

测定峰面积。结果表明供试品溶液及对照品溶液在 9 h 内基本稳定,以峰面积计算,RSD 分别为 1.20% 和 0.071%。

2.6 干扰性考察:将阴性对照溶液进样 5 μ L,测定,结果在与厚朴酚对照品相应保留时间的位置无色谱峰。

2.7 重现性试验:取同一批号小儿磨积片样品,除去糖衣,研成细粉,精密称取 5 份,按供试品溶液制备项下方法制备供试品溶液,进样测定,计算厚朴酚中厚朴酚的含量。结果厚朴酚含量为 1.15 mg/g, RSD 为 1.31%。

2.8 加样回收试验:取厚朴酚含量为 1.15 mg/g 的小儿磨积片,除去糖衣,研成细粉,精密称取约 0.15 g,加入相当于原样品中厚朴酚量的 75%、110%、150% 的厚朴酚对照品,制备供试品溶液,进样测定,结果平均回收率为 100.1%,RSD 为 1.79% ($n=9$)。

2.9 样品测定:按供试品溶液制备项下方法制备供试品溶液,进样 5 μ L,按外标法,以峰面积计算厚朴酚的含量,结果见表 1。

表 1 小儿磨积片中厚朴酚的测定结果 ($n=3$)

Table 1 Magnolol in Xiao'er Moji Tablet ($n=3$)

批号	厚朴酚含量/(mg·g ⁻¹)	RSD/%
20030401	1.28	0.21
20030501	1.15	0.67
20030701	1.21	0.19

3 讨论

本试验对比了甲醇、50% 甲醇、95% 乙醇和 50% 乙醇的提取效果,确立 95% 乙醇为提取溶剂,同时调整流动相比比例排除干扰,使厚朴酚实现基线分离。试验证明,此方法准确度高、重现性好,可作为该制剂质量检测的方法,提高药品质量可控性,确保临床用药的有效性。

References

- [1] Drug Specifications Promulgated by Ministry of Health PRC (中华人民共和国卫生部药品标准) [S]. WS₃-B-1887-95, 1995.
- [2] Jiangsu New Medical College. Dictionary of Chinese Materia Medica (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1985.
- [3] Zheng H Z. Modern Research and Application of Traditional Chinese Medicine (中药现代研究与应用) [M]. Beijing: Xueyuan Press, 1998.

RP-HPLC 法测定山楂提取物中金丝桃苷的含量

张忠会¹, 秦婷², 王惠达², 王栋^{3*}, 元英进¹

(1. 天津大学化工学院, 天津 300072; 2. 承德颈复康药业集团有限公司, 河北承德 067000; 3. 承德医学院, 河北承德 067000)

山楂为常用中药,药食同源,味酸、甘,性微温,归脾、胃、肝经。具有消食健胃、行气散瘀的功效,用于肉食积滞、胃脘胀满、泻痢腹痛、瘀血经闭、产后瘀阻、心腹刺痛、疝气疼痛,高脂血症^[1]。山楂中含有黄酮类、三萜酸类等成分。其中山楂黄酮类成分被认为是保护心肌、促进心肌收缩的主要有效成分,而金丝桃苷有抗心肌缺血损伤、心肌脂质过氧化等作用,被认为是其中的代表性有效成分。《欧洲药典》规定山楂叶中黄酮类的含量测定采用比色法测定总黄酮,尚无指标性成分金丝桃苷等的含量测定^[2]。本实验以金丝桃苷为指标,建立了山楂提取物的 HPLC 含量测定方法,并测定了不同批号的山楂提取物中的金丝桃苷的含量,为山楂提取物及其制剂

的质量控制提供依据^[3,4]。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10AVP 高效液相色谱仪(包括在线脱气机、二元泵、SPD-M10AVP 二极管阵列检测器,CLASS-VP5.03 软件),Metler 十万分之一电子分析天平,超声清洗仪。

金丝桃苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 1521-200202),山楂提取物由承德颈复康药业集团有限公司雾灵药业公司提供,乙腈、四氢呋喃为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱: Intersil ODS-3 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)(GL Science Co. Ltd); 流动相:

* 收稿日期: 2003-11-13

作者简介: 张忠会(1975-),男,河北承德人,工程师,就职于承德颈复康药业集团有限公司,从事中药研发,天津大学工程硕士。

Tel: (0314) 2153758 E-mail: zzh03076@yahoo.com.cn

乙腈-四氢呋喃-水-甲酸 (55 : 45 : 400 : 1.5); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 255 nm; 柱温: 25 °C。在上述色谱条件下, 金丝桃苷与其他成分得到了很好的分离, 色谱图见图 1, 金丝桃苷保留时间约为 28 min, 理论塔板数为 6 000。

