

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.08.006

高效液相色谱法测定消癌平片中通关藤苷 G 含量*

王祁民¹, 李亚静^{1,2}, 安 静¹, 孟 璐^{1,2}, 马银玲¹

(1. 河北省人民医院药学部, 河北 石家庄 050051; 2. 河北医科大学研究生学院, 河北 石家庄 050017)

摘要:目的 建立测定消癌平片中通关藤苷 G 含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Symmetry C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液(55:45, V/V), 流速为 1 mL/min, 检测波长为 230 nm, 柱温为 25 ℃, 进样量为 20 μL。结果 通关藤苷 G 质量浓度线性范围为 2~100 μg/mL; 加样回收率为 97.50%~99.00%, RSD 为 0.73% (n=9)。结论 该方法可靠、简便、准确, 可用于消癌平片的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 消癌平片; 通关藤苷 G; 含量测定; 质量控制

中图分类号: R917; R927.2

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)08-0017-03

Content Determination of Tenacissoside G in Xiao'aiping Tablets by HPLC

WANG Qimin¹, LI Yajing^{1,2}, AN Jing¹, MENG Lu^{1,2}, MA Yinling¹

(1. Department of Pharmacy, Hebei General Hospital, Shijiazhuang, Hebei, China 050051; 2. Graduate School of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China 050017)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the content determination of tenacissoside G in Xiao'aiping Tablets. **Methods** The chromatographic column was Symmetry C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid (55:45, V/V), the flow rate was 1 mL/min, the detection wavelength was 230 nm, the column temperature was 25 ℃, and the sample size was 20 μL. **Results** The tenacissoside G showed good relationship in the range of 2-100 μg/mL. The recovery rates ranged from 97.50% to 99.00%, and RSD was 0.73% (n=9). **Conclusion** The method is reliable, simple and accurate, which can be used for the quality control of Xiao'aiping Tablets.

Key words: HPLC; Xiao'aiping Tablets; tenacissoside G; content determination; quality control

消癌平片由摩罗科植物通关藤(乌骨藤)干燥藤茎水提后经现代工艺制得,具有抗癌、消炎、平喘作用,目前临床主要用于治疗肝癌、肺癌、食管癌等恶性肿瘤^[1-6]。消癌平片药品质量标准含量测定仅以绿原酸一种成分为指标^[7],但绿原酸存在于多种中药中,特异性不强。通关藤及消癌平中主要活性成分均为 C₂₁ 甾体皂苷类物质(包括通关藤苷 G)^[8-9]。本试验中采用高效液相色谱(HPLC)法测定消癌平片中通关藤苷 G 含量,为消癌平片的质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪,配备有 2487 型紫外检测器(美国 Waters 公司);AB204-S 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 仪器有限公司);KQ3200 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

通关藤苷 G 对照品(北京北纳创联生物技术研究院,批号为 160104,纯度大于 98%);消癌平片(烟台东诚大洋制药有限公司,批号分别为 20150301,20150611,20160114,规格为每片 0.3 g);甲醇、乙腈为色谱纯,其

余试剂均为分析纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Symmetry C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1% 磷酸溶液(55:45, V/V);检测波长:230 nm;流速:1 mL/min;柱温:25 ℃;进样量:20 μL。

2.2 溶液制备

供试品溶液:取消癌平片,去除糖衣,研细,取 0.55 g,精密称定,置分液漏斗中,加入三氯甲烷 6 mL、水 24 mL,摇匀,静置,取有机层,连续萃取 3 次,将所制得溶液蒸干,用甲醇复溶,并定容至 10 mL,经 0.22 μm 微膜滤过,取续滤液,即得。

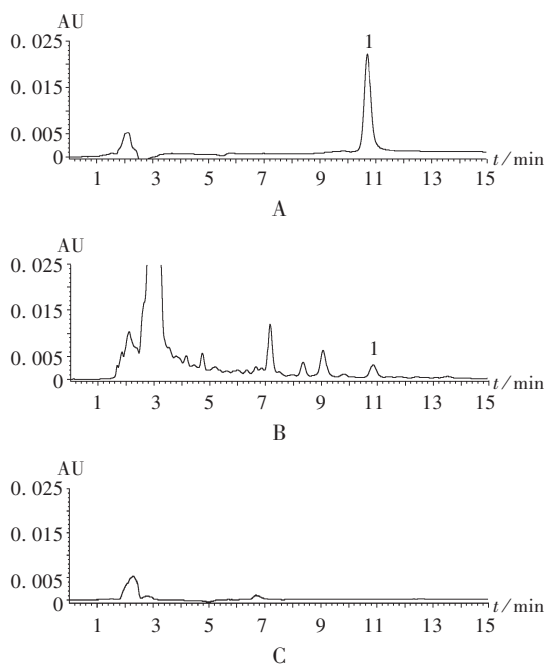
对照品溶液:称取通关藤苷 G 对照品 13.4 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容,得通关藤苷 G 质量浓度为 1.34 mg/mL 的对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性考察:取 2.2 项下对照品溶液适量,用甲醇稀释,制成通关藤苷 G 质量浓度为 67 μg/mL 的对照品溶液。按拟订色谱条件进样对照品溶液、供试品溶液及阴性对照品(甲醇)溶液进行分析,色谱图见图 1。

