

不同生长期独一味中山梔苷甲酯和 8-O-乙酰山梔苷甲酯的含量研究

郭敏, 汪付田, 王晓琳, 李晓东, 杨丽霞, 薛世萍, 姜华

(甘肃省中医院, 兰州 730050)

摘要 目的: 研究分析不同生长期独一味中山梔苷甲酯和 8-O-乙酰山梔苷甲酯含量。方法: 采用 HPLC 反相色谱柱 Waters Symmetry C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm), 梯度洗脱 [0~10 min 乙腈-水 (10:90); 10~30 min 乙腈-水 (18:82)], 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 235 nm, 柱温 25 °C。结果: 不同生长期的独一味中山梔苷甲酯和 8-O-乙酰山梔苷甲酯的总含量有明显差异, 从 6 月份到 9 月份呈近似于正态分布的趋势, 以 7 月中旬到 8 月初期间的含量为最高。结论: 本方法结果准确, 重现性好, 易于操作, 可用于不同生长期独一味中山梔苷甲酯和 8-O-乙酰山梔苷甲酯的含量研究。

关键词: 独一味; 山梔苷甲酯; 8-O-乙酰山梔苷甲酯

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)01-0124-03

Content research of shanzhiside methyl ester and 8-O-acetylshanzhiside methyl ester in *Lamiothymus rotatus* (Benth.) Kudo with different growing periods

GUO Min, WANG Fu-tian, WANG Xiao-lin, LI Xiaodong
YANG Lixia, XUE Shiping, JIANG Hua

(Gansu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine Lanzhou 730050 China)

Abstract Objective To research the contents of shanzhiside methyl ester and 8-O-acetylshanzhiside methyl ester in *Lamiothymus rotatus* (Benth.) Kudo with different growing periods **Methods** HPLC analysis was performed on Symmetry C₁₈ column, the mobile phase consisted of acetonitrile-water with gradient elution [0-10 min acetonitrile-water (10:90), 10-30 min acetonitrile-water (18:82)] at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 235 nm and the column temperature was 25 °C. **Results** The total content of shanzhiside methyl ester and 8-O-acetylshanzhiside methyl ester in *Lamiothymus rotatus* (Benth.) Kudo was gaussian distribution from June to September and the maximum value was in between mid-July and early August **Conclusion** This method is accurate, precise, sensitive and specific to be used in the content determination of shanzhiside methyl ester and 8-O-acetylshanzhiside methyl ester content in *Lamiothymus rotatus* (Benth.) Kudo with different growing periods

Key words *Lamiothymus rotatus* (Benth.) Kudo, shanzhiside methyl ester, 8-O-acetylshanzhiside methyl ester

独一味 (*Lamiothymus rotatus* (Benth.) Kudo) 是一种藏族习用药材^[1], 为唇形科多年生草本植物, 原为全草入药, 为了保护中药资源, 中国药典 2010 年版已将其药用部位修订为地上部分入药^[2]。独一味主要生长于西藏、青海、云南、四川、甘肃等高寒地区, 为我国藏族、蒙古族和纳西族等民间常用草药, 最早收藏于藏族医药学巨著《四部医典》及《晶珠本草》, 距今已有 1200 年历史, 其味甘、微苦、性温, 具有活化淤血、止痛止血、消肿补髓、行气、续筋

接骨、通经等重要功效, 对扭伤、风湿痹痛、崩漏、手术后的软组织关节炎及腰挫折、小骨骨折外伤、风湿性关节炎等临床疗效确切。中国药典 2010 年版中含量测定项的指标已经由 2005 年版中的木犀草素不得低于 0.15% 变更为山梔苷甲酯和 8-O-乙酰山梔苷甲酯的总和不得低于 0.50%。为此, 笔者从 2009 年 6 月份开始采摘, 直到 9 月份该植物完全枯黄, 2 周为 1 个采集周期。以山梔苷甲酯和 8-O-乙酰山梔苷甲酯的含量作为分析指标, 考察不同生长

