

· 化学与分析 ·

重楼克感胶囊中重楼皂苷 I, II, VI, VII 及金丝桃苷含量测定

尹兴斌, 林龙飞, 曹飒丽, 张慧, 张晋, 祁娟娟, 倪健*
(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的:建立重楼皂苷 I, II, VI, VII 及金丝桃苷的 HPLC 含量测定方法,并使用本方法测定 3 批重楼克感胶囊中 5 种化合物的含量。方法:Dikma C₁₈(2) 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),乙腈-0.1% 磷酸(42:58)为流动相,检测波长 203, 360 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃。结果:重楼皂苷 I, II, VI, VII 及金丝桃苷在 0.1~10 μg 线性关系均良好,加样回收率为 98.91%~102.23%。结论:建立了重楼皂苷 I, II, VI, VII 及金丝桃苷的 HPLC 测定方法,操作方便,结果准确,可用于重楼克感胶囊中 5 种化合物的含量测定。

[关键词] 重楼皂苷; 金丝桃苷; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)15-0058-04

[doi] 10.11653/syfy2013150058

Simultaneous Determination of Polyphyllin I, II, VI, VII and Hyperoside in Chonglou Kegan Capsule

YIN Xing-bin, LIN Long-fei, CAO Sa-li, ZHANG Hui, ZHANG Jin, QI Juan-juan, NI Jian*
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** A rapid and specific RP-HPLC-UV method was developed for the analysis of polyphyllin I, II, VI, VII and hyperoside. The method was applied to study the content determination of Chonglou Kegan capsule containing polyphyllin I, II, VI, VII and hyperoside. **Method:** The analysis was carried out on a Diamonsil C₁₈(2) reversed-phase column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) by isocratic elution with acetonitrile and 0.1% phosphoric acid (42:58). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was set at 203, 360 nm. **Result:** Linear responses were obtained for polyphyllin I, II, VI, VII and hyperoside ranging from 0.1 to 10 μg. The extraction recovery ranged from 98.91%-102.12%. Stability studies showed that polyphyllin I, II, VI, VII and hyperoside were stable in preparation and analytical process. **Conclusion:** The results indicated that the validated method was successfully used to determine the concentration of polyphyllin I, II, VI, VII and hyperoside.

[Key words] polyphyllin; hyperoside; HPLC

重楼克感胶囊处方由重楼、贯叶金丝桃 2 味中药组成,具有清热透表、清热解毒的功效,主要用于流行性感冒的预防和治疗。重楼具有清热解毒、消

肿止痛、凉肝定惊的功效^[1],现代药理学研究证明重楼止血、免疫调节、抗肿瘤、抑菌作用及镇静止痛^[2-7]等作用,2010 年版《中国药典》中使用 HPLC

[收稿日期] 20120921(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(面上项目 81173563);国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09103201-026);北京中医药大学复方中药制药创新团队项目(2011-CX70-13)

[第一作者] 尹兴斌,在读博士,从事中药制剂新技术及体内过程研究,Tel: 13581739327, E-mail: yxbtcm@163.com

[通讯作者] *倪健,教授,博士生导师,从事中药制剂新技术及体内过程研究,Tel: 010-84738607, E-mail: njtcm@263.net

测定重楼药材中重楼皂苷 I, II, VI, VII 的含量。贯叶金丝桃具有疏肝解郁、清热利湿、消肿通乳的功效^[1],现代药理学研究证明具有抗抑郁、抗焦虑、抗病毒、抗菌作用、抗肿瘤作用^[7-14],2010年版《中国药典》中使用 HPLC 测定贯叶金丝桃中金丝桃苷的含量。参考药典标准,本实验准备采用 HPLC 对重楼克感胶囊中重楼皂苷 I, II, VI, VII 及金丝桃苷 5 种化合物同时测定,为全面评价重楼克感胶囊质量提供了方法。

1 材料

高效液相色谱仪(岛津 LC M20A,二极管阵列检测器),BT125D 型电子天平(赛多利斯,0.01 mg),移液枪(Transferringette® S, Germany BRAND, 200 μL, 1 mL, 5 mL),KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

