

HPLC-DAD 同时测定苦碟子注射液中 7 种黄酮类成分含量

马思萌, 刘睿, 任晓亮*, 戚爱棣, 李遇伯
(天津中医药大学中药学院, 天津 300193)

[摘要] 目的: 建立 HPLC-DAD 同时测定苦碟子注射液中的 7 种黄酮类成分[木犀草素-7-*O*-龙胆二糖苷(LGT)、木犀草素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(LGCOP)、木犀草素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖醛酸苷(LGCRP)、芹菜素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(AGCOP)、芹菜素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖醛酸苷(AGCRP)、木犀草素(LI)、芹菜素(AGI)]含量的方法。方法: 采用 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱(3.9 mm × 150 mm, 4.6 μ m), 流动相 0.05% 甲酸-乙腈和 0.05% 甲酸-水, 梯度洗脱。流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 35 $^{\circ}$ C, 检测波长 340 nm。结果: 7 种待测成分的分离度良好, 线性关系良好, 加样回收率为 99.0% ~ 101.5%, 均符合含量测定要求。建立的方法能够同时测定 LGT, LGCOP, LGCRP, AGCOP, AGCRP, LI, AGI 的含量, 并对 8 批苦碟子注射液进行含量测定, 各黄酮含量在 0.157 9 ~ 103.4 mg·L⁻¹。结论: 该法简便可行, 结果可靠, 且能同时测定苦碟子注射液中 7 种黄酮类成分, 可作为本制剂多成分内控质量的测定方法。

[关键词] 高效液相色谱; 苦碟子注射液; 黄酮类; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0063-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014070063

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000023.html>

[网络出版时间] 2014-01-21 9:26

Simultaneous Determination of Seven Flavonoids Constitutes in Kudiezi Injection by RP-HPLC-DAD

MA Si-meng, LIU Rui, REN Xiao-liang*, QI Ai-di, LI Yu-bo
(College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin University of
TCM, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an analysis method of simultaneously determining [luteolin-7-*O*-gentibioside (LGT), luteolin-7-*O*- β -D-glucopyranoside (LGCOP), luteolin-7-*O*- β -D-glucuronopyranoside (LGCRP), apigenin-7-*O*- β -D-glucopyranoside (AGCOP), apigenin-7-*O*- β -D-glucuronopyranoside (AGCRP), luteolin (LI) and apigenin (AGI)] in Kudiezi injection by RP-HPLC-DAD. **Method:** 0.05% formic acid-acetonitrile and 0.05% formic acid-water as the mobile phase, chromatographic column was Waters Symmetry C₁₈ (3.9 mm × 150 mm, 4.6 μ m) in gradient elution mode with velocity: 1 mL·min⁻¹, column temperature 35 $^{\circ}$ C, detection wavelength of 340 nm. **Result:** There were perfect chromatogram with good separation. All the 7 calibration curves showed a good linear relationship. The recoveries were 99.0% -101.5%, according to the requirement. The developed method was successfully applied for the simultaneous determination of the 7 components (LGT, LGCOP, LGCRP, AGCOP, AGCRP, LI, AGI). After the determination of 8 batch of Kudiezi injection, the content of 7 flavonoids was in 0.157 9-103.4 mg·L⁻¹. **Conclusion:** The method is

[收稿日期] 20130920(002)

[基金项目] 国家科技重大专项(2011ZX09401-305-42);国家自然科学基金青年基金项目(81102732)

[第一作者] 马思萌, 硕士在读, 从事药物分析, Tel:18222706930, E-mail:xiaoanni@126.com

[通讯作者] *任晓亮, 博士, 讲师, 从事药物分析研究, Tel:022-59596221, Fax:022-59596221, E-mail:xiaoliang_ren@sina.com

convenient, specific, and can be used for the flavonoids constitutes quality control of Kudiezi injection.

[Key words] HPLC-DAD; Kudiezi injection; flavonoids constitutes; assaying

苦碟子为菊科植物抱茎苦蕒菜的全草,具有活血止痛、清热去瘀的功效^[1],常用于治疗冠心病、脑梗塞等疾病^[2]。苦碟子注射液是以该药材为原料经现代工艺提取精制而成的中药注射剂,具有抑制氧自由基,防治缺血/再灌注损伤,增加心脑血管血流量,降低心肌耗氧量,改善微循环,镇痛、镇静的作用^[3-4];可通过抗血小板聚集、增强纤维蛋白酶的活性来改善神经功能缺损^[5]。其主要成分为黄酮类及腺苷类等物质^[6-7],黄酮类成分具有明显扩张冠脉及降低冠脉血管阻力的作用^[8]。《国家中成药标准汇编》以总黄酮含量作为苦碟子注射液质量控制的指标,规定总黄酮以芦丁为对照,按分光光度法测定^[9]。由于芦丁并非注射液中所含有的成分且紫外分光光度法专属性不强,故测定结果不能准确反映注射液中真实的黄酮类成分含量^[10]。为更好地控制产品质量,本研究采用 HPLC-DAD 建立了同时测定苦碟子注射液中 7 种黄酮类成分含量的方法。

