

## HPLC 同时测定奇正消痛贴膏中 3 种成分的含量

袁涛, 王森, 管咏梅, 陈丽华, 吴德智, 朱卫丰\*

(江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

**[摘要]** 目的: 建立 RP-HPLC 同时测定奇正消痛贴膏中山栀苷甲酯、8-*O*-乙酰山栀苷甲酯、2', 4'-二羟基查尔酮的含量。方法: 采用 Synchronis C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈(A)-0.05% 磷酸水梯度洗脱(B)(0~12 min 11% A; 12~17 min, 11%~18% A; 17~25 min, 18% A; 25~40 min, 60% A), 检测波长 235 nm(0~24 min, 检测山栀苷甲酯、8-*O*-乙酰山栀苷甲酯)和 365 nm(24.01~50 min, 检测 2', 4'-二羟基查尔酮)。结果: 在 48 min 内消痛贴膏中的山栀苷甲酯、8-*O*-乙酰山栀苷甲酯、2', 4'-二羟基查尔酮分离良好, 依次在 15.12~90.72 ( $r = 0.9999$ ), 15.90~95.40 ( $r = 0.9999$ ), 4.50~27.00 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9999$ ) 呈良好的线性关系, 平均加样回收率分别为 97.12%, 104.90%, 105.63%。结论: 该方法简便、可靠、重复性好, 适用于测定奇正消痛贴膏中山栀苷甲酯、8-*O*-乙酰山栀苷甲酯、2', 4'-二羟基查尔酮的含量, 可用于制剂质量控制。

**[关键词]** 奇正消痛贴膏; 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯; 2', 4'-二羟基查尔酮; 程序波长法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0072-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190072

## HPLC Wavelength Switching Simultaneous Determination of 3 Active Components in Qizheng Xiaotong Plaster

YUAN Tao, WANG Sen, GUAN Yong-mei, CHEN Li-hua, WU De-zhi, ZHU Wei-feng\*

(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Key Laboratory for Modern Preparation of TCM Ministry of Education, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** The aim of this study was to develop an HPLC method with programmed UV detection wavelength for the simultaneous determination of shanzhiside methyl ester, 8-*O*-acetyl shanzhiside methyl ester and 2', 4'-dihydroxy chalcone in Qizheng Xiaotong plaster. **Method:** The samples were separated on a Synchronis C<sub>18</sub> Dim. (mm) column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) by a linear gradient elution (0-12 min, 11% A; 12-17 min, 11%-18% A; 17-25 min, 18% A; 25-40 min, 60% A) using acetonitrile (A) and 0.05% [phosphoric acid solution] (B) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and the eluate was detected by programmed wavelength (0-24 min, 235 nm for shanzhiside methyl ester, 8-*O*-acetyl shanzhiside methyl ester; 24.01-50 min, 365 nm for 2', 4'-dihydroxy chalcone). **Result:** Shanzhiside methyl ester, 8-*O*-acetyl shanzhiside methyl ester and 2', 4'-dihydroxy chalcone were well separated excellently in less than 48 min within the linear range of 15.12-90.72 mg ( $r = 0.9999$ ), 15.90-95.40 mg ( $r = 0.9999$ ) and 4.50-27.00 mg ( $r = 0.9999$ ), respectively. The average recoveries of the compounds listed above were 97.12%, 104.90%, and 105.63%, respectively. **Conclusion:** Very satisfactory and reproducible results were obtained for the simultaneous determination of the 3 active compounds in Qizheng Xiaotong plaster.

