

HPLC法同时测定消癌平片中通关藤苷A和通关藤苷I的含量^Δ

王祁民^{1*}, 马银玲¹, 安 静¹, 张 磊², 孙利民³, 白万军¹, 温艳虹¹, 董占军^{1#}(1.河北省人民医院药学部, 石家庄 050051; 2.河北省食品药品监督管理局, 石家庄 050090; 3.解放军白求恩国际和平医院质量管理科, 石家庄 050082)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)13-1790-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.13.15

摘 要 目的:建立同时测定消癌平片中通关藤苷A和通关藤苷I含量的方法。方法:取消癌平片经三氯甲烷萃取后采用高效液相色谱(HPLC)法进样分析。色谱柱为Symmetry C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),检测波长为223 nm,流速为1.0 mL/min,柱温为25 ℃,进样量为20 μL。采用上述条件测定3批样品中通关藤苷A和通关藤苷I的含量。结果:通关藤苷A、通关藤苷I的质量浓度检测线性范围分别为26.40~264.00 μg/mL($r=0.999\ 4$)、4.59~45.90 μg/mL($r=0.999\ 3$),检测限分别为0.26、0.12 μg/mL,定量限分别为0.79、0.36 μg/mL;精密性、稳定性(12 h)、重复性试验峰面积的RSD均<2.0%($n=6$);加样回收率分别为98.53%~99.28%(RSD为0.20%~0.51%, $n=9$)、97.00%~98.89%(RSD为0.19%~1.03%, $n=9$)。3批样品中通关藤苷A和通关藤苷I的含量分别为2.27~2.32、0.64~0.69 mg/g。结论:本试验建立的方法简便,结果准确可靠,适用于消癌平片中通关藤苷A和通关藤苷I含量的同时测定。

关键词 高效液相色谱法;消癌平片;通关藤苷A;通关藤苷I;含量测定

Simultaneous Determination of Tenacissoside A and Tenacissoside I in Xiaoaiping Tablets by HPLC

WANG Qimin¹, MA Yinling¹, AN Jing¹, ZHANG Lei², SUN Limin³, BAI Wanjun¹, WEN Yanhong¹, DONG Zhanjun¹(1.Dept. of Pharmacy, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China; 2.Hebei Food and Drug Administration, Shijiazhuang 050090, China; 3.Dept. of Quality Management, Bethune International Peace Hospital of PLA, Shijiazhuang 050082, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for simultaneous determination of tenacissoside A and tenacissoside I in Xiaoaiping tablets. METHODS: HPLC method was used to analyze Xiaoaiping tablets after extracted by trichloromethane. The determination was performed in Symmetry C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 223 nm, and the column temperature was 25 ℃. The sample size was 20 μL. The content of tenacissoside A and tenacissoside I in 3 batches of samples were determined by above condition. RESULTS: The linear range of tenacissoside A and tenacissoside I were 26.40-264.00 μg/mL ($r=0.999\ 4$) and 4.59-45.90 μg/mL ($r=0.999\ 3$), respectively. The limits of detection were 0.26, 0.12 μg/mL, and the limits of quantification were 0.79, 0.36 μg/mL. RSDs of precision, stability (12 h) and repeatability tests were all lower than 2.0% ($n=6$). The recoveries were 98.53%-99.28% (RSD=0.20%-0.51%, $n=9$) and 97.00%-98.89% (RSD=0.19%-1.03%, $n=9$). The contents of tenacissoside A and tenacissoside I in 3 batches of samples were 2.27-2.32 mg/g and 0.64-0.69 mg/g, respectively. CONCLUSIONS: The established method is accurate, simple and reliable, which is suitable for simultaneous determination of tenacissoside A and tenacissoside I in Xiaoaiping tablets.