对照品重楼皂苷 I (批号 111590-201103,含量 92.1%)、重楼皂苷 II (批号 111591-201103,含量 93.4%)、重楼皂苷 VI (批号 111592-200402,含量 99.9%)、重楼皂苷 VII (批号 111593-200402,含量 99.9%)、金丝桃苷(批号 111521-201004,含量 93.9%)均由中国食品药品检定研究院提供。重楼克感胶囊(北京中医药大学制备,0.46 g/粒,批号 120101,120102,120103),色谱纯甲醇和乙腈(美国 Fisher 公司),磷酸(分析纯,天津市光复科技发展有限公司),水(娃哈哈纯净水)。

2 方法与结果

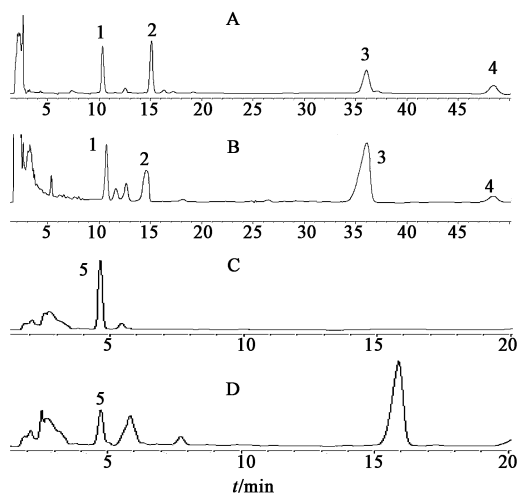
2.1 对照品溶液的配制 分别精密称取干燥至恒重的重楼皂苷 I, II, VI, VII 及金丝桃苷对照品适量,置于同一量瓶中,以甲醇溶解,配制成重楼皂苷 I, II, VI, VII 及金丝桃苷浓度均为 1.0 g·L⁻¹ 的对照品储备液。

精密量取上述对照品储备液适量,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,依次获得 5 种化合物质量浓度为 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.01 g·L⁻¹ 的对照品系列溶液。

2.2 供试品溶液的配制 取本品适量,去除胶囊壳,将内容物研碎,称取约 0.5 g,置具塞锥形瓶中,精密加入加入 70% 乙醇 25 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,用 70% 乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件 Dikma C₁₈ (2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸(42:58),检测波长 203 nm(重楼皂苷 I, II, VI, VII)及 360 nm(金丝桃苷),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进

样量 10 μL。对照品、供试品溶液的 HPLC 见图 1,从图中可以看出,各个化合物分离良好,色谱峰的分离度均 > 1.5,色谱峰理论塔板数均 > 4 000,重楼皂苷 I, II, VI, VII 及金丝桃苷的出峰时间分别为 49.02, 35.97, 15.05, 10.25, 4.79 min。



A. 对照品(203 nm); B. 重楼克感胶囊(203 nm);
C. 对照品(360 nm); D. 重楼克感胶囊(360 nm);
1. 重楼皂苷 I; 2. 重楼皂苷 II;
3. 重楼皂苷 VI; 4. 重楼皂苷 VII; 5. 金丝桃苷

图 1 重楼克感胶囊 HPLC

2.4 线性关系考察 分别用 5 种化合物的峰面积比进样量作线性回归,所用权重为 1/X²,得相应的回归方程。5 种化合物的线性方程见表 1。

表 1 重楼皂苷 I, II, VI, VII 及金丝桃苷的线性方程

化合物	线性方程	r	检测下限	检测上限
			/μg	/μg
重楼皂苷 I	$Y = 5\ 034\ 890X + 9\ 786$	0.999 7	0.1	10
重楼皂苷 II	$Y = 6\ 769\ 232X + 4\ 326$	0.999 7	0.1	10
重楼皂苷 VI	$Y = 5\ 436\ 979X + 3\ 267$	0.999 1	0.1	10
重楼皂苷 VII	$Y = 5\ 697\ 542X + 2\ 312$	0.999 5	0.1	10
金丝桃苷	$Y = 4\ 467\ 409X + 3\ 096$	0.999 3	0.1	10