1 材料

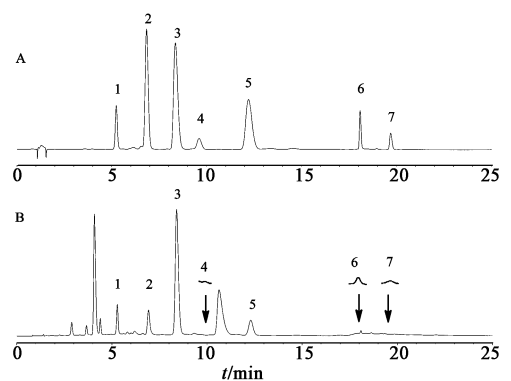
1.1 仪器 Waters 2695 型高效液相色谱仪(四元梯度泵,在线真空脱气,自动进样器,恒温柱箱,2998 DAD 检测器,Empower 2 色谱工作站,美国 Waters 公司),Satorius BT 25 S 型 1/10 万电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器公司),KH 2200 B 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 试药 对照品木犀草素-7-*O*-龙胆二糖苷(LGT)、木犀草素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖醛酸苷(LGCRP)均为本实验室从抱茎苦蕒菜药材中分离、鉴定,经 HPLC 面积归一化法测定纯度均达 97.0% 以上,可供含量测定用;木犀草素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(LGCOP)(批号 20121176,含量 > 98.0%),芹菜素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(AGCOP)(批号 20121229,含量 > 98.0%)、木犀草素(LI)(批号 20121060,含量 > 99.2%)、芹菜素(AGI)(批号 20121133,含量 > 99.2%)均购自天津一方科技有限公司;芹菜素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖醛酸苷(AGCRP)(批号 120229,购自成都瑞芬思生物科技有限公司,含量 > 98.0%)。苦碟子注射液(吉林通化华夏药业有限责任公司,2013-1,2013-2,2013-3,2013-4,2013-5,2013-6,2013-7,2013-8)。乙腈为色谱纯(Sigma 公司),甲醇为色谱纯(天津市康科德科技有限公司),水为超纯水(杭州娃哈哈集团公

司),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱(3.9 mm × 150 mm, 4.6 μ m), 0.05% 甲酸-水(A) 0.05% 甲酸-乙腈(B) 梯度洗脱(0 ~ 3 min, 90.0% ~ 82.0% A; 3 ~ 15 min, 82.0% ~ 80.8% A; 15 ~ 16 min, 80.8% ~ 67.0% A; 16 ~ 21 min, 67.0% ~ 66.4% A); 检测波长 340 nm, 流速 1 mL · min⁻¹, 柱温 35 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L。在上述色谱条件下 LGT, LGCOP, LGCRP, AGCOP, AGCRP, LI, AGI 的对照溶液和苦碟子注射液供试溶液的色谱图见图 1。



1. 木犀草素-7-*O*-龙胆二糖苷; 2. 木犀草素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷; 3. 木犀草素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖醛酸苷; 4. 芹菜素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷; 5. 芹菜素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖醛酸苷; 6. 木犀草素; 7. 芹菜素
图 1 对照溶液(A)和苦碟子注射液供试溶液(B) HPLC

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取 LGT, LGCOP, LGCRP, AGCOP, AGCRP, LI, AGI 对照品适量,加甲醇溶解制成 460, 700, 800, 400, 600, 400, 200 mg · L⁻¹ 的各对照品储备液,待用;再将 AGCOP, LI, AGI 的储备液分别稀释制成 40, 40, 20 mg · L⁻¹ 的对照品溶液。另精密吸取各储备液适量于同一 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,即得 LGT, LGCOP, LGCRP, AGCOP, AGCRP, LI, AGI, 质量浓度分别为 92.00, 140.0, 160.0, 16.00, 120.0, 16.00, 10.00 mg · L⁻¹ 的混合对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取苦碟子注射液,用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液,待测。

2.3 线性关系考察 分别精密吸取 2.2.1 项下混

合对照品储备液适量,置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,逐级稀释并摇匀,即得系列混合对照品溶液。各取10 μL ,按2.1项下色谱条件进样测

定。以对照品溶液进样量 $X(\text{ng})$ 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,以最小二乘法求得回归方程,见表1。