KEYWORDS HPLC; Xiaoaiping tablets; Tenacissoside A; Tenacissoside I; Content determination

消癌平片为通关藤单味药材提取所制,具有抗癌、消炎、平喘的功效,临床主要用于单独或配合放、化疗及手术后的肝癌、食管癌、胃癌、肺癌等恶性肿瘤^[1-6]的治疗,其制剂质量标准中仅以绿原酸为测定指标^[7],代表性

不足。参考文献[8-9],笔者采用高效液相色谱(HPLC)法测定消癌平片中抗肿瘤主要活性成分通关藤苷A和通关藤苷I的含量,以便对消癌平片质量进行更全面、准确、简便的控制。通关藤苷A和通关藤苷I结构式见图1。

1 材料

1.1 仪器

2695HPLC仪,包括2487紫外检测器、E2695四元梯度泵、Empower3分析软件、自动进样器(美国Waters公司);AB204-S分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);KQ3200超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

^Δ 基金项目:河北省中医药管理局中医药类科研计划课题(No.2018073);河北省医学科学研究重点课题计划(No.20170245、20180176)

* 主管药师,硕士。研究方向:医院药学。电话:0311-85988076。E-mail:littlebear_chao@sina.com

通信作者:主任药师,硕士生导师。研究方向:医院药学。电话:0311-85988604。E-mail:13313213656@126.com

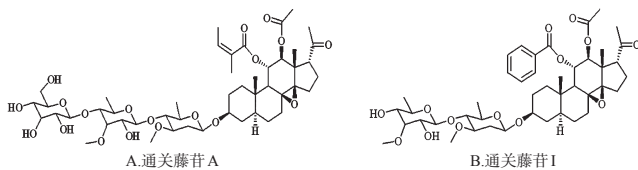


图1 2种通关藤苷化学结构式

Fig1 Chemical structure of 2 kinds of tenacissosides

1.2 药品与试剂

消癌平片(长春银诺克药业有限公司,批号:20160601、20160411、20160508,规格:0.3 g/片);通关藤苷A对照品(山西省中医药研究院,批号:20130513,纯度:>98%);通关藤苷I对照品(深圳远扬生物技术有限公司,批号:20160311,纯度:>98%);甲醇和乙腈均为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~10 min, 32% A; 10~10.01 min, 32%→42% A; 10.01~15 min, 42% A; 15~15.01 min, 42%→50% A; 15.01~28 min, 50% A);检测波长:223 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:25℃;进样量:20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取通关藤苷A对照品和通关藤苷I对照品33.02、22.01 mg,分别置于10 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容,摇匀,制得对照品溶液I(通关藤苷A质量浓度为3.30 mg/mL)及对照品溶液II(通关藤苷I质量浓度为2.20 mg/mL)。取对照品溶液I 8 mL、对照品溶液II 1.7 mL,置于同一10 mL量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取消癌平片,去除糖衣,研细,即得消癌平片粉末。精密称取消癌平片粉末0.55 g,置于60 mL分液漏斗中,加入三氯甲烷6 mL,纯化水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量瓶中,0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 空白对照溶液 称取生产厂家处方中所添加各种辅料适量,按“2.2.2”项下方法制备空白对照溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、空白对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果,在该色谱条件下,各待测成分间、待测成分与杂质峰间均能达到基线分离,分离度>1.5,色谱图见图2。

2.4 线性关系考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液20、40、80、120、160、200 μL,分别置于2 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,制成

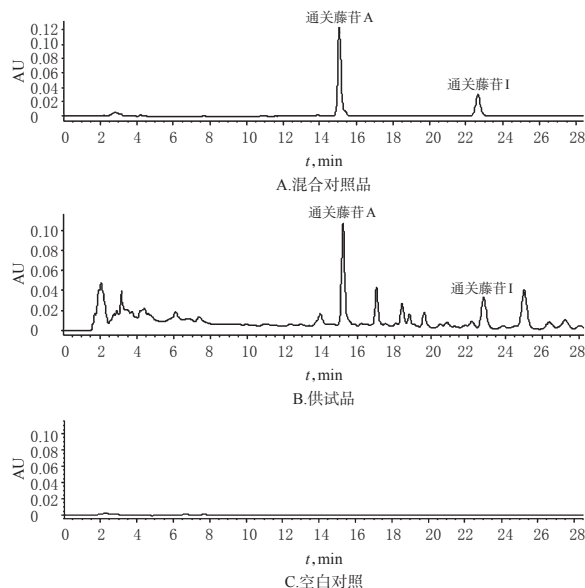


图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

系列混合对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,得通关藤苷A和通关藤苷I的回归方程分别为 $y=9499.8x+9251.30$ ($r=0.9994$)、 $y=13770x+3764.40$ ($r=0.9993$)。结果表明,通关藤苷A和通关藤苷I的检测质量浓度线性范围分别为26.40~264.00、4.59~45.90 μg/mL。

