

高效液相色谱法测定贯叶金丝桃提取物缓释胶囊中 金丝桃苷的含量

樊敏伟, 马能溢, 王冰*, 朱薇婕, 钱佳华
(上海市中药研究所, 上海 201203)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法测定贯叶金丝桃提取物缓释胶囊中金丝桃苷的含量。方法: 色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C₁₈(5 μm, 4.5 mm × 150 mm); 流动相: 水-乙腈-磷酸(825: 175: 1); 检测波长: 368 nm。结果: 贯叶金丝桃提取物缓释胶囊中金丝桃苷的线性范围为(0.06~ 0.30) μg, $r = 0.9999$ 。结论: 此方法可有效控制本制剂质量, 简单、快速、准确、可行。

[关键词] 贯叶金丝桃; 提取物缓释胶囊; 高效液相色谱法; 金丝桃苷; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)11-0009-03

Determination of hyperin in sustained-release capsules of *Hypericum perforatum* extract by HPLC

FAN Min-wei, MA Neng-yi, WANG Bing*, ZHU Wei-jie, QIAN Jia-hua
(Shanghai Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for the determination of hyperin in *Hypericum perforatum* L. extract sustained-release capsules. **Methods:** The analysis was performed on an Agilent ZORBAX SB-C₁₈(5 μm, 4.5 mm × 150 mm) column eluted with the mobile phase consisted of water-acetonitrile-phosphoric acid (825: 175: 1). The detection wavelength was set at 368 nm. **Result:** The linear range for hyperin was (0.06~ 0.30) μg ($r = 0.9999$). **Conclusion:** This method can be used effectively for the quality control of the capsules. It was simple, rapid, accurate and feasible.

[Key words] *Hypericum perforatum* L.; extract sustained-release capsules; HPLC; hyperin; Determination

贯叶金丝桃系藤黄科植物贯叶金丝桃 *Hypericum perforatum* L. 的干燥地上部分^[1]。其主要成分包括黄酮类化合物, 如芦丁、金丝桃苷等和苯并二萜酮类化合物, 如金丝桃素、伪金丝桃素等。金丝桃苷具有凉血止血、活血祛瘀、清热解毒、散郁结等功效^[2]。张俊松等采用 HPLC 法测定贯叶金丝桃及提取物中伪金丝桃素和金丝桃苷的含量^[3]; 范之枫等报道新疆贯叶金丝桃不同部位中金丝桃苷、芦丁和金丝桃素的含量及提取工艺对它们的影响^[4]。金

丝桃苷为本制剂中主要活性成分, 为了能有效控制贯叶金丝桃提取物缓释胶囊的内在质量, 本文采用高效液相色谱法进行金丝桃苷含量测定方法研究。

1 仪器与试剂

岛津 LC-10ATVP 溶剂输送泵, SPD-10AVP 紫外检测器, SCL-10AVP 化学工作站(岛津公司); BS224S 电子天平(Sartorius 公司); CQ 型超声波清洗器(上海沪超声波仪器有限公司); UV-2401PC 型紫外分光光度计(岛津)。

贯叶金丝桃提取物缓释胶囊(自制); 甲醇、乙腈为色谱纯; 磷酸、乙醇为分析纯; 金丝桃苷对照品(批号: 1521-200202 中国药品生物制品检定所)。

贯叶金丝桃药材购自陕西省汉中市, 经上海市

[收稿日期] 2007-06-21

[通讯作者] * 王冰, Tel: (021) 58956227; E-mail: annable_cn@sina.com

中药研究所生物工程室顾慧芬主任鉴定。

2 溶液的制备

2.1 对照品溶液的制备 精密称取金丝桃苷对照品,加 70% 乙醇制成每 1 mL 含金丝桃苷 0.03 mg 的溶液,作为对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 制备方法的选择 考虑到供试品溶液制备过程中提取溶剂的种类、溶剂使用量、超声处理的时间为影响因素,因此根据以下实验条件进行优选。

表 1 样品处理方法考察试验

Table 1 Test for the processing method of sample

提取溶剂 (乙醇)	溶剂使用量 (mL)	超声处理时间 (min)	峰面积
70%	50	5	398 544
70%	100	15	417 593
95%	50	5	348 955
95%	100	15	367 782
甲醇	50	5	316 879
甲醇	100	15	345 661

根据上表数据,我们选定以 70% 乙醇作为溶剂来提取金丝桃苷,使用量为 100 mL,超声处理时间为 15 min。

2.2.2 供试品溶液的制备 取胶囊 4 粒,除去胶囊壳,将内容物研细,取细粉 0.1 g,精密称定,置 100 mL 容量瓶中,加 70% 乙醇 90 mL,超声处理 15 min,放冷,用 70% 乙醇定容至刻度,摇匀。用微孔滤膜(0.45 μm)过滤,取续滤液作为供试品溶液。

3 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈(5 μm, 4.5 mm × 150 mm); 流动相: 水-乙腈-磷酸(825: 175: 1); 流速: 1 mL·min⁻¹; 检测波长: 368 nm。分别吸取对照品溶液、供试品溶液各 10 μL 注入液相色谱仪中,记录色谱图见图 1~ 2。

4 方法学考察

4.1 线性关系考察 吸取上述对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 μL, 注入液相色谱仪,按上述色谱条件,测定峰面积,以峰面积作为纵坐标,对照品进样量(μg)作为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程: $Y = 1.80 \times 10^6 X + 4.29 \times 10^3$, $r = 0.9999$,表明金丝桃苷含量在 0.06~ 0.30 μg 范围内具有良好线性关系。

