

· 研究报告 ·

应用高效液相色谱法测定消亢胶囊中迷迭香酸的含量

肖金宝¹, 姜宗文¹, 孙丹², 肖秋生¹, 王双¹, 夏智¹ (1. 解放军208医院461临床部药剂科, 吉林长春130021; 2. 空军航空大学门诊部, 吉林长春130021)

[摘要] 目的 建立测定消亢胶囊含量的方法。方法 采用高效液相色谱(HPLC)法测定消亢胶囊中迷迭香酸的含量。色谱柱: Agilent C₁₈柱, 流动相: 甲醇-0.5%甲酸(50:50), 流速: 1 ml/min, 检测波长: 330 nm, 柱温: 30℃, 进样量: 10 μl。结果 消亢胶囊中夏枯草迷迭香酸的浓度在2.88~20.16 μg范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.9998$), 平均回收率为99.54%, RSD为0.40% ($n=9$)。结论 该方法操作简便、结果准确可靠, 适用于消亢胶囊中迷迭香酸的含量测定。

[关键词] 消亢胶囊; 迷迭香酸; 夏枯草; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1; O657.72

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2015)06-0555-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.06.020

Determination of the rosmarinic acid in Xiaokang capsule by HPLC

XIAO Jinbao¹, JIANG Zongwen¹, SUN Dan², XIAO Qiusheng¹, WANG Shuang¹, XIA Zhi¹ (1. Department of Pharmacy, 461th Clinical Department, No.208 Hospital of PLA, Changchun 130021, China; 2. Outpatient Department of Air force Aviation University, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective** To develop a method for determination of the rosmarinic acid in Xiaokang capsules. **Methods** An HPLC method was developed. The determination was performed on Agilent C₁₈ column at 30℃ with a mobile phase composed of methanol: 0.5% formic acid (50:50) run at a flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 330 nm and the injection volume was 10 μl. **Results** The linear range of rosmarinic acid concentrations was 2.88 to 20.1 μg/ml ($r=0.9998$). The average recovery was 99.5% (RSD=0.40%, $n=9$). **Conclusion** An assay for the determination of the rosmarinic acid in Xiaokang capsule that is simple, rapid, accurate and reliable has been developed.

[Key words] Xiaokang capsule; rosmarinic acid; Prunella; HPLC

消亢胶囊是由空军航空大学门诊部研制的非标准制剂, 具有滋阴清热、养心宁神之功效。用于治疗甲状腺功能亢进、心慌、乏力、多食、消瘦、手颤、情绪急躁、粗脖、突眼等。该制剂是由夏枯草、羚羊角、朱砂、牡蛎、郁金等药材组成。夏枯草系方中主要药味之一, 具有清肝泻火、明目、散结消肿之功效, 临床多用于治疗甲状腺肿大、淋巴结核、乳腺增生、高血压、肺结核、急性黄疸型传染性肝炎等疾病^[1]。目前, 国内针对含夏枯草制剂的含量测定方法已有较多文献报道^[2-7], 迷迭香酸为夏枯草标志性成分^[3], 笔者采用高效液相色谱(HPLC)法测定消亢胶囊中迷迭香酸的含量, 为消亢胶囊质量评价和质量标准的建立

提供科学依据, 以确保制剂质量可靠和安全有效。

1 仪器与试剂

LC-15CHPLC仪、SPD-15C检测器、CTO-15C柱温箱(日本岛津公司)、101A-2E电热鼓风干燥箱(上海实验仪器厂有限公司)、SB-5200DT超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)、TG328B电光分析天平(上海天平仪器厂)、SHZ-D(III)循环水式真空泵(河南省予华仪器有限公司)。

消亢胶囊(规格: 每粒0.3g, 空军航空大学门诊部研制生产, 批号: 140518、140722、140801), 迷迭香酸对照品(中国食品药品检定研究所, 批号: 11181-201203), 甲醇(美国Fisher公司), 甲酸(天津市华东试剂厂, 批号: 20140412), 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent C₁₈ 色谱柱

[基金项目] 军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题(No. 14ZJZ03-2)

[作者简介] 肖金宝, 硕士研究生, 药师。研究方向: 医院制剂、临床药学。E-mail: xiaojinyi2007@126.com

[通讯作者] 姜宗文, 本科, 副主任药师。研究方向: 医院药学。Tel: (0431)86946285; E-mail: jiangzw5637@163.com

(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.5% 甲酸(50 : 50), 流速: 1.0 ml/min, 检测波长: 330 nm, 柱温: 30 °C, 进样量: 10 μl。

