RP-HPLC 法同时测定独一味地上部分中 Sesamoside、Phlorigidoside C 的含量

胡惠平[1]，蔡　垠[2]，陶莹莹[2]，黄孝春[2]，玄振玉[2*]

[1]上海中医药大学，上海 201203；[2]苏州玉森新药开发有限公司，苏州 215125

摘　要　目的：建立同时测定独一味地上部分中 Sesamoside、Phlorigidoside C 的反相高效液相色谱法。**方法：**采用 RP-HPLC 法，色谱柱 Ultimate XB-C_{18}(4.6 mm×250 mm，5 μm)；流动相为甲醇(A 相)-0.2%磷酸梯度洗脱(0~22 min A 相 15%；22~24 min A 相 15~70%；24~30 min A 相 70%；30~32 min A 相 70~15%)；流速 1 mL·min^{-1}；检测波长 237 nm；柱温 30℃。**结果：**回归方程分别为 Sesamoside：Y=1.536×10^3X-1.151(r=0.9999)；Phlorigidoside C：Y=1.286×10^3X-4.995，(r=0.9999)。**结论：**该方法快速、准确、重复性好，为更好地控制独一味药材的质量提供了可行的方法。

关键词　Sesamoside；Phlorigidoside C；独一味；环烯醚萜；高效液相色谱法

中图分类号　R927.2　**文献标志码**　A　**文章编号**　1673-7806(2011)06-515-03

独一味为唇形科植物独一味 *Lamiophlomis rotata*(Benth.)Kudo.的干燥全草，是藏、蒙、纳西等少数民族常用草药[1]。具有止血、镇痛消肿、活血化瘀、补髓行气、续筋接骨之功效。其主要化学成分包括黄酮类、环烯醚萜类、苯乙醇苷类等[2]。现代药理学研究表明，独一味中环烯醚萜类成分是独一味发挥止血作用的主要活性成分，独一味提取物(2 g·kg^{-1}，ig) 能显著缩短小鼠断尾出血时间和凝血时间[3-5]。而现对独一味中环烯醚萜类成分的含量测定只有 HPLC 法测定 Phlorigidoside C[6]，分光光度法测定总环烯醚萜[7]。在对独一味药材进行研究的过程中发现，独一味环烯醚萜类成分中 Sesamoside 的含量较高，可作为独一味环烯醚萜苷类成分的代表性成分，而目前尚未见报道测定其含量的方法。本文建立了反相高效液相色谱法快速准确的测定独一味中两种主要环烯醚萜类成分 Sesamoside、Phlorigidoside C(结构式见图 1)的含量，并对 10 批不同产地的独一味地上部分中两种环烯醚萜类成分进行测定，全面反映独一味中环烯醚萜的质量，为建立独一味中环烯醚萜类成分的测定标准提供参考。

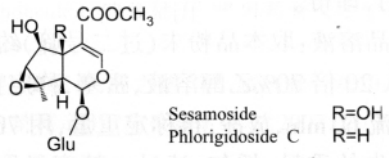

图 1　Sesamoside 和 Phlorigidoside C 的结构式

1　仪器和试药

HP1100 高效液相色谱仪（Agilent 科技公司）；Sartorius CP225D 分析天平(精确度 1 μg)。

独一味地上部分购于亳州药材市场，经苏州市药品检验所鉴定确认；Sesamoside、Phlorigidoside C 对照品由上海诗丹德生物技术有限公司提供，纯度经 HPLC 归一化法测定大于 99.0%。甲醇、磷酸为色谱纯；其他试剂为分析纯；水为纯净水。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱：Ultimate XB-C_{18} 柱(4.6 mm×250 mm，5 μm)；流动相：甲醇(A 相)-0.2%磷酸溶液梯度洗脱(0~22 min A 相 15%；22~24 min A 相 15%~70%；24~30 min A 相 70%；30~32 min A 相 70%~15%)；流速：1 mL·min^{-1}；检测波长：237 nm；柱温：30℃；进样量：10 μL。在此条件下，Sesamoside、Phlorigidoside C 均能达到基线分离。HPLC 谱图见图 2。

2.2　样品制备

对照品溶液：称取经五氧化二磷干燥过夜的

作者简介　胡惠平，女，助理研究员
E-mail: huhuiping2001@163.com
*通讯作者　玄振玉，男，博士，高级工程师
E-mail: xuanzhenyu@163.com
收稿日期　2011-04-15　修回日期　2011-10-19

