

HPLC法同时测定不同来源抗宫炎片中连翘酯苷 B和金石蚕苷的含量*

周国平, 谢二磊, 章红, 汤小波

(江西省食品药品检验所, 南昌 330046)

摘要 目的: 采用反相高效液相色谱法测定抗宫炎片中连翘酯苷 B和金石蚕苷的含量。方法: 使用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 - 0.3% 磷酸 (18:82), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 332 nm。结果: 连翘酯苷 B 金石蚕苷进样量分别在 0.12~4.7 μg 和 0.12~4.8 μg 范围内, 与峰面积呈良好线性关系 ($r=0.9999$); 连翘酯苷 B 及金石蚕苷的平均回收率 ($n=6$) 分别为 99.7% 和 100.1%, RSD 分别为 1.8% 和 1.9%。结论: 本法简便、准确, 重复性好, 可为抗宫炎片的质量控制提供实验依据。

关键词: 抗宫炎片; 连翘酯苷 B 金石蚕苷; 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)01-0173-03

Simultaneous HPLC determination of forsythiaside B and poliumoside in Kangongyan tablets of different manufacturers*

ZHOU Guo-ping XIE Er-lei ZHANG Hong TANG Xiao-bo

(Jiangxi Provincial Institute for Food and Drug Control Nanchang 330046, China)

Abstract Objective To develop an RP-HPLC method for the determination of forsythiaside B and poliumoside in Kangongyan tablets **Method** The separation was performed in a Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase of acetonitrile-0.3% phosphoric acid (18:82). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the detecting wavelength was 332 nm. **Results** The linear ranges of forsythiaside B and poliumoside were 0.12-4.7 μg ($r=0.9999$) and 0.12-4.8 μg ($r=0.9999$), respectively. The average recoveries of forsythiaside B and poliumoside were 99.7% (RSD = 1.8%) and 100.1% (RSD = 1.9%), respectively. **Conclusion** The method is simple and accurate with good reproducibility. It can be used to control the quality of Kangongyan tablets

Key words Kangongyan tablets; forsythiaside B; poliumoside; HPLC

抗宫炎片收载在卫生部药品标准中药成方制剂第十一册 87页, 2008年经国家药典委员会认可, 拟上中国药典 2010年版。抗宫炎片由广东紫珠干浸膏、益母草干浸膏、乌药干浸膏 3味中药浸膏组成, 具有清湿热、止带下之功效, 用于因慢性宫颈炎引起的湿热下注、赤白带下、宫颈糜烂、出血等症。方中广东紫珠为君药, 广东紫珠对金黄色葡萄球菌、伤寒沙门氏菌在体外有较强的抑制作用, 对实验性炎症早期的渗出有明显的抑制炎症反应, 可明显缩短出血和凝血时间, 止血效果显著^[1]。化学成分研究表明, 广东紫珠中含有没食子酸、紫珠萜酮、谷甾醇、齐墩果酸、熊果酸、水杨酸、丙氨酸^[2-4]等多种成分。

本实验室首次从该植物中分离出连翘酯苷 B和金石蚕苷 2种化合物。连翘酯苷 B抗金黄色葡萄球菌^[5,6]和奇异变形杆菌^[5]的作用以及金石蚕苷抗氧化、抑制红血球溶血^[7]的作用与广东紫珠的药理作用密切相关。本文采用反相高效液相色谱法同时测定抗宫炎片中连翘酯苷 B和金石蚕苷的含量, 考察不同来源 3批抗宫炎片中这 2种成分含量的差异, 为抗宫炎片的质量控制提供科学依据。

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 2996二极管阵列检测器, Empower 色谱工作站。

* 国家科技支持计划中药产业区域发展及特色产品研究专项资助 (2006BA D6A01-01); 中国药典 2010年版起草品种 (ZH-181)

第一作者 Tel: 13870868633; E-mail: 13870868633@139.com

电子天平:赛多利斯 (Sartorius) BS110S 十万分之一天平。

连翘酯苷 B 和金石蚕苷均为本实验室自制, 经 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、MS 鉴定结构, 纯度以 HPLC 和 TLC 检测均大于 98%; 样品由生产厂家提供, 抗宫炎片 A (江西心正药业有限责任公司, 批号 20071201, 每片含干浸膏 0.25 g), 抗宫炎片 B (江西海尔思药业有限公司, 批号 080729, 每片含干浸膏 0.25 g), 抗宫炎片 C (江西省博士达药业有限公司, 批号 080723, 每片含干浸膏 0.25 g); 乙腈为色谱纯; 水为娃哈哈饮用纯净水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取连翘酯苷 B 及金石蚕苷均约 12 mg 置同一 100 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 (连翘酯苷浓度 $0.1184\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 金石蚕苷浓度 $0.1212\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

2.2 供试品溶液的制备 取本品 10 片, 除去糖衣, 平均片重约 0.24 g 研细, 取 0.25 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加 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 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 0.5% 磷酸 (18:82); 流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长 332 nm; 柱温: 常温; 进样量: 10 μL; 分析时间为 20 min。在上述色谱条件下, 色谱图见图 1。

