

· 论 著 ·

HPLC 法测定益心酮片中四种黄酮类成分的含量

于 森, 原 源

〔摘要〕 目的 建立高效液相色谱法(HPLC)同时测定益心酮片中牡荆素鼠李糖苷、牡荆素葡萄糖苷、牡荆素、金丝桃苷四种成分的含量。方法 采用 SHISEIDO CAPCELL Pak C18 AQ 250 mm × 4.6 mm 色谱柱;流动相为四氢呋喃-乙酸-水-甲醇-乙腈(38:4:152:3:3);流速为 1.0 mL/min;柱温:25 ℃;检测波长:330 nm。结果 牡荆素鼠李糖苷、牡荆素葡萄糖苷、牡荆素、金丝桃苷的线性范围分别为 10.11 ~ 201.02 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9997$), 7.92 ~ 158.42 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9996$), 4.02 ~ 80.42 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9995$), 6.28 ~ 125.61 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9995$), 范围内线性关系良好、精密度、重现性、回收率均符合要求。结论 该方法快速、准确、重现性好可用于本品的质量控制。

〔关键词〕 高效液相色谱法;益心酮片;牡荆素鼠李糖苷;牡荆素葡萄糖苷;牡荆素;金丝桃苷

〔中图分类号〕 R286 〔文献标志码〕 A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2015.02.014

Determination of four flavonoid ingredients in *Yixintong* tablets by HPLC

YU Miao, YUAN Yuan. Department of Pharmacy, 85 Hospital of PLA, Shanghai 200433, China

〔Abstract〕 Objective To establish the quantitative analysis method for simultaneous determination of Vitexin rhamnosides, Vitexin glucoside, Vitexin and Hyperoside in *Yixintong* tablets by HPLC. Methods HPLC was performed on SHISEIDO CAPCELL Pak C18 AQ (4.6 mm × 250 mm), with the mobile phase of THF-acetic acid-water-methanol-acetonitrile (38:4:152:3:3) at a flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was set at 25 ℃, and the detection wavelength was 330 nm. Results The linear ranges of Vitexin rhamnoside, Vitexin glucoside, Vitexin, Hyperoside were 10.11 ~ 201.02 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9997$), 7.92 ~ 158.42 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9996$), 4.02 ~ 80.42 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9995$), 6.28 ~ 125.61 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9995$) respectively. The linear relationship, precision, reproducibility, recovery rates all meet the requirements. Conclusion The content of Vitexin rhamnosides is significantly higher than Hyperoside, and the study shows that Vitexin rhamnosides has effect on dilating blood vessels, protecting cardiac tissue, which is consistent with the effect of the *Yixintong* tablets. Therefore, it's not reasonable to choose Hyperoside as the only quality control indicator of the *Yixintong* tablets in the 2010 Chinese Pharmacopoeia. Vitexin rhamnoside and Vitexin glucoside are also important pharmacological active components in Hawthorn Leaves, and could be considered as quality control indicators of the *Yixintong* tablets.

〔Key words〕 HPLC; *Yixintong* tablets; vitexin rhamnosides; vitexin glucoside; vitexin; hyperoside

山楂叶为蔷薇科植物山里红(*Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major*)或山楂(*Crataegus pinnatifida* Bge)的干燥叶,含有多种化学成分,包括黄酮和三萜两大类,如槲皮素、牡荆素、牡荆素鼠李糖苷、山奈酚、金丝桃苷、熊果酸^[1-2]等,其中黄酮是山楂叶酮生理活性的主要成分。山楂叶提取物在医治心脑血管疾病方面应用广泛,具有抗血栓^[3]、调脂^[4]、抗心肌缺血^[5]、抗动脉粥样硬化^[6]等活性。

益心酮片是以山楂叶提取物为原料制成的中成药制剂,收载于《中国药典》2010 年版一部^[1],具有活血化瘀、宣通血脉的功效。研究表明,黄酮类化合物是山楂叶中的主要活性成分,包括牡荆素鼠李糖苷、牡荆素葡萄糖苷、牡荆素、芦丁、槲皮素、金丝桃苷等。本试验采用高效液相色谱法(HPLC)同时测定益心酮片中牡荆素鼠李糖苷、牡荆素葡萄糖苷、牡

