱峰, 表明阴性对照对检测无干扰。理论板数以迷迭香酸峰计不低于4 000, 分离度>1.5。

## 2.5 线性关系考察

精密量取“2.3.1”项下混合对照品溶液1、2、5、10、15 μl, 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以待测成分进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸回归方程分别为 $y=1.398 3x+0.790 3$  ( $r=0.999 9$ )、 $y=1.151 6x-0.063 5$  ( $r=0.999 9$ )、 $y=1.942x+0.002 8$  ( $r=0.999 9$ )。结果表明, 冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸检测进样量线性范围分别为41.6~623.4、13.8~207.2、36.8~552.0 ng。

## 2.6 相对校正因子计算

以冬凌草甲素为标准, 按“2.1”项下公式分别计算冬凌草乙素和迷迭香酸对冬凌草甲素的相对校正因子, 详见表2。

## 2.7 精密度试验

取“2.3.1”项下混合对照品溶液适量, 按“2.2”项下色谱条件连续进样测定6次, 记录峰面积。结果, 冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸峰面积的RSD分别为1.0%、1.5%、0.5% ( $n=6$ ), 表明仪器精密度良好。

## 2.8 稳定性试验

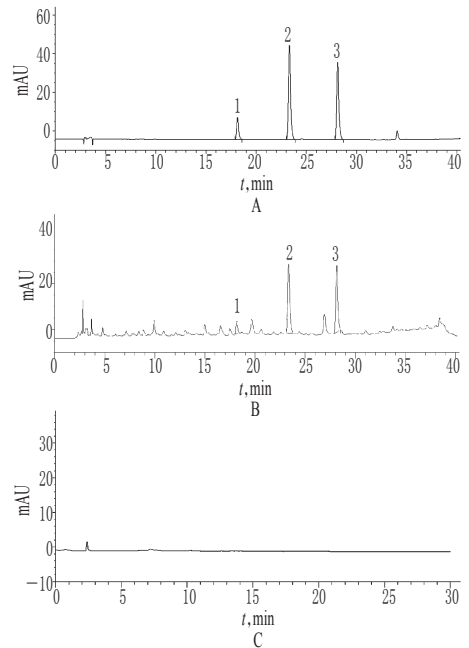


图1 高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 冬凌草乙素; 2. 迷迭香酸; 3. 冬凌草甲素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. test sample; C. negative control; 1. ponicedin; 2. rosemary acid; 3. oridonin

表2 冬凌草乙素和迷迭香酸对冬凌草甲素的相对校正因子  
Tab 2 Relative retention time and relative correction factors measured by different columns

进样体积, μl	$f_{JY}$	$f_{JM}$
1	1.231	0.467
2	1.227	0.470
5	1.232	0.470
10	1.231	0.471
15	1.233	0.468
平均值	1.231	0.469
RSD, %	0.2	0.3

取“2.3.2”项下供试品溶液(批号: 20121118)适量, 分别于放置0、4、8、12、16 h时按“2.2”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸峰面积的RSD分别为1.0%、1.5%、0.5% ( $n=5$ ), 表明供试品溶液在16 h内基本稳定。

## 2.9 重复性试验

精密称取同一批样品(批号: 20121118)适量, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 共6份, 再按“2.2”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸的平均含量分别为0.72、0.13、0.52 mg/片, RSD分别为2.4%、2.3%、2.9% ( $n=6$ ), 表明本方法重复性良好。

## 2.10 加样回收率试验

取已知含量样品(批号: 20121118)适量, 共6份, 分别加入一定量的冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸对照品, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.2”项下色谱条件进样测定, 计算样品含量, 并计算加样回收率, 结果见表3。

表3 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 3 Results of recovery test(n=6)

待测成分	称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
冬凌草甲素	0.269 0	0.772 8	0.782 0	1.574 7	102.5	101.1	1.1
	0.257 1	0.738 6	0.782 0	1.535 1	101.8		
	0.246 8	0.709 1	0.782 0	1.503 1	101.5		
	0.243 5	0.699 6	0.782 0	1.478 3	99.6		
	0.251 0	0.721 1	0.782 0	1.514 8	101.5		
	0.241 8	0.694 7	0.782 0	1.475 7	99.9		
冬凌草乙素	0.269 0	0.142 0	0.131 8	0.274 5	100.5	100.7	1.0
	0.257 1	0.135 7	0.131 8	0.269 4	101.4		
	0.246 8	0.130 3	0.131 8	0.263 6	101.1		
	0.243 5	0.128 5	0.131 8	0.262 0	101.3		
	0.251 0	0.132 5	0.131 8	0.262 7	98.8		
	0.241 8	0.127 6	0.131 8	0.260 6	100.9		
迷迭香酸	0.269 0	0.564 1	0.582 0	1.140 5	99.0	100.8	1.5
	0.257 1	0.539 1	0.582 0	1.132 2	101.9		
	0.246 8	0.517 5	0.582 0	1.093 7	99.0		
	0.243 5	0.510 6	0.582 0	1.101 8	101.6		
	0.251 0	0.526 3	0.582 0	1.123 1	102.5		
	0.241 8	0.507 0	0.582 0	1.092 2	100.5		

