

• 研究报告 •

应用高效液相色谱法测定葫芦素片中葫芦素 B 的含量

豆甲泰, 李胜文 (解放军 209 医院药械科 黑龙江 牡丹江 157011)

[摘要] 目的 测定葫芦素片中葫芦素 B 的含量。方法 采用高效液相色谱法,应用 Waters Symmetry C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm) 色谱柱,流动相:乙腈-水(51:49),流速:1.0 ml/min,柱温:25 ℃,检测波长:228 nm。结果 葫芦素 B 的回归方程: $Y = 1\,067.3C - 0.5084$ ($r = 0.9999$),平均回收率为 99.39% ($n = 6$),RSD 为 0.56%,说明该法具有良好的回收率。结论 用 HPLC 法测定葫芦素片中葫芦素 B 的含量,方法简便,重复性好,结果准确。

[关键词] HPLC; 葫芦素片; 葫芦素 B

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)04-0294-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.04.015

Determination of content of cucurbitacin B in cucurbitacins by HPLC

DOU Jiatai, Li Shengwen (Department of Pharmacy, No. 209 Hospital of PLA, Mudanjiang 157011, China)

[Abstract] **Objective** To determine the content of cucurbitacin B in cucurbitacins. **Methods** The highly effective liquid phase chromatography was used, with Waters Symmetry C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm) column. The mobile phase was acetonitrile-water (51:49), the flow rate was 1 ml/min, column temperature was 25 ℃, the detection wavelength was 228 nm. **Results** Cucurbitacin B regression equation: $Y = 1\,067.3C - 0.5084$ ($r = 0.9999$), the average recovery rate was 99.39% ($n = 6$), RSD was 0.56%, which showed that this method had a good recovery rate. **Conclusion** The HPLC method for the determination of content of cucurbitacin B in cucurbitacins was simple, reproducible, accurate.

[Key words] HPLC; cucurbitacin tablet; cucurbitacin B

葫芦素片临床上主要用于湿热毒盛所致迁延性肝炎、慢性肝炎及原发性肝癌的辅助治疗。其主要成分是从葫芦科植物甜瓜瓜蒂中提取出的葫芦素 B,国内外学者对葫芦素 B 抗癌机制的研究可归纳为:葫芦素 B 分子结构侧链上带有的不饱和羰基,是高度亲电子中心的亲核基团,可使控制细胞分裂的酶烷化,从而抑制肿瘤细胞的生长。据研究其还具有细胞毒性、保肝、提高机体免疫力和抗炎活性等多种作用^[1-3]。本实验采用反相高效液相色谱法,对葫芦素片中葫芦素 B 的含量进行测定,方法简便快捷,结果准确、可靠。

1 仪器和试剂

Aglilent-1100 高效液相色谱系统包括四元泵、柱温箱、自动进样器、紫外检测器, Agilent-1100 色谱工作站。实验用超纯水由 Milli-Q 超纯水器制备系统 (Millipore Corporation, MA, U. S. A.) 提供。葫芦素片 (批号: 080301、080601、080901、090101、090102、

090601、090602、090701、091001、091002,浙江普洛康裕天然药物有限公司),葫芦素 B 标准品(自制,纯度 >98.5%)。乙腈、甲醇(色谱纯, Merck 公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Waters Symmetry C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm); 流动相: 乙腈-水 = (51:49); 流速: 1.0 ml/min; 进样体积: 4 μl; 柱温: 25 ℃。葫芦素 B 标准品及供试品色谱图,见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取葫芦素 B 标准品适量,加入无水甲醇适量制成 1 mg/ml 的标准溶液。将上述溶液通过微孔滤膜后,放入 4 ℃ 冰箱中备用。

2.3 供试品溶液的制备 取葫芦素片 18 片,精密称定,研细,取细粉约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加甲醇 30 ml,超声振摇 30 min,放置 10 min,滤过,用少量甲醇洗涤,洗液并入同一量杯中,并用甲醇定容为 30 ml,摇匀,即得。取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜,4 ℃ 保存,供进样分析用。

2.4 线性关系考察 准确配制葫芦素 B 对照品的甲醇溶液,浓度为 1 mg/ml,自动进样量分别设为 0.1、0.2、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 μl,测出葫芦素 B

[作者简介] 豆甲泰,药师。Tel: (0453) 8848257, E-mail: doujiatai@126.com.