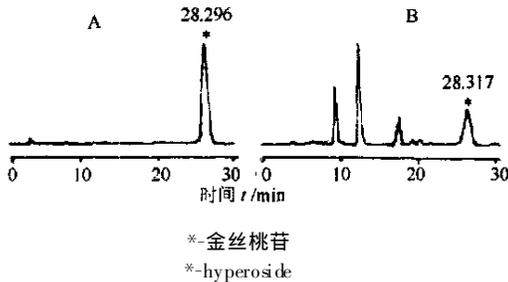


图 1 金丝桃苷(A)和山楂提取物(B)的 HPLC 图

Fig 1 HPLC of hyperoside (A) and Fructus Crataegi extract (B)

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取干燥至恒重的金丝桃苷对照品 0.84 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 混匀即得。

2.3 线性关系考察: 精密称取金丝桃苷对照品 3.08 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 混匀。分别精密吸取 1、2、3、4、5 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 混匀, 微孔滤膜滤过。依次进样 10 μL, 按上述色谱条件操作。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 $Y = 1\,714\,968.34 X - 20\,498.2$, $r = 0.999\,9$ 。结果表明, 金丝桃苷在 12.32 ~ 61.6 μg/mL 与峰面积线性关系良好。

2.4 供试品溶液的制备: 精密称取山楂提取物 0.4 g, 加入 70% 丙酮溶液超声提取, 共 3 次, 每次使用溶液 30 mL、超声 10 min, 滤过, 最后使用少量 70% 丙酮溶液反复洗涤 3~4 次, 合并滤液, 水浴挥干, 残渣加甲醇溶解, 并稀释成 50 mL, 摇匀, 微孔滤膜滤过, 即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验: 取同一份山楂提取物的供试品溶液连续进样 6 次, 测定金丝桃苷的峰面积, 计算其 RSD 为 0.52% ($n=6$)。

2.5.2 重现性试验: 精密称取同一批山楂提取物 6 份, 每份 0.4 g, 制备供试品溶液, 检测, 测定金丝桃苷质量分数, 计算得其 RSD 为 0.63%。

2.5.3 稳定性试验: 取一份山楂提取物供试品溶

液, 分别在 0、1、2、4、8、14、24 h 检测, 测定金丝桃苷峰面积, 计算得其 RSD 为 0.90%。

2.5.4 回收率试验: 精密称取同一批 2.15 mg/g 山楂提取物样品 0.25 g, 共 6 份, 分别精密加入 0.553 0 mg/mL 金丝桃苷对照品溶液 0.8、0.8、1.0、1.0、1.2、1.2 mL, 按供试品溶液的制备项下的方法操作, 采用 HPLC 分别检测, 结果平均回收率为 101.7%, RSD 为 0.77%。

2.6 样品测定: 将 5 个不同批次的山楂提取物制成供试品溶液, 进样, 测定峰面积, 采用外标法计算金丝桃苷的质量分数。结果见表 1。

表 1 山楂提取物中金丝桃苷的含量 ($n=3$)

Table 1 Hyperoside in Fructus Crataegi extract ($n=3$)

批号	金丝桃苷/(mg·g ⁻¹)	RSD/%
20021001	2.23	0.47
20030501	3.24	0.23
20030702	1.95	0.61
20030902	2.63	0.55
20031101	2.46	0.29

3 讨论

试验曾直接使用甲醇超声提取; 使用 80% 乙醇超声提取, 挥干后, 甲醇溶解; 使用 70% 丙酮超声提取, 挥干后, 甲醇溶解处理山楂提取物。通过比较色谱峰的峰面积、分离度和溶液的处理难度, 最后使用 70% 丙酮超声提取、挥干后, 甲醇溶解的方法。

在色谱条件的探索中, 单纯使用乙腈-水或四氢呋喃-水系统均不能够得到最佳分离, 而两者合用可以达到较理想的分离; 加入甲酸可以有效地防止拖尾; 金丝桃苷在 255 nm 处有较强的吸收。同时在此波长下检测, 可于同一色谱中显示其他黄酮类成分的保留时间、峰面积等参数, 在测定金丝桃苷的同时, 可增加色谱的指纹性。

References:

[1] Ch P (中国药典) [S]. Vol I. 2000.
 [2] EP [S]. 3 ed 2001.
 [3] Cuyckens F, Claeys M. Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometric and ultraviolet photodiode array detection for analysis of flavonoid glycosides [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2002, 16: 2341-2348.
 [4] Wang F C, Dou W T, Zhu W X. Determination of vitexin, vitexin-2"-O-rhamnoside, hyperoside, rutin in Shan zha Powder by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2002, 24(2): 122-124.