荆素、金丝桃苷四种成分的含量,操作简便,方法可靠,可作为益心酮片的质量控制指标。

1 仪器与试剂

Agilent-1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),KS5200H 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司),BP211D 电子天平(德国 Sartorius 公司),Milli-Q50 sP 纯水系统(美国 Millipore 公司)。

牡荆素鼠李糖苷对照品(111668-200401)、金丝桃苷对照品(111521-200303)、牡荆素对照品(111687-200501)均购自中国药品生物制品检定所;牡荆素葡萄糖苷(自制,纯度大于 98%);乙腈、四氢呋喃均为色谱纯;其余试剂均为分析纯。

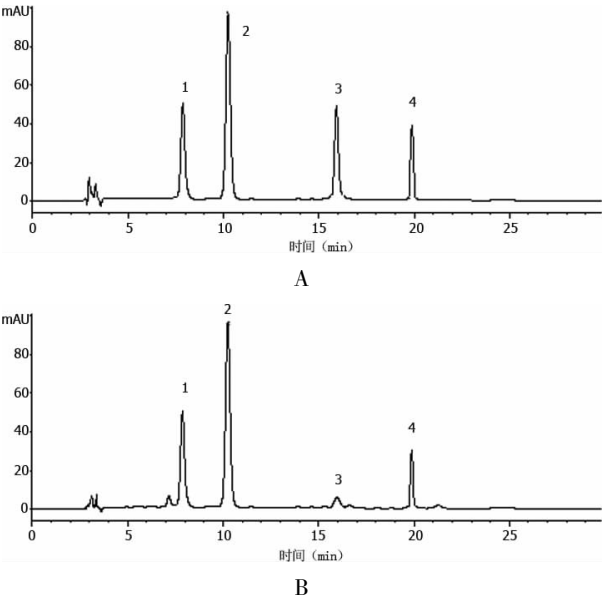
益心酮片均为市售品(Y1 批号 110921, Y2 批号 111105, Y3 批号 111108, Y4 批号 120219, Y5 批号 120225, Y6 批号 120307),由太极集团浙江东方制药有限公司提供。

作者单位:200052 上海,解放军 85 医院药剂科

通讯作者:原 源, E-mail:yuanyuan <yuanbao122@163.com>

2 方 法

2.1 色谱条件 色谱柱:SHISEIDO CAPCELL Pak C18 AQ 250 × 4.6 mm, 5 μm;流动相:四氢呋喃-乙酸-水-甲醇-乙腈(38:4:152:3:3);流速:1.0 mL/min;柱温:25 ℃;检测波长:330 nm;理论板数按牡荆素鼠李糖苷计不得少于 3000,色谱图见图 1。



A:混合对照品溶液;B:益心酮片;1:牡荆素葡萄糖苷;
2:牡荆素鼠李糖苷;3:牡荆素;4:金丝桃苷
横坐标为保留时间(min),纵坐标为色谱峰响应(mAU)

图 1 益心酮片的 HPLC 色谱图

2.2 溶液的制备 精密称取牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷对照品 7.92、10.10、4.02、6.28 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,制备成 0.792、1.01、0.402、0.628 mg/mL 的对照品母液。精密吸取上述对照品溶液各 1 mL,分别置 5 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得 4 个成分的混合对照品溶液,然后依次用甲醇逐级稀释,即得系列浓度的混合对照品溶液,置于 4 ℃冰箱保存。

取样品 20 片,除去包衣,精密称定,研细,取约 0.5 g,置 50 mL 量瓶中,加 60% 乙醇溶液 40 mL,超

声处理(功率 250 W,频率 50 kHz)30 min,放冷,用 60% 乙醇稀释至刻度,摇匀,离心,滤过,取续滤液,即得检测样品液。

3 结 果

3.1 线性关系考察 分别将“2.2”项下制备的不同浓度的系列对照品溶液按“2.1”项下色谱条件依次连续进样,分别重复 3 次,以对照品溶液浓度(X , μg/mL)对峰面积(Y)进行线性回归,呈良好的线性关系,见表 1。