表1 7个化合物的线性回归方程、相关系数和线性范围

成分	回归方程	R	线性范围/ ng
LGT	$Y = 1.561 \times 10^3 X + 4.644 \times 10^3$	0.999 9	14.38 ~ 920.0
LGCOP	$Y = 3.132 \times 10^3 X - 3.157 \times 10^3$	0.999 9	21.88 ~ 1 400
LGCRP	$Y = 2.451 \times 10^3 X + 3.826 \times 10^4$	0.999 8	25.00 ~ 1 600
AGCOP	$Y = 4.399 \times 10^3 X + 4.034 \times 10^2$	0.999 7	2.500 ~ 160.0
AGCRP	$Y = 3.024 \times 10^3 X - 7.079 \times 10^3$	0.999 9	18.75 ~ 1 200
LI	$Y = 4.858 \times 10^3 X - 2.267 \times 10^3$	0.999 7	2.500 ~ 160.0
AGI	$Y = 5.384 \times 10^3 X + 2.912 \times 10^3$	0.999 9	1.560 ~ 100.0

结果表明,LGT,LGCOP,LGCRP,AGCOP,AGCRP,LI,AGI分别在14.38 ~ 920.0,21.88 ~ 1 400,25.00 ~ 1 600,2.500 ~ 160.0,18.75 ~ 1 200,2.500 ~ 160.0,1.560 ~ 100.0 ng线性关系良好。

2.4 精密度试验 精密吸取低浓度(LGT,LGCOP,LGCRP,AGCOP,AGCRP,LI,AGI分别为2.875,4.375,5.00,0.500,3.75,0.500,0.3125 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、中浓度(LGT,LGCOP,LGCRP,AGCOP,AGCRP,LI,AGI分别为11.5,17.5,20.0,2.00,15.0,2.00,1.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、高浓度(LGT,LGCOP,LGCRP,AGCOP,AGCRP,LI,AGI分别为46.0,70.0,80.0,8.00,60.0,8.00,5.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的混合对照品溶液,按2.1项下色谱条件,每种浓度连续进样6次,每次10 μL ,计算各对照品色谱峰面积及RSD,结果见表2。结果表明RSD均 $\leq 1.5\%$,表明仪器精密度良好。

表2 苦碟子注射液中7种黄酮精密度试验($n=6$) %

成分	低浓度 RSD	中浓度 RSD	高浓度 RSD
LGT	1.2	0.5	0.4
LGCOP	1.2	0.8	0.2
LGCRP	1.1	0.7	0.3
AGCOP	1.5	1.0	0.6
AGCRP	1.1	0.7	0.5
LI	1.5	0.9	0.5
AGI	1.5	0.9	0.7

2.5 重复性试验 精密量取同一批次的苦碟子注射液(2013-6)样品6只,按2.2.2项下方法制备成供试溶液,按2.1项下色谱条件,进样分析($n=6$),每次10 μL ,测定各待测物色谱峰面积并计算平均含量和RSD。测得LGT,LGCOP,LGCRP,AGCOP,AGCRP,LI,AGI的平均含量分别为15.43,15.85,89.11,0.6712,18.46,0.466 8,0.180 5 $\text{mg} \cdot$

L^{-1} 。RSD分别为1.0%,1.0%,0.7%,2.1%,1.4%,2.1%,2.2%,表明方法重复性良好。

2.6 稳定性试验 取供试苦碟子注射液(2013-6),室温放置,分别于0,2,4,8,10,12 h进样,按2.1项下色谱条件进样分析,以峰面积计算,LGT,LGCOP,LGCRP,AGCOP,AGCRP,LI,AGI峰面积的RSD分别为1.1%,0.8%,0.6%,1.9%,1.2%,1.9%,2.2%,表明供试品溶液在12 h内稳定($n=6$)。

2.7 加样回收率试验 精密量取已知含量的苦碟子注射液(2013-6)5.0 mL,置于10 mL量瓶中,分别精密加入2.2.1项下LGT,LGCOP,LGCRP,AGCOP的对照品储备液及AGCOP,LI,AGI的对照品溶液适量,摇匀,甲醇定容至刻度,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,平行操作6份。按2.1项下色谱条件进样分析,记录峰面积,计算加样回收率和RSD,结果见表3。

表3 苦碟子注射液中7种成分加样回收率试验($n=6$)

成分	样品含量 / μg	加入量 / μg	测定量 / μg	平均回收率 /%	RSD /%
LGT	77.15	78.2	155.1	100.7	1.3
LGCOP	79.25	77	157.6	100.6	1.0
LGCRP	445.6	440	882.6	99.0	0.5
AGCOP	3.356	3.2	6.497	100.0	1.8
AGCRP	92.28	90	183.9	101.5	1.1
LI	2.334	2.4	4.760	101.1	1.8
AGI	0.902 5	1	1.891	100.7	2.0