[通讯作者] 李胜文。Tel: (0453) 8848216.

的峰面积,同时以对对照品含量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程: $Y = 1067.3C - 0.5084$, $r = 1$,

$n = 7$;结果表明葫芦素 B 在进样量为 $0.1 \sim 16 \mu\text{g}$ 时具有良好的线性关系。

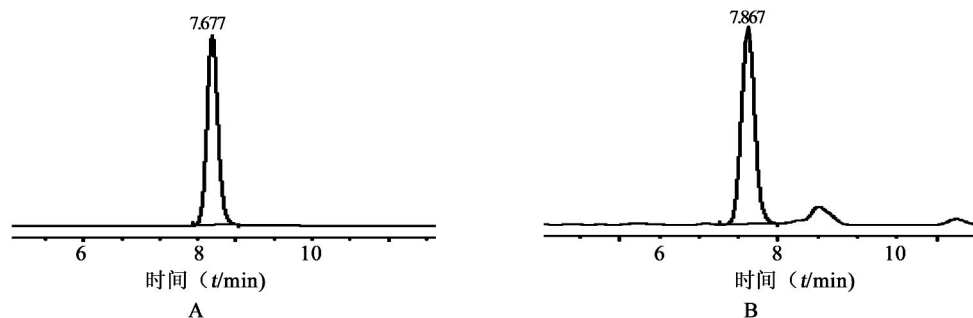


图1 葫芦素 B 高效液相色谱图
A. 标准品溶液; B. 供试品溶液

2.5 精密度实验 取对照品溶液,连续进样6次,每次进样 $4 \mu\text{l}$,再以上述色谱条件和检测方法下测定对照品的峰面积, $\text{RSD} = 0.197\%$,说明本法精密度较好,结果见表1。

表1 葫芦素片精密度、稳定性、重复性实验结果($n = 6$)

编号	精密度		稳定性		重复性	
	峰面积	RSD (%)	峰面积	RSD (%)	含量 (mg)	RSD (%)
1	357.7	0.197	216.8	1.27	0.175 7	3.87
2	359.8		220.5		0.192 6	
3	359.4		214.4		0.195 8	
4	359.3		221.3		0.194 1	
5	358.4		222.1		0.190 6	
6	358.6		221.1		0.193 1	

2.6 重复性实验 取葫芦素片粉末(批号:090602,浙江普洛康裕天然药物有限公司)6份,每份 0.2 g ,精密称定。按“2.3”项下制备,并在上述色谱条件和检测方法下测定,记录色谱峰的峰面积,计算出每 0.2 g 葫芦素片中葫芦素 B 的平均含量为 $0.190 3 \text{ mg}$,计算葫芦素 B 含量的 $\text{RSD} = 3.87\%$,说明本法重复性较好。

2.7 稳定性实验 取葫芦素片粉末(生产厂家:浙江普洛康裕天然药物有限公司;批号:090602),按照“2.3”项下制备供试品溶液,分别在样品制备并于室温($25 \text{ }^\circ\text{C}$)放置 $0.2, 6, 10, 16, 24 \text{ h}$ 后在上述色谱条件和检测方法下测定,记录色谱峰的峰面积,计算峰面积 $\text{RSD} = 1.27\%$,说明供试品溶液中各目标成分至少在 24 h 内稳定,满足样品测定的要求。

2.8 加样回收率实验 精密称取葫芦素片粉末(批号:090602,浙江普洛康裕天然药物有限公司),6份 0.2 g ,精密加入对照品适量,按照“2.3”项下制备供试品溶液,在上述色谱条件和检测方法下进行

