

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.36.041

· 药学 ·

HPLC 法测定抗宫炎凝胶剂中金石蚕苷含量的研究 *

刘 玠¹ 曲海影¹ 张 迪² 初李佳娃¹ 常 越¹

(1 黑龙江中医药大学 黑龙江 哈尔滨 150040; 2 哈尔滨医科大学附属第四医院 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:采用高效液相色谱法(HPLC)测定抗宫炎凝胶剂中金石蚕苷的含量,为制定其质量标准提供基础。**方法:**采用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,乙腈-0.5%磷酸(18:82)为流动相;检测波长为 332 nm;流速为 1.0 ml/min,探讨 HPLC 测定抗宫炎凝胶剂中金石蚕苷含量的专属性、精密度、稳定性、重现性等。**结果:**金石蚕苷在 0.104~0.468 mg/ml 范围内呈良好的线性关系($r=0.9999$),平均回收率为 99.76%,RSD 为 1.56%。**结论:**采用 HPLC 测定抗宫炎凝胶剂中金石蚕苷含量的专属性、精密度、稳定性、重现性均良好,该方法简便可靠,可用于抗宫炎凝胶剂的质量标准的研究。

关键词:抗宫炎凝胶剂;高效液相色谱法;金石蚕苷

中图分类号:R711.32;R284.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)36-7154-06

Quantitative Study of Poliumoside by HPLC in the Kanggongyan Gels*

LIU Jie¹, QU Hai-ying¹, ZHANG Di², CHU Li-jiawa¹, CHANG Yue¹

(1 Heilongjiang university of Chinese medicine, Harbin, Heilongjiang, 150040, China;

2 The fourth affiliated hospital of Harbin medical university, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To establish a HPLC method to determine the contents of Poliumoside in the Kanggongyan Gels and provide foundation for the development of its quality standard. **Methods:** C18 was used as chromatographic column, the mobile phase was Acetonitrile-0.5% H_3PO_4 (18:82), the wave length was 332 nm. and the flow rate was 1.0ml/min. The specificity, precision, stability, and reproducibility of HPLC in the detection of content of Poliumoside in the Kanggongyan Gels were analyzed. **Results:** The Poliumoside showed good linear relationship in the range of 0.104~0.468 mg/ml and the average recovery was 99.76% with RSD of 1.56%. **Conclusion:** The specificity, precision, stability, reproducibility of HPLC in the detection of content of Poliumoside in the Kanggongyan Gels were good. HPLC was a simple and reliable method for the research of quality standard of kanggongyan gels.

Key words: KangGongyan gel; HPLC; Poliumoside

Chinese Library Classification(CLC): R711.32; R284.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)36-7154-06

前言

慢性宫颈炎是女性生殖系统最为常见的炎症性疾病,多为急性宫颈炎治疗不彻底转变而来^[1],该病在已婚或有性生活的妇女中发病率高达 50%以上,且是宫颈癌发病的高危因素之一^[2,3]。其临床局部表现包括宫颈糜烂、宫颈腺体囊肿、宫颈肥大、宫颈息肉和宫颈管炎等,可引起白带增多、下腹坠痛、接触性出血、不孕等症状^[4,5],且与宫颈癌的发生密切相关。慢性宫颈炎的临床治疗方法较多,主要包括物理治疗、手术治疗和药物治疗等方法^[6,7]。

抗宫炎凝胶剂是在抗宫炎片的基础上研究制得的^[8,9],主要由广东紫珠、益母草、乌药三味药材组成^[10],在临床上用于治疗因慢性宫颈炎引起的宫颈糜烂效果明显。广东紫珠主要成分为黄酮类化合物,具有较好的抗菌消炎作用,外用治疗跌打肿痛、

外伤出血、烧伤等症^[11,12];益母草主要含有益母草碱、水苏碱等成分,具有活血调经、清热解毒之功效,由益母草、柴胡、丹皮等中药制成的外用贴剂,治疗盆腔炎症效显著^[13,14];乌药具有抗病毒、抑菌、抗炎镇痛等药理作用,其外用可使局部血管扩张,缓和肌肉痉挛性疼痛^[15,16]。凝胶剂与阴道黏膜具有良好的偶合和水合作用,可较长时间与病灶部位黏附紧密^[17,18],能充盈整个阴道,有较好的生物相容性,有利于药物的释放,能更好地发挥疗效,是治疗宫颈疾病较理想的剂型^[19,20]。相比于抗宫炎片,抗宫炎凝胶剂不需要通过肝脏首过作用和胃肠道生理关卡效应,因而不会降低其病灶部位的有效浓度,也不会延长其起效时间及降低药物的疗效^[21,22]。本实验采用高效液相法测定抗宫炎凝胶剂中的主药广东紫珠中金石蚕苷的含量,旨在为制定其质量标准奠定基础,为慢性宫颈炎及宫颈糜烂的临床治疗提供更多的基础。