周期内藏药独一味中两者各自的含量及总含量的变化情况,进而为该药材能够适时采收提供参考,确保药效^[7]。

1 仪器、试剂与样品

美国 Waters 公司 (Waters 2695) 高效液相色谱仪,包括 2695 型四元梯度泵、2698 型二极管阵列紫外检测器。

独一味植株采自甘肃省玛曲县尼玛镇,从 2009 年 6 月 7 日至 9 月 6 日,每隔 15 d 分期采样,每次采样方法和位置相同,即只取其地上部分,置塑料袋中装纸箱运回实验室,清洗并自然晾干,保存样品至所有样品采集结束后统一测定含量;对照品山栀苷甲酯和 8-O-乙酰山栀苷甲酯(实验室自制,MS、NMR 确定其结构,HPLC 归一化法测定其纯度均大于 95%,含量测定按 95% 计算,以下结果均为折算后结果);水为屈臣氏纯化水,甲醇、乙腈为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Waters Symmetry C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) 色谱柱,梯度洗脱 [0~10 min 乙腈-水 (10:90); 10~30 min 乙腈-水 (18:82)], 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 235 nm, 柱温 25 °C,

进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品储备液 取干燥至恒重的对照品山栀苷甲酯约 3.14 mg 和 8-O-乙酰山栀苷甲酯约 4.31 mg 精密称定,置同一 50 mL 量瓶中,用 70% 甲醇溶解并稀释至刻度,得山栀苷甲酯质量浓度为 62.72 μg · mL⁻¹ 和 8-O-乙酰山栀苷甲酯质量浓度为 86.28 μg · mL⁻¹ 的混合溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品粉末(过 3 号目筛)约 0.60 g 精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇溶液 25 mL, 密塞,称定重量,加热回流 1 h 放冷,用 70% 甲醇溶液补重,摇匀,滤过。精密量取续滤液 2 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,即得。

2.3 专属性考察 分别取混合对照品溶液、供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液与对照品溶液均在相同保留时间出现吸收峰,山栀苷甲酯、8-O-乙酰山栀苷甲酯色谱峰与其他组分色谱峰分离完全 ($R_1 = 6.4$, $R_2 = 13.8$), 理论塔板数 21589。见图 1。

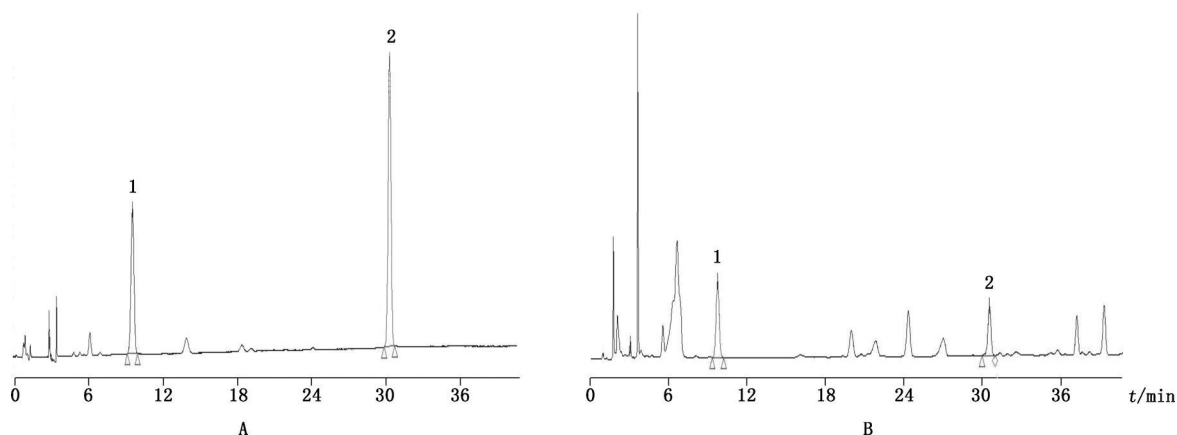


图 1 对照品 (A) 及样品 (090609) (B) 色谱图

Fig 1 Chromatograms of reference substances (A) and sample (collected on June 9 2009) (B)