2.2 系统适用性实验 在上述色谱条件下对迷迭香酸的对照品和供试品进行分析, 结果显示, 理论塔板数>3 000, 供试品中迷迭香酸色谱峰与相邻色谱峰分离度>1.4, 拖尾因子 1.01。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液 精密称取迷迭香酸对照品适量, 加甲醇稀释制成浓度为 0.028 8 mg/ml 的对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液 取 20 粒本品胶囊的内容物并称重, 混匀, 从中精密称定 0.3 g 置 50 ml 具塞锥形

瓶中, 加甲醇 10 ml, 连锥形瓶称重, 超声 30 min, 取出, 静置, 放凉, 补重, 抽滤, 滤液以 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3.3 阴性对照溶液 取按处方比例及生产工艺制备缺夏枯草的阴性样品, 按供试品溶液的制备方法, 制成阴性对照溶液。

2.4 方法专属性考察 精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各 10 μl, 注入 HPLC 仪中, 色谱图见图 1。在与对照品色谱峰相应的位置上供试品具有相同保留时间的色谱峰, 阴性对照溶液在此峰位无吸收, 对本品的含量测定无干扰。图 1A 迷迭香酸的浓度为 28.8 μg/ml, 图 1B 迷迭香酸的含量为 14.89 μg/ml。

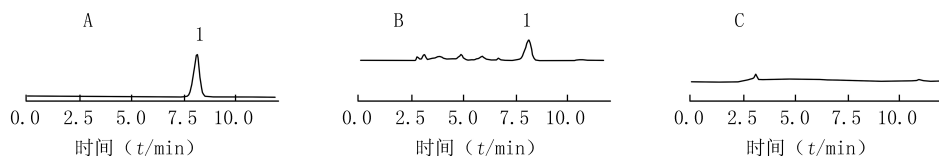


图 1 迷迭香酸的 HPLC 图

A. 对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 阴性对照溶液; 1. 迷迭香酸

2.5 线性关系考察 分别精密量取对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 ml 置 5 ml 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 按“2.1”项下色谱条件进样 10 μl, 测定峰面积。以对照品的浓度(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程: $Y=25\ 690.93 X-28\ 564.93$, $r=0.999\ 8$ 。结果表明, 迷迭香酸的浓度在 2.88~20.16 μg 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μl, 按“2.1”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 记录色谱图。结果显示, $RSD=0.93\%$, 表明精密度良好。

2.7 重复性试验 取供试品溶液 6 份, 按“2.1”项下色谱条件, 测定峰面积并计算迷迭香酸平均含量为 0.05%。 $RSD=0.61\%$, 表明方法重现性良好。

2.8 稳定性试验 取同一供试品(批号: 20140722) 适量, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 室温下放置, 按“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样 10 μl, 测定峰面积, 记录色谱图。结果显示, $RSD=0.75\%$, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.9 加样回收率试验 精密称取已知含量的消亢胶囊内容物 9 份(每份约 0.15 g), 分别加入对照品溶液, 按“2.3.2”项下方法制备, 按“2.1”项下色谱条件测定峰面积, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果(n=9)

取样量 (m/mg)	胶囊中含量 (m/μg)	加入量 (m/μg)	测得量 (m/μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
149.8	74.9	60.0	134.5	99.33		
150.3	75.2	60.0	135.0	99.67		
150.0	75.0	60.0	135.1	100.20		
150.3	75.2	75.0	149.8	99.73		
150.0	75.0	75.0	149.2	98.93	99.54	0.40
150.1	75.1	75.0	149.7	99.46		
150.5	75.3	90.0	165.1	99.78		
150.3	75.2	90.0	164.8	99.56		
150.3	75.2	90.0	164.5	99.22		

2.10 样品含量测定 取 3 批消亢胶囊(批号: 140518、140722、140801) 约 0.3 g, 精密称定, 按“2.3.2”项下方法制备, 在“2.1”项下色谱条件下, 测定峰面积, 并计算样品中迷迭香酸含量分别为 0.052%、0.050%、0.050%。

3 讨论

3.1 检测波长的选择 根据文献^[3,4,8,9], 取供试品溶液、对照品溶液分别在 319 nm 和 330 nm 波长下进行检测。供试品溶液和对照品溶液均在 330 nm 波长处有最大吸收, 阴性对照溶液在此处无吸收, 故选择检测波长为 330 nm。

(下转第 560 页)

