

HPLC法同时测定山香圆片中女贞苷和野漆树苷的含量^{*}

章光文¹, 周国平¹, 杨香菊², 谢二磊¹

(1. 江西省食品药品检验所, 南昌 330046 2. 江西省胸科医院, 南昌 330006)

摘要 目的: 采用反相高效液相色谱法同时测定山香圆片中女贞苷和野漆树苷的含量。方法: 使用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇 - 0.5% 磷酸 (43: 57), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 336 nm, 柱温为 30 ℃。结果: 女贞苷、野漆树苷浓度分别在 14.2~170 μg · mL⁻¹ 和 7.24~86.9 μg · mL⁻¹ 范围内, 线性关系良好; 平均回收率 ($n=6$) 分别为 101.2% 和 101.3%, RSD 分别为 1.2% 和 1.7%。结论: 本法简便、准确, 重复性好, 可为山香圆片的质量控制提供实验依据。

关键词: 山香圆片; 女贞苷; 野漆树苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)06-0912-03

HPLC simultaneous determination of ligustroflavone and rhoifolin in Shanxiangyuan tablets^{*}

ZHANG Guang-wen¹, ZHOU Guo-ping¹, YANG Xiang-ju², XIE Er-lei¹

(1. Jiangxi Provincial Institute for Food and Drug Control Nanchang 330046 China 2. Jiangxi Chest Hospital Nanchang 330006, China)

Abstract Objective To develop an RP-HPLC method for the determination of ligustroflavone and rhoifolin in Shanxiangyuan tablets **Method** The separation was performed on a Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase of acetonitrile-0.5% phosphoric acid (43: 57). The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, and the detecting wavelength was 336 nm; column temperature of 30 ℃. **Results** The linear ranges of ligustroflavone and rhoifolin were 14.2 to 170 μg · mL⁻¹ and 7.24 to 86.9 μg · mL⁻¹, respectively; the average recoveries of ligustroflavone and rhoifolin were 101.2% (RSD=1.2%) and 101.3% (RSD=1.7%), respectively **Conclusion** The method is simple and accurate with good reproducibility. It can be used to control the quality of Shanxiangyuan tablets

Key words Shanxiangyuan tablets; ligustroflavone; rhoifolin; HPLC

山香圆片是山香圆叶 (Folium Turpiniae) 的单方制剂, 具有清热解毒、利咽消肿之功效, 用于喉痹、乳蛾、咽喉肿痛等症。现代药理研究表明, 山香圆叶具有抗菌、镇痛以及调节免疫作用, 总黄酮是其主要有成分^[1~4], 但目前山香圆叶化学成分研究报道其仅含有三萜类成分^[5~7]、大柱烷类成分^[8], 为检测山香圆片中有效成分的含量, 江西省食品药品检验所从山香圆叶中提取分离出女贞苷 (C₃₃H₄₀O₁₈, 芹菜素-7-O-鼠李糖-(1→2)-[鼠李糖-(1→6)]-葡萄糖苷)^[9] 和野漆树苷 (C₂₇H₃₀O₁₄, 芹菜素-7-O-鼠李糖-(1→2)-葡萄糖苷)^[10] 2个黄酮类化合物, 作为含量测定用对照品。目前尚未有同时测定女贞苷和野漆树苷含量的文献报道, 本文采用

反相高效液相色谱法同时测定山香圆片中女贞苷和野漆树苷的含量, 并考察了多批山香圆片中2种成分的含量, 为山香圆片的质量控制提供了科学依据。

1 仪器与试剂

Waters系列高效液相色谱仪: Waters 600 Controller 低压混合四元泵, Waters 717 自动进样器, Waters 2996 PAD 检测器, Empower 色谱工作站。电子天平: 赛多利斯 (Sartorius) BS110S 十万分之一天平。

女贞苷和野漆树苷均为江西省食品药品检验所自制, 经¹H-NMR、¹³C-NMR、MS 鉴定结构, 纯度以 HPLC 峰面积归一化法测定均高于 98%; 样品 (每片重 0.25 g) 及缺山香圆叶浸膏阴性样品由江

^{*} 国家科技支撑计划子课题任务书 (2006BA106A01-01)

第一作者 Tel: (0791) 8158028 E-mail: zhanggw@jxfda.gov.cn

西山香药业有限公司提供; 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品混合溶液的制备 称取女贞苷对照品 10 mg 精密称定, 置 50 mL 量瓶中; 再称取野漆树苷对照品 10 mg 精密称定, 置 100 mL 量瓶中。分别加 50% 甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品储备液; 分别精密量取上述的女贞苷和野漆树苷对照品储备液各 5 mL 至 25 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 即得 (女贞苷浓度 $47.36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 野漆树苷浓度 $21.48 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.2 供试品溶液的制备 取本品 20 片, 除去包衣, 精密称定总重, 计算出平均片重, 研细, 取约 0.3 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 称定重量, 加热回流 60 min, 放冷, 再称定重量, 用 50% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 阴性样品溶液的制备 取缺山香圆叶浸膏的阴性样品, 同“2.2”项下方法操作, 制得阴性样品溶液。