2.11 不同品牌色谱柱适应性考察

取“2.3.1”项下混合对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件考察了3个不同品牌的色谱柱,以冬凌草甲素为参照峰,测得冬凌草乙素和迷迭香酸的相对保留时间和相对校正因子,详见表4。

表4 不同色谱柱下的相对保留时间和相对校正因子

Tab 4 Relative retention time and relative correction factor valuer under different chromatographic columns

色谱柱	相对保留时间		相对校正因子	
	冬凌草乙素	迷迭香酸	冬凌草乙素	迷迭香酸
Phenomenex Luna C <sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	0.645	0.830	1.231	0.469
Innovation Explorer C <sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	0.583	0.818	1.242	0.472
Welch ultimate LP C <sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	0.638	0.829	1.235	0.476
平均	0.622	0.826	1.236	0.472

2.12 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,以外标法计算冬凌草片中冬凌草甲素含量,分别采用一测多评法和外标法计算冬凌草片中冬凌草乙素和迷迭香酸的含量,结果见表5。

表5 样品含量测定结果(n=3)

Tab 5 Result of content determination of Samples(n=3)

样品批号	冬凌草甲素, mg/片	冬凌草乙素, mg/片			迷迭香酸, mg/片		
		外标法	一测多评法	相对平均偏差, %	外标法	一测多评法	相对平均偏差, %
131005	0.72	0.132	0.131	0.4	0.524	0.538	1.3
20121118	0.44	0.134	0.133	0.4	0.804	0.826	1.3
1406005	0.44	0.106	0.106	0	0.866	0.890	1.4

结果表明,采用一测多评法和外标法测得的冬凌草片中冬凌草乙素和迷迭香酸的含量基本一致。对于外标法和一测多评法计算结果进行t检验分析, |t| = 2.007, 而当α = 0.05

时, t(1-0.05/2) = 2.571, |t| < t(1-0.05/2)。由此可见,两组结果无显著性差异,说明一标多评方法可行。

3 讨论

本试验对乙腈-磷酸系统进行梯度洗脱条件优化,建立了冬凌草片的指纹图谱,并根据各组分的最优检测波长随保留时间进行变换。本试验考察了不同溶剂、不同超声提取时间对提取效果的影响,结果表明甲醇超声提取40 min时的提取效率最高,且杂质干扰较少。

本试验借鉴中药指纹图谱分析方法和相对保留时间概念,对冬凌草乙素、迷迭香酸与冬凌草甲素的相对保留时间进行定位;通过计算前两者与后者的相对校正因子,采用一测多评法计算样品含量,并与外标法测定结果进行比较,表明两组结果无显著性差异,一标多评法有很好的准确性和可行性。

本试验考察了不同色谱柱的影响,结果表明不同色谱柱对冬凌草乙素和迷迭香酸的相对校正因子影响不大,偏差均在2.5%以内。但由于不同色谱柱的填料不同,会影响各组分的相对保留时间。试验中如有保留时间相近的色谱峰干扰,可通过光谱吸收来帮助确认准确保留时间。冬凌草乙素λ<sub>max</sub>为240 nm,迷迭香酸λ<sub>max</sub>为329 nm。

中药的质量控制近年来多采用指纹图谱、多指标质量评价等技术来体现中药的整体性。但指纹图谱的模糊性、多指标质量评价对照品的昂贵成本及不易得到,给检验监督带来了一定的难度。本试验在指纹图谱的基础上采用1种对照品评价3种成分的含量,不仅能够控制中药质量的整体性,还能节约对照品成本。

参考文献

- [1] 冯卫生,李红伟,郑晓珂,等.冬凌草化学成分进展[J].中国新药杂志,2008,17(23):2 003.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:806.
- [3] 李可强,王坤,张振秋.HPLC切换波长同时测定迷迭香酸和冬凌草甲素的含量[J].中成药,2008,30(4):526.
- [4] 张静,袁珂,金永春,等.UPLC法同时测定冬凌草中5种有效成分的含量[J].药物分析杂志,2011,31(4):641.
- [5] 王坤,李可强,张振秋.冬凌草高效液相指纹图谱研究[J].中药现代应用杂志,2008,25(6):509.
- [6] 王智民,高慧敏,付雪涛,等.“一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J].中国中药杂志,2006,31(23):1 925.
- [7] 文乾映,龙芳,杨华,等.中药质量控制中一测多评法的应用进展[J].中国药房,2014,25(23):2 185.
- [8] 暴凤伟,张振秋,刘玉强,等.波长切换HPLC法同时测定丹参中5种水溶性成分的含量[J].中国药房,2013,24(11):1 002.

(收稿日期:2015-04-08 修回日期:2015-08-23)

(编辑:张 静)