

HPLC 法测定独一味制剂中山栀苷甲酯

何希瑞^{1, 2}, 李茂星², 樊鹏程², 尉丽力^{1, 2}, 张汝学², 贾正平^{1, 2*}

(1. 兰州大学, 兰州 730000; 2. 兰州军区兰州总医院, 兰州 730050)

[摘要] 目的: 建立独一味制剂中山栀苷甲酯的 HPLC 测定方法, 为进一步控制独一味制剂的质量提供良好的参考。方法: 采用 HPLC 反向色谱柱 Symmetry C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 梯度洗脱, 0~9 min 乙腈-水(9:91), 9~20 min 乙腈-水(15:85), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 20℃, 检测波长 235 nm。结果: 山栀苷甲酯浓度在 9.6~115.2 μg·mL⁻¹ 范围内与峰面积积分值线性关系良好; 加样回收率为 97.69%。从所有的制剂中均检测出山栀苷甲酯, 但含量差别较大。结论: 该方法准确、简便、专属性强、重现性好, 适用于独一味制剂中山栀苷甲酯的含量测定。

[关键词] 高效液相色谱; 独一味; 山栀苷甲酯; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0050-03

Determination of Shanzhiside Methyleneester in Preparations of *Lamiophlomis Rotata* by HPLC

HE Xi-rui^{1, 2}, LI Mao-xing², FAN Peng-cheng², WEI Li-li², ZHANG Ru-xue², JIA Zheng-ping^{1, 2*}

(1. Lanzhou University, Lanzhou Gansu 730000; 2. Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou Gansu 730050)

[Abstract] Objective: To establish a HPLC method for the determination of shanzhiside methyleneester in the preparations of *Lamiophlomis rotata*. **Method:** HPLC analysis was performed on Symmetry C₁₈(5 μm) column and gradient elution [0-9 min, acetonitrile-water (9:91), 9-20 min, acetonitrile-water (15:85)] was used as the mobile phase at a flow rate of 1.0 ml·min⁻¹. The column temperature was 20℃ and the detection wavelength was at 235 nm. **Result:** The linear range of shanzhiside methyleneester was 9.6~115.2 μg·mL⁻¹ ($r=0.9998$) and the average recovery was 97.69%. Shanzhiside methyleneester could be detected from all preparations and the content varied greatly. **Conclusion:** The method can be applied to determine the content of shanzhiside methyleneester in the preparations of *L. rotata*.

[Key words] HPLC; *Lamiophlomis rotata*; shanzhiside methyleneester; assaying

独一味为唇形科独一味属植物 *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudog 干燥根及全草, 主要分布在甘肃、青海、四川、云南、西藏等地^[1]。《中国药典》先

后收载独一味片剂、胶囊剂和原药材。近年来, 先后有 50 余家单位申报了 90 余种各类相关制剂, 临床应用广泛。黄酮和环烯醚萜苷是独一味的主要化学成分, 药理实验表明, 环烯醚萜苷是其止血镇痛活性成分^[2-6]。2010 年版《中国药典》在独一味制剂及原料的质量标准中要求增加 8-O-乙酰山栀苷甲酯和山栀苷甲酯的 HPLC 含量测定。有关独一味药材及制剂中 8-O-乙酰山栀苷甲酯的含量测定已有报道^[7-8], 本实验首次采用 HPLC 法对不同厂家独一味制剂中的山栀苷甲酯进行含量测定, 为进一步完善独一味的质量标准, 保证用药的有效性和安全性提供良好的参考。

[收稿日期] 20100107(004)

[基金项目] 全军中医药研发推广项目(2006032001); 甘肃省科技攻关项目(2GS054-A43-014-14)

[第一作者] 何希瑞, 硕士研究生, 主要从事天然活性成分筛选与中药新药开发; Tel: (0931) 8994676, E-mail: xiruihe6105194@163.com

[通讯作者] * 贾正平, 主任药师, 博士生导师; Tel: (0931) 8994676, E-mail: limaox2005@yahoo.com.cn

1 仪器与试药

1.1 仪器 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), 600 型二元梯度泵、996 型二极管阵列紫外检测器, BP210S 电子分析天平(德国 Sartorius 公司), SY-2 电热恒温水浴锅(北京泰克仪器有限公司), SK7200H 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 试药 市售独一味制剂(见表 1), 山栀苷甲酯对照品(实验室自制, MS, NMR 确定其结构纯度), 纯化水, 乙腈为色谱纯(Caledon Laboratories LTD. Canada)。

表 1 市售独一味制剂

No.	药品名称	生产厂家	国药准字	生产批号
1	独一味颗粒剂	四川川大华西药业	Z20050308	080401
2	独一味片剂	广州白云山制药	Z44020946	1080001
3	独一味胶囊剂	甘肃独一味生物制药	Z10970053	0710025331
4	独一味胶囊剂	甘肃独一味生物制药	Z10970053	0806022320
5	独一味软胶囊	海南神同洲制药	Z20050090	20080429
6	独一味软胶囊	江苏万高药业	Z20050221	0802291
7	奇正消痛贴膏	甘肃奇正藏药	Z54020113	090854

