

HPLC法测定银荞胶囊中4种黄酮类成分的含量

南海军^{1*}, 陈阿丽¹, 王峰¹, 梁生旺¹, 谭玉彬^{2#} (1. 广东药学院中药学院, 广州 510006; 2. 南方医科大学附属何贤纪念医院, 广州 511400)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)18-2573-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.18.45

摘要 目的: 建立同时测定银荞胶囊中4种黄酮类成分含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Hypersil ODS C₁₈, 流动相A为甲醇-水-乙酸(10:88:2, V/V/V), 流动相B为甲醇-水-乙酸(88:10:2, V/V/V), 采用梯度洗脱, 流速为1.0 ml/min, 检测波长为327 nm, 柱温为25℃, 进样量为10 μl。结果: 槲皮素、山柰素、异鼠李素、芦丁的进样量分别在0.050 9~1.018 0、0.050 2~1.004 0、0.051 0~1.020 0、0.050 4~1.007 0 μg范围内与各自峰面积呈良好的线性关系(*r*分别为0.999 8、0.999 5、0.999 4、0.999 8); 精密密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%; 平均加样回收率分别为100.09%、99.83%、100.51%、101.19%, RSD分别为0.93%、0.75%、1.17%、1.08% (*n*=9)。结论: 该方法专属性强、结果稳定、重复性好, 可作为控制银荞胶囊质量的方法。

关键词 银荞胶囊; 高效液相色谱法; 梯度洗脱; 槲皮素; 山柰素; 异鼠李素; 芦丁

Content Determination of 4 Flavonoids Constituents in Yinqiao Capsules by HPLC

NAN Hai-jun¹, CHEN A-li¹, WANG Feng¹, LIANG Sheng-wang¹, TAN Yu-bin² (1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Hexian Memorial Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 511400, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of 4 flavonoids constituents in Yinqiao capsules. METHODS: HPLC method was adopted. The Hypersil ODS C₁₈ column was used with the mobile phase A of methanol-water-acetic acid (10:88:2, V/V/V) and B of methanol-water-acetic acid(88:10:2, V/V/V) in gradient elution at the flow rate of 1.0 ml/min; the detection wavelength was 327 nm, the column temperature was 25℃, and the volume was 10 μl. RESULTS: There was a good linear relationship between the amount of quercetin and peak area in the range of 0.050 9-1.018 0 μg (*r*=0.999 8), kaempferide in the range of 0.050 2-1.004 0 μg (*r*=0.999 5), isorhamnetin in the range of 0.051 0-1.020 0 μg (*r*=0.999 4) and rutin in the range of 0.050 4-1.007 0 μg (*r*=0.999 8). RSDs of precision, stability and repeatability tests were <2%. The average recoveries were 100.09% (RSD=0.93%, *n*=9), 99.83% (RSD=0.75%, *n*=9), 100.51% (RSD=1.17%, *n*=9) and 101.19% (RSD=1.08%, *n*=9). CONCLUSIONS: The method is amount specific, stable and reproducible and can be used for the quality control of Yinqiao capsules.

KEYWORDS Yinqiao capsules; HPLC; Gradient elution; Quercetin; Kaempferide; Isorhamnetin; Rutin

银荞胶囊由银杏叶提取物、苦荞提取物等黄酮类天然产物制成, 具有抗氧化、辅助降血脂等保健功能, 对改善肤质、抗衰老、预防心脑血管疾病有显著作用。银荞胶囊中功效性成分为银杏黄酮和芦丁, 其中银杏黄酮能够增加脑血管流量、改善脑血管循环功能、保护脑细胞, 扩张冠状动脉、防止心绞痛及心肌梗死, 防止血栓形成, 提高机体免疫力^[1-3]; 芦丁则具有抗炎、抗辐射、抗自由基, 维持血管抵抗力、降低其通透性、减少脆性等作用^[4]。在银杏叶提取物中, 槲皮素、山柰素、异鼠李素是3种重要的黄酮类成分, 而芦丁是苦荞提取物中主要的黄酮组成^[5-6]。银荞胶囊现有的质量控制中, 通常以总黄酮的量作为控制指标。为进一步提高质量控制标准, 同时提高检测效率, 本试验建立了以高效液相色谱(HPLC)法同时测定产品中槲皮素、山柰素、异鼠李素及芦丁含量的方法。该方法分离效果好、灵敏、准确, 可达到较好地控制产品质量的目的。