检测,记录色谱峰的峰面积,计算葫芦素 B 含量。回收率 = (测得葫芦素 B 的含量 - 葫芦素片中葫芦素 B 的含量) / 对照品加入量 $\times 100\%$ 。加样回收率和 RSD 值见表2。结果表明,葫芦素 B 的平均回收率为 99.39% , RSD 为 0.48% ,说明回收率较高。

表2 葫芦素片加样回收率试实结果($n = 6$)

编号	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.193 3	0.193 4	0.385 4	99.33		
2	0.192 6	0.193 4	0.385 5	99.74		
3	0.194 1	0.193 4	0.386 6	99.53	99.39	0.56
4	0.195 8	0.193 4	0.386 8	98.76		
5	0.191 1	0.193 4	0.384 8	100.2		
6	0.193 1	0.193 4	0.384 2	98.81		

2.9 样品含量测定 取同一厂家(浙江普洛康裕天然药物有限公司)生产的6个不同批号的葫芦素片样品。按照“2.3”项下制备供试品溶液,在上述色谱条件和检测方法下进行检测,记录色谱峰的峰面积,计算各批次葫芦素片中葫芦素 B 的含量,每批测3次,取平均值(表3)。结果表明:6个批次中的葫芦素片中葫芦素 B 含量最低为 $0.076 7\%$,符合葫芦素 B 0.06 mg/片 的要求,所测6批样品均合格。

3 讨论

3.1 流动相的选择 本实验试用不同配比的乙腈-水系统进行洗脱,最终发现以流动相乙腈:水(51:49)系统为佳,各色谱峰的分离度较好,保留时间适中。

3.2 提取溶剂、方法及时间的优化 笔者采用超声波提取法,以甲醇为提取溶剂,先后采用甲醇 $8, 12, 20 \text{ ml}$;提取时间 $20, 30, 50 \text{ min}$;最终确定甲醇 12 ml ,提取 30 min 效果最佳。

表3 样品含量测定结果($n=6$)

批号	称样量 (g)	含测编号	峰面积	测得量 (mg)	平均值 (mg)	含量
080301	0.199 9	HC11	271.6	0.191 2	0.191 2	0.095 7
		HC12	271.6	0.191 2		
		HC13	271.7	0.191 3		
080601	0.200 4	HC21	217.1	0.152 9	0.153 8	0.076 7
		HC22	217.7	0.153 3		
		HC23	220.1	0.155 0		
080901	0.200 3	HC31	240.5	0.169 4	0.169 4	0.084 6
		HC32	241.1	0.169 8		
		HC33	240.0	0.169 0		
090101	0.200 3	HC41	246.8	0.173 8	0.173 5	0.086 6
		HC42	246.7	0.173 7		
		HC43	245.7	0.173 0		
090102	0.200 3	HC51	248.2	0.174 8	0.174 0	0.086 9
		HC52	246.5	0.173 6		
		HC53	246.6	0.173 6		
090602	0.200 5	HC61	269.2	0.189 5	0.189 3	0.094 4
		HC62	268.7	0.189 2		
		HC63	268.7	0.189 2		