2.4 线性关系考察 分别吸取按“2.1”项下方法制备的对照品溶液 1, 5, 10, 20, 40 μL, 按上述色谱条件进行分析。结果表明: 连翘酯苷 B、金石蚕苷进样量分别在 0.12 ~ 4.7 μg 和 0.12 ~ 4.8 μg 范围内, 与峰面积呈良好线性关系, 回归方程分别为:

$$Y = 3.386 \times 10^6 X - 4.618 \times 10^4 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 3.141 \times 10^6 X - 5.286 \times 10^4 \quad r = 0.9999$$

2.5 精密度试验 吸取按“2.1”项下方法制备的对照品溶液, 在上述色谱条件下连续进样 6 次, 测定峰面积。结果连翘酯苷 B 及金石蚕苷峰面积的 RSD 分别为 0.9% 和 0.6%。

2.6 稳定性试验 取同一批号的抗宫炎片 A 供试品溶液分别在 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12, 24 h 测定。结果连翘酯苷 B 及金石蚕苷峰面积的 RSD 分别为 0.6% 和 0.9%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

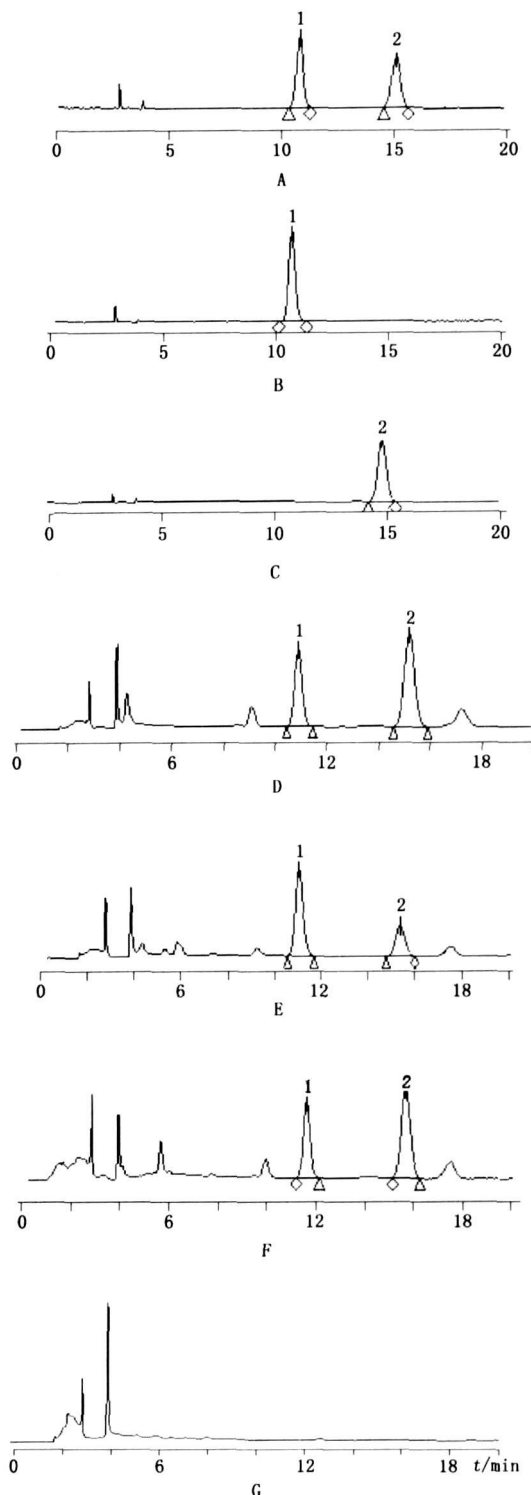


图 1 混合对照品 (A)、连翘酯苷 B 对照品 (B)、金石蚕苷对照品 (C)、抗宫炎片 A (D)、抗宫炎片 B (E)、抗宫炎片 C (F) 及缺广东紫珠阴性样品 (G) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), forsythiaside B reference substance (B), polygodin reference substance (C), Kanggongyan tablets A (D), Kanggongyan tablets B (E), Kanggongyan tablets C (F) and negative sample of Kanggongyan tablets without *Gallipara kwangtungensis* Chun. (G)

1. 连翘酯苷 B (forsythiaside B) 2. 金石蚕苷 (polygodin)

2.7 重复性试验 精密称取同一批号的抗宫炎片 A 6份, 每份 0.25 g 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进行分析测定。结果连翘酯苷 B 及金石蚕苷含量的平均值分别为 2.0 mg·片⁻¹和 3.4 mg·片⁻¹, RSD 分别为 1.8% 和 1.3%。