1 材料

* 讲师, 硕士。研究方向: 药物分析。电话: 020-39352180

通信作者: 副主任医师。研究方向: 生殖内分泌。电话: 020-39152253。E-mail: tanyubin0904@163.com

1.1 仪器

600型 HPLC仪, 包括2487型紫外检测器、717型自动进样器(美国 Waters公司); SB3200型超声波清洗器[必能信超声(上海)有限公司]; AE240S电子天平(瑞士 Mettler-Toledo公司); SZ-93自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 药品与试剂

银荞胶囊(广东药学院中药学院自制, 编号: 1、2、3); 槲皮素对照品(批号: 100081-200406, 纯度: 97.3%)、山柰素对照品(批号: 0861-200002, 纯度: >98.0%)、异鼠李素对照品(批号: 110860-200407, 纯度: >98.0%)均购自中国食品药品检定研究院; 芦丁对照品[阿法埃莎(中国)化学有限公司, 批号: 10122197, 纯度: 97%]; 甲醇(色谱纯)购于北京迪马科技有限公司, 乙酸为分析纯, 水为双重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相A为甲醇-水-乙酸(10:88:2, V/V/V), 流动相B为甲醇-水-乙酸(88:10:2, V/V/V), 梯度洗脱程序详见表1; 流速: 1.0 ml/

min;检测波长:327 nm;柱温:25 ℃;进样量:10 μl。

表1 梯度洗脱程序
Tab 1 Gradient elution

时间,min	流动相A,%	流动相B,%
0	65	35
8	50	50
15	30	70
30	20	80

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取减压干燥至恒质量的槲皮素对照品 5.23 mg、山柰素对照品 5.02 mg、异鼠李素对照品 5.10 mg、芦丁对照品 5.19 mg，用甲醇溶解后定容于 25 ml 量瓶中，配制成含槲皮素 203.6 μg/ml、山柰素 200.8 μg/ml、异鼠李素 204.0 μg/ml、芦丁 201.4 μg/ml 的混合对照品贮备液。将该贮备液稀释成各组分质量浓度分别约为 100、50、25、10、5 μg/ml 的系列溶液，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，即得。

2.2.2 供试品溶液 取银杏胶囊内容物，混匀，取约 0.2 g，精密称定，置于 50 ml 锥形瓶中，加甲醇 25 ml，超声（功率：250 W，频率：40 kHz）提取 30 min，滤过，滤渣用甲醇洗涤 2 次，合并滤液，转移至 50 ml 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，即得。

2.3 专属性试验

精密吸取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液各 10 μl，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，详见图 1。由图 1 可见，对照品色谱与供试品色谱在相应位置处无干扰峰出现，表明处方中其他成分对测定结果无影响。

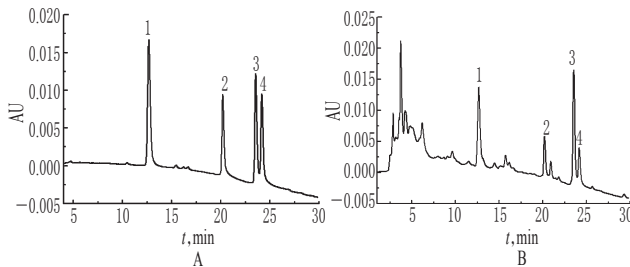


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;1.芦丁;2.槲皮素;3.山柰素;4.异鼠李素

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference;B.test sample;1.rutin;2.querctetin;3.kaempferide;4.isorhamnetin

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下系列混合对照品溶液各 10 μl，按“2.1”项下色谱条件分别进样测定，记录峰面积。以进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标，进行线性拟合，得槲皮素的回归方程为 $y=17\ 316x-5\ 389.4$ ($r=0.999\ 8$)，山柰素的回归方程为 $y=20\ 891x+11\ 619$ ($r=0.999\ 5$)，异鼠李素的回归方程为 $y=18\ 228x+16\ 209$ ($r=0.999\ 4$)，芦丁的回归方程为 $y=35\ 230x-41\ 402$ ($r=0.999\ 8$)。结果，槲皮素、山柰素、异鼠李素、芦丁进样量分别在 0.050 9~1.018 0、0.050 2~1.004 0、0.051 0~1.020 0、0.050 4~1.007 0 μg 范围内与各自峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下各组分质量浓度约为 10 μg/ml 的混合对照品溶液 10 μl，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录