2.5 精密度试验 取同一批重楼克感胶囊样品适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液。按照 2.3 项下的色谱条件,进样 10 μL 测定,重复进样 6 次,测定重楼皂苷 I, II, VI, VII 及金丝桃苷的含量。RSD 分别为 2.11%, 1.13%, 0.75%, 0.94%, 2.56%, 表明精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批重楼克感胶囊样品 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,平行制备 6 份试样,分别按照 2.3 项下的色谱条件,进样 10 μL 测定,测定重楼皂苷 I, II, VI, VII 及金丝桃苷的含量。RSD 分别为 1.24%, 1.96%, 1.77%, 2.53%,

0.79% ,表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一批重楼克感胶囊样品适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,室温放置 0, 1, 2, 4, 6, 10, 12 h 后,按照 2.3 项下的色谱条件,进样 10 μ L 测定。RSD 分别为 2.57% , 1.23% , 1.76% , 1.34% , 1.90% ,表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的重楼克感胶囊样品 6 份,质量分别为 45.86, 46.46, 45.46, 44.66, 46.87, 45.86 mg, 依次添加一定量的对照品溶液,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按照 2.3 项下的色谱条件,进样 10 μ L 测定,计算回收率,结果见表 2。

表 2 重楼皂苷 I, II, VI, VII 及金丝桃苷的回收率试验

化合物	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
重楼皂苷 I	2.29	2.05	4.33	99.51	100.81	2.71
	2.32	2.05	4.36	99.51		
	2.27	2.05	4.39	103.41		
	2.23	2.05	4.33	102.44		
	2.34	2.05	4.32	96.59		
	2.29	2.05	4.41	103.41		
重楼皂苷 II	1.09	1.12	2.23	101.79	102.23	2.75
	1.11	1.12	2.22	99.11		
	1.09	1.12	2.24	102.68		
	1.07	1.12	2.19	100.00		
	1.07	1.12	2.22	102.68		
	1.14	1.12	2.34	107.14		
重楼皂苷 VI	1.14	1.17	2.32	100.85	101.99	2.58
	1.15	1.17	2.33	100.85		
	1.12	1.17	2.31	101.71		
	1.21	1.17	2.46	106.84		
	1.23	1.17	2.39	99.15		
	1.17	1.17	2.37	102.56		
重楼皂苷 VII	1.31	1.37	2.71	102.19	98.91	2.02
	1.37	1.37	2.69	96.35		
	1.31	1.37	2.66	98.54		
	1.42	1.37	2.77	98.54		
	1.36	1.37	2.73	100.00		
	1.45	1.37	2.79	97.81		
金丝桃苷	1.93	1.83	3.79	101.64	100.82	1.56
	1.78	1.83	3.65	102.19		
	1.78	1.83	3.61	100.00		
	1.69	1.83	3.57	102.73		
	1.86	1.83	3.67	98.91		
	1.69	1.83	3.51	99.45		

2.9 样品含量测定 取 3 批重楼克感胶囊样品,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按照 2.3 项下的色谱条件,进样 10 μ L 测定,计算含量,结果见表 3。

表 3 重楼克感胶囊中重楼皂苷 I, II, VI, VII 及金丝桃苷的含量

批号	重楼皂苷 I	重楼皂苷 II	重楼皂苷 VI	重楼皂苷 VII	金丝桃苷
120101	21.85	10.70	11.44	12.96	19.30
120102	20.87	10.87	10.96	12.47	19.68
120103	21.68	10.32	11.26	12.22	19.43
平均值	21.47	10.63	11.22	12.55	19.47

3 讨论

建立了测定重楼克感胶囊中重楼皂苷 I, II, VI, VII 及金丝桃苷含量的高效液相色谱法,经方法学验证该方法的精密度、稳定性和回收率均符合要求,适合测定 5 种化合物的含量。

考察提取溶剂为甲醇、乙醇、50% 乙醇、60% 乙醇、70% 乙醇、80% 乙醇,结果表明,70% 乙醇对重楼克感胶囊样品的提取效率最高,能够最大程度的提取 5 种化合物。

考察了 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 100 mm, 3.5 μ m)、Agilent Venusil MP C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m)、Agilent TC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) 及 Dikma C₁₈ (2) 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 发现使用 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱时 5 种化合物的出峰时间较快,在 20 min 内出峰完毕,但重楼皂苷 VI, VII 在出峰位置有较大干扰,尝试不同液相条件后分离效果没有改善,因此排除使用 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱。后 3 种色谱柱 5 种化合物的出峰时间接近,峰形相似,其中 Dikma C₁₈ (2) 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) 中 5 种化合物的峰形最好,分离度良好。

[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: 中国医药科技出版社, 2010: 243, 215.
[2] 夏亚飞, 阎姝. 重楼抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 304.
[3] 贾科, 吴庆琛, 张成. 重楼总皂苷对胃癌细胞株 MGC-803 生长的抑制作用[J]. 中国生化药物杂志, 2011, 32(4): 284.
[4] 陈志红, 龚先玲, 刘义. 重楼总皂苷对人鼻咽癌细胞 CNE-2Z 周期及凋亡的影响[J]. 中成药, 2011, 33(1): 25.