3.3 检测波长的选择 对葫芦素 B 进行 UV 测试,发现在 228 nm 处有最大吸收,故选择 228 nm 作为含量测定的检测波长^[4-10]。

【参考文献】

- [1] 杨凯,郑刚. 葫芦素 BE 的药理作用研究进展[J]. 国际中医中药杂志, 2006, 28(1): 27.
- [2] 么焕开,刘鲁,王菊,等. 葫芦素的研究概况[J]. 齐鲁药事, 2005, 24(12): 737.
- [3] 吉宏,李宗友. 葫芦素及其药理学研究[J]. 国外医学: 中医中药分册, 1996, 18(6): 13.
- [4] 刘晓辉,刘欣荣,石莉,等. RP-HPLC 法测定半乳糖化肝靶向葫芦素 B 脂质体中药物含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(10): 816.
- [5] 黄璐琦,姚三桃. 高效液相色谱法测定异叶马交儿根中葫芦素 B 的含量[J]. 中草药, 1994, 25(10): 555.
- [6] 周涛,黄璐琦,江维克. 高效液相色谱法测定大方油栝楼药材中葫芦素 B 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(6): 4.
- [7] 李乐,邓意辉,石莉,等. RP-HPLC 法测定葫芦素 B 月桂酸酯纳米乳剂中药物的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(9): 720.
- [8] 冯雪松,王大成,蔡辉,等. 高效液相色谱测定苦味西葫芦中葫芦素的含量[J]. 中药材, 2007, 30(4): 418.
- [9] 张茂新,凌冰,曾玲,等. 六种植物叶片中葫芦素 B 对美洲斑潜蝇寄主选择性的影响[J]. 生态学报, 2004, 24(11): 2564.
- [10] 刘金丹,孙国祥,池剑玲. 毛细管区带电泳法测定甜瓜蒂药材中葫芦素 B 的含量[J]. 中成药, 2008, 30(4): 570.

[收稿日期] 2012-11-13 [修回日期] 2013-04-08

[本文编辑] 李睿旻

(上接第 289 页)

表3 冷藏(4℃)放置1年戊二醛的 pH 值及含量测定结果

批号	种类	1月	3月	6月	12月	1月	3月	6月	12月
090623	B液	3.53	3.51	3.51	3.50	1.22	1.21	1.20	1.20
	AB混合液	7.45	7.42	7.42	7.40	0.62	0.61	0.61	0.60
110721	B液	3.49	3.48	3.47	3.47	1.16	1.16	1.15	1.15
	AB混合液	7.40	7.39	7.38	7.38	0.59	0.59	0.58	0.58
120109	B液	3.60	3.60	3.58	3.57	1.17	1.16	1.16	1.16
	AB混合液	7.50	7.50	7.48	7.45	0.60	0.60	0.59	0.59

且多次少量配制增加了配制的时间和成本。本实验对心包固定液的配制工艺进行了改进,将配好的缓冲盐溶液和戊二醛溶液消毒后分别置于冰箱中 4℃ 冷藏储存,使用前等量混合均匀,调节 pH 值在 7.4 左右,与血液 pH 值相近,且在碱性条件下,具有强杀菌活性,固定作用增强。此方法同时解决了碱性戊二醛溶液稳定性差、保质期短的难题,减少了过期试剂对环境的污染,避免了配制试剂给受试者带来的健康损害。

由本实验结果可见,笔者对制备方法的改进可行且可靠,1年内使用稳定性好,为心包固定液的储存及使用提供了依据。

【参考文献】

- [1] 陈新谦,金有豫,汤光. 新编药物学[M]. 17版. 北京:人民

卫生出版社, 2011: 839-840.

- [2] 王莉,米志芬. 戊二醛类消毒剂国内临床应用现状[J]. 中华医院感染学杂志, 2003, 13(1): 99-100.
- [3] 陈卫国,肖桂珍,李长峰. 加强消毒液质量监控,确保临床消毒效果[J]. 中国药师, 2000, 3(5): 286.
- [4] 陈渝军,张少文,管红珍,等. 经典恒温法预测 0.5% 戊二醛溶液的稳定性[J]. 中国药房, 2010, 32: 3069-3070.
- [5] 徐莅. 2% 碱性戊二醛溶液的稳定性考察[J]. 传染病学, 1998, 8(3): 24-26.
- [6] 黄兴兰. 心包固定液的制备及质量控制[J]. 职业与健康, 2003, 19(2): 119-120.
- [7] 孔福明. 戊二醛含量测定及稳定性验证[J]. 国际医药卫生导报, 2005, 12(11): 94-95.
- [8] 中华人民共和国卫生部药政司. 中国医院制剂规范(西药制剂)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 1995: 16.

[收稿日期] 2013-07-10 [修回日期] 2013-12-18

[本文编辑] 李睿旻