**[Key words]** Qizheng Xiaotong plaster; 8-*O*-acetyl shanzhiside methyl ester; 2', 4'-dihydroxy chalcone

**[收稿日期]** 20131213(017)

**[基金项目]** 江西中医药大学校级研究生创新基金项目(JZYC12B03)

**[第一作者]** 袁涛, 在读硕士, 从事经皮给药系统研究, Tel: 0791-87118614, E-mail: li\_631126@126.com

**[通讯作者]** \*朱卫丰, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 0791-87118614, E-mail: zwf0322@126.com

奇正止痛贴膏是根据藏医传统验方并结合多年临床实践,选用藏族医药特有的天然野生药材独一味、棘豆、姜黄、花椒、水牛角、水柏枝等,应用湿敷剂型及超低温真空脱水冻干技术工艺精制而成的贴膏剂,具有活血化瘀、消肿止痛之效,适用于急慢性扭挫伤、腰肌劳损、风湿及类风湿疼痛等疾病。制剂现收载于《卫生部药品标准中药成方制剂》第十二册中,含量测定采用薄层扫描法测定姜黄素含量,结果误差较大。目前也有报道奇正止痛贴膏中木犀草素、山梔苷甲酯、总环烯醚萜苷的含量测定方法,但其药效成分体现的仍不够全面<sup>[1-4]</sup>。现代药理研究发现<sup>[5-8]</sup>,独一味中的山梔苷甲酯和8-*O*-乙酰山梔苷甲酯、镰形棘豆中的2',4'-二羟基查尔酮均具有显著的镇痛抗炎作用,与制剂的疗效密切相关,测定其含量对于止痛贴膏的质量控制具有重要意义。本文在前人研究的基础上,采用双波长切换法同时测定止痛贴膏中的山梔苷甲酯、8-*O*-乙酰山梔苷甲酯、2',4'-二羟基查尔酮的含量,建立专属性较强的检测方法,为全面控制奇正止痛贴膏的质量提供参考。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪[包括G1322A型在线脱气机、G1311A型四元泵、G1316A型柱温箱、G1314A可变波长检测器(VWD)],BS124S型电子分析天平(Sartorius)。

山梔苷甲酯和8-*O*-乙酰山梔苷甲酯对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号M-0008-130111,120809,经HPLC纯度检查,用归一化法计算,纯度 $\geq 99\%$ ),2',4'-二羟基查尔酮对照品(天津阿法埃莎化学有限公司,经HPLC纯度检查,纯度 $\geq 99\%$ ),乙腈(色谱级,TEDIA公司),水为双蒸水,其他试剂位分析纯。

奇正止痛贴膏(西藏奇正藏药股份有限公司,批号120875,121098,121237,以下简称止痛贴膏)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件**<sup>[9-10]</sup> Synchronis C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),以乙腈(A)-0.05%磷酸水(B)梯度洗脱(0~12 min,11% A;12~17 min,11%~18% A;17~25 min,18% A;25~40 min,60% A),检测波长235 nm(0~24 min,检测山梔苷甲酯、8-*O*-乙酰山梔苷甲酯)和365 nm(24.01~50 min,检测2',4'-二羟基查尔酮),柱温30℃,流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量20 μL。

### 2.2 溶液的制备

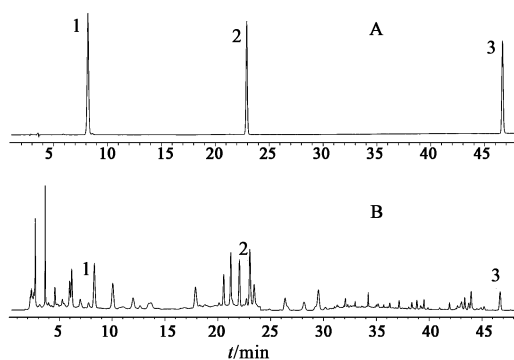
**2.2.1 混合对照品溶液的制备** 取山梔苷甲酯、8-

*O*-乙酰山梔苷甲酯、2',4'-二羟基查尔酮对照品适量,精密称定,用甲醇溶解并稀释成每1 mL含山梔苷甲酯0.756 mg,8-*O*-乙酰山梔苷甲酯0.795 mg,2',4'-二羟基查尔酮0.225 mg的混合对照品溶液,即得。

**2.2.2 供试品溶液的制备**<sup>[9]</sup> 精密称定止痛贴膏内容物粉末约0.8 g,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇25 mL,密塞,称定质量,加热回流1 h,放冷,再称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,用0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

### 2.3 方法学研究

**2.3.1 系统适应性试验** 精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液各20 μL注入液相色谱仪,按2.1项下色谱条件进样测定,见图1。其中山梔苷甲酯、8-*O*-乙酰山梔苷甲酯、2',4'-二羟基查尔酮的保留时间分别为8.15,22.85,46.64 min,分离度良好,不受其他组分的干扰。



1. 山梔苷甲酯;2. 8-*O*-乙酰山梔苷甲酯;3. 2',4'-二羟基查尔酮

图1 混合对照品(A)和奇正止痛贴膏供试品(B)HPLC

**2.3.2 线性关系考察** 精密吸取0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 mL混合对照品溶液,置于10 mL量瓶中,用双蒸水稀释定容,制得6个不同质量浓度的对照品溶液。取上述对照品溶液,按2.1项下色谱条件进样分析,测定峰面积,以峰面积积分值(*Y*)为纵坐标,对照品质量浓度(*X*)为横坐标绘制标准曲线,计算回归方程。结果见表1。

**2.3.3 精密度考察** 精密吸取同一供试品溶液按2.1项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积,结果山梔苷甲酯、8-*O*-乙酰山梔苷甲酯、2',4'-二羟基查尔酮的峰面积RSD分别为0.30%,0.30%,0.49%,表明仪器的精密度良好。

