

高效液相色谱法测定红藤方中间体中 异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷含量

胡昭君, 刘力*, 徐德生

(上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法测定红藤方中间体中异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷的含量。方法: 采用高效液相色谱法, ACE[®] C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水-冰醋酸(14: 79.4: 0.6), 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 254 nm; 柱温: 20 °C。结果: 异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷的线性为(0.040 4~ 2.02) μg, $r = 0.999\ 95$, 平均回收率为 99.78%, RSD 为 1.09%。结论: 方法简便, 结果准确。

[关键词] 红藤方; 中间体; 异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)02-0011-03

Determination of Isorhamnetin-3-O-neohesperidoside in Intermediate Products of Hongtengfang by High-performance Liquid Chromatography

HU Zhaojun, LIU Li*, XU De-sheng

(Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200021, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method to determine isorhamnetin-3-O-neohesperidoside in intermediate products of Hongtengfang. **Methods:** The separation was performed on an ACE C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with acetonitrile-water-acetic acid(14: 79.4: 0.6) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the wavelength of UV detector was set at 254 nm and the column temperature was set at 20 °C. **Results:** The linear relationship of Isorhamnetin-3-O-neohesperidoside was in the range of 0.040 4 μg~ 2.02 μg ($r = 0.999\ 95$). The average recovery of isorhamnetin-3-O-neohesperidoside was 99.78% ($n = 6$), RSD 1.09%. **Conclusion:** The method was simple, rapid and accurate.

[Key words] Hongtengfang; intermediate products; isorhamnetin-3-O-neohesperidoside; HPLC

红藤方为上海中医药大学附属曙光医院自制制剂, 由红藤、蒲黄、牡蛎等中药组成, 临床用于治疗子宫内膜异位症, 取得良好的疗效。为方便患者使用, 经剂型改革将原来的合剂研制成颗粒剂。本研究以红藤方主药蒲黄中治疗子宫内膜异位症的有效成分异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷为指标, 为红藤方中间体

建立可行的质量标准, 以控制成品的质量, 保证疗效。

1 材料、试剂与仪器

HP1100 高效液相色谱仪及化学工作站(美国惠普公司); 分析天平(上海天平仪器厂), CQX25-06 超声波发生器(上海必能信超声有限公司), ZF-90 型多功能暗箱式紫外透射仪(上海顾村电光仪器厂), 电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂)。

红藤方中间体(为喷雾粉, 自制)。异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷对照品(批号: 111571-200402, 含量测定用, 购自中国药品生物制品检定所)。乙腈为色谱

[收稿日期] 2007-08-06

[基金项目] 上海市科委基金资助项目(02DZ19112)

[通讯作者] * 刘力, Tel: (021) 53825761; E-mail: liuli2750@hotmail.com

纯, 水为重蒸水, 其余所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 ACE C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水-冰醋酸(14: 79.4: 0.6); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 254 nm; 柱温: 20 °C。

2.2 线性关系的考察 取异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.080 8 mg 的对照品溶液。分别精密吸取不同体积的对照品溶液, 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 以异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷峰面积的积分值为纵坐标 Y, 进样量 X(μg) 为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为: $Y = 2.39 \times 10^3 X + 22.224$, $r = 0.999\ 95$, 说明异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷在(0.040 4 ~ 2.02) μg 范围内呈良好的线性关系。

2.3 供试品溶液的制备 取红藤方喷雾粉约 1.0 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞三角瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定重量, 超声 30 min, 冷至室温, 称定重量, 用甲醇补足失重, 摇匀, 滤过, 滤液作为供试品溶液。

2.4 空白对照试验 取缺蒲黄的红藤方各药材, 制成缺蒲黄的红藤方中间体, 按 2.3 项的方法制成空白对照品溶液。吸取对照品溶液、供试品溶液、空白对照品溶液各 10 μL, 在上述色谱条件下, 分别注入液相色谱仪, 结果见图 1~ 3。实验结果表明, 红藤方中其它组分不干扰异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷的测定。