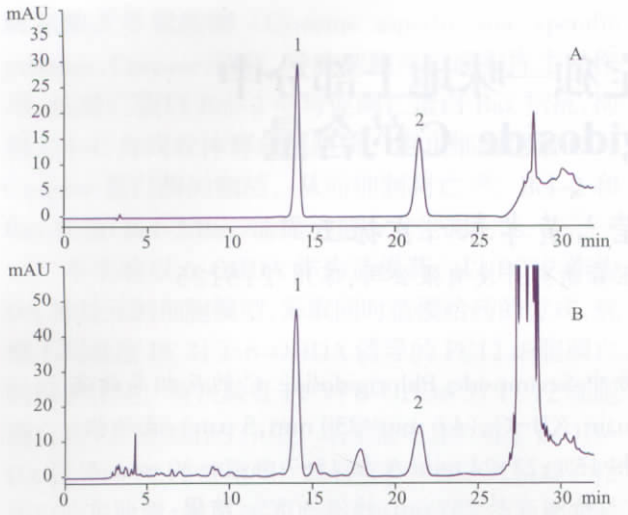

图 2 Sesamoside(1)、Phlorigidoside C(2) HPLC 色谱图

A:对照品;B:样品

Sesamoside、Phlorigidoside C 对照品各约 10 mg,精密称定,置同一 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,作为对照品储备液。精密吸取上述对照品储备液 1 mL 置 10 mL 量瓶中,用 50%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

供试品溶液:取本品粉末(过二号筛)约 1 g,精密称定,加入 20 倍 70%乙醇溶液,密塞,称定重量,90℃水浴中回流 60 min,放冷,再称定重量,用 70%乙醇溶液补足减失的重量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 2 mL 置 10 mL 量瓶中,加 50%甲醇稀释至刻度,即得。

2.3 线性关系考察

从对照品储备液中,精密量取 0.2、0.4、1.0、2.0、5.0 mL,分置于 10 mL 量瓶中,加 50%甲醇稀释至刻度,摇匀,制成 Sesamoside 浓度为 8.12、16.24、40.60、80.20、203.00 μg·mL^{-1} 和 Phlorigidoside C 浓度为 8.04、16.08、40.20、80.40、201.00 μg·mL^{-1} 的溶液。分别精密吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件进行测定,以峰面积积分值为纵坐标,对照品进样量为横坐标进行回归计算得回归方程:Sesamoside:Y=1.536×10^3X−1.151,相关系数:r=0.9999;Phlorigidoside C:Y=1.286×10^3X−4.995,相关系数:r=0.9999。X 为对照品量(μg),Y 为峰面积,表明 Sesamoside 在 0.0812~2.03 μg、Phlorigidoside C 在 0.0804~2.01 μg 范围内线性关系良好。

2.4 精密度试验

取独一味供试品溶液,重复测定 6 次,Sesamoside、Phlorigidoside C 峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 0.15%、0.06%,表明仪器的精密度良好。

2.5 稳定性试验

取本品粉末(产地甘肃天水,批号 20070913,过二号筛)约 1 g,精密称定,按供试品制备方法制备供试品溶液,在 0、2、4、6、8 h 分别进样 1 次,每次进样 10 μL,在 5 个时间点测定的 Sesamoside、Phlorigidoside C 峰面积积分值的相对标准偏差(RSD)分别为 0.29%、0.31%,表明本品溶液在 8 h 内稳定。

2.6 重复性试验

取本品粉末(产地甘肃天水,批号 20070913,过二号筛)6 份,每份约 1 g,精密称定,按供试品制备方法制备供试品溶液。每份进样 10 μL,样品中 Sesamoside、Phlorigidoside C 的平均含量分别为 8.069 mg·g^{-1}、4.952 mg·g^{-1},相对标准偏差(RSD)分别为 1.37%、1.37%。

2.7 回收率试验

取本品粉末(产地甘肃天水,批号 20070913,Sesamoside 含量为 8.069 mg·g^{-1}、Phlorigidoside C 含量为 4.952 mg·g^{-1},过二号筛)9 份,每份 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,按样品含量的 80%、100%、120%分别加入对照品,每份平行 3 份,按供试品制备方法制备供试品溶液。按拟订方法测定含量,本方法平均回收率为 Sesamoside:101.65%、Phlorigidoside C:100.70%,RSD 分别为 1.03%、1.80%,符合要求。

2.8 样品的测定

按供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,按拟订方法测定 10 批不同产地独一味药材中环烯醚萜的含量,结果见表 1。

表 1 10 批不同产地独一味药材中 Sesamoside、Phlorigidoside C 含量测定结果

产地及批号	Sesamoside 含量 (mg·g^{-1})	Phlorigidoside C 含量 (mg·g^{-1})
西藏拉萨(20080802)	6.423	5.509
西藏徒布(20071015)	9.958	5.612
甘肃定西(20070928)	11.183	4.783
甘肃天水(20070913)	9.399	5.082
甘肃陇西(20070910)	8.085	4.683
甘肃玛曲(20080604)	10.474	6.393
青海玉树(20071009)	9.992	10.337
青海久治(20080617)	7.808	3.073
甘肃金昌(20070910)	10.327	5.018
青海河南(20080910)	1.588	1.538