3.2 精密度实验 取“2.2”项下制备的混合对照品溶液在 1 d 以内连续进样 6 次,根据所得峰面积分别考察精密度。结果 4 个指标性成分的精密度(RSD)均 <3%,表明方法的精密度良好。

3.3 定量限和检测限 考察将 4 个对照品溶液以此进行稀释,以信噪比 10:1 时,确定其最低定量限;以信噪比 3:1 时,确定其最低检测限。4 个指标性成分的最低定量限和最低检测限见表 1。

3.4 稳定性实验 取制备的益心酮片样品溶液,分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 测定 4 个成分的峰面积,考察其稳定性。结果 4 个成分峰面积的 RSD 分别为 2.65%、1.59%、2.77%、2.42%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.5 重复性实验 精密称取同一批样品(Y_1)5 份,分别按供试品溶液制备方法制备,测定样品中各成分的含量,牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷含量 RSD 分别为 1.31%、0.95%、1.48%、1.91%。表明方法重现性较好。

3.6 加样回收率实验 精密称取已知各成分含量的供试品(Y_1)约 0.25 g,精密加入一定量的牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷对照品,平行试验 5 次,按“2.1”项下方法制备,测定相应峰面积,计算含量和回收率,结果见表 2~表 5。据《药典》规定的方法,同一个浓度,做 5~6 份样本。

3.7 样品测定 按“2.2”项下方法制备不同批次的益心酮片样品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析计算样品含量,结果见表 6。

表 1 4 个黄酮成分的线性关系、LOD 和 LOQ 值

成分	回归方程	线性范围(μg/mL)	r	最低检测限(ng)	最低定量限(ng)
牡荆素葡萄糖苷	$Y = 1547.4X + 1.1009$	7.92 ~ 158.42	0.9996	4.8	17.1
牡荆素鼠李糖苷	$Y = 1509.2X - 2.0864$	10.11 ~ 201.02	0.9997	5.1	17.5
牡荆素	$Y = 1327.6X + 1.7582$	4.02 ~ 80.42	0.9995	4.2	15.2
金丝桃苷	$Y = 987.4X - 2.1213$	6.28 ~ 125.61	0.9995	5.8	20.8

表 2 牡荆素葡萄糖苷的加样回收率试验结果

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
0.2511	2.5873	2.6048	5.1966	100.17	101.44	1.07
0.2498	2.5739	2.6048	5.2231	101.70		
0.2523	2.5997	2.6048	5.2751	102.71		
0.2466	2.5411	2.6048	5.2018	102.15		
0.2508	2.5842	2.6048	5.2017	100.49		

表 3 牡荆素鼠李糖苷的加样回收率试验结果

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
0.2511	7.3522	7.3056	14.6288	99.61	99.30	0.65
0.2498	7.3141	7.3056	14.5769	99.41		
0.2523	7.3873	7.3056	14.6955	100.04		
0.2466	7.2204	7.3056	14.4631	99.14		
0.2508	7.3434	7.3056	14.5239	98.29		

表 4 牡荆素的加样回收率试验结果

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
0.2511	0.4911	0.4976	0.9903	100.35	101.91	1.62
0.2498	0.4884	0.4976	0.9911	101.02		
0.2523	0.4933	0.4976	1.0122	104.28		
0.2466	0.4822	0.4976	0.9945	102.96		
0.2508	0.4904	0.4976	0.9925	100.91		

表 5 金丝桃苷的加样回收率试验结果

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
0.2511	0.7698	0.7712	1.5479	100.90	100.62	1.79
0.2498	0.7658	0.7712	1.5396	100.34		
0.2523	0.7735	0.7712	1.5538	101.19		
0.2466	0.756	0.7712	1.5106	97.85		
0.2508	0.7689	0.7712	1.5617	102.81		

表 6 益心酮片中 4 个黄酮的含量测定结果(n=3)

