

HPLC 测定 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮的含量*

张 娟^{1,2}, 张 伟², 王 珺², 杨兆祥^{2△}

(1. 云南中医学院, 云南 昆明 650500; 2. 昆明制药集团股份有限公司药物研究院, 云南 昆明 650100)

摘要: 目的 建立高效液相色谱测定 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮含量的方法。方法 色谱柱 Luna C18 (4.6mm×150mm, 5μm), 乙腈-0.02%磷酸(50:50)为流动相, 流速 1mL/min, 检测波长 254nm, 柱温 35℃。结果 经方法学验证表明, 精密度、稳定性、重现性、线性范围、回收率等均符合要求。结论 该方法简便、快速、准确, 可用于 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮的含量测定和质量控制。

关键词: 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮; 含量; 高效液相色谱

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)02-0025-04

灯盏花素是从菊科飞蓬属(*Erigeron* L.)植物短草飞蓬[*Erigeron brevisca PuS (Vant.) Hand-MaZZ.*]中提取的黄酮类有效成分, 其主要成分为灯盏花乙素, 即 4', 5, 6-三羟基黄酮-7 葡萄糖醛酸苷^[1], 又名野黄芩苷, 具有增加脑血流量、降低脑血管阻力、改善脑循环、缓解微动脉痉挛^[2-3]、提高血脑屏障通透性^[4]、拮抗心肌缺血再灌注损伤^[5-6]、抑制血小板凝集、降低血液粘稠度^[7]、促进纤溶活性以及抗血栓形成^[8]等多种药理作用。临床上常用于高血压、心率失常、脑梗死、脑出血等心脑血管疾病的治疗^[9]。在灯盏花乙素合成过程中, 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮为重要中间体, 建立高效液相色谱法测定 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮含量的方法, 对其生产及其质量控制有实际意义。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津 20AD 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); Luna C18 色谱柱 (美国菲罗门公司); XP205 型分析天平 (梅特勒公司); CP225D 型分析天平 (Sartorius 公司); UPT-I-40L 型超纯水机 (成都超纯科技有限公司)。

1.2 试剂

5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮 (昆明制药集团股份有限公司药物研究院研制, 批号 20131230);

5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮对照品 (昆明制药集团股份有限公司药物研究院研制, 批号 20131009); 乙腈 (色谱纯, 韩国德山药品工业, 批号: DAVJ21); 磷酸 (色谱纯, ROE, 批号 OK6639)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 C18 柱 (Luna C18 150 mm×4.6 mm, 5μm), 流动相为乙腈-0.02%磷酸(50:50), 检测波长 254 nm, 柱温 35℃, 流速 1.0 mL/min, 进样量 10μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮对照品适量, 用乙腈溶解制成每 1mL 含 0.5mg 的溶液作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮原料药适量, 用乙腈溶解制成每 1mL 含有 0.5mg 的溶液作为供试品溶液。

5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮与 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮对照品均为自制, 对照品的纯度较高经过结构确证及标定。此批对照品 (20131009) 的纯度: 97.24%。

3 方法学验证

3.1 专属性

取 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮供试品溶液、空白

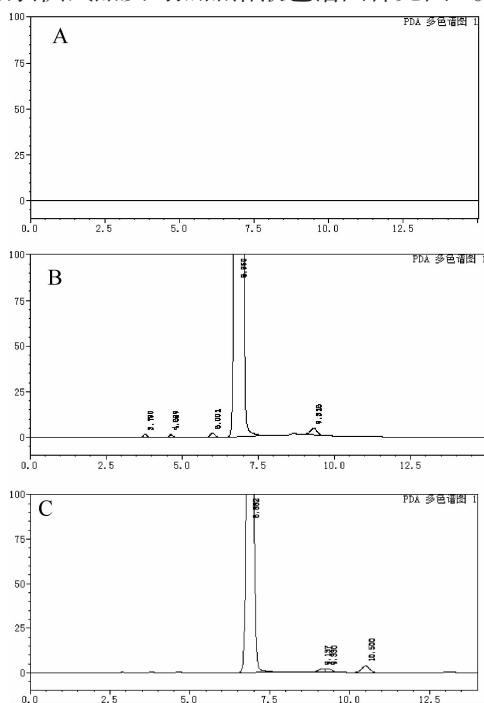
* 基金项目: 云南省重点新产品开发计划项目 (2014BC009)

收稿日期: 2014-11-05

作者简介: 张娟 (1990-), 女, 安徽安庆人, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药剂学。

△通信作者: 杨兆祥, E-mail: yangzxky@163.com

溶剂进行专属性分析,结果溶剂不干扰主峰测定。空白溶剂、供试品及对照品溶液色谱图详见图 1。



A. 空白溶剂; B. 供试品; C. 对照品

图 1 溶液液相色谱图

3.2 溶液稳定性试验

分别取对照品溶液及供试品溶液,于室温条件

下放置,分别在 0, 2, 4, 8, 12, 16, 24 h 精密量取上述溶液各 10 μ L 注入高效液相色谱仪,根据峰面积计算其 RSD,结果见表 1。

表 1 对照品及供试品溶液的稳定性试验结果

时间/h	对照品溶液峰面积	供试品溶液峰面积
0	12569373	12674138
2	12563771	12642268
4	12565376	12631792
8	12563343	12620034
12	12541362	12612380
16	12509398	12630414
24	12522750	12621069
平均	12547910	12633156
RSD/%	0.19	0.16

