

HPLC法同时测定三味龙胆花片中马钱苷酸和异金雀花素的含量^Δ

艾悦言^{1*}, 赵学勇^{2#}, 付林¹, 卞晓莲², 古锐¹, 张静波², 南措¹, 西绕娜姆¹(1.成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137; 2.宇妥藏药股份有限公司, 四川红原 624400)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)20-2810-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.20.16

摘要 目的:建立同时测定三味龙胆花片中马钱苷酸、异金雀花素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Inertsil ODS-3,流动相为甲醇-0.2%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为240 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:马钱苷酸和异金雀花素进样量线性范围分别为0.040 08~4.008 0 μg($r=0.999\ 9$)、0.021 96~2.196 0 μg($r=0.999\ 9$);定量限分别为0.160 32、0.087 8 ng/mL,检测限分别为0.080 16、0.043 92 ng/mL;精密密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%;加样回收率分别为103.07%~104.26%(RSD=0.52%, $n=6$)、95.57%~99.61%(RSD=1.55%, $n=6$)。结论:该方法简便、精确,可用于同时测定三味龙胆花片中马钱苷酸和异金雀花素的含量。

关键词 高效液相色谱法;三味龙胆花片;马钱苷酸;异金雀花素;含量测定

Simultaneous Determination of Loganic Acid and Isoscoparin in Sanwei Longdanhua Tablets by HPLC

AI Yueyan¹, ZHAO Xueyong², FU Lin¹, BIAN Xiaolian², GU Rui¹, ZHANG Jingbo², Nancuo¹, Xiraonamu¹(1. School of Ethnomedicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2. Yutuo Tibetan Pharmaceutical Co., Ltd., Sichuan Hongyuan 624400, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of loganic acid and isoscoparin in Sanwei longdanhua tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Inertsil ODS-3 column with mobile phase consisted of methanol-0.2% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 240 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μL. RESULTS: The linear range were 0.040 08-4.008 0 μg ($r=0.999\ 9$) for loganic acid and 0.021 96-2.196 0 μg ($r=0.999\ 9$) for isoscoparin. The quantitative limits were 0.160 32 and 0.087 8 ng/mL, and detection limits were 0.080 16 and 0.043 92 ng/mL. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. The recoveries were 103.07%-104.26% (RSD=0.52%, $n=6$) and 95.57%-99.61% (RSD=1.55%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and suitable for simultaneous determination of loganic acid and isoscoparin in Sanwei longdanhua tablets.

KEYWORDS HPLC; Sanwei longdanhua tablets; Loganic acid; Isoscoparin; Content determination

三味龙胆花片为国药准字藏药,处方中主要含白花龙胆、甘草等,具有清热、润肺的作用,可用于肺热气喘

和咽喉炎等症的治疗。该制剂在国家食品药品监督管理局标准中已有含量测定项目,但仅以甘草有效成分甘

[16] 陈丹丹,谢晓芳,万峰,等. 氢溴酸樟柳碱对急性脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织细胞凋亡及ERK1/2磷酸化水平的影响[J]. 中国药房,2017,28(28):3907-3910.

[17] CHEN W, WEI S, YU Y, et al. Pretreatment of rats with increased bioavailable berberine attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury via down regulation of adenosine-5' monophosphate kinase activity[J]. *Eur J Pharma-*

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81603395);四川省第一批科技计划项目(No.2016FZ0044);成都中医药大学科技发展基金课题(No.CGPY1604)

* 硕士研究生。研究方向:中药化学。E-mail:972177255@qq.com

通信作者:实习研究员,硕士。研究方向:植物药新药开发。E-mail:398087968@qq.com

col,2016,779(5):80-90.

[18] LIU Z, LIU Q, CAI H, et al. Calcitonin gene-related peptide prevents blood-brain barrier injury and brain edema induced by focal cerebral ischemia reperfusion[J]. *Regul Pept*,2011,171(1/2/3):19-25.

[19] 余晴晴,柏建峰,王江军. 当归补血汤对脑缺血再灌注损伤大鼠血管新生及Ang-1、Ang-2、VEGF和Tie-2的影响[J]. 国际医药卫生导报,2017,23(9):29-33.