**2.3.4 稳定性考察** 按2.1项下色谱条件精密吸取同一供试品溶液于0,3,6,9,12,15 h进样分析,记录峰面积,结果山梔苷甲酯、8-*O*-乙酰山梔苷甲

表 1 线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/mg·L <sup>-1</sup>
山梔苷甲酯	Y = 23.433X - 14.953	0.999 9	15.12 ~ 90.72
8-O-乙酰山梔苷甲酯	Y = 17.334X - 10.721	0.999 9	15.90 ~ 95.40
2',4'-二羟基查尔酮	Y = 64.050X - 75.613	0.999 9	4.50 ~ 27.00

酯、2',4'-二羟基查尔酮的峰面积 RSD 1.54%, 1.45%, 1.82%, 表明供试品溶液在 15 h 内稳定。

**2.3.5 重复性考察** 取同一批号的消痛贴膏内容物粉末 6 份,按 2.2.2 项下分别制得供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,结果山梔苷甲酯、8-O-乙酰山梔苷甲酯、2',4'-二羟基查尔酮的峰面积 RSD 分别为 1.35%, 1.86%, 1.38%, 表明重复性良好。

**2.3.6 回收率试验** 精密称取已知含量的消痛贴膏内容物粉末 6 份,每份 0.5 g,分别精密加入混和对照品储备液 1.0 mL,按 2.1 项下色谱条件进样分析,记录峰面积,结果山梔苷甲酯、8-O-乙酰山梔苷甲酯、2',4'-二羟基查尔酮的平均回收率分别为 97.12%, 104.90%, 105.63%, 回收率 RSD 分别为 1.84%, 1.94%, 1.84%。

表 2 消痛贴膏中各成分加样回收试验

成分	样品中 量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
山梔苷甲酯	0.575	0.756	1.303	96.29	97.12	1.84
	0.575	0.756	1.334	100.39		
	0.575	0.756	1.300	95.86		
	0.575	0.756	1.316	97.99		
	0.575	0.756	1.303	96.36		
	0.575	0.756	1.300	95.84		
8-O-乙酰	1.150	0.795	2.005	107.54	104.90	1.94
山梔苷甲酯	1.150	0.795	1.984	104.84		
	1.150	0.795	1.993	105.98		
	1.150	0.795	1.961	101.95		
	1.150	0.795	1.992	105.87		
	1.150	0.795	1.970	103.19		
2',4'-二羟 基查尔酮	0.140	0.225	0.394	113.07	105.63	1.84
	0.140	0.225	0.398	114.71		
	0.140	0.225	0.385	109.00		
	0.140	0.225	0.394	112.69		
	0.140	0.225	0.390	111.07		
	0.140	0.225	0.395	113.51		

**2.4 样品含量测定** 分别取 3 批样品,按 2.2.2 项

下方法制备供试品溶液,采用外标法计算山梔苷甲酯、8-O-乙酰山梔苷甲酯、2',4'-二羟基查尔酮的含量。结果见表 3。

表 3 消痛贴膏样品含量测定(n=3)

批号	山梔苷甲酯	8-O-乙酰山梔苷甲酯	2',4'-二羟基查尔酮
120875	1.15	2.30	0.28
121098	1.39	2.75	0.28
121237	1.00	2.22	0.36

### 3 讨论

**3.1 检测波长的选择** 为了实现山梔苷甲酯、8-O-乙酰山梔苷甲酯、2',4'-二羟基查尔酮的同时测定,分别对 3 个对照品溶液在 200 ~ 700 nm 进行紫外扫描,其中山梔苷甲酯、8-O-乙酰山梔苷甲酯在 233, 240 nm 有最大吸收,但 2',4'-二羟基查尔酮的最大吸收波长在 365 nm,难以选择单一波长对这 3 个化合物进行紫外检测。故根据出峰时间,变换检测波长进行测定,兼顾到各成分的最大吸收,提高检测灵敏度。

**3.2 流动相的选择** 消痛贴膏由 6 味藏药组成,其成分非常复杂。其中山梔苷甲酯、8-O-乙酰山梔苷甲酯属环烯醚萜苷类,2',4'-二羟基查尔酮属黄酮类,由于苷类化合物极性大,而查尔酮为平面型分子,分子与分子间的排列紧密导致极性较小,在等度洗脱条件下很难实现同时对这几种成分进行的分离测定。为此,实验考察乙腈-水、乙腈-0.05% 磷酸水、甲醇-水、甲醇-0.1% 乙酸水 4 种流动相,结果以乙腈-0.05% 磷酸水系统的洗脱效果最佳,并尝试了该流动相的多种线性梯度洗脱,得到的色谱峰峰形和分离度都较好,基线稳定。