4.2 精密度试验 吸取上述对照品溶液 10 μL,连续进样 5 次,按上述色谱条件测定峰面积,计算 RSD

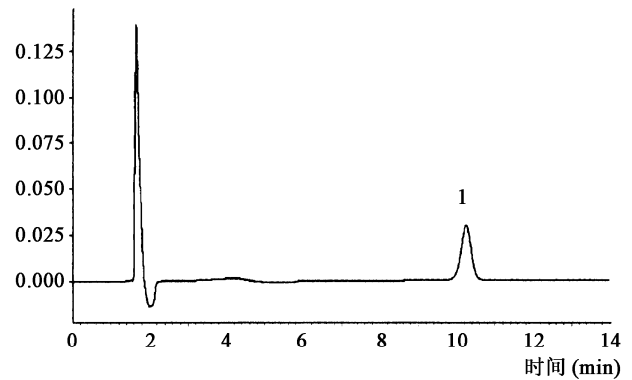


图 1 金丝桃苷对照品 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of standard hyperin

1. 金丝桃苷(hyperin)

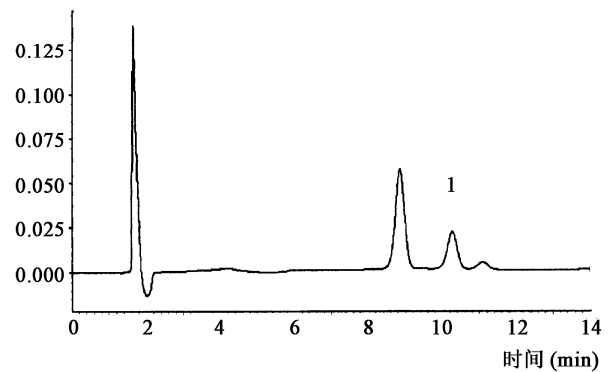


图 2 样品 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of sample

1. 金丝桃苷(hyperin)

= 0.57%, 表明此方法精密度良好。

4.3 稳定性试验 吸取同一供试品溶液,于 0, 2, 4, 8 h 分别进样,每次 10 μL,计算 RSD= 0.66%。结果表明金丝桃苷在 8 h 内稳定。

4.4 重复性试验 取同一批号样品,按上述方法制备 5 份供试品溶液,按上述色谱条件依次测定金丝桃苷含量,计算 RSD= 0.73%,表明此方法重复性良好。

4.5 回收率试验 称取已知含量的贯叶金丝桃提取物缓释胶囊(批号: 20070512 含量为 6.100 mg/粒)内容物细粉 5 份,每份 0.1 g,精密称定,分别加入精密量取的金丝桃苷对照品溶液 1 mL(1 mg·mL⁻¹),按上述色谱条件测定,计算回收率,结果见表 2。金丝桃苷平均回收率为 97.32%,RSD 为 2.46%,表明此方法的加样回收率良好。

4.6 样品测定 取不同批号的 3 批样品,按上述供试品溶液制备方法制备供试品溶液,并按上述色谱条件测定金丝桃苷含量,结果分别为 5.975, 5.800, 6.025 mg/粒($n = 3$)。

表 2 加样回收率试验结果

Table 2 Data for recoveries of hyperin

样品号	样品量 (g)	含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.105 8	2.582	1.000	3.575	99.2		
2	0.101 2	2.469	1.000	3.411	94.2		
3	0.098 5	2.403	1.000	3.396	99.3	97.32	2.46
4	0.097 4	2.376	1.000	3.329	95.3		
5	0.096 8	2.362	1.000	3.348	98.6		

5 讨论

5.1 质量控制指标的确定 金丝桃苷是贯叶金丝桃药材中主要的黄酮类成分,具有凉血止血、活血祛瘀、清热解毒、散郁结等功效^[2],因此我们选择金丝桃苷作为测定贯叶金丝桃提取物缓释胶囊的质控指标。

5.2 供试品溶液制备方法的选择 根据制备方法试验结果,决定以 70% 乙醇 100 mL 来提取金丝桃苷,超声处理时间为 15 min,可得到满意的结果。在优选供试品溶液制备方法过程中,曾经尝试加大溶媒用量及延长超声处理时间,但金丝桃苷提取率并未明显增加,考虑节能省时,决定选用上述方法。

5.3 吸收波长的选择 取上述金丝桃苷对照品溶液,用紫外分光光度仪于(200~ 800) nm 波长范围内

扫描,结果在 368 nm 波长处有最大吸收,因此决定采用 368 nm 作为检测波长。

5.4 流动相的选择 本次试验中通过参考文献^[5,6],比较了不同体系和不同比例的流动相,最后决定以水-乙腈-磷酸(825: 175: 1)作为流动相,分离效果最好。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部,北京:化学工业出版社,2005. 159.
- [2] 宋立人. 现代中药学大辞典[M]. 下册,北京:人民卫生出版社,2001. 2274.
- [3] 张俊松,王晓利,罗谦,等. HPLC 测定贯叶金丝桃及提取物中伪金丝桃素和金丝桃苷的含量[J]. 中成药,2006,28(5): 709-712.
- [4] 范之枫,张瑞欣,黄毅. 新疆贯叶金丝桃不同部位中金丝桃苷、芦丁和金丝桃素的含量及提取工艺对它们的影响[J]. 新疆中医药,2005,23(4): 4-7.
- [5] 王晶. 高效液相色谱法测定贯叶连翘中金丝桃苷的含量[J]. 黑龙江医药科学,2005,28(3): 33-34.
- [6] 王怀冲,范国荣,何莉. 贯叶连翘提取物中金丝桃苷的 HPLC 测定[J]. 中国医药工业杂志,2006,37(2): 119-120.