

HPLC 法测定心脑血管通颗粒中野黄芩苷和 4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸

马 莉¹, 廖艳华², 韩 锋^{1*}, 高 静¹

1. 天津药物研究院, 天津 300193

2. 昆明滇红药业有限公司, 云南 昆明 650106

摘 要:目的 建立 HPLC 法同时测定心脑血管通颗粒中野黄芩苷和 4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸的方法。方法 色谱柱为岛津 Interstil ODS 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%三氟乙酸 (25:75), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 335 nm, 柱温 37 °C, 进样量 10 μL。结果 2 种成分均能达到基线分离, 重现好, 且呈现较好的线性关系; 加样回收率分别为 97.1%、99.8%, RSD 值分别为 0.66%、0.82%。结论 该方法准确、灵敏、可靠, 重复性好, 可用于心脑血管通颗粒的快速检测。

关键词: 心脑血管通颗粒; 野黄芩苷; 4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2012)06-0582-03

Determination of scutellarin and 4,5-dicaffeoylquinic acid in Xinnao Luotong Granules by HPLC

MA Li¹, LIAO Yan-hua², HAN Feng¹, GAO Jing¹

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Kunming Dihon Pharmaceutical Co., Ltd., Kunming 650106, China

Abstract: Objective To develop an HPLC method for simultaneous determination of scutellarin and 4,5-dicaffeoylquinic acid in Xinnao Luotong Granules. **Methods** The samples were separated on Shimadzu Interstil ODS column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.1% trifluoroacetic acid (25:75) as mobile phase. The detection wavelength was 335 nm and column temperature was 37 °C with injection volume of 10 μL at a flow rate of 0.8 mL/min. **Results** Two active components were well separated with good repeatability and linearity. The calibration curves were linear. The average recovery rates were 97.1% and 99.8% with RSD values at 0.66% and 0.82%, respectively. **Conclusion** The method is accurate, sensitive, credible, and repeatable, and could be used for the rapid detection of Xinnao Luotong Granules.

Key words: Xinnao Luotong Granules; scutellarin; 4,5-dicaffeoylquinic acid; HPLC

心脑血管通颗粒由灯盏细辛、党参、黄芪等 6 味药材经乙醇提取制备的无糖颗粒剂, 具有养血通络、益气养阴之功效, 用于气阴两虚、瘀阻经络引起的心痛、心悸、心肌缺血、脑中风后遗症等。野黄芩苷和 4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸是制剂的有效成分, 故质量标准研究中分别采用不同色谱系统对野黄芩苷和 4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸进行测定。分别采用不同的色谱系统对野黄芩苷和 4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸进行测定, 但是检测周期长, 占用仪器资源, 不利于生产过程的含量监控。因此本实验建立了在测定心

脑血管通颗粒中 4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸色谱系统中同时对野黄芩苷的测定方法, 为心脑血管通颗粒生产过程中高效、快速进行检测, 缩短待检时间提供了保障。

1 仪器与试药

岛津 LC—2010AHT 高效液相色谱仪, XS—205 型电子天平 (十万分之一, 梅特勒-托利多公司), AS3120 超声波清洗器 (北京华瑞博远科技发展有限公司)。

野黄芩苷 (批号 110842-201106)、4,5-二-O-咖

收稿日期: 2012-08-21

作者简介: 马 莉 (1971—), 女, 理学硕士, 副研究员, 1994 年毕业于沈阳药科大学中药系, 主要从事中药新药研发。

Tel: (022)23006851 E-mail: 893915361@qq.com

*通讯作者 韩 锋 E-mail: 56039704@qq.com

咖啡酰奎宁酸(批号 111894-201001)对照品均购自中国药品生物制品检定所,乙腈、甲醇均为色谱纯,三氟乙酸为分析纯,水为自制纯化水。心脑血管颗粒由天津药物研究院中药现代部提供,批号分别为20110816、20110820、20110825,规格为10.0 g/袋。缺灯盏细辛的阴性样品由天津药物研究院中药现代部提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为岛津 Interstil ODS 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%三氟乙酸(25:75),体积流量1.0 mL/min,检测波长335 nm,柱温37℃,进样量10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 野黄芩苷对照品溶液的制备 取野黄芩苷对照品适量,精密称定,加70%甲醇制成100 μg/mL的溶液,摇匀,即得。

2.2.2 4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸对照品溶液的制备 取4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成1 mg/mL的溶液。精密吸取1 mL,置100 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀即得含4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸10 μg/mL的溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取心脑血管颗粒约0.65 g,精密称定,置100 mL

量瓶中,加水适量,超声处理(功率120 W,频率40 kHz)10 min,放冷,再加水至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取100 μg/mL野黄芩苷、10 μg/mL 4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸对照品溶液0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,分别置5 mL量瓶中,加甲醇至刻度,制成不同质量浓度的对照品溶液,滤过,取续滤液10 μL注入液相色谱仪,进样测定。以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标进行线性回归,得回归方程。野黄芩苷: $Y=45\,102\,209 X-74\,428$, $r=0.999\,8$,表明野黄芩苷在90~150 μg/mL时峰面积与进样质量具有高度正相关。4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸: $Y=3\,992\,506 X-1\,298$, $r=0.999\,5$,表明4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸质量浓度在8~17 μg/mL时峰面积与进样质量具有高度正相关。