* 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(J2511515)

作者简介:刘玠(1958-),女,硕士生导师,研究员,主要研究方向:中药制剂及新药研究,电话:0451-82196224, E-mail: 1447111706@qq.com

(收稿日期:2014-07-21 接受日期:2014-08-14)

1 材料与方法

1.1 实验材料

高效液相色谱仪; Waters 1525-2489; METTLER AE 200 电子天平(梅特勒托利多仪器公司生产)。

AB204-N 电子分析天平(梅特勒托利多仪器公司生产); 指针式电热恒温水浴锅 (上海跃进医疗器械厂); KQ-500DB 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 金石蚕苷对照品 (111812-201001, 中国药品生物制品检定所); 抗宫炎凝胶剂(自制:批号 20110901、20110902、20110903)。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件与系统适应性 色谱柱:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;流动相:乙腈-0.5%磷酸(18:82);检测波长:332nm;流速:1.0ml/min;理论板数按金石蚕苷峰计算应不低于3000。

1.2.2 溶液的制备 供试品制备方法考察:超声:精密称取供试品 5.00 g, 置锥形瓶中, 精密加入 50%甲醇 50 mL, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz)60 min, 转移至 50 mL 容量瓶中, 用 50%甲醇洗涤锥形瓶, 洗液并入容量瓶, 50%甲醇定容, 摇匀, 过

滤, 取续滤液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 作为供试品溶液。

水浴回流:精密称取供试品 5.00 g, 置圆底烧瓶中, 精密加入 50%甲醇 50 mL, 精密称定重量, 水浴回流 1 h, 放冷, 再精密称定重量, 用 50%甲醇补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 取续滤液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 作为供试品溶液^[9]。

测定法:分别精密吸取对照品溶液 10 μL 与上述两种供试品溶液各 5 μL , 注入液相色谱仪, 测定、记录色谱图。

结果:加热回流提取的效果明显优于超声提取, 故本实验选用加热回流提取方法。结果见表 1。

提取时间的选择:取本品 5.00 g 三份, 精密称定, 分别置圆底烧瓶中, 精密加入 50%甲醇 50 mL, 称定重量, 分别加热回流提取 0.5 h、1 h、1.5 h, 放冷, 再称定重量, 用 50%甲醇补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 取续滤液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 作为供试品溶液。并按拟定的色谱条件测定, 结果见表 1。通过比较超声与加热回流提取方法与选择提取时间的试验, 优化了供试品制备的条件, 确定了样品处理方法:精密称取供试品 5.00g, 置圆底烧瓶中, 精密加入 50%甲醇 50 mL, 称定重量, 水浴加热回流 1 h, 放冷, 再称定重量, 用 50%甲醇补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 取续滤液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 作为供试品溶液。

表 1 供试品制备提取时间及方法筛选

Table 1 Extraction time and method selection of the preparation

Extraction condition	Back flow (h)			Ultra sound(h)
Time	0.5	1	1.5	1
Content(mg/g)	1.78	1.84	1.80	1.65

溶液的制备:①供试品溶液的制备:取样品 5.00 g, 置锥形瓶中, 加入 50%甲醇 50 mL, 称定重量。加热回流 1 h, 放冷, 再称定重量, 用 50%甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液用微孔滤膜滤过, 即得供试品^[20]。②对照品溶液的制备:精密称取金石蚕苷对照品适量, 加 50%色谱甲醇制成每 1 mL 含金石蚕苷约 0.156 mg 的溶液^[21]。③阴性对照品的制备:按处方比例去除广东紫珠外的其余药材, 照供试品溶液的制备方法制成阴性对照品。

1.2.3 测定方法 分别精密吸取对照品溶液 10 μL 与供试品

溶液 5 μL 注入液相色谱仪, 测定和记录色谱图。

2 结果

2.1 专属性实验

分别取对照品、供试品、阴性样品溶液注入液相色谱仪, 结果在金石蚕苷对照品出峰处, 供试品有明显的色谱峰而阴性对照品无色谱峰出现, 表明阴性对照品无干扰, 本方法专属性强。结果见图 1、图 2 和图 3。