[20] ZHANG X, CHEN XP, LIN JB, et al. Effect of enriched environment on angiogenesis and neurological functions in rats with focal cerebral ischemia[J]. *Brain Research*, 2017(1655):176-185.

(收稿日期:2018-01-08 修回日期:2018-03-06)

(编辑:张静)

草酸为测定指标,而甘草在该制剂中为调和药性的药物,并非君药。该制剂处方中君药为白花龙胆^[1],此药材在藏、蒙、阿萨克等民族药中均被广泛应用^[2-4],具有泻肝胆实火、止咳利咽、舒筋止痛、健胃等功效,主治肺热咳嗽及目赤咽痛等症^[5-7]。因此,有必要以白花龙胆有效成分为含量测定指标来建立该制剂的质量标准。相关文献指出,白花龙胆是多基源药材,来源于大花龙胆(*Gentiana szechenyii* Kanitz)和高山龙胆(*G. algida* Pall.),但上述两种植物成分存在较大差异^[8-13]。经过成分比较研究与分离鉴定表明,环烯醚萜类的马钱苷酸(Loganic acid)和黄酮类的异金雀花素(Isoscoparin)是两种源自白花龙胆的共有成分^[14-16]。因此,笔者采用高效液相色谱法(HPLC)同时测定了三味龙胆花片中马钱苷酸和异金雀花素的含量,旨在为其质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-2010A(HT)型HPLC仪,包括四元泵、柱温箱、紫外检测器、LC Solution 色谱工作站(日本 Shimadzu 公司);SB-5200 型超声波清洗器(宁波新艺超声设备有限公司);DZKW-S-4 型电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司);BSA124S 型万分之一电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];FA1004 型十万分之一电子分析天平(上海良平仪器仪表有限公司);ULUP-1-10T 型超纯水机(成都优普超纯水科技有限公司)。

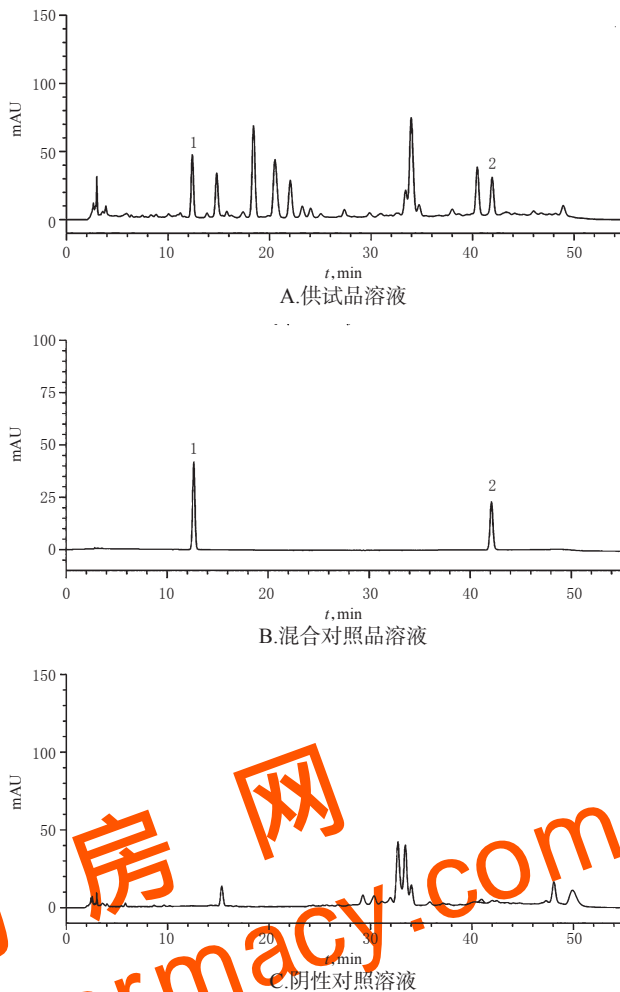
1.2 药品与试剂

马钱苷酸对照品(成都普思生物科技股份有限公司,批号:PS0330-0025,纯度:>98%);异金雀花素对照品(成都普思生物科技股份有限公司分离鉴定的对照品,纯度:>98%);三味龙胆花片(宇妥藏药股份有限公司,批号:170401、1710021037、1710031052、1710051035、1710061035、1710071003、1710071035,规格:0.5 g/片);甲醇(分析纯,成都市科隆化学品有限公司);甲醇[色谱纯,赛默飞世尔科技(中国)有限公司];磷酸(诺尔施 HPLC 级,成都市科隆化学品有限公司);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性