*基金项目:河北省中医药管理局 2018 年度中医药类科研课题计划[冀中医药[2017]67 号-2018073];河北省 2017 年度医学科学研究重点课题计划[20170245];河北省 2018 年度医学科学研究重点课题计划[20180176]。

第一作者:王祁民,男,硕士研究生,主管药师,研究方向为医院药学,(电话)0311-85988076(电子邮箱)littlebear_chao@sina.com。



1. 通关藤苷 G
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液
图1 高效液相色谱图

线性关系考察:精密量取2.2项下对照品溶液,用甲醇稀释成系列质量浓度(2,4,8,20,40,60,80,100 $\mu\text{g/mL}$)的对照品溶液,按拟订色谱条件进样分析,记录色谱图。以通关藤苷 G 色谱峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 5 \times 10^6 X - 6048$, $r = 0.9995$ ($n = 8$)。结果表明,通关藤苷 G 质量浓度在2~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取2.2项下对照品溶液适量,加甲醇制成通关藤苷 G 低、中、高质量浓度(20.0, 40.0, 60.0 $\mu\text{g/mL}$)的对照品溶液,各分别重复进样6次,记录峰面积。结果的 RSD 分别为0.76%, 1.71%, 1.27% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:室温下取供试品(样品批号为20150301)溶液,分别于0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 h 时进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 为0.82% ($n = 7$),表明室温下供试品溶液在24 h 内稳定。

重复性试验:取同批(批号为20150301)样品粉末,6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果的 RSD 为1.84% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:称取样品粉末300 mg, 9份,精密称定,分别加入对照品适量,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表1。

2.4 样品含量测定

取3批次样品,依法制备供试品溶液,按拟订色谱

表1 加样回收试验结果($n = 9$)

样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
19.8	10	29.6	98.00		
20.0	10	29.7	97.00		
19.9	10	29.8	99.00		
19.8	20	39.5	98.50		
20.1	20	39.6	97.50	98.20	0.73
19.9	20	39.6	98.50		
19.8	30	49.6	99.30		
19.9	30	49.3	98.00		
20.0	30	49.4	98.00		

条件进样测定,计算含量。结果批号为20150301, 20150611, 20160114 的消癌平片中通关藤苷 G 含量分别为每片39.8, 39.4, 40.1 μg 。

3 讨论

3.1 检测方法选择

全波长扫描显示,通关藤苷 G 最大吸收波长为230 nm, 以此确定230 nm 为本试验检测波长。预试验中流动相曾采用乙腈-水等度洗脱,通关藤苷 G 分离度较差;选用乙腈-0.1%磷酸溶液(55:45, V/V)为流动相时通关藤苷 G 峰与相邻峰分离好,基线稳定,最终采用乙腈-0.1%磷酸溶液(55:45, V/V)洗脱。

3.2 质量控制指标选择

通关藤及其制剂消癌平中成分较复杂,含有C21甾体苷类化合物、三萜皂苷类化合物、多糖类化合物、酚酸类化合物、生物碱类化合物、甾醇/环醇类化合物、挥发油等化学成分^[8-9]。前些年文献多报道其酚酸类成分,徐佳佳等^[10]、刘峰群等^[11]、潘成学等^[12]曾报道通关藤及消癌平中绿原酸等酚酸含量。绿原酸在忍冬科忍冬属、菊科蒿属等植物(如菊花、杜仲、咖啡、金银花等)中含量都非常高。此外,一些水果和蔬菜(如菠菜、马铃薯、胡萝卜等)中也含有绿原酸等酚酸成分。随着研究的深入,学者发现通关藤及消癌平抗肿瘤主要活性成分为其中C21甾体苷类化合物^[8-9],如通关藤苷、通光素等。目前从通关藤中鉴定分离的C21甾体苷有50多种^[13],通关藤苷对人胃癌细胞SGC-7901、小鼠移植S180细胞、小鼠移植P388细胞有显著的体内抑制作用^[14];对人宫颈癌腺癌荷瘤裸鼠的肿瘤生长增殖均有抑制作用^[15];可抑制肝癌细胞增殖,减少甲胎蛋白分泌^[16];对乙酰氨基酚诱导的肝损伤有一定保护作用,其机制可能与其减少自由基产生、提高抗氧化物酶活性有关^[17];对CCl₄诱导的肝纤维化模型大鼠有显著的保护作用,其机制可能与抗氧化及抑制TGF- β_1 /Smad信号通路相关^[18]。有必要建立以通关藤苷为指标的消癌平片质量控制方法,本研