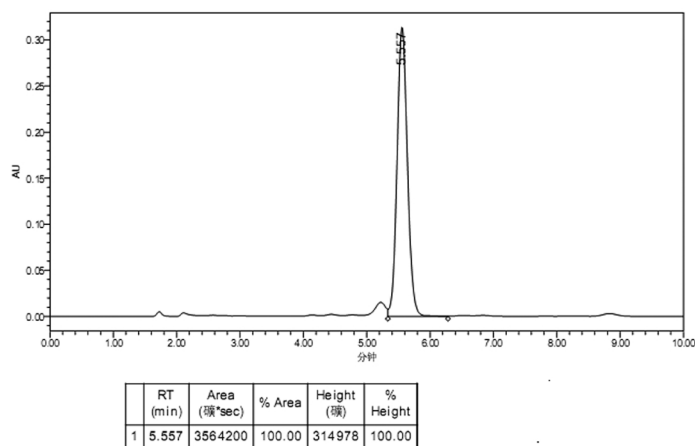


图 1 金石蚕苷对照品

Fig. 1 Comparison products of poliumoside

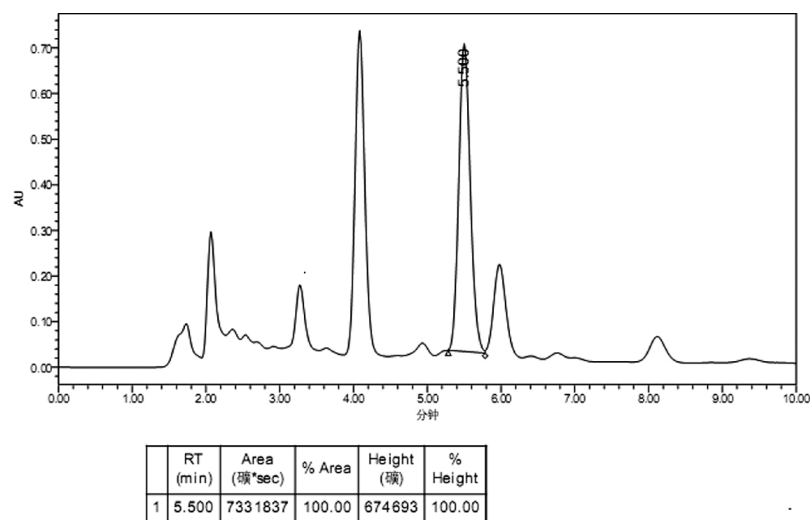


图 2 抗宫炎凝胶剂供试品
Fig.2 Preparation of Kang gongyan gels

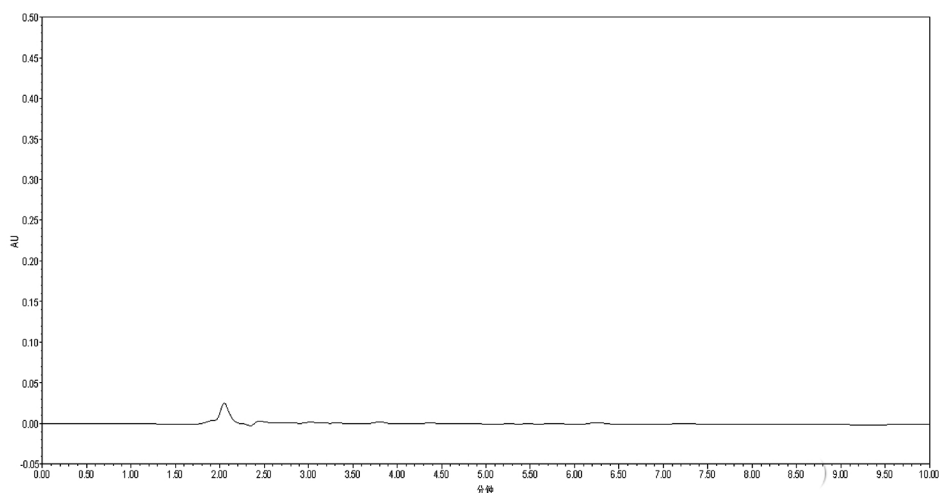


图 3 阴性对照品
Fig.3 Negative reference substance

2.2 精密度实验

精密吸取浓度为 0.156 mg/ml 对照品 15 μ L 注入液相色谱

仪,重复进样 6 次,结果 RSD 为 0.24%,表明本法的精密度良好,见表 2。

表 2 精密度试验
Table 2 Precision experiment

Number	Sample size(μ L)	Peak area	Appearance time	RSD
1	15.0	3583313	5.584	0.24%
2	15.0	3586156	5.555	
3	15.0	3578441	5.571	
4	15.0	3564655	5.531	
5	15.0	3567668	5.516	
6	15.0	3570842	5.538	