2.5 检测限与定量限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定。当信噪比为3:1时,得检测限;当信噪比为10:1时,得定量限。结果表明,通关藤苷A的检测限和定量限分别为0.26、0.79 μg/mL,通关藤苷I的检测限和定量限分别为0.12、0.36 μg/mL。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,每次20 μL,记录峰面积。结果显示,通关藤苷A和通关藤苷I峰面积的RSD分别为0.36%、0.52%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取供试品溶液(批号:20160601)适量,分别于室温下放置0、1、2、4、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,通关藤苷A和通关藤苷I峰面积的RSD分别为0.26%、0.17%($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置12 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取消癌平片(批号:20160601)粉末,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,通关藤苷A和通关藤苷I峰面积的RSD分别为1.05%、1.45%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取消癌平片(批号:20160601)粉末,共9份,每份约0.30 mg,精密称定,分别置于25 mL分液漏斗中,各加入低、中、高质量的待测成分对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果显示,通关藤苷A和通关藤苷I加样回收率分别为98.53%~99.28%(RSD为0.20%~0.51%, $n=9$)、97.00%~98.89%(RSD为0.19%~1.03%, $n=9$),表明方法准确度较高。加样回收率试验结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=9$)

待测成分	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
通关藤苷A	0.680	0.340	1.016	98.82	98.53	0.29
	0.681	0.340	1.015	98.24		
	0.683	0.340	1.018	98.53		
	0.678	0.680	1.353	99.26		
	0.681	0.680	1.350	98.38		
	0.682	0.680	1.351	98.38		
	0.680	1.020	1.695	99.51		
	0.683	1.020	1.695	99.22		
	0.681	1.020	1.692	99.12		
通关藤苷I	0.196	0.100	0.294	98.00	97.00	1.03
	0.198	0.100	0.295	97.00		
	0.199	0.100	0.295	96.00		
	0.198	0.200	0.395	98.50		
	0.201	0.200	0.397	98.00		
	0.202	0.200	0.399	98.50		
	0.197	0.300	0.494	99.00		
	0.199	0.300	0.495	98.67		
	0.198	0.300	0.495	99.00		
				98.89		

2.10 样品含量测定

取3批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,消癌平片中通关藤苷A和通关藤苷I含量分别为2.27~2.32、0.64~0.69 mg/g,样品含量测定结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$,mg/g)

Tab 2 Results of content determination of samples ($n=3$,mg/g)

批次	通关藤苷A	通关藤苷I
20160601	2.27	0.66
20160411	2.29	0.64
20160508	2.32	0.69

3 讨论

3.1 检测方法的选择

笔者在前期试验中采用超高效液相色谱-串联质谱法建立了同时测定通关藤药材中3种皂苷通关藤苷A、H、I的含量^[10]。由于消癌平片为通关藤经水多次煎煮浓缩而成,其各成分含量理论比药材中高。本试验参考文献[11-12]建立了较为普适的HPLC-紫外检测器法的条