2.4 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 - 0.5% 磷酸 (43:57); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长 336 nm; 柱温: 30°C ; 进样量: 10 μL ; 分析时间为 30 min。在上述色谱条件下, 女贞苷和野漆树苷与相邻色谱峰分离度大于 2.0, 理论塔板数均大于 3000。色谱图见图 1。

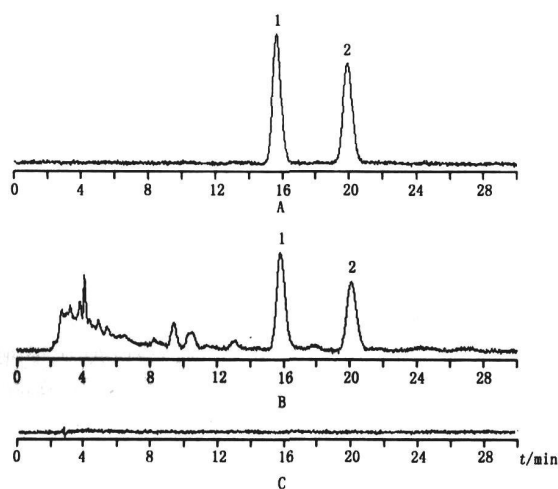


图 1 对照品 (A)、080501 号样品 (B) 及阴性样品 (C) 色谱图

Fig 1 Chromatograms of reference substances (A), sample No. 080501 (B) and negative sample without Folium Turpiniae

1. 女贞苷 (ligustroflavone) 2. 野漆树苷 (rhoifolin)

2.5 线性关系考察 取对照品女贞苷和野漆树苷适量, 配成女贞苷浓度分别为 14.2, 21.3, 42.5, 84.2, 170 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 野漆树苷浓度分别为 7.24, 10.9, 21.7, 42.1, 86.9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品混合溶液, 按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积 Y 对浓度 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 绘制标准曲线, 得女贞苷和野漆树苷回归方程分别为:

$$Y = 1.217 \times 10^4 X + 8.447 \times 10^2 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 2.380 \times 10^4 X + 9.133 \times 10^2 \quad r = 0.9999$$

结果表明: 女贞苷在 14.2~170 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 野漆树苷在 7.24~86.9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 线性关系良好。

2.6 精密度试验 精密吸取按“2.1”项下方法制备的对照品混合溶液 10 μL , 在上述色谱条件下连续进样 5 次, 测定峰面积。结果女贞苷及野漆树苷峰面积的 RSD ($n=5$) 分别为 0.7% 和 0.6%。

2.7 稳定性试验 取同一批号的山香圆片 (批号 080501) 的供试品溶液分别在 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12 h 测定, 女贞苷及野漆树苷峰面积的 RSD ($n=7$) 分别为 0.7% 和 1.0%, 说明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 重复性试验 精密称取同一批号的山香圆片 (批号 080501) 0.3 g 共 5 份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进样测定。结果女贞苷和野漆树苷含量平均值 ($n=5$) 分别为 $7.88 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $3.32 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.2% 和 1.6%, 表明该方法重复性良好。

2.9 回收率试验 精密称取已测知含量的山香圆片 (批号 080501) 粉末 6 份, 每份 0.15 g, 每份精密加入含女贞苷 $21.26 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和野漆树苷 $10.86 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液 50 mL, 按“2.2”项下方法制备所需溶液, 在上述色谱条件下进行分析测定, 计算回收率。结果女贞苷和野漆树苷的平均回收率 ($n=6$) 分别为 101.2% 和 101.3%, RSD 分别为 1.2% 和 1.7%。

2.10 样品测定 分别取不同批次的山香圆片, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液 10 μL , 在上述色谱条件下进样分析, 测定峰面积, 用外标法计算出女贞苷和野漆树苷的含量, 测定结果见表 1。

3 讨论

3.1 提取方式的选择 考察了加热回流法、超声提取法 2 种方法对女贞苷和野漆树苷含量测定的影响, 结果表明加热回流提取法提取更完全, 故选择回

表 1 山香圆片中女贞苷和野漆树苷的含量 (mg·片⁻¹, n= 2)
Tab 1 The contents of ligustroflavone and rhoifolin in Shanxiangyuan tablets(mg per tablet n= 2)