1 山栀苷甲酯 (shanzhiside methyl ester) 2 8-O-乙酰山栀苷甲酯 (8-O-acetylshanzhiside methyl ester)

2.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品储备液适量,以 70% 甲醇依次稀释配制,制得山栀苷甲酯质量浓度分别为 12.54, 25.09, 37.63, 50.18, 62.72 μg · mL⁻¹, 8-O-乙酰山栀苷甲酯质量浓度分别为 17.26, 34.51, 51.77, 69.02, 86.28 μg · mL⁻¹ 的系列混合对照品溶液,分别进样 10 μL,以色谱峰面积 A 和质量浓度 C 进行回归分析,得山栀苷甲酯、8-O-乙酰山栀苷甲酯回归方程分别为:

$$A = 7.331 \times 10^3 C - 89.70 \quad r = 0.9998$$

$$A = 2.346 \times 10^4 C + 271.2 \quad r = 0.9999$$

线性范围分别为 12.54~62.72 μg · mL⁻¹ 和 17.26~86.28 μg · mL⁻¹。

2.5 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL,连续进样 7 次,结果山栀苷甲酯、8-O-乙酰山栀苷甲酯峰面积的 RSD ($n = 7$) 分别为 0.39% 和 0.48%,表明仪器精密度较好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液分别在 0, 2, 8, 12, 24, 48, 72 h 测定峰面积积分值, RSD

为 1.1%, 表明供试品溶液在 72 h 内基本稳定。

2.7 重复性试验 取同批样品粉末 6 份, 精密称定, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.1”项下条件进样分析。结果样品中山栀子苷甲酯、8-O-乙酰山栀子苷甲酯含量平均值分别为 1.78% 和 0.40%, RSD 分别为 0.69% 和 0.87%, 表明方法的重复性较好。

2.8 加样回收试验 取已知含量(山栀子苷甲酯、8-O-乙酰山栀子苷甲酯含量分别为 1.73% 和 1.32%) 的样品 0.50 g 精密称定, 分别精密加入低、中、高量的山栀子苷甲酯、8-O-乙酰山栀子苷甲酯对照品各 0.75 mg 0.95 mg 1.18 mg 按“2.2.2”项下方法制备供试溶液, 进样测定。计算得山栀子苷甲酯低、中、高 3 个浓度的回收率 ($n=3$) 分别为 97.73% (RSD = 1.1%), 98.04% (RSD = 1.2%), 98.53% (RSD = 1.1%), 平均回收率 ($n=9$) 为 98.10%; 8-O-乙酰山栀子苷甲酯低、中、高 3 个浓度的回收率 ($n=3$) 分别为 99.08% (RSD = 1.3%), 99.77% (RSD = 1.3%), 99.81% (RSD = 1.2%), 平均回收率 ($n=9$) 为 99.55%。

2.9 样品含量测定 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件进样测定, 根据标准曲线计算含量, 结果见表 1。根据表 1 中的结果, 我们可以得出以下结论: 不同生长期的独一味中山栀子苷甲酯和 8-O-乙酰山栀子苷甲酯的总含量有明显差异, 从 6 月份到 9 月份呈近似于正态分布的趋势, 以 7 月中旬到 8 月初期间的含量为最高。

表 1 不同生长期的独一味中山栀子苷甲酯和 8-O-乙酰山栀子苷甲酯的含量 (%)