编号	牡荆素葡萄糖苷(mg/片)	牡荆素鼠李糖苷(mg/片)	牡荆素(mg/片)	金丝桃苷(mg/片)	总量(mg/片)
Y1	1.031 ± 0.025	2.928 ± 0.079	0.196 ± 0.005	0.307 ± 0.011	4.462
Y2	1.133 ± 0.019	3.451 ± 0.072	0.208 ± 0.005	0.429 ± 0.009	5.221
Y3	0.988 ± 0.016	2.903 ± 0.063	0.187 ± 0.004	0.303 ± 0.011	4.381
Y4	1.289 ± 0.021	3.872 ± 0.058	0.246 ± 0.004	0.615 ± 0.012	6.022
Y5	1.255 ± 0.018	3.696 ± 0.041	0.255 ± 0.003	0.607 ± 0.009	5.813
Y6	0.865 ± 0.016	3.007 ± 0.058	0.207 ± 0.004	0.387 ± 0.010	4.463

本实验采用超声提取方法,分别考察了水、不同体积分数的甲醇、乙醇等溶媒。结果表明体积分数为 60% 的乙醇提取效率最高。

4 讨 论

通过对 4 个对照品进行紫外吸收光谱的扫描,可知 4 种成分分别在 280、330 nm 处有最大吸收,考虑到 4 个组分要在一个色谱系统中同时检出又要使

样品中各个成分有较大的响应值,参阅有关文献^[24,7-8]。选择 330 nm 作为检测波长,在该波长处 5 个组分均有较强吸收,干扰少,且分离效果良好。

稳定性实验说明,样品在 24 h 内测定峰面积,其稳定性良好。4 个成分峰面积的 RSD 分别为 2.65%、1.59%、2.77%、2.42%。重复性实验说明,牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝(下转第 165 页)

感染出现仍可出现异物反应招致手术失败。⑤吊带植入组织纤维化固定时间在 3 个月以上^[5],此时方能受力并充分发挥对中段尿道的“吊床”作用,故术后应避免过早负重用力 and 性生活^[2]。本组 2 例随访结果为无效,均与术后早期参加体力劳动有关。

总之,从 TVT 发展而来的 TOT 手术,吊带从闭孔途径会阴组织间隙悬吊尿道中段,治疗女性 SUI 具有微创简便、安全高效的特点。

【参考文献】

[1] 那彦群,叶章群,孙颖浩,等. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:340-355.

[2] Dmochowski RR, Padmanabhan P, Scarpero HM. Slings: autologous, biologic, synthetic, and midurethral[M]//Wein AJ. Campbell-walsh urology. 10th ed. Philadelphia, USA: Elsevier, 2012: 2115-2167.

[3] Fritel X, Dumoulin C. Incontinence: stress urinary incontinence treatment-surgery first[J]. Nat Rev Urol, 2014, 11(1): 10-11.

[4] De Lancey JO. Structural support of the urethra as it relates to stress urinary incontinence: the hammock hypothesis[J]. Am J Obstet Gynecol, 1994, 170(6): 1713-1723.

[5] Delorme E, Droupy S, de Tayrac R, et al. Transobturator tape(Urat-ape): a new minimally-invasive procedure to treat female urinary

incontinence[J]. Eur Urol, 2004, 45(2): 203-207.

[6] 姚大强,魏金星,张雪培,等. 经闭孔尿道中段悬吊治疗女性压力性尿失禁两种术式的解剖学对比研究[J]. 临床泌尿外科杂志, 2008, 23(10): 728-730.

[7] Sousa A, Jesus A, Carvalho M, et al. Transobturator slings for female stress urinary incontinence[J]. Acta Med Port, 2014, 27(4): 422-427.

[8] Zugor V, Labanaris AP, Rezaei-Jafari MR, et al. TVT vs. TOT: a comparison in terms of continence results, complications and quality of life after a median follow-up of 48 months[J]. Int Urol Nephrol, 2010, 42(4): 915-920.