峰面积。结果，槲皮素、山柰素、异鼠李素、芦丁 RSD 分别为 1.21%、0.87%、0.74%、0.93%，表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:1)适量,置于白色透明的量瓶中,分别于放置 0、1、2.5、5、7.5、10、18、24 h 时进样,考察 4 个待测成分峰面积随时间变化的情况。结果,4 个待测成分峰面积的 RSD 均小于 1.0%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

精密称取样品(编号:1)6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,槲皮素、山柰素、异鼠李素、芦丁含量的 RSD 分别为 1.32%、1.86%、1.15%、1.04%，表明本方法重复性较好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已测知含量的样品(编号:1)9份,每份约 0.2 g，分别精密加入槲皮素、山柰素、异鼠李素、芦丁质量浓度分别为 0.197 9、0.205 2、0.202 4、0.206 2 mg/ml 的混合对照品溶液适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,并计算加样回收率,结果详见表 2。

表2 加样回收率试验结果(n=9)

待测成分	称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %			
槲皮素	0.213 7	0.314 8	0.197 9	0.514 1	100.71	100.09	0.93			
	0.204 1	0.305 1	0.197 9	0.501 7	99.34					
	0.207 9	0.310 4	0.197 9	0.510 8	101.26					
	0.217 4	0.321 8	0.395 8	0.718 7	100.28					
	0.204 4	0.311 9	0.395 8	0.705 4	99.42					
	0.212 9	0.318 9	0.395 8	0.710 1	98.84					
	0.200 4	0.297 4	0.593 7	0.899 8	101.47					
	0.218 7	0.335 9	0.593 7	0.927 4	99.63					
	0.195 4	0.290 8	0.593 7	0.883 9	99.90					
	山柰素	0.213 7	0.742 0	0.205 2	0.945 5			99.17	99.83	0.75
		0.204 1	0.738 2	0.205 2	0.940 9			98.78		
		0.207 9	0.733 7	0.205 2	0.936 7			98.93		
0.217 4		0.765 4	0.410 4	1.176 4	100.15					
0.204 4		0.729 8	0.410 4	1.143 1	100.71					
0.212 9		0.754 7	0.410 4	1.162 9	99.46					
0.200 4		0.716 9	0.615 6	1.341 8	101.51					
0.218 7		0.770 3	0.615 6	1.386 2	100.05					
0.195 4		0.712 8	0.615 6	1.326 9	99.76					
异鼠李素		0.213 7	0.314 5	0.202 4	0.519 7	101.38	100.51	1.17		
		0.204 1	0.301 1	0.202 4	0.502 8	99.65				
		0.207 9	0.310 4	0.202 4	0.511 4	99.31				
	0.217 4	0.322 8	0.404 8	0.723 8	99.06					
	0.204 4	0.306 8	0.404 8	0.719 5	101.95					
	0.212 9	0.316 2	0.404 8	0.722 3	100.32					
	0.200 4	0.298 7	0.607 2	0.908 7	100.46					
	0.218 7	0.324 3	0.607 2	0.937 5	100.99					
	0.195 4	0.296 8	0.607 2	0.912 9	101.47					
	芦丁	0.213 7	0.468 9	0.206 2	0.677 4	101.12			101.19	1.08
		0.204 1	0.442 3	0.206 2	0.652 7	102.04				
		0.207 9	0.453 4	0.206 2	0.665 3	102.76				
0.217 4		0.476 6	0.412 4	0.897 6	102.09					
0.204 4		0.447 9	0.412 4	0.858 8	99.64					
0.212 9		0.463 7	0.412 4	0.884 1	101.94					
0.200 4	0.436 0	0.618 6	1.052 3	99.63						

缩宫素注射液效价测定的不确定度评定

李海芳*,耿文宁,闫明俞(新疆维吾尔自治区食品药品检验所,乌鲁木齐 830004)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)18-2575-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.18.46