色谱柱:Inertsil ODS-3(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.2%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~5 min, 21% A→25% A; 5~15 min, 25% A→28% A; 15~35 min, 28% A→40% A; 35~45 min, 40% A→46% A; 45~50 min, 46% A→21% A; 50~55 min, 21% A);检测波长:240 nm;柱温:30 ℃;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL。在上述色谱条件下,马钱苷酸、异金雀花素峰理论板数均大于5 000,分离度均大于1.5,阴性对照对测定无干扰,详见图1。



注:1. 马钱苷酸; 2. 异金雀花素
Note: 1. loganic acid; 2. isoscoparin

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取马钱苷酸、异金雀花素对照品各适量,加75%甲醇溶解并稀释,制成含马钱苷酸0.400 8 mg/mL、异金雀花素0.219 6 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品10片,除去包衣,研细,精密称取0.5 g,加75%甲醇25 mL,称定质量,超声(功率:250 W,频率:40 kHz)处理45 min,放冷,再次称定质量,用75%甲醇补足减失的质量,摇匀,上清液经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按三味龙胆花片的处方和工艺制备不含白花龙胆的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,加75%甲醇制成马钱苷酸质量浓度分别为0.400 8、0.080 16、0.040 08、0.016 032、0.008 016、0.004 008 mg/mL,异金雀花素质量浓度分别为0.219 6、0.043 92、0.021 96、0.008 784、0.004 392、0.002 196 mg/mL的线性关系工作溶液。精

精密取上述线性关系工作溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量($x, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得马钱苷酸回归方程为 $y=1\ 570\ 514.938\ 7x+23\ 270.548\ 7$ ($r=0.999\ 9$),异金雀花素回归方程为 $y=2\ 164\ 949.062\ 0x+4\ 886.334\ 6$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,马钱苷酸、异金雀花素进样量线性范围分别为0.040 08~4.008 0、0.021 96~2.196 0 μg 。

2.4 定量限与检测限考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以信噪比10:1、3:1分别计算定量限、检测限。结果,马钱苷酸、异金雀花素的定量限分别为0.160 32、0.087 8 ng/mL,检测限分别为0.080 16、0.043 92 ng/mL。

2.5 精密度试验

取“2.3”项下线性关系工作溶液(马钱苷酸质量浓度为0.080 16 mg/mL、异金雀花素质量浓度为0.043 92 mg/mL)适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,马钱苷酸、异金雀花素峰面积的RSD分别为0.076%、0.832%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:1710071035)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,马钱苷酸、异金雀花素峰面积的RSD分别为0.590%、1.950%($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

2.7 重复性试验

精密称取样品(批号:1710071035)细粉适量,共6份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,马钱苷酸、异金雀花素的平均含量分别为2.216、1.340 mg/g,RSD分别为1.314%、1.190%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品(批号:1710071035)细粉0.25 g,共6份,分别加入一定量的混合对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

待测成分	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,%
马钱苷酸	0.554 6	0.540 0	1.112 2	103.26	103.67	0.52
	0.556 0	0.540 0	1.117 1	103.91		
	0.555 5	0.540 0	1.113 2	103.28		
	0.553 9	0.540 0	1.110 5	103.07		
	0.553 9	0.540 0	1.116 9	104.26		
	0.554 2	0.540 0	1.116 7	104.17		
异金雀花素	0.335 2	0.280 0	0.606 5	96.89	96.82	1.55
	0.335 5	0.280 0	0.603 1	95.57		
	0.335 7	0.280 0	0.604 4	95.96		
	0.334 8	0.280 0	0.603 0	95.79		
	0.334 8	0.280 0	0.606 6	97.07		
	0.334 9	0.280 0	0.613 8	99.61		