Tab 1 Contents of shanzhizi methyl ester and 8-O-acetylshanzhizi methyl ester in *Lamioiphlonis rotata* (Benth.) Kudo with different growing periods

| 采集时间 (collectin time) | 山栀子苷甲酯 (shanzhizi methyl ester) | 8-O-乙酰山栀子苷甲酯 (8-O-acetylshanzhizi methyl ester) | 总含量 (total content) |
|--------------------------|---------------------------------------|---|------------------------|
| 090609 | 1.90 | 0.19 | 2.09 |
| 090620 | 1.75 | 0.44 | 2.19 |
| 090704 | 1.88 | 0.78 | 2.66 |
| 090718 | 1.73 | 1.32 | 3.05 |
| 090801 | 1.76 | 1.27 | 3.03 |
| 090815 | 1.77 | 0.32 | 2.09 |
| 090829 | 0.86 | 0.28 | 1.14 |

3 讨论

3.1 中国药典 2010 年版对独一味药材中山栀子苷甲酯和 8-O-乙酰山栀子苷甲酯的含量测定采用的是

梯度洗脱法 [0~9 min, 乙腈-水 (9:91); 9~20 min, 乙腈-水 (15:85)], 检测波长 235 nm。本文综合考虑峰形、分离度及保留时间等因素, 把洗脱程序和柱温适当调整; 在样品处理过程中, 采取正交试验, 对提取溶剂、提取方法、提取时间进行考察, 根据峰形及目标面积优选最佳提取工艺为: 70% 甲醇溶液加热回流 1 h, 当取样量为 0.6 g 时, 溶剂 25 mL 即可提取完全。

3.2 中国药典 2010 年版要求独一味的含量为山栀子苷甲酯和 8-O-乙酰山栀子苷甲酯的总量不得低于 0.50%, 通过对 7 个采摘期 7 批样品的分析可以得到: 不同生长期的独一味中山栀子苷甲酯和 8-O-乙酰山栀子苷甲酯的总含量有明显差异, 从 6 月份到 9 月份呈近似于正态分布的趋势, 以 7 月中旬到 8 月初期间的含量为最高。8-O-乙酰山栀子苷甲酯最高时的含量可以达到最低时的 7 倍左右。这就说明选择最佳的采收季节对于独一味的含量及药效具有至关重要的意义。建议藏药独一味的最佳采收季节可以考虑为 7 月中旬到 8 月初。

参考文献

- 1 《Zhonghua Bencao》Editorial Committee of The State Administration of Traditional Chinese Medicine (国家中医药管理局《中华本草》(编委会). Zhonghua Bencao (中华本草). Vol 17 (第 7 卷). Shanghai (上海): Shanghai Science and Technology Publishers (上海科学技术出版社), 1999. 6074
- 2 ChP (中国药典). 2010. Vol I (一部): 245
- 3 LIM ao-xing (李茂星), LIW en-bin (李文斌), FAN Peng-cheng (樊鹏程), et al The content determination of 8-O-acetylshanzhizi methyl ester in *Lamioiphlonis rotata* (Benth.) Kudo preparations (独一味制剂中 8-乙酰氧基山栀子苷甲酯的含量测定). *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2009, 29(8): 688
- 4 WANG Juan (王娟), LIM ao-xing (李茂星), LIW en-bin (李文斌), et al The content determination of 8-O-acetylshanzhizi methyl ester in *Lamioiphlonis rotata* (Benth.) Kudo (独一味药材中 8-乙酰氧基山栀子苷甲酯的含量测定). *China Pharm* (中国药房), 2009, 20(33): 2595
- 5 QIAN Da-wei (钱大玮), DUAN Jin-ao (段金傲), ZHU Ling-ying (朱玲英), et al The content determination of Phlorigidol in *Lamioiphlonis rotata* (Benth.) Kudo by HPLC (HPLC 测定独一味中 Phlorigidol 的含量). *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2004, 35(6): 549
- 6 Tan JJ, Tan CH, Li M, et al Iridoid glycosides from *Lamioiphlonis rotata*. *Heb Chim Acta*, 2007, 90: 143
- 7 Li M X, Ji Z P, Hu Z D, et al. Experimental study on the hemostatic activity of Tibet medicinal herb *Lamioiphlonis rotata*. *Phytother Res* 2008, 22: 759

(本文于 2010 年 3 月 1 日收到)