摘要 目的:建立缩宫素注射液效价测定的不确定度评定方法。方法:建立评定缩宫素注射液效价测定的不确定度的数学模型,分析其测定不确定度的影响因素,并将由之引起的不确定度分量进行量化分析,计算扩展不确定度。结果:缩宫素注射液效价测定的扩展不确定度为0.20 u/ml,其效价可表示为(9.29±0.20)u/ml,包含因子K=2。结论:该方法适用于缩宫素注射液效价测定的不确定度评定。

关键词 缩宫素注射液;效价;测定;不确定度评定

Uncertainty Evaluation of the Potency Testing of Oxytocin Injection

LI Hai-fang, GENG Wen-ning, YAN Ming-yu (Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute for Food and Drug Control, Urumqi 830004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method of the uncertainty evaluation of the potency testing of Oxytocin injection. METHODS: Mathematical model was established for potency testing of Oxytocin injection to analyze the influential factors of uncertainty. The uncertainty components were quantitatively analyzed and the uncertainty was calculated. RESULTS: The expanded uncertainty of the potency testing of Oxytocin injection was 0.20 u/ml and the potency was (9.29±0.20)u/ml, coverage factor K=2. CONCLUSIONS: The method is suitable for the uncertainty evaluation of potency testing of Oxytocin injection.

KEYWORDS Oxytocin injection; Potency; Testing; Uncertainty evaluation

续表2

Continued tab 2

待测成分	称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
芦丁	0.218 7	0.480 1	0.618 6	1.108 2	101.54		
	0.195 4	0.433 4	0.618 6	1.051 6	99.94		

2.9 样品含量测定

取3批样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别取各组质量浓度约为10 μg/ml的混合对照品溶液与上述供试品溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,平行测定3次,按外标法计算含量,结果详见表3。

表3 样品含量测定结果(n=3, mg/ml)

Tab 3 Results of content determination of samples (n=3, mg/ml)

编号	槲皮素	山柰素	异鼠李素	芦丁
1	1.458 5	3.536 5	1.456 2	2.192 3
2	1.431 8	3.582 9	1.440 9	2.152 0
3	1.412 7	3.512 4	1.491 7	2.202 1

3 讨论

3.1 流动相的选择

在试验条件摸索过程中,先后尝试了甲醇-水-磷酸、甲醇-水-乙酸等作流动相,最终以流动相A为甲醇-水-乙酸(10:88:2, V/V/V),流动相B为甲醇-水-乙酸(88:10:2, V/V/V),进行梯度洗脱(0 min, 35% B; 8 min, 50% B; 15 min, 70% B; 30 min, 80% B)的分离效果最佳。

3.2 流速的选择

由于山柰素与异鼠李素极性相似,较难达到基线分离,在确定流动相的前提下,流速试验了0.6、0.8、1.0 ml/min 3种,最终确定为1.0 ml/min。

3.3 检测波长的选择

通过紫外扫描获取槲皮素、山柰素、异鼠李素和芦丁对照品溶液的光谱图,发现4种对照品溶液在320~360 nm波长范围内最大吸收在327 nm,故选择327 nm为本试验的检测波长。

综上所述,本方法专属性强、结果稳定、重复性好,可作为控制银莽胶囊质量的方法。

参考文献

- [1] 杜向红,赵红卫,王豫,等.银杏叶提取物对神经系统作用的研究进展[J].中药材,2003,26(11):838.
- [2] 王德伟,朱红,高尔.银杏黄酮的药理作用和临床应用[J].食品与药品,2006,8(6):7.
- [3] 夏安周,邢淑华,张召辉.银杏叶提取物对肾缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国药理学通报,2004,20(7):839.
- [4] 贾冬英,耿磊,姚开.苦荞麦茎及籽壳中黄酮类化合物(芦丁)的提取及其鉴定[J].食品科学,1998,19(9):46.
- [5] 张琪,刘慧灵,朱瑞,等.苦荞麦中总黄酮和芦丁的含量测定方法的研究[J].食品科学,2003,24(7):113.
- [6] 姜帆,杨星钢,郭迎新,等.银杏叶制剂溶出液中槲皮素、山柰素与异鼠李素的HPLC测定方法研究[J].沈阳药科大学学报,2013,30(9):691.

(收稿日期:2014-06-10 修回日期:2015-01-16)

(编辑:余庆华)

* 副主任药师。研究方向:药品检验、药理毒理。电话:0991-2816492。E-mail:lhfhr@163.com