3 讨 论

独一味主要产于西藏、青海、云南、四川、甘肃等省区,分布面积较广,各地质量有着很大的差异,这给独一味的研究、应用带来了很大的困难。研究结果表明 10 批不同产地的独一味地上部分中

Sesamoside、Phlorigidoside C 含量相差较大，以青海河南最低，青海玉树最高，两者间两种环烯醚萜苷的含量相差近 7 倍，因此，非常有必要建立相应的定量方法对独一味中环烯醚萜类成分进行准确的测定，控制原药材的质量，从而保证药效的一致性。

对独一味中地上部位小鼠口服给药，实验结果表明，独一味中环烯醚萜苷类成分能显著缩短小鼠断尾出血时间和凝血时间，其药效与云南白药相近，其他部位则基本无此方面的活性[3-5]。而现行的标准中并未对独一味中的环烯醚萜类成分进行质量控制。本文对独一味中两种主要的环烯醚萜类成分进行测定，测定结果表明 10 批不同产地的独一味地上部分中 Sesamoside 的含量绝大部分都高于 Phlorigidoside.C 的含量(青海玉树除外)。钱大玮[6]及李茂星[7]的研究，Phlorigidoside C 的含量为 3.607~4.142 mg·g^{-1}，而两批独一味地上部分中总环烯醚萜的含量为 32.8~37.6 mg·g^{-1}，本文所测定的环烯醚萜类成分 Sesamoside 的含量较高，绝大部分含量均大于 6 mg·g^{-1}，而 10 批独一味地上部分中两种环烯醚萜含量最高者可达 20.329 mg·g^{-1}，表明 Sesamoside、Phlorigidoside C 这两种环烯醚萜是独一味中主要的环烯醚萜类成分。

本文建立了反相高效液相色谱法，快速准确的测定独一味地上部分中 Sesamoside、Phlorigidoside.C 的含量，并对 10 批不同产地的独一味地上部分中两种环烯醚萜类成分进行测定，全面地反映了独一味中环烯醚萜类成分的质量，为建立独一味环烯醚萜类成分的质量控制方法提供了一定的参考。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[S]. 北京：化学工业出版社，2005：184-5.
[2] 张 凤，孙连娜，陈万生. 独一味的化学成分及药理作用[J]. 药学实践杂志，2008，26(3)：169-71.
[3] 李茂星，贾正平，胡之德，等. 藏药独一味止血有效部位总环烯醚萜对大鼠血液凝集参数的影响 [J]. 民族医药，2007，18(3)：231-3.
[4] 贾正平，李茂星，张汝学，等. 独一味止血有效部位的实验研究[J]. 解放军药学学报，2005，21(4)：272-4.
[5] 沈 涛，贾正平，李茂星，等. 独一味水提取物止血作用及其机理的初步研究[J]. 中药新药与临床药理，2006，17(2)：93-6.
[6] 钱大玮，段金廒，朱玲英，等. HPLC 测定独一味中 Phlorigidoside.C 的含量[J]. 中国药科大学学报，2004，35(6)：549-51.
[7] 李茂星，贾正平，胡之德，等. 藏药独一味中总环烯醚萜苷的含量测定[J]. 华西药学杂志，2007，22(2)：208-10.

Determination of Sesamoside and Phlorigidoside C in Herb *Lamiophlomis rotata* by HPLC

HU Hui-ping[1], CAI yin[2], TAO Ying-ying[2], HUANG Xiao-chun[2], XUAN Zhen-yu[2*]

[1]*Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203;*
[2]*Suzhou Youseen New Medicine Exploration Co., Ltd., Suzhou 215125, China*

ABSTRACT **Objective:** To develop an HPLC method to determine Sesamoside and Phlorigidoside C in Herb *Lamiophlomis rotata*. **Methods:** The samples were separated at 30℃ on an Ultimate XB-C_{18} column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) eluted with methanol and 0.2% phosphoric acid in a gradient mode. The ratio of methanol was kept constant of 15% from 0 to 22 min and increased to 70% in 2 min, then kept constant from 24 to 30 min and decreased back to 15% in 2 min. The detection wavelength was 237 nm, and the flow rate was 1 mL·min^{-1}. **Results:** Sesamoside: $Y=1.536\times10^{3}X-1.151$, $r=0.9999$; Phlorigidoside C: $Y=1.286\times10^{3}X-4.995$, $r=0.9999$. **Conclusion:** The method was rapid and precise, and can be used for controlling the quality of Herb *Lamiophlomis rotata*.

KEY WORDS Sesamoside; Phlorigidoside C; Herb *Lamiophlomis rotata*; Iridoids; HPLC