2.8 回收率试验 精密称取已知含量(连翘酯苷 B 和金石蚕苷的含量分别为 2.0 mg·片⁻¹和 3.4 mg·片⁻¹)的抗宫炎片 A 粉末 6份, 每份约 0.125 g 每份精密加入含连翘酯苷 B (0.021 mg·mL⁻¹) 和金石蚕苷 (0.035 mg·mL⁻¹) 的对照品混合溶液 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。结果连翘酯苷 B 及金石蚕苷的平均回收率 ($n = 6$) 分别为 99.7% 和 100.1%, RSD 分别为 1.8% 和 1.9%。

2.9 样品测定 分别取不同来源的抗宫炎片, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液 10 μ L, 在上述色谱条件下进样分析, 测定峰面积, 用外标法计算出连翘酯苷 B 和金石蚕苷的含量, 测定结果见表 1。

表 1 抗宫炎片中连翘酯苷 B 和金石蚕苷的含量
(mg·片⁻¹, $n = 3$)

Tab 1 The contents of forsythiaside B and polioside in Kanggongyan tablets (mg per tablet, $n = 3$)

样品 (sample)	连翘酯苷 B (forsythiaside B)	金石蚕苷 (polioside)
抗宫炎片 A (Kanggongyan tablet A)	2.1	3.5
抗宫炎片 B (Kanggongyan tablet B)	2.5	1.3
抗宫炎片 C (Kanggongyan tablet C)	2.2	3.3

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 种方法对连翘酯苷 B 和金石蚕苷含量测定的影响, 结果表明: 加热回流提取法提取更完全, 故选择回流提取法; 提取溶剂考察了水、30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇, 结果表明: 50% 甲醇提取效率较高, 故选择 50% 甲醇为提取溶剂; 提取时间考察了 30, 60, 90, 120 min, 结果表明: 60 min 可提取完全, 故提取时间定为 60 min; 考察了提取溶剂用量 (25, 50, 100 mL), 结果采用 50 mL 以上的用量可提取完全, 故选择 50 mL 作为提取溶剂用量。

3.2 检测波长的选择 连翘酯苷 B 和金石蚕苷均

在 331.6 nm 有最大吸收, 故选择 332 nm 作为检测波长。

3.3 流动相的选择 考察了甲醇-水、甲醇-0.5% 磷酸水溶液、乙腈-0.5% 磷酸水溶液 3 个溶剂系统。结果表明, 以乙腈-0.5% 磷酸溶液为流动相, 所得色谱峰峰形较好, 分离效果最佳。同时考察了乙腈-0.5% 磷酸溶液为流动相的 3 个比例 (10:90, 18:82, 25:75), 结果流动相比比例为 18:82 时 20 min 内出峰, 保留时间合适, 分离效果佳。故选择乙腈-0.5% 磷酸溶液 (18:82) 作为流动相。

3.4 小结 本文测定了 3 批抗宫炎片中连翘酯苷 B 和金石蚕苷的含量, 结果表明: 3 批均含连翘酯苷 B 和金石蚕苷, 二者总量之和分别为 5.6, 3.8, 5.5 mg·片⁻¹, 含量接近, 因此连翘酯苷 B 和金石蚕苷可以作为抗宫炎片的含量控制指标。

参考文献

- 1 ZHOU Bo-ting (周伯庭), LIXin-zhong (李新中), ZHONG Guang-rong (钟广蓉), *et al* Elementary pharmacodynamic studies of aerial part of *Calliapa kwangtungensis* Chun (广东紫珠地上部位主要药效学试验). *China J Mod Med* (中国现代医学杂志), 2006, 16(2): 204
- 2 ZHOU Bo-ting (周伯庭), LIXin-zhong (李新中), XU Ping-sheng (徐平声), *et al* Chemical constituents from the upground of *Calliapa kwangtungensis* Chun. (I) [广东紫珠地上部位化学成分研究 (I)]. *Cent South Pharm* (中南药学), 2004, 2(4): 238
- 3 CHEN Yan-hua (陈艳华), FENG Feng (冯锋), REN Dong-chun (任冬春), *et al* Chemical constituents from the upground of *Calliapa kwangtungensis* Chun. (广东紫珠地上部分的化学成分). *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2008, 6(2): 120
- 4 ZHOU Bo-ting (周伯庭), LIXin-zhong (李新中), XU Ping-sheng (徐平声), *et al* Chemical constituents from the upground of *Calliapa kwangtungensis* Chun. (II) (广东紫珠地上部位化学成分研究 (II)). *JTCM Univ Hunan* (湖南中医学院学报), 2005, 25(1): 20
- 5 Dily N, Seidel V, Dubreuil L, *et al* Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from *Ballota nigra* *J Ethnopharmacol* 1999, 67(2): 197
- 6 Nazen iyeh H, Rahman MM, Gibbons S, *et al* Assessment of the antibacterial activity of phenylethanoid glycosides from *Phlomis lanceolata* against multiple-drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* *Nat Med (Tokyo)*, 2008, 62(1): 91
- 7 He ZD, Lau KM, Xu HX, *et al* Antioxidant activity of phenylethanoid glycosides from *Brandisia hancei* *J Ethnopharmacol* 2000, 71(3): 483

(本文于 2008 年 11 月 25 日修改回)