2.3 线性曲线

精密称取 105 $^{\circ}$ C 干燥 5 h 的金石蚕苷对照品 25.00 mg,置 25 mL 容量瓶中,加入 50%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得浓度为 1 mg/ml 的对照品溶液。分别精密吸取上述对照品溶液

1.04 mL、1.56 mL、2.08 mL、2.60 mL、4.16 mL、4.68 mL 分别置于 10 mL 容量瓶中,加 50%色谱甲醇稀释至刻度,摇匀,制成浓度分别为 0.104 mg/ml、0.156 mg/ml、0.208 mg/ml、0.260 mg/ml、0.416 mg/ml、0.468 mg/ml 的金石蚕苷对照品溶液。精密吸取上

述浓度对照品溶液各 15 μL , 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以浓度为横坐标, 峰面积积分值为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到线性回归方程为 $y=23189646.34x-103111.8155(r=0.9999, n=6)$, 表

明金石蚕苷浓度在 0.104~0.468 mg/ml 范围内, 对照品浓度与峰面积之间具有良好的线性关系, 见表 3。

表 3 标准曲线

Table 3 Standard curve

Number	Concentration(mg/ml)	Peak area	Appearance time
1	0.104	2279910	5.568
2	0.156	3506459	5.623
3	0.208	4754732	5.608
4	0.260	5944522	5.592
5	0.416	9547485	5.590
6	0.468	10729931	5.608

2.4 稳定性实验

μL , 注入液相色谱仪, RSD 为 0.46%, 表明本样品溶液在 24 h 内稳定性良好, 见表 4。

取抗宫炎凝胶剂一支, 精密称定, 按供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 分别于第 0、1、3、5、7、9、12、24 h 精密吸取 5

表 4 稳定性试验

Table 4 Stability experiment

Number	Time(h)	Peak area	Appearance time	RSD
1	0	7331836	5.467	0.46%
2	1	7339241	5.447	
3	3	7331837	5.500	
4	5	7277159	5.528	
5	7	7341462	5.483	
6	9	7338090	5.489	
7	12	7351708	5.450	
8	24	7401823	5.486	

2.5 重现性实验

6 份样品中金石蚕苷的含量, 得 RSD 为 0.087%, 表明该方法的重现性良好, 见表 5。

精密称取同一批样品 6 份, 按供试品溶液制备方法平行制备六份供试品溶液, 分别精密吸取 5 μL 注入液相色谱仪, 测定

表 5 重现性试验

Table 5 Reproducibility experiment

Number	Sample size(μL)	Peak area	Appearance time	RSD
1	5.0	7313577	5.552	0.087%
2	5.0	7311453	5.515	
3	5.0	7315391	5.550	
4	5.0	7302721	5.502	
5	5.0	7314681	5.473	
6	5.0	7322291	5.443	

2.6 样品含量的测定

注入液相色谱仪, 测定和记录色谱图, 结果见表 6。

取三批样品按上述供试品溶液制备方法制备, 分别精密吸取浓度为 0.156 mg/ml 对照品溶液 15 μL 及供试品溶液 5 μL ,

2.7 回收率实验

精密称取已知含量的样品 9 份(含量 1.842 mg/g)约 5.00 g,

分别加入上述浓度为 1 mg/ml 对照品溶液, 其中三份加入 7.4 mL, 三份加入 9.2 mL, 三份加入 11 mL, 测定上述 9 份药品中金石蚕苷的含量, 计算平均回收率为 99.76%, RSD 为 1.56%, 表明该法的回收率好, 见表 7。

$$\text{回收率}\% = \frac{(\text{实测值} - \text{原样品中金石蚕苷含量})}{\text{加入对照品量}} \times 100\%$$