批号 (LotNo)	女贞苷 (ligustroflavone)	野漆树苷 (rhoifolin)
080401	3.17	1.43
080402	3.16	1.43
080403	3.16	1.44
080404	3.11	1.46
080405	3.16	1.46
080406	3.14	1.46
080407	3.13	1.47
080408	3.16	1.51
080409	3.19	1.16
080410	3.21	1.49
080501	3.95	1.73
080502	3.80	1.65
080503	3.93	1.72
080504	3.87	1.69
080505	3.92	1.69
080506	3.83	1.67
080507	3.91	1.67
080508	3.88	1.67
080509	3.90	1.73
080510	3.13	1.51
080511	4.73	1.13
080606	4.11	1.12
080607	4.43	2.76
080703	4.55	1.20
080704	5.10	1.42
080708	4.42	1.15
080902	4.84	1.32

流提取法; 提取溶剂考察了水、30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇、50% 乙醇、乙醇, 结果表明 50% 甲醇提取效率较高, 故选择 50% 甲醇为提取溶剂; 对 50% 甲醇用量 (10 25 50 100 mL) 进行考察, 结果表明 50% 甲醇用量为 50 mL 时可提取完全, 故提取溶剂用量定为 50 mL; 提取时间考察了 20 30 60 90 min, 结果表明 60 min 可提取完全, 故提取时间定为 60 min。

3.2 检测波长的选择 取“2.1”项的对照品混合溶液, 在 210~ 400 nm 范围内进行扫描, 女贞苷在 265 336 nm 处出现 2 个吸收峰, 野漆树苷在 266 336 nm 处出现 2 个吸收峰。考虑到在短波长处样品中其他组分的干扰较大, 在 336 nm 处女贞苷和野漆树苷均有最大吸收, 故选择 336 nm 作为女贞苷和野漆树苷的检测波长。

3.3 流动相的选择 在对流动相进行选择时考察

了甲醇-水、甲醇-0.5% 磷酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.5% 磷酸水溶液 4 个溶剂系统。结果表明, 以甲醇-0.5% 磷酸水溶液为流动相, 所得色谱峰峰形好, 分离效果佳。

3.4 小结 本文测定了 27 批山香圆片中女贞苷和野漆树苷的含量, 结果显示, 二成分的含量稳定, 波动幅度不大, 可作为山香园片的含量测定指标。

参考文献

1 ZHAN Yi-fei(詹怡飞), ZHANG Jian-jun(张建军), CHEN Jiao-ting(陈娇婷), et al. Studies on the analgesia effect of Shanxiangyuan baical tablet(山香圆含片镇痛作用研究). *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2005 16(5): 389

2 ZHAN Yi-fei(詹怡飞), ZHANG Jian-jun(张建军), MAO You-chang(毛有昌). Studies on the antibacterial activity of Shanxiangyuan baical tablet(山香圆含片抗菌作用的试验研究). *J Jiangxi Univ Tradit Chin Med*(江西中医学院学报), 2005 17(2): 55

3 ZHANG Lei(张磊), LI Jun(李俊), YU Si-chun(余世春), et al. Effect of total flavonoids of *Turpinia arguta* Seem. on immune function in adjuvant arthritis rats in vitro(山香圆总黄酮体外对大鼠佐剂性关节炎免疫功能的影响). *Chin Pharm Bull*(中国药理学通报), 2007, 23(1): 106

4 ZHANG Lei(张磊), LI Jun(李俊), YU Shi-chun(余世春), et al. Effect of total flavonoids of *Turpinia arguta* Seem. on immune function in hypofunction rats(山香圆总黄酮对免疫功能低下小鼠免疫功能的影响). *Acta Univ Med Anhui*(安徽医科大学学报), 2006 21(5): 539

5 FANG Zha-pu(方乍浦), YIN Guo-jiang(尹国江). Chemical constituents of *Folium Turpiniae* II(山香圆叶化学成分的研究 II). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 1985 16(2): 5

6 FANG Zha-pu(方乍浦), LU Pu-ping(卢普平). Chemical constituents of *Folium Turpiniae* III(山香圆叶化学成分的研究 III). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 1985 16(12): 5

7 FANG Zha-pu(方乍浦), YIN Guo-jiang(尹国江), ZHANG Ya-jun(张亚均). Chemical constituents of *Folium Turpiniae* IV(山香圆叶化学成分的研究 IV). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 1987 18(7): 6

8 Yu Q, Otsuka H, Hirata E, et al. Turpinionosides A-E megastigmane glucosides from leaves of *Turpinia temata* Nakai. *Chem Pharm Bull*, 2002 50(5): 640

9 Pieroni A, Padaly P. Isolation and structure elucidation of ligustroflavone a new apigenin triglycoside from the leaves of *Ligustrum vulgare* L. *Pharmazie*, 2000, 55(1): 78

10 LIANG Qiao-li(梁侨丽), DING Lin-sheng(丁林生). Chemical constituents of *kiblab*(扁豆花化学成分研究). *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 1996 27(4): 205

(本文于 2008 年 11 月 25 日收到)