- ed bone metastases of breast carcinoma successfully treated by S-1 chemotherapy [J]. *GanTo Kagaku Ryoho*, 2011, 38 (11):1873-1875.
- [23] Mori T, Yoshimura G, Ito D, *et al.* Three cases effectively treated with S-1 therapy for liver metastasis of breast cancer in long term [J]. *GanTo Kagaku Ryoho*, 2011, 38 (9):1495-1498.
- [24] Kubo H, Kijima D, Tada K, *et al.* A case of anthracycline- and taxane-resistant recurrent advanced breast cancer successfully treated with S-1 monotherapy [J]. *GanTo Kagaku Ryoho*, 2010, 37 (7):1325-1327.
- [25] Kato M, Kitayama J, Yamaguchi H, *et al.* Three cases of metastatic breast cancer effectively treated with S-1 therapy [J]. *GanTo Kagaku Ryoho*, 2010, 37 (5):903-906.
- [26] Aoyagi H, Kaneko J, Makinose T, *et al.* A case of stage IV breast cancer responding to S-1 therapy after FEC and PTX therapies [J]. *GanTo Kagaku Ryoho*, 2009, 36 (12):2474-2476.
- [27] Takashima T, Nakayama T, Yoshidome K, *et al.* Phase II study of s-1 in combination with trastuzumab for HER2-positive metastatic breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34:3583-3588.
- [28] Ishida K. A case of recurrent breast cancer with liver metastases showing good response to combination therapy with S-1 plus trastuzumab [J]. *GanTo Kagaku Ryoho*, 2013, 40 (10):1385-1387.
- [29] Nakayama T, Morita S, Takashima T, *et al.* Phase I study of S-1 in combination with trastuzumab for HER2-positive metastatic breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31 (9):3035-3039.
- [30] Tokugawa T, Kobayashi A, Okubo K, *et al.* A patient with multiple skin metastases from breast cancer responding to S-1 effectively under treatment with trastuzumab [J]. *GanTo Kagaku Ryoho*, 2009, 36 (4):679-682.
- [收稿日期] 2015-02-09 [修回日期] 2015-06-04
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 556 页)

3.2 流动相的选择 根据文献[8,9]报道,选用 A. 乙腈-1.0% 醋酸(16:84)、B. 甲醇-0.5% 甲酸(40:60)、C. 甲醇、D. 甲醇-0.5% 甲酸(50:50),4 种流动相进样,记录色谱图。结果显示,以 A 为流动相时,未分离出迷迭香酸特定峰;以 B 为流动相时,分离效果不佳,出现拖尾峰并且保留时间长;以 C 为流动相时,分离效果不佳但保留时间适宜;以 D 为流动相时,分离良好并有适宜的保留时间。因此,确定以甲醇-0.5% 甲酸(50:50)为本实验的流动相。迷迭香酸为酚酸类化合物,流动相 pH 值对峰形影响较大,甲酸含量在 0.5% 时,色谱峰形较好。如果流动相中不添加有机酸则峰形不对称,且酚酸类化合物在有机溶剂占流动相体积 1/2 时,分离效果更好,并有适宜的保留时间。

实验结果显示,本方法操作简便、快捷,结果准确、可靠,可用于消冗胶囊含量的质量控制。

【参考文献】

[1] 南京中医药大学,中药大辞典[M].上海:上海科技出版社,

- 2014:1827.
- [2] 梁杰康,张琳,严晓明,等.采用 HPLC-ESI-MS/MS 测定夏枯草的主要化学成分[J].*中国中医学报*,2013,11(14):153-154.
- [3] 刘伟,丁海杰.HPLC 测定夏枯草中熊果酸、齐墩果酸、迷迭香酸的含量[J].*中成药*,2008,30(4):577-579.
- [4] 刘伟,丁海杰,孙曙光,等.夏枯草 HPLC 指纹图谱的研究[J].*中草药*,2008,39(2):272-274.
- [5] 郭兴辉,刘伟.HPCE 法测定夏枯草中咖啡酸的含量[J].*中国药事*,2010,24(2):166-167.
- [6] 邢志霞,崔燕兵,赵喜兰,等.毛细管胶束电动色谱法测定夏枯草中齐墩果酸、熊果酸含量[J].*药品鉴定*,2009,16(24):47.
- [7] 林丽美,许招懂,姚江雄,等.夏枯草中异迷迭香酸苷和迷迭香酸的含量测定[J].*中国药理学杂志*,2012,47(15):1204-1207.
- [8] 许招懂,王智民,刘菊妍,等.夏枯草中异迷迭香酸苷 TLC 鉴别和 HPLC 含量测定[J].*中国实验方剂学杂志*,2012,18(21):106-108.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典 2010 年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:236.

[收稿日期] 2014-11-25 [修回日期] 2015-04-03
[本文编辑] 李睿旻