2.8 样品含量测定 取8批苦碟子注射液适量,按2.2.2项下方法制备供试溶液($n=3$),按2.1项下色谱条件进样分析,结果见表4。

3 讨论

比较了甲醇-水和乙腈-水流动相洗脱系统,结果待测成分在乙腈-水流动相系统的分离效果比在

表 4 不同批次样品中 7 种黄酮类成分的含量测定 ($n=3$)

mg·L⁻¹

批次	LGT	LGCOP	LGCRP	AGCOP	AGCRP	LI	AGI	总和
2013-1	18.29	17.47	93.42	0.567 1	19.04	0.689 5	0.158 6	149.6
2013-2	15.55	17.91	98.12	0.640 8	18.11	0.513 9	0.157 9	151.0
2013-3	15.69	14.84	82.44	0.569 6	17.67	0.436 5	0.184 3	131.8
2013-4	14.81	16.57	99.27	0.479 1	18.71	0.416 2	0.185 0	150.4
2013-5	17.61	16.78	103.4	0.433 7	19.44	0.617 2	0.159 3	158.4
2013-6	15.43	15.85	89.11	0.671 2	18.46	0.466 8	0.180 5	140.2
2013-7	16.33	16.79	96.89	0.895 2	16.97	0.670 0	0.167 2	148.7
2013-8	14.53	15.22	89.87	0.470 5	16.74	0.487 2	0.220 0	137.5
平均值	16.03	16.43	94.07	0.590 9	18.14	0.537 2	0.176 6	146.0
RSD/%	8.2	6.5	7.2	25.1	5.3	19.9	11.9	5.9

甲醇-水流动相系统中好。对加入甲酸的用量进行考察,分别考察了不加入甲酸和加入不同比例甲酸的分离效果,结果显示以 0.05% 甲酸-乙腈和 0.05% 甲酸-水作流动相色谱峰分离度最佳。对不同流速和柱温对峰形的影响进行考察,最终确定流速为 1 mL·min⁻¹、柱温为 35 ℃ 的色谱条件。

从 DAD 全波长扫描 (200 ~ 400 nm) 结果看,当检测波长为 340 nm 时,7 个待测成分均有较大紫外吸收,响应高且分离效果良好。综合考虑各色谱峰的响应和干扰因素,选择 340 nm 作为检测波长。

从样品的含量测定结果来看,不同批次的苦碟子注射液之间黄酮含量的平均值为 146.0 mg·L⁻¹,有一定的批间差异 (RSD 5.9%),可能与不同批次的药材来源、采收季节以及生产工艺有关,提示苦碟子注射液的质量有待进一步规范。

对含量较高的 3 种黄酮类成分 LGT, LGCOP, LGCRP, 将其含量之和与黄酮总含量进行拟合得回归方程 $Y = 1.068X + 10.83$ ($r = 0.9963$), 表明两者之间有很强的线性相关性。LGT, LGCOP, LGCRP 的母核在 7 种黄酮中具有代表意义且含量相对较高,故其含量对注射液中总黄酮的含量具有较强的代表作用;又是注射液中活血化瘀、改善微循环的主要活性成分。因此建议将 LGT, LGCOP, LGCRP 同时作为苦碟子注射液含量测定的指标成分,并采用 HPLC-DAD 测定,比紫外分光光度法测定有更高的专属性。

[参考文献]

[1] 廖星, 曾宪斌, 谢雁鸣, 等. 基于苦碟子注射液 HIS 数据临床实效研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(18):2723.

[2] 孙国祥, 王璐, 侯志飞. 注射用苦碟子 HPLC 数字化指纹图谱研究[J]. 中成药, 2008, 30(6):784.

[3] 张建斌, 张丽玲, 魏明阳. 苦碟子注射液联合蕲蛇酶治疗老年进展性脑梗死的疗效[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(15):3730.

[4] 王彩霞, 赵强. 苦碟子注射液的药理作用[J]. 实用药物与临床, 2005, 8(5):43.

[5] 叶晓勤, 魏戎, 谢雁鸣, 等. 苦碟子注射液治疗缺血性中风急性期上市后再评价[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(20):2793.

[6] 高晟, 周静. 苦碟子注射液临床应用研究进展[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(2):180.

[7] 尹然, 王凯, 陈晓辉, 等. RP-HPLC 法测定苦碟子中腺苷[J]. 中草药, 2006, 37(4):609.

[8] 赵凯鑫, 苏丹, 赵雪梅, 等. HPLC 法测定苦碟子中木犀草素 7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(6):1019.

[9] 国家药品监督管理局. 国家中成药标准汇编. 内科心系分册[S]. 2002:492.

[10] 戴锦娜, 尹然, 陈晓辉, 等. 苦碟子化学成分和药理作用研究进展[J]. 西北药学杂志, 2006, 21(2):94.

[责任编辑 蔡仲德]