2.9 样品含量测定

分别取7批样品细粉各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积并按外标法计算样品含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of content determination of samples($n=3$)

批号	马钱苷酸,mg/片	异金雀花素,mg/片
170401	1.996.1	0.866 9
1710021037	2.100 9	1.858 9
1710031052	2.504 4	1.824 8
1710051035	1.734 3	0.537 0
1710061035	1.860 3	0.814 6
1710071003	1.690 8	0.437 0
1710071035	1.108 3	0.669 8

3 讨论

试验前期,笔者比较了50%甲醇、75%甲醇、甲醇、无水乙醇、乙酸乙酯5种提取溶剂对含量测定的影响。结果显示,以50%甲醇和75%甲醇提取时,马钱苷酸、异金雀花素两种成分含量相近且较高,但由于以50%甲醇超声提取后用微孔滤膜过滤时十分困难难以制样,故选择75%甲醇为提取溶剂。笔者又比较了25、50、75、100 mL 4种不同提取溶剂量对含量测定的影响,结果显示,提取溶剂量为25 mL时马钱苷酸、异金雀花素两种成分含量均最高。另外,笔者还比较了超声15、30、45、60 min和回流30 min 5种方式对提取效率的影响,结果显示,超声45 min时提取效率最高。

在色谱条件的选择方面,最初选择乙腈-0.2%磷酸溶液为流动相进行洗脱,结果显示,马钱苷酸与异金雀花素峰分离度和峰形均不好;而改用甲醇-0.2%磷酸溶液为流动相后,马钱苷酸与异金雀花素峰的分度均大于1.5且峰形均较好。另外,笔者用二极管阵列检测器在200~400 nm波长范围内进行检测,结果显示,马钱苷酸在240 nm波长处有最大吸收,异金雀花素虽在210、280、350 nm波长处有最大吸收,但其在240 nm波长处的峰形较好且吸收也较大,故选择检测波长为240 nm。

综上所述,本方法简便、精确,可用于同时测定三味龙胆花片中马钱苷酸和异金雀花素的含量。

参考文献

- [1] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准: 藏药: 第一册[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 259.
- [2] 努尔巴衣·阿不都沙勒克, 买热木尼沙·艾孜则. 新疆龙胆属植物及其地理分布[J]. 干旱区研究, 2000, 17(2): 42-49.
- [3] 巴哈尔古丽·黄尔汗. 阿萨克药志: 第一卷[M]. 北京: 民族出版社, 2009: 132-133.
- [4] 刘勇民, 沙吾提, 伊克木. 维吾尔药志: 上册[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1985: 103-104.
- [5] 国家中医药管理局. 中华本草: 藏药卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 283.
- [6] 马羚, 周兵冰, 蒋运斌, 等. 藏药“榜间嘎保”的药用概况

基于数据挖掘探讨含“桔梗-甘草”药对成方制剂的证治规律[△]

吕建军^{1*},郝瑞春^{2#},门九章²,李孝波²,寇永锋²(1.山西药科职业学院中药系,太原 030031;2.山西中医药大学中医临床学院,太原 030619)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)20-2813-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.20.17

摘要 目的:为“桔梗-甘草”药对的临床应用及相关新药研发提供依据。方法:收集《卫生部药品标准·中药成方制剂》中含“桔梗-甘草”药对的所有成方制剂,运用中医传承辅助平台V 2.5对其证治规律进行数据挖掘和分析。结果:共收集到含“桔梗-甘草”药对成方制剂315首,主治证候89种,主治疾病88种。其中,高频主治证候为风热犯表证、风寒束表证,其核心药物组合分别为银翘散和杏苏散;高频主治疾病为感冒、咳嗽,治疗感冒的核心药物组合包含了银翘散、杏苏散、藿香正气散和柴胡枳桔汤等,治疗咳嗽的核心药物组合包含了杏苏散、止嗽散、通宣理肺丸和清金化痰汤等。结论:该研究明确了含“桔梗-甘草”药对成方制剂的证治规律,可为“桔梗-甘草”药对的临床应用和新药研发提供依据。