本实验建立的方法能同时测定消痛贴膏中山梔苷甲酯、8-O-乙酰山梔苷甲酯、2',4'-二羟基查尔酮含量,该方法简便、可靠,重复性好,可全面评价制剂的质量。通过检测不同批次生产的消痛贴膏,发现 3 种有效成分含量的一致性较好,这更说明测定它们的含量无论是对于控制生产工艺还是保障药品质量都具有十分重要的意义,为奇正消痛贴膏的质量标准修订提供参考依据。

# 高效液相色谱法同时检测石菖蒲中 $\beta$ -细辛醚、 $\alpha$ -细辛醚的含量

柳梦婷, 方婧, 吴宏伟\*, 付梅红, 杨洪军  
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:建立石菖蒲药材中 $\beta$ -细辛醚、 $\alpha$ -细辛醚的HPLC含量测定方法,并对石菖蒲药材进行质量评价。方法:采用岛津高效液相色谱仪,对样品的前处理方法、色谱柱、检测波长、流动相等分析条件进行了优化筛选,并对分析方法的线性范围、精密度、重复性、稳定性、准确度进行考察,建立同时检测 $\beta$ -细辛醚、 $\alpha$ -细辛醚的石菖蒲药材质量控制方法。结果:采用Kromasil C<sub>18</sub>色谱柱,柱温35℃,流动相甲醇-水(含0.1%甲酸)(70:30)等度洗脱,检测波长257 nm。回归方程 $\beta$ -细辛醚为 $Y = 2 \times 10^6 X + 205.93$  ( $r = 0.9999$ ,  $0.02696 \sim 0.5392 \mu\text{g}$ ),  $\alpha$ -细辛醚 $Y = 6 \times 10^6 X - 117.6$  ( $r = 0.9999$ ,  $0.01604 \sim 0.3208 \mu\text{g}$ );方法精密度 $\beta$ -细辛醚RSD 0.119%, $\alpha$ -细辛醚RSD 0.116%;重复性试验 $\beta$ -细辛醚RSD 0.877%, $\alpha$ -细辛醚RSD 0.815%;稳定性试验室温下20 h内样品中 $\beta$ -细辛醚RSD 0.42%, $\alpha$ -细辛醚RSD 0.25%;准确度 $\beta$ -细辛醚平均回收率为97.7% (RSD 1.9%), $\alpha$ -细辛醚平均回收率为102.3% (RSD 1.5%)。所收集的石菖蒲样品中 $\beta$ -细辛醚含量1.12%~3.51%, $\alpha$ -细辛醚含量0.03%~1.01%。结论:该方法快速、准确、重复性好,可用于石菖蒲药材的质量评价。

**[关键词]** 石菖蒲;  $\beta$ -细辛醚;  $\alpha$ -细辛醚; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0075-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190075

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140819.0919.005.html>

**[网络出版时间]** 2014-08-19 9:19

**[收稿日期]** 20131209(012)

**[基金项目]** 北京市中药学重点学科资助

**[通讯作者]** \* 吴宏伟, 博士, 助理研究员, 从事中药学研究, Tel:010-64014411-2948, E-mail:whw9905012@163.com

## [参考文献]

- [1] 刘兰生, 宋阳, 扬锡, 等. 高效液相色谱法测定奇正止痛贴膏中木犀草素的含量[J]. 中国药事, 2006(7):418.
- [2] 何希瑞, 李茂星, 樊鹏程, 等. HPLC法测定独一味制剂中山梔苷甲酯[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7):50.
- [3] 邱建国, 张泉龙, 尉丽力, 等. 止血镇痛散的制备及其质量标准[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21):15.
- [4] 金兰, 罗桂花. HPLC测定青海野生和栽培藏药独一味中山梔苷甲酯[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14):71.
- [5] 朱斌, 龚念, 彭崇胜, 等. 独一味镇痛作用及其有效成分研究[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(3):442.
- [6] 吴诚, 许惠琴. 镰形棘豆中2',4'-二羟基查尔酮抗炎止血作用的实验研究[J]. 药学实践杂志, 2010, 28(6):431.
- [7] Li M, Shang X, Zhang R, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of iridoid glycosides extract of *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo [J]. Fitoterapia, 2010, 81(3):167.
- [8] 苑伟, 宋玉成, 梁资富. 不同产地藏药独一味的镇痛、抗炎作用比较[J]. 中国药房, 2003(12):12.
- [9] 廖立东, 唐灿, 卢胜明, 等. HPLC梯度洗脱法测定山梔苷甲酯、8-O-乙酰山梔苷甲酯在独一味中含量[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(5):70.
- [10] 杨凤梅. 青鹏膏剂中多组药效成分的含量测定[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(7):1633.

[责任编辑 顾雪竹]