件,对消癌平片中2种活性成分通关藤苷A和通关藤苷I进行了含量测定,结果显示,此方法能准确、灵敏地对2种成分进行定性、定量分析。

3.2 质量控制指标的选择

消癌平中含有C₂₁甾体皂苷类、三萜类、多糖类、酚酸类等化学成分^[8-9]。绿原酸存在于金银花、杜仲等多种中药植物中,对通关藤及消癌平的研究多集中在绿原酸等酚酸类成分,如谢丽艳、张阿琴等^[13-14]报道消癌平注射液中绿原酸、咖啡酸、香草酸等酚酸类成分的含量测定方法。通关藤及消癌平抗肿瘤主要活性成分为C₂₁甾体皂苷(即通关藤苷及其苷元),目前从通关藤中鉴定分离出50多种通关藤苷及其苷元^[15],对其成分功效的研究还处于初步阶段。通关藤苷不仅对人胃癌细胞SGC-7901、小鼠肉瘤细胞S180、小鼠淋巴细胞性白血病细胞P388有显著的体内抑制作用^[16],还可以抑制肝癌细胞增殖,使甲胎蛋白分泌量降低^[17],对乙酰氨基酚诱导的肝损伤也具有一定的保护作用,其机制可能与其减少自由基产生、提高抗氧化酶活性有关^[18]。2015年版《中国药典》(一部)^[1]关于通关藤的含量测定引入了通关藤苷H指标成分,在消癌平注射液质量标准^[19]中含量测定引入了通关藤苷A指标成分。本研究在参照国家质量标准^[7,19]基础上,结合预试验结果选择了含量较高的通关藤苷A和通关藤苷I^[11-12]作为质量控制指标。

3.3 色谱条件的选择

3.3.1 检测波长 通关藤苷A和通关藤苷I属于C₂₁甾体皂苷类化合物,是一类苷元为孕甾烷衍生物与2-脱氧糖等形成的苷,在紫外末端有吸收。文献报道,通关藤苷A和通关藤苷I的最大吸收波长分别为223 nm^[1]和230 nm^[11]。笔者在选择检测波长时发现,在223 nm波长处通关藤苷A和通关藤苷I峰形均良好。因此,选择223 nm为检测波长。

3.3.2 流动相 笔者在预试验中曾用乙腈和水等度洗脱,通关藤苷A和通关藤苷I色谱峰的分度度小于1.5,而选用乙腈和磷酸溶液梯度洗脱后,30 min内即可完成对样品的分析,通关藤苷A和通关藤苷I均能得到较好的峰形及分度度大于1.5,故本试验最终采用乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相并进行梯度洗脱。

综上所述,本研究建立的方法简便,结果准确可靠,适用于消癌平片中通关藤苷A和通关藤苷I含量的同时测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:296-297.
- [2] 丁纪元,黄静,寇军燕,等.消癌平联合热疗对吉非替尼耐药肺腺癌细胞株A549作用的实验研究[J].中华全科医学,2016,14(1):32-34.
- [3] 吴建钟,袁治顺,于良.消癌平联合5-氟尿嘧啶处理对肝

锦鸡儿总黄酮预处理对局灶性脑缺血再灌注损伤模型大鼠血脑屏障通透性的影响及机制研究[△]

张亚洲^{1*},何前松^{2#},胡斐然²,樊梓媛²(1.贵州理工学院药学院,贵阳 550002;2.贵阳中医学院第二临床医学院,贵阳 550025)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)13-1793-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.13.16

摘要 目的:研究锦鸡儿总黄酮(TFC)预处理对局灶性脑缺血再灌注损伤模型大鼠血脑屏障通透性的影响及机制,为其进一步开发和临床用于治疗缺血性脑卒中提供参考。方法:将120只大鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平组(阳性对照,12.6 mg/kg)和TFC高、中、低剂量组(60、30、15 mg/kg),每组20只。各给药组大鼠灌胃相应药物,假手术组和模型组大鼠灌胃等量生理盐水,每天1次,连续7 d。末次灌胃2 h后,除假手术组外的其余各组大鼠均采用线栓法复制局灶性脑缺血再灌注损伤模型。再灌注24 h后,进行神经功能缺损评分,采用2,3,5-氯化三苯基四氮唑染色计算脑梗死面积百分比,分光光度法测定脑组织中伊文思蓝含量以考察血脑屏障的通透性;Western blot法检测脑缺血半暗带区基质金属蛋白酶9(MMP-9)、MMP-2和血脑屏障紧密连接相关蛋白Claudin-5、Occluding的表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分、脑梗死面积百分比、脑组织中伊文思蓝含量和脑缺血半暗带区MMP-9、MMP-2蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$),脑缺血半暗带区Claudin-5、Occluding蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,除TFC低剂量组大鼠脑缺血半暗带区MMP-2蛋白表达水平降低不显著外,其余各组大鼠上述指标均显著改善($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:TFC对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有一定的预防作用,可改善神经功能缺损,减少脑梗死面积;其机制可能与抑制MMP-9、MMP-2蛋白表达,促进Claudin-5、Occluding蛋白表达,降低血脑屏障的通透性有关。