不同产地藏药余甘子总鞣质含量测定

吴玲芳,张鸿雁,王坤风,李淑青,石任兵,张兰珍*

(北京中医药大学中药学院,北京 100102)

[摘要] 目的:建立磷钼钨酸/干酪素分光光度法测定不同产地藏药余甘子中总鞣质含量的方法。方法:以没食子酸为对照品,磷钼钨酸为显色剂,检测波长 760 nm,测定 8 个不同产地余甘子中总鞣质含量。结果:没食子酸在 0.306~2.448 mg·L⁻¹ 与吸光度呈良好线性关系($r=0.9991$),平均加样回收率 99.27%,RSD 2.30%。不同产地余甘子药材总鞣质含量差别较大(6.72%~11.95%),印度和尼泊尔产余甘子中总鞣质含量最高。结论:该方法简单、准确、重复性好,可用于测定余甘子中总鞣质含量。

[关键词] 余甘子;总鞣质含量,不同产地;没食子酸

[中图分类号] R284.1,R284.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0061-03

[doi] 10.11653/syjf2013150061

Determination of Total Tannins in Fruits of Tibetan Medicine *Phyllanthus emblica* from Different Areas

WU Ling-fang, ZHANG Hong-yan, WANG Kun-feng, LI Shu-qing, SHI Ren-bing, ZHANG Lan-zhen*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a phosphomolybdic acid-casein spectrophotometry for determination of total tannins in fruits of *Phyllanthus emblica* from different areas. **Method:** With gallic acid as reference substance

[收稿日期] 20121231(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274187);北京中医药大学自主课题(2009TYB22JS027);北京中医药大学创新团队项目(2011-CXTD-12)

[通讯作者] *张兰珍,研究员,博士生导师,从事中药药效物质与质量研究,Tel:010-84738629,E-mail:zhanglanzhen01@126.com

- [5] 王强,徐国钧,程永宝. 中药七叶一枝花类的抑菌和止血作用研究[J]. 中国药科大学学报,1989,20(4):251.
- [6] 季申,周坛树,张锦哲. 中药重楼和云南白药中抗肿瘤细胞毒活性物质 Craeillin 的测定[J]. 中成药,2001,23(2):212.
- [7] 彦璐璐,张艳军,高文远,等. 滇重楼皂苷对 10 种瘤细胞株的细胞毒素及构效关系研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(16):2057.
- [8] 杨得彼,甘良春,胡海燕. 国外对贯叶连翘抗抑郁疗效的临床验证[J]. 中西医结合学报,2004,2(3):231.
- [9] Anna R B. Evaluation of chemical stability of st John's wort commercial extract and some p reparations[J]. Int J Pharm, 2001, 213:199.
- [10] Linde K, Ramirez G, Mulrow C D, et al. st. John's wort for depressionan overview and meta-analysis of randomized clinical trials [J]. BMJ, 1996, 313(7052):253.
- [11] 朱晓薇. 贯叶金丝桃研究进展 I-药代动力学、药理学和临床应用[J]. 国外医药:植物药分册,1998,13(5):210.
- [12] Maraleda G, Wu T T, Jilbert A R, et al. Inhibition of duck hepatitis Bvirus replication by hypericin [J]. Antiviral Res,1993,20(3):235.
- [13] 刘金钊,王晓莉,张俊松,等. 贯叶连翘在癌症治疗中应用前景[J]. 中国现代中药,2006,8(2):22.
- [14] 贾永蕊,胡然,库宝善. 贯叶连翘提取物和盐酸赖氨酸复方(赖金丝)的抗炎作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2004,10(2):35.

[责任编辑 顾雪竹]