[9] Dokmeci F, Yuce T, Cetinkaya SE. Vesico-cutaneous fistula: unusual complication after transobturator mid-urethral sling[J]. Int Urogynecol J, 2014, 25(10): 1437-1439.

[10] Ko JK, Ku CH. Embolization for pelvic arterial bleeding following a transobturator tape procedure[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2014, 40(3): 865-868.

[11] Aydogmus S, Kelekci S, Aydogmus H, et al. Obturator nerve injury: an Infrequent complication of TOT procedure[J]. Case Rep Obstet Gynecol, 2014. doi:10. 1155/2014/290382.

[12] Kokanali MK, Doganay M, Aksakal O, et al. Risk factors for mesh erosion after vaginal sling procedures for urinary incontinence[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2014, 177(1): 146-150.

(收稿日期:2014-11-18;修回日期:2015-01-14)

(本文编辑:黄攸生; 英文编辑:王建东)

(上接第 159 页)

桃苷含量 RSD 分别为 1. 31%、0. 95%、1. 48%、1. 91%,表明本方法重现性较好。

《中国药典》2010 年版一部^[9]收载了益心酮片及其原料山楂叶提取物,两者质量控制的指标成分均为金丝桃苷,药典规定山楂叶提取物中的含量限度仅为 0.4%,非专属性成分,而牡荆素鼠李糖苷的含量显著高于金丝桃苷,且为专属性成分^[2-3,10]。本研究结果显示,牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷其回收率分别为 101. 44%、99. 30%、101. 91% 和 100. 62%,RSD 分别为 1. 07、0. 65、1. 62 和 1. 79。本研究的结果同样显示牡荆素鼠李糖苷的含量显著高于金丝桃苷,且牡荆素鼠李糖苷与山楂叶的功效作用相一致,是山楂叶中重要的药理活性成分^[5-6,11-12]。因此,我们认为选择金丝桃苷作为益心酮片质量控制的指标成分有待商榷,而牡荆素鼠李糖苷更适宜作为益心酮片的质量控制指标。

【参考文献】

[1] 宋少江,陈 佳,寇 翔,等. 山楂叶的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报,2006,23(2): 88-90.

[2] 丁杏苞,姜碉青. 山楂叶化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1990, 15(5): 39-41.

[3] 杨利平,王春霖,王永利,等. 山楂叶提取物对家兔血小板聚集和大鼠实验性心肌缺血的影响[J]. 中草药,1993,24(9): 482-483.

[4] 刘全亮,杨中林. 不同纯度山楂叶总黄酮降血脂作用的比较研究[J]. 海峡药学,2008,20(2): 23-24.

[5] 闵 清,白育庭,舒思洁,等. 山楂叶总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床,2005,21(2): 19-21.

[6] Fürst R, Zirgiebel U, Totzke F, et al. The Crataegus extract WS 1442 inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia in the rat carotid artery by directly influencing PDGFR-beta[J]. Atherosclerosis, 2010, 211(2): 409-417.

[7] Chen J, Song SJ, Song N. Simultaneous determination of 2"-O-rhamnosyl vitexin and vitexin in Chinese hawthorn leaf and its extract by RP-HPLC[J]. J Chin Pharm Sci, 2006, 15(1): 51-54.

[8] 马 国,蒋学华,黄 婷,等. HPLC 同时测定山楂叶提取物中的 5 种主要成分[J]. 华西药理学杂志,2007,22(5): 547-549.

[9] 中国药典 2010 版一部[S]. 2010:1026.

[10] 王福成,豆文太,朱文学. HPLC 测定山楂精中牡荆苷、牡荆苷-2"-O-鼠李糖苷、金丝桃苷、芦丁的含量[J]. 中成药,2002,24(2): 122-124.

[11] 朱晓新,李连达,刘建勋,等. 牡荆素鼠李糖苷对脐静脉内皮细胞缺氧再给氧损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2005,11(6): 30-33.

[12] 朱晓新,李连达,刘建勋,等. 牡荆素鼠李糖苷对内皮细胞血管舒缩因子表达影响的实验研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(7): 566-569.

(收稿日期:2014-12-15;修回日期:2015-03-02)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)