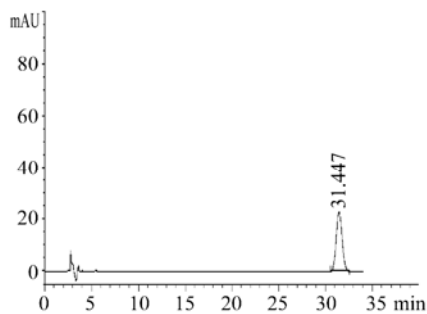


图 1 对照品的 HPLC 图谱

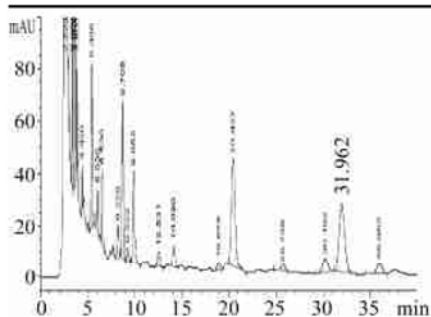


图 2 供试品的 HPLC 图谱

2.5 精密度试验 精密吸取供试品溶液 5 μL, 重复进样 6 次, 记录峰面积, RSD 为 1.06%, 表明精密度

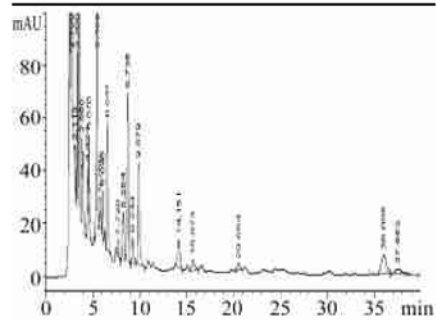


图 3 空白对照品的 HPLC 图谱

良好。

2.6 稳定性试验 取供试品溶液分别在 0, 24, 48 h 进样 10 μL, 记录峰面积并计算出 RSD 为 0.68%。结果表明, 供试品溶液 48 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取红藤方喷雾粉 6 份, 按项 2.3 的方法制得样品溶液, 注入液相仪测定, 计算含量, RSD 为 1.23%。结果表明本法重复性良好。

2.8 加样回收试验 取已测含量的红藤方喷雾粉样品约 0.5 g, 精密称定, 精密加入不同量的异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷对照品, 按供试品溶液制备方法制备样品, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果

样品中量 (mg)	添加量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.679 8	0.508 0	1.180 8	98.62	99.78	1.09
0.671 0	0.508 0	1.185 1	101.2		
0.675 6	0.635 0	1.306 2	99.31		
0.676 7	0.635 0	1.312 8	100.2		
0.676 8	0.762 0	1.428 5	98.65		
0.676 3	0.762 0	1.443 6	100.7		

2.9 供试品的测定 分别取 3 批红藤方喷雾粉, 按项 2.3 的方法制备供试品溶液, 滤过, 吸取供试品溶液 10 μL, 注入高效液相色谱仪测定, 结果供试品中异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷含量为 0.740, 0.759, 0.522 mg·g⁻¹。

3 讨论

红藤方由红藤、蒲黄、牡蛎等中药组成, 我院临床用于治疗子宫内膜异位症, 取得良好的疗效。本研究以红藤方主药蒲黄中治疗子宫内膜异位症的有效成分异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷为指标, 为红藤方中间体建立可行的质量标准, 以控制成品的质量, 保证疗效。

红藤方主药蒲黄有止血、化瘀、通淋的作用, 文献报道其主要含有槲皮素、异鼠李素、异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷等黄酮类成分, β-谷甾醇等甾类成分以

及长链脂肪烃、氨基酸类等成分^[1],其中异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷具有强烈的刺激猪动脉内皮细胞产生 PGI₂ 和 tPA 活性的作用,同时抑制 ADP 诱导的血小板聚集,为从蒲黄中筛选出的抗血栓形成活性成分^[2,3],提示其为蒲黄化瘀的有效成分。

文献报道异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷的测定方法不多,2005年版中国药典虽有蒲黄中异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷的含量测定方法,但由于红藤方是个复方中药制剂,用药典的方法,方中其它成分对其测定有干扰。因此在摸索 HPLC 分离条件时,曾试用过 Dikma C₁₈ 柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), Angilent C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Nobel C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)等,但分离效果均不理想。经多次试验用本文所述色谱柱和流动相可得到满意的分离效果,保留时间虽较长,但分离度很好,另外流动相中加入

少量冰醋酸能改善峰的拖尾现象。

异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷具有一定的脂溶性,因此对供试品溶液的制备方法进行了考察。包括提取溶媒、提取方法、提取时间等。经过筛选比较,以甲醇超声提取 30 min 为佳。

[参考文献]

- [1] 苑可武,徐文豪.蒲黄的化学及药理研究概况[J].中草药,1996,27(11):693-696.
- [2] Zhao J, Zhang C Y, Xu D M, *et al.* The Antiatherogenic Effects of Components, Isolated from Pollen Typhae [J]. Thrombosis Research, 1990, 57(3):957.
- [3] Zhao J, Zhang C Y, Xu D M, *et al.* Futher Study of Pollen Typhae' s Effects on the Production of tPA and PGI₂ by Cultured Endothelial Cells [J]. Thrombosis Research, 1989, 56(6):677.