关键词 锦鸡儿总黄酮;局灶性脑缺血再灌注损伤;血脑屏障;血脑屏障紧密连接相关蛋白;预防作用;大鼠

癌细胞体外生长及癌基因表达的影响[J].海南医学院学报,2017,23(6):728-731.

[4] 赵瑞娟,李宾.消癌平联合TACE术治疗老年原发性肝癌的疗效和生命质量的临床观察[J].中国实用医药,2016,11(27):3-5.

[5] 葛蕙心,畅继武.消癌平对人膀胱癌细胞体外生长作用的实验研究[J].临床合理用药杂志,2012,5(4B):86-87.

[6] 武阳.伊立替康单药与联合消癌平治疗老年晚期胃癌的比较研究[J].中国药房,2016,27(5):657-659.

[7] 国家食品药品监督管理总局.WS3-B-3959-98-2013 消癌平片[S]. 2014-01-08.

[8] 白爽,李奕诺,徐鑫,等.通关藤化学成分及药理活性研究进展[J].解放军药学学报,2015,31(3):260-264.

[9] 韩丽,张慧,康廷国,等.中药通关藤的研究进展[J].中华中医药学刊,2016,34(10):2329-2331.

[10] 王祁民,安静,李颖,等.UPLC-MS/MS法同时测定通关藤药材中3种皂苷的含量[J].中国药房,2018,29(8):1048-1051.

[11] 徐凯,乔佳,韩丽,等.HPLC法测定不同产地通关藤中通关藤苷G和I的含量[J].药物分析杂志,2016,36(4):607-610.

[12] 张慧,裴志东,姜欢,等.HPLC法同时测定乌骨藤中通关藤苷A和D的含量[J].药物分析杂志,2013,33(6):1037-1040.

[13] 谢丽艳,徐洁,戴国梁,等.HPLC同时测定消癌平注射液中7种主要成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(21):86-89.

[14] 张阿琴,张仓,梁敏钰.HPLC法测定消癌平注射液中5种酚酸的含量[J].药学与临床研究,2011,19(6):498-500.

[15] 方奕奇,孙雪梅.通关藤化学成分及抗肿瘤作用的研究进展[J].中国生化药物杂志,2011,32(2):165-167.

[16] 林耀才.乌骨藤总苷对SGC-7901、S180、P388肿瘤细胞的抑制作用研究[J].药学研究,2015,34(7):376-379.

[17] 邹渭洪,付成效,邓丽菁.乌骨藤总苷抑制肝癌细胞增殖和AFP分泌[J].中南医学科学杂志,2013,41(4):344-346.

[18] 常伟,李培培,袁平凡,等.乌骨藤总皂苷对乙酰氨基酚诱导的小鼠肝损伤的保护作用[J].中国新药杂志,2015,24(24):2835-2839.

[19] 国家食品药品监督管理局.WS-10630(ZD-0630)-2002-2011Z 消癌平注射液[S]. 2012-12-18.

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81560725);贵州省科技计划项目(No.黔科合基础[2018]1071);贵州理工学院高层次人才科研启动项目(No. XJGC20141106)

*副教授,博士。研究方向:中药化学成分及药效物质基础。电话:0851-88210126。E-mail:670566181@qq.com

#通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中西医结合防治脑血管疾病。E-mail:hqs0820@126.com

(收稿日期:2018-03-01 修回日期:2018-05-22)
(编辑:余庆华)