

HPLC 测定三叶口服液中总黄酮的含量

王天奇¹, 马 静², 张永萍³

(1. 贵州遵义医院 563000; 2. 贵州长寿长乐医药研究所, 遵义 563000; 3. 贵阳中医学院, 贵阳 550002)

摘要: 目的: 建立高效液相色谱法测定三叶口服液中总黄酮的含量。方法: Hypersil ODS₂C₁₈ 流动相甲醇-0.4% 磷酸水溶液 (45:55), 槲皮素为对照品, 外标法峰面积定量, 紫外检测($\lambda = 360\text{nm}$)。结果: 平均回收率为 100.37%。

关键词: 三叶口服液; 总黄酮

中图分类号: R284.1 文献标识码: D 文章编号: 1005-9903(2001)04-0012-02

三叶口服液是由银杏叶、柿叶等药材组成的复方制剂, 其主要功能为降血脂、降血压。银杏叶、柿叶及杜仲叶的提取物经酸水解后都会有槲皮素、山奈素及少量异鼠李素, 在无山奈素、异鼠李素对照品的情况下, 为控制三叶口服液的产品质量, 研究制定了 HPLC 法测定总黄酮的含量。

1 仪器与药品

岛津 LC-10Avp 系列高效液相色谱仪, 其中包含 LC-10Avp 高压泵, LC-10Avp 紫外—可见光检测器, LC-10Avp 柱恒温箱, CLASS-VP 色谱工作站。

三叶口服液(贵州长寿长乐制药厂提供), 槲皮素(中国药品生物制品检定所), 其余试剂均为分析纯。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱 Hypersil ODS₂C₁₈, (5 μm , 200 \times 4.6mm), 大连依利特; 流动相: 甲醇-0.4% 磷酸水溶液(45:55), 流速 1.2ml/min, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 360nm。

分别取对照品溶液、供试品溶液、银杏叶、柿叶、杜仲叶供试品溶液注入色谱仪, 记录色谱图, 从图中可见, 供试品溶液、银杏叶、柿叶供试品溶液在 8、14、16min 左右有三个峰, 分别为槲皮素、山奈素、异鼠李素, 杜仲叶供试品溶液在 8、14min 左右有两个峰, 分别为槲皮素、山奈素即本试验条件下槲皮素、山奈素、异鼠李素与其它组分完全分离。理论塔板数以槲皮素计为 1280, 故理论塔板数应不低于 1300^[1,2]。

2.2 线性关系 对照品溶液制备: 精密称取五氧化二磷干燥过夜的槲皮素对照品 14.64mg, 置于 200ml 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度、摇匀, 得每 1ml

含 0.0732mg 的槲皮素对照品溶液。

标准曲线绘制: 精密吸取对照品溶液 2、4、6、8、10 μl , 分别注入液相色谱仪, 以峰面积对质量数进行线性回归, 计算得回归方程: $C_{(10)} = 2.932 \times 10^{-6}A + 2.764 \times 10^{-4}$, $r = 0.9998$, 表明槲皮素进样量在 0.15~0.73 $\mu\text{g/ml}$ 范围内呈良好的线性关系。

供试品溶液的制备^{[1][2]}: 精密称取供试品 50ml 置圆底烧瓶中, 加入硫酸(5 \rightarrow 100) 15ml, 甲醇 20ml 混匀后, 置水浴中回流水解 3.5h, 取出冷至室温, 转移至 100ml 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 取滤液作为供试品溶液。

2.3 精密度试验 取一样品, 按含量测定项下制备成供试品精密吸取 10 μl , 注入液相色谱仪, 进样 5 次, 测定峰面积, 计算 RSD 为 0.49%。

2.4 重现性试验 取样品 5 份, 分别按含量测定项下制备成供试品溶液, 各取 10 μl , 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 计算 RSD 为 2.34%。

2.5 回收率试验 称取已测定含量的供试品(槲皮素 0.106 $\mu\text{g/ml}$), 加入一定量的槲皮素对照品, 按含量测定项下制备成供试液, 分别取 10 μl 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图, 依峰面积计算槲皮素含量, 结果见表 1。

表 1 槲皮素回收率结果

| 样品中含量 (mg) | 加入槲皮素 (mg) | 测得量 (mg) | 回收率 (%) | \bar{x} (%) | RSD (%) |
|---------------|---------------|-------------|------------|------------------|------------|
| 1.54 | 1.482 | 3.03 | 100.3 | | |
| 1.54 | 1.482 | 2.99 | 97.8 | | |
| 1.54 | 1.482 | 3.06 | 102.5 | | |
| 1.54 | 1.482 | 3.02 | 99.9 | 100.4 | 1.55 |
| 1.54 | 1.482 | 3.04 | 101.3 | | |

2.6 稳定性试验 取一样品, 按含量测定项下制备

成供试品液,精密吸取 10 μ l,注入液相色谱仪,按 1、2、4、8、16、24h 进样 6 次,测定峰面积,计算出日内差为 4.56% ($n=6$)。结果表明 24h 内测定结果稳定。

2.7 样品测定 按供试品溶液制备项下操作,进样 10 μ l,测定总黄酮含量^[3],结果见表 2。

表 2 10 批三叶口服液总黄酮含量

| 批号 | 1 | 2 | 总黄酮(mg/ml) |
|----------|--------|--------|------------|
| 20001101 | 0.1167 | 0.1172 | 0.1169 |
| 20001102 | 0.1238 | 0.1232 | 0.1235 |
| 20001103 | 0.1175 | 0.1179 | 0.1177 |
| 20001104 | 0.1200 | 0.1208 | 0.1204 |
| 20001105 | 0.1361 | 0.1367 | 0.1364 |
| 20001201 | 0.1278 | 0.1284 | 0.1281 |
| 20001202 | 0.1286 | 0.1292 | 0.1289 |
| 20001203 | 0.1093 | 0.1099 | 0.1096 |
| 20001204 | 0.1290 | 0.1296 | 0.1293 |
| 20001205 | 0.1216 | 0.1220 | 0.1218 |

根据 10 批样品测定结果,暂定样品中总黄酮醇苷以槲皮素计,含量不低于 0.10mg/ml。

3 讨论

根据文献资料记载^{[4][5]} 柿叶、杜仲叶等均含有槲皮素,三种药材提取物的 HPLC 图谱也表明其水解物中含水解苷元槲皮素、山奈素,故本测定方法拟定以总黄酮醇苷含量作为定量指标来控制本产品质量,此法简便、快速、易行,又可缓解标准对照品缺乏之急。

参考文献:

- [1] 张迪清,何照范,银杏叶资源化学研究[M].北京:中国轻工业出版社,1999.23-24.
- [2] 中华人民共和国药典.一部[S].北京:化学工业出版社,2000.257.
- [3] 钱之玉,傅建,胡梅.银杏黄酮的 HPLC 法测定及其探讨[J].中国药科大学学报,1996,27(4):255.
- [4] 吴伟,付红征,程铁明,HPLC 法测定杜仲中槲皮素含量[J].中草药,1998,29(1):745.
- [5] 全国中草药汇编编写组.全国中草药汇编(上册)[M].北京:人民卫生出版社,1977.1137.