2.8 耐用性试验

取一份供试品, 分别改变流动相组成、色谱柱、流速、检测波长, 进行含量测定。结果表明, 以上四种因素小的变动对金石

蚕苷含量的测定影响较小, 提示本测定方法稳定、可行, 见表 8。

表 6 样品含量测定
Table 6 Content determination of samples

Number	Content (mg)
20110901	9.20
20110902	9.21
20110903	9.20

表 7 回收率实验
Table 7 Recovery experiment

Number	Sample siaz(g)	Content(mg)	AAddition(mg)	Measured value(mg)	Recovery rate(%)	Average recovery rate%	RSD%
1	5.002	9.2136	7.4000	16.5462	99.09	99.76%	1.56%
2	5.001	9.2118	7.4000	16.5163	98.71		
3	5.002	9.2136	7.4000	16.6195	100.08		
4	5.003	9.2155	9.2000	18.6317	102.35		
5	4.998	9.2063	9.2000	18.2968	98.81		
6	4.998	9.2063	9.2000	18.4909	100.92		
7	4.998	9.2063	11.000	19.8884	97.11		
8	5.003	9.2155	11.000	20.3420	101.15		
9	5.001	9.2118	11.000	20.1667	99.59		

表 8 耐用性实验
Table 8 Durability experiment

Number	Variable factor	Content(mg)
1	Mobile phase: acetonitrile-0.5% H_3PO_4 (20:80)	9.20
2	Chromatographic column(C_{18} 5 μ 250 $\times$ 4.6mm)	9.21
3	Flow rate(0.8 mL/min)	9.21
4	Determine wavelength(330nm)	9.20

3 讨论

3.1 供试品制备方法的选择

本实验探讨了超声提取法和加热回流提取法两种方法, 结果显示加热回流提取的效果明显优于超声提取, 故本实验选用加热回流提取方法^[15]。

3.2 提取时间的选择

本实验分别考察了加热回流提取 0.5 h、1 h、1.5 h, 结果表明提取时间为 1 h 时, 样品的含量最高, 故本实验采取回流 1 h 的提取时间, 最终确定样品的最佳提取工艺为加热回流 1 h。

3.3 对主要成分进行高效液相色谱法的定量鉴别

本实验对方中的主药广东紫珠的主要成分金石蚕苷进行了高效液相色谱法的定量鉴别, 通过方法学考察, 金石蚕苷峰型良好, 其专属性、精密度、稳定性、重现性均良好, 说明该方法简便可靠, 可用于抗宫炎凝胶剂的质量标准的研究。

综上所述, 凝胶剂作为近几年局部外用药的新剂型, 是局部外用药研发的热点^[20]。应用于阴道内给药的凝胶主要是功能水凝胶, 与吸附处的黏膜紧密结合, 具有制备工艺简单、形状美观、易于涂布使用、易清洗、不污染衣物、稳定性较好等特点, 现在水性凝胶基质在新研发的局部外用制剂中所占比例越来越大。

参考文献(References)

- [1] 韦日葵. 慢性宫颈炎病因和治疗方法的研究[J]. 中国医药科学, 2012, 2(10): 40-42
Wei Ri-kui. Method study the causes and treatment of chronic cervicitis [J]. Journal of Chinese Medical Sciences, 2012, 2(10): 40-42
- [2] 林川, 熊希, 杨君, 等. 慢性宫颈炎定义与治疗方法的历史沿革[J]. 临床医学, 2010, 18(09): 1330-1332
Lin Chuan, Xiong Xi, Yang Jun, et al. The history of the definition and treatment of chronic cervicitis[J]. Clinical Medicine, 2010, 18(09): 1330-1332
- [3] 李琳. 慢性宫颈炎的治疗进展[J]. 中国医药指南, 2013, 11(09): 67-68