关键词 中药成方制剂;“桔梗-甘草”药对;证治规律;中医传承辅助平台

Discussion on Syndrome and Treatment Rules of Set Prescription Preparation Containing *Platycodon grandiflorum-Glycyrrhiza uralensis* Based on Data Mining

LYU Jianjun¹,HAO Ruichun²,MEN Jiuzhang²,LI Xiaobo²,KOU Yongfeng²(1. Dept. of Chinese Materia Medica, Shanxi Pharmaceutical Vocational College, Taiyuan 030031, China; 2. Clinical College of TCM, Shanxi University of TCM, Taiyuan 030619, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide reference for clinical application and related new drug R&D of the couplet medicines of *Platycodon grandiflorum-Glycyrrhiza uralensis*. METHODS: All set prescription preparations containing *P. grandiflorum-G. uralensis* in Ministry of Public Health Drug Standard·TCM Set Prescription Preparation were collected; data mining and analysis for the syndrome and treatment rules of these prescriptions were performed by using TCM Inheritance System V.2.5. RESULTS: There were a total of 315 set prescription preparations containing couplet medicine of *P. grandiflorum-G. uralensis*, 89 main syndromes and 88 main diseases. Among of them, high frequency major syndrome were exterior syndrome attacked by wind-heat and exterior syndrome tightened by wind-cold, and dominating medicine combination were respectively Yinqiao powder and Xingsu powder. High frequency main diseases were common cold and cough. Core medicine combination in the treatment of common cold included Yinqiao powder, Xingsu powder, Huoxiang zhengqi powder and Chaihu zhijie decoction, etc. Core medicine combination in the treatment of cough included Xingsu powder, Zhisou powder, Tongxuan lifei pills and Qingjin huatan decoction, etc. CONCLUSIONS: The study confirms the syndrome and treatment rules of set prescription preparations containing couplet medicines of *P. grandiflorum-G. uralensis*, and could provide evidence for clinical application of the couplet medicines of *P. grandiflorum-G. uralensis* and new drug R&D.

KEYWORDS TCM set prescription preparation; Couplet medicines of *P. grandiflorum-G. uralensis*; Syndrome and treatment rule; TCM Inheritance System

- [J]. 中国民族民间医药,2016,25(3):4-7.
- [7] 卫生部药政管理局. 现代实用本草:上册[M]. 北京:人民卫生出版社,1997:1.
- [8] 钟世红,古锐,马羚,等. 藏药白花龙胆品种考证与使用现状调查[J]. 中国中药杂志,2014,39(13):2450-2455.
- [9] 余继英,吴亮,徐傅能,等. HPLC法同时测定三味龙胆花片中龙胆苦苷及獐牙菜苦苷[J]. 中成药,2016,38(2):318-321.
- [10] 罗达尚. 新修晶珠本草[M]. 成都:四川科学技术出版社,2004:153-158.
- [11] 杨竞生,初称江措. 迪庆藏药[M]. 昆明:云南民族出版社,1989:12-13.
- [12] 杨芳,王洪伦,李春婷,等. 藏药材白花龙胆花中微量元素的分析[J]. 广东微量元素科学,2008,15(9):34-37.
- [13] 张晓峰,魏富财. 青海省藏药炮制规范[M]. 西宁:青海人民出版社,2010:7.
- [14] 付林,古锐,张彩虹,等. 藏药大花龙胆正丁醇部位的化学成分研究[J]. 中草药,2018,49(5):1002-1006.
- [15] 赵丹丹. 大花龙胆的化学成分研究[D]. 上海:上海中医药大学,2014.
- [16] 韩晗. 藏药高山龙胆化学成分及生物活性研究[D]. 兰州:兰州理工大学,2012.

△ 基金项目:门氏中医流派的继承与创新山西省科技创新重点团队建设项目(No.201705D131021)

* 讲师,硕士。研究方向:方药配伍规律。电话:0351-7820661。E-mail:514786025@qq.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:中医药防治肝纤维化。电话:0351-3179728。E-mail:1954837703@qq.com

(收稿日期:2018-04-23 修回日期:2018-08-28)
(编辑:陈宏)