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Symmetry C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 梯度洗脱, 0 ~ 9 min 乙腈-水(9:91), 9 ~ 20 min 乙腈-水(15:85), 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 235 nm; 柱温 20 °C; 进样量 10 μL。在此色谱条件下, 山栀苷甲酯与其他组分可达基线分离, 见图 1。

2.2 对照品溶液 精密称取 50 mg 干燥至恒重的山栀苷甲酯对照品 19.2 mg 置 100 mL 量瓶中, 甲醇加至刻度, 得浓度为 192 μg·mL⁻¹ 的对照品母液。

2.3 供试品溶液 取独一味胶囊 20 粒, 倒出内容物, 研细; 取独一味颗粒剂 10 袋, 倒出内容物, 研匀; 取独一味软胶囊 20 粒, 剪破外壳, 挤出内容物, 混匀; 取独一味片剂 20 粒, 去除薄膜包衣, 研细; 取奇正消痛贴膏 10 片, 撕开, 倒出内容物, 研细; 精密称定上述样品各 0.5 g, 平行称定 3 份于具塞三角锥瓶中, 精密加入 70% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 加热回流 60 min, 放冷, 再称定质量, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

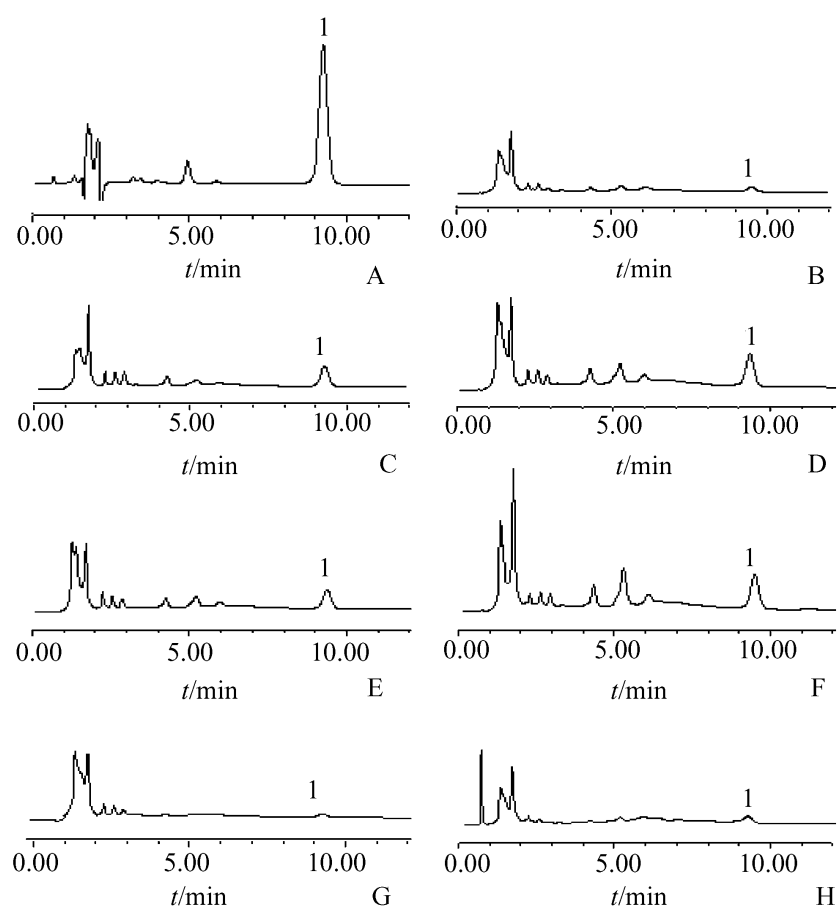


图 1 独一味制剂 HPLC 色谱图

A. 山栀苷甲酯对照液; B. 独一味颗粒剂(四川); C. 独一味片剂(广州); D. 独一味胶囊剂(甘肃, 0710025331); E. 独一味胶囊剂(甘肃, 0806022320); F. 独一味软胶囊(海南); G. 独一味软胶囊(江苏); H. 消痛贴膏(甘肃)

2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液, 以注射用水依次稀释, 使山栀苷甲酯浓度分别为 9.6, 19.2, 38.4, 57.6, 76.8, 96.0, 115.2 μg·mL⁻¹, 分别进样 10 μL, 以色谱峰面积和浓度进行回归分析, 得回归方程 $A = 8.15 \times 10^3 C - 6.68 \times 10^3$ ($r = 0.9998$), 表明山栀苷甲酯的浓度在 9.6 ~ 115.2 μg·mL⁻¹ 范围内与峰面积呈良好线性关系。

2.5 精密度试验 精密取 38.4 μg·mL⁻¹ 对照品溶液 10 μL, 分别于第 1 天, 第 2 天, 第 3 天各重复进样 5 次并测定, 山栀苷甲酯峰日内精密度 RSD 分别为 0.17%, 0.63%, 0.16%, 日间精密度 RSD 为 0.97%, 精密度良好。