- Li Lin. Progress in the treatment of chronic cervicitis [J]. Guide of China Medicine, 2013, 11(09): 67-68
- [4] 李智红. 中西医治疗慢性宫颈炎进展[J]. 实用中医药杂志, 2010, 26(06): 443-444
- Li Zhi-hong. Progress in Western medicine treatment of chronic cervicitis[J]. Journal of Practical Traditional Chinese Medicine, 2010, 26(06): 443-444
- [5] 程周霞. 宫颈糜烂病因学及治疗方法研究进展 [J]. 中国实用医药, 2009, 4(06): 230-231
- Cheng Zhou-xia. Progress in the etiology and treatment of cervical erosion method[J]. China Practical Medicine, 2009, 4(06): 230-231
- [6] 黎瑞英. 慢性宫颈炎的诊疗研究进展[J]. 北方药学, 2011, 8(03): 36-37
- Li Rui-ying. To study the diagnosis and treatment of chronic cervicitis [J]. The northern pharmaceutical, 2011, 8(03): 36-37
- [7] 何维艳. 慢性宫颈炎的诊疗综述[J]. 中国医药指南, 2010, 8(03): 34-35
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010
- State Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia [M]. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2010
- [9] 奚念朱. 药剂学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 239
- Xi Nian-zhu. Pharmacy [M]. 2. Beijing: People's Health Publishing House, 1994: 239
- [10] 赖宝林, 王利胜, 张升, 等. 中药凝胶剂的研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(02): 211
- Lai Bao-lin, Wang Li-sheng, Zhang Sheng, et al. Advances in medicine gel [J]. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology, 2010, 21(2): 211
- [11] 陈艳华, 冯锋. 广东紫珠地上部分的化学成分[J]. 中国天然药物, 2008, 6(02): 120-122
- Chen Yan-hua, Feng Feng. The research of chemical component of Callicarpa kwangtungensis on the ground [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2008, 6(02): 120-122
- [12] 刘灿黄, 刘塔斯. 广东紫珠不同产地、不同部位中连翘酯苷 B 和金石蚕苷含量的测定[J]. 中国中药杂志, 2013, 10(19): 3324-3326
- [13] 魏丽春, 李庆军. 益母草的药理与临床研究进展[J]. 西北药学杂志, 2009, 24(04): 333-334
- Wei Li-chun, Li Qi-jun. The pharmacological and clinical research progress of Leonurus [J]. Journal of northwest pharmacy, 2009, 24(04): 333-334
- [14] 郭鹏, 高颖, 张静泽. 益母草的药理学研究进展[J]. 武警医学院学报, 2008, 17(01): 83-84
- Guo Peng, Gao Ying, Zhang Jing-yi. The pharmacological research progress of Leonurus [J]. Acta Academiae Medicinae CPAPF, 2008, 17(01): 83-84
- [15] 王军伟, 阮冰. 乌药的植化及药理研究概况[J]. 浙江中医杂志, 2006, 41(11): 675-677
- Wang Jun-wei. Ruan Bing. Planting of radix linderiae and pharmacological research [J]. Zhejiang journal of traditional Chinese medicine, 2006, 41(11): 675-677
- [16] 李庆林, 创桂新, 窦昌贵, 等. 乌药提取物的镇痛抗炎作用研究[J]. 中药材, 1997, 20(02): 629
- Li Qing-lin, Chuang Gui-xin, Dou Chang-gui. The analgesic anti-inflammatory effects of extracts from radix linderiae research[J]. Journal of Chinese medical materials, 1997, 20(02): 629
- [17] 石馨, 肖瑾, 陈磊. 抗宫炎片治疗慢性宫颈炎 142 例疗效分析[J]. 甘肃中医, 2001, 14(04): 53-54
- Shi Xin, Xiao Jin, Chen Lei. Resistance to GongYan treatment efficacy analysis of 142 cases of chronic cervicitis [J]. Journal of traditional Chinese medicine in gansu province, 2001, 14(04): 53-54
- [18] 刘玠, 韩雪, 席珊珊. 治糜灵凝胶剂的制备工艺研究[J]. 中成药, 2010, 32(10): 1822-1823
- Liu Jie, Han Xue, Xi Shan-shan. Preparation technology governance Kangmiling gel [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2010, 32(10): 1822-1823
- [19] 刘玠, 翟春梅, 褚利娟. 中药凝胶剂在宫颈炎中的应用进展[J]. 中医药学报, 2011, 39(5): 88-90
- Liu Jie, Zhai Chun-mei, Chu Li-juan. Advances in medicine gels of cervicitis[J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2011, 39(5): 88-90
- [20] 林吉, 高卫东, 叶其馨, 等. 谈中药凝胶剂的进展[J]. 江西中医药, 2005, 36(7): 60-62
- Lin Ji, Gao Wei-dong, Ye Qi-xin, et al. Advances in medicine talk gels [J]. Jiangxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 2005, 36(7): 60-62
- [21] 周刚, 吕庆红. 中药阴道给药制剂研发问题的思考[J]. 中药新药与临床药, 2008, 19(05): 412-413
- Zhou Gang, Lv Qing-hong. Investigate traditional Chinese medicine preparations vaginal problems[J]. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology, 2011, 28(2): 36-37
- [22] 靳涛. 慢性宫颈炎的临床治疗效果[J]. 求医问药, 2013, 13(11): 79
- Jin Tao. Chronic cervicitis clinical therapeutic effect [J]. Doctor & Pharmacy, 2013, 13(11): 79