2.5 专属性试验

取缺灯盏细辛的阴性样品,同“2.3”项下方法,制备阴性样品溶液。同时取批号20110816的供试品溶液10 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,见图1。可见系统中野黄芩苷与4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸的分离度均大于1.5,符合《中国药典》2010年版的要求。

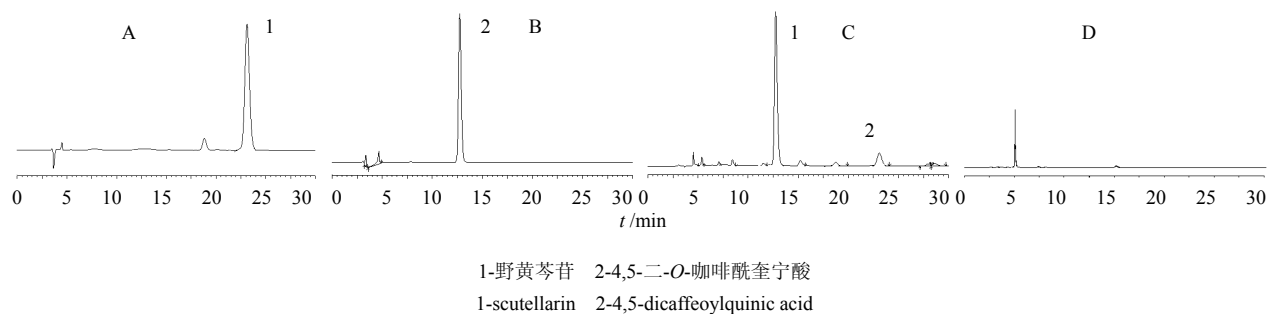


图1 野黄芩苷对照品(A)、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸对照品(B)、心脑血管颗粒(C)和缺灯盏细辛阴性样品(D) HPLC图谱
Fig. 1 HPLC chromatograms of scutellarin reference substance (A), 4,5-dicaffeoylquinic acid reference substance (B), Xinnao Luotong Granules (C), and negative samples without *Erigerontis Herba* (E)

2.6 耐用性试验

同一批样品(批号20110816)样品,制备供试品溶液。分别用岛津 Interstil ODS 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Arkzo Nobel Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、汉邦 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)4种色

谱柱,进行检测,结果运用 MINITAB 统计软件进行统计分析,所有检测结果均在95%置信区间,4种品牌的色谱柱检测的野黄芩苷和4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸的结果差异均无显著性。

2.7 重复性试验

取批号为20110816样品6份,制备供试品溶液,

注入高效液相色谱仪测定,结果野黄芩苷、4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸质量分数的 RSD 值分别为 0.82%、1.27%。

2.8 中间精密度试验

同一批样品(批号 20110816),制备供试品溶液,在同一个实验室,于不同时间采用型号分别为 LC—2010AHT、LC—10AVP 的高效液相色谱仪由不同的分析人员测定,运用 MINITAB 统计软件进行统计分析。结果野黄芩苷和 4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸测定结果的差异无显著性。

2.9 加样回收率试验

取批号 20110816 心脑血管通颗粒样品 6 份,每份约 0.3 g,精密称定,分别加入含野黄芩苷 2.06、2.21、2.45 mg/mL, 4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸 9.8、10.6、11.7 μg/mL 混合对照品溶液 1 mL,每一水平平行取样 2 份,制备供试品溶液,进样测定,计算回收率,结果平均加样回收率分别为 97.1%、99.8%,RSD 值分别为 0.66%、0.82%。

2.10 样品的测定

取 3 批心脑血管通颗粒,每批各 2 份,制备供试品溶液,进行测定,结果见表 2。心脑血管通颗粒质量标准以野黄芩苷计不得少于 60 mg/袋,含 4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸不得少于 5 mg/袋。因此本实验结果符合标准的规定。

表 1 心脑血管通颗粒中野黄芩苷、4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸的测定结果 ($n=2$)

Table 1 Determination of scutellarin and 4,5-dicaffeoylquinic acid in Xinnao Luotong Granules ($n=2$)

批 号	质量分数/(mg·袋 ⁻¹)	
	野黄芩苷	4,5-二- <i>O</i> -咖啡酰奎宁酸
20110816	71.2	5.67
20110820	68.9	6.13
20110825	70.4	6.08

3 讨论

本方法的建立是基于心脑血管通颗粒中的两个主要成分的控制,通过对色谱条件的摸索,确立了同一色谱系统中两个定量成分都能达到较好分离的色谱条件,该法在生产过程中,可缩短一半的检测时间,并能减少人力、物力和时间成本的投入。但本法检测的结果与法定方法比较略呈系统偏高,实际应用可引入校正因子,或考虑适当提高内控标准。

本实验建立了在 4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸色谱系统中同时测定野黄芩苷的方法,为心脑血管通颗粒生产过程的快速测定提供了经济、简便的方法。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 138.