2.6 重复性试验 精密称取同一样品 6 份, 测得其中山栀苷甲酯的含量分别为 4.38, 4.48, 4.46, 4.49, 4.45, 4.52 mg·g⁻¹, 平均为 4.46 mg·g⁻¹, RSD 为 1.07%。

2.7 稳定性试验 精密吸取同一样品溶液分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 h 测定峰面积积分值, RSD 为 1.42%, 表明样品溶液在 72 h 内基本稳定。

2.8 加样回收率试验 取已知样品含量的供试品适量 6 份, 加入对照品 0.92 mg, 混匀, 按 2.3 项下制备供试品溶液, 按 2.1 项下测定色谱峰面积, 计算

山梔苷甲酯的含量及相应的加样回收率, 结果见表 2。

表 2 加样回收率试验 (n=6)

No.	原含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.92	0.96	1.8677	98.72		
2	0.92	0.96	1.8623	98.16		
3	0.92	0.96	1.8432	96.17	97.69	1.95
4	0.92	0.96	1.8876	100.79		
5	0.92	0.96	1.8398	95.81		
6	0.92	0.96	1.8466	96.52		

2.9 样品含量测定 按 2.3 项下方法制备独一味不同制剂的供试品溶液, 按 2.1 项色谱条件测定山梔苷甲酯的色谱峰面积, 根据标准曲线计算含量, 每个样品含量为平行测定 3 次所得平均值 (n=3), 结果见表 3。

表 3 样品含量测定 (n=3)

No.	剂型	批号	含量 /mg·g ⁻¹	每剂重量 /g	每剂含量 /mg	每次使用剂量 /mg
1	颗粒剂	080401	1.84	3.00	5.52	5.52
2	片剂	1080001	12.56	0.30	3.77	11.31
3	胶囊剂	0710025331	12.55	0.28	3.52	10.56
4	胶囊剂	0806022320	9.24	0.28	2.59	7.77
5	软胶囊	20080429	4.46	0.64	2.85	8.55
6	软胶囊	0802291	0.88	0.55	0.48	1.44
7	贴膏 (复方)	090854	0.92	0.80	0.74	0.74

3 讨论

作者借鉴正在公示的 2010 年《中国药典》中关于独一味制剂的山梔苷甲酯测定方法, 采用梯度洗脱法, 流动相 0~9 min 乙腈-水 (9:91), 9~20 min 乙腈-水 (15:85), 检测波长 235 nm 下, 山梔苷甲酯保留时间为 9.40 min。相比于 8-O-乙酰山梔苷甲酯, 山梔苷甲酯极性较大, 选择梯度洗脱, 实现了很好的分离效果。另外由于样品 2, 3, 4 中山梔苷甲酯含量较大, 超出标准曲线的范围, HPLC 测定前先将这 3 种样品溶液稀释 5 倍再进行测定并计算。

该试验采用高效液相色谱法, 测定了不同厂家生产的独一味不同制剂中山梔苷甲酯的含量, 其方法简便、准确、灵敏、回收率效好, 可为该类制剂的质量控制提供一个有效的质量控制指标。不同厂家生产的独一味不同制剂中检测出的山梔苷甲酯含量差异较大, 且这种差异与课题组测定的 8-O-乙酰山梔苷甲酯含量基本类似, 新版药典联合控制独一味药材及其制剂中的山梔苷甲酯和 8-O-乙酰山梔苷甲酯含量可以更好的保障药品质量。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 第 7 卷. 上海: 上海科技出版社, 1999: 6074.
- [2] Zhang CZ, Li C, Feng SL, et al. Iridoid glucosides from *phlomis rotata* [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30 (12): 4156.
- [3] Tan J J, Tan C H, Li M, et al. Iridoid Glycosides from *Lamiophlomis rotata* [J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2007, 90: 143.
- [4] Li M X, Jia Z P, Hu Z D, et al. Experimental study on the Hemostatic Activity of Tibet medicinal herb *Lamiophlomis rotata* [J]. *Phytotherapy Research*, 2008, 22: 759.
- [5] Li M X, Zhang R X, Jia Z P, et al. Isolation and identification of hemostatic ingredients from *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo [J]. *Phytotherapy Research*, 2009, 23 (6): 816.
- [6] Li M X, Shang X F, Jia Z P, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of iridoid glycosides extract of *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81: 167.
- [7] 李茂星, 李文斌, 樊鹏程, 等. 独一味制剂中 8-乙酰氧基山梔子苷甲酯的含量测定 [J]. *中国医院药学杂志*, 2009, 29(8): 688.
- [8] 王娟, 李茂星, 李文斌, 等. 独一味药材中 8-乙酰氧基山梔子苷甲酯的含量测定 [J]. *中国药房*, 2009, 20 (33): 2595.

[责任编辑 顾雪竹]