结果表明:本品对照品溶液及供试品溶液在室温下放置 24h 内稳定性良好;RSD 小于 2.0%。

3.3 进样精密度试验

精密量取 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮对照品溶液 10 μ L,注入高效液相色谱仪,连续进样 6 次,记

表 2 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮含量测定进样精密度结果

进样次数	1	2	3	4	5	6	平均	RSD/%
峰面积	12561336	12564589	12555315	12555851	12553705	12557947	12558124	0.03

录色谱图。考察主峰峰面积变化(RSD),结果见表 2。结果表明:进样精密度良好(RSD=0.03%)。

3.4 重复性试验

按 2.3 项下的供试品溶液配制方法由同一分析人员配置供试品溶液 6 份,按含量测定方法测定,记录色谱图,求各份供试品含量及 RSD,结果见表 3。

结果:平行操作测定的 6 份供试品溶液含量 RSD 为 0.25%,在规定范围内,说明此测定方法的重复性较好。

3.5 线性和范围

精密称定 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮对照品 50mg 于 50mL 容量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,混匀,作为储备液;精密量取一定体积的储备液,配制成浓度为 102.1, 204.3, 306.4, 408.6, 510.7, 612.8, 715.0 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的溶液。分别精密量取 10 μ L 注入高效液相色谱仪进行测定,结果见下一页表 4。

以对照品的浓度(μ g/mL)为横坐标,以峰面

表 3 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮含量测定重复性实验结果

	1	2	3	4	5	6	平均/%	RSD/%
称样量/mg	12.75	12.35	12.82	12.65	12.64	12.91	12.72	0.25
含量/%	97.96	98.48	98.34	98.45	98.52	98.01	98.29	0.25

表 4 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮含量测定标准曲线数据

浓度/(μg/mL)	102.1	204.3	306.4	408.6	510.7	612.8	715.0
峰面积 1	2440202	4925379	7389442	9886149	12273384	1473128	17227676
峰面积 2	2439759	4924119	7395241	9888497	12265155	14750496	17230724
峰面积 3	2441655	4921507	7388720	9883787	12272725	14734134	17201438
平均	2440538	4923668	7391134	9886144	12270421	14738637	17219946

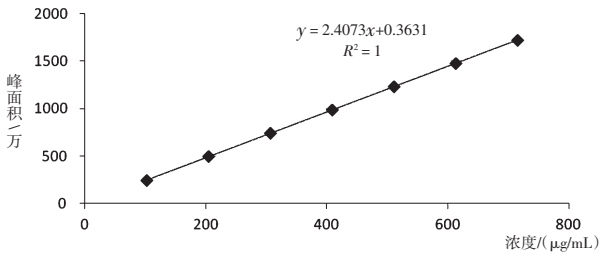


图 2 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮含量测定线性关系图

积的平均值为纵坐标进行线性回归计算,得到线性回归方程: $Y=2.4073x+0.3631$ $R^2=1$ ($n=7$),结果见图 2。

结果表明:5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮在 102.1μg/mL~715.0μg/mL 范围内线性关系良好。

3.6 回收率

为了考察测定的结果与真实值的接近程度,配置相当于 2.3 项下样品浓度的 80%、100%、120%的供试品溶液,进行回收率的测定。具体操作如下:

对照品溶液的配制:精密称取 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮对照品 25mg 于 50mL 量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,作为对照品溶液。

对照储备液的配制:精密称取 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮对照品 50mg 于 100mL 量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,作为对照品储备液。

供试品溶液的配制:精密称取 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮原料药 125mg 于 50mL 量瓶中作为母液,分别精密移取 1mL 的母液置 10mL 量瓶中,重复 12 份;取其中 3 份直接加乙腈稀释至刻度,作为测定样品含量的溶液;另取 3 份,分别精密加入 3mL 对照品储备液,用乙腈稀释至刻度,以此作为浓度为 80%的供试品溶液;另取 3 份,分别精密加入 5mL 对照品储备液,用乙腈稀释至刻度,作为浓度为 100%的供试品溶液;另取 3 份,分别精密加入 7mL 对照品储备液,用乙腈稀释至刻度,作为浓度为 120%的供试品溶液;

表 5 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮含量测定回收率实验结果

	已知量 /mg	对照品 加入量 /mg	测得量 /mg	回收量 /mg	回收率 /%	平均 /%	RSD /%
80%	2.5254	1.5324	4.0785	1.5531	101.35		
	2.5254	1.5324	4.0911	1.5657	102.18		
	2.5254	1.5324	4.0784	1.5530	101.34		
100%	2.5254	2.5540	5.0724	2.5470	99.73		
	2.5254	2.5540	5.0561	2.5307	99.09	100.71	0.91
	2.5254	2.5540	5.0983	2.5729	100.74		
120%	2.5254	3.5756	6.1196	3.5942	100.52		
	2.5254	3.5756	6.1166	3.5912	100.44		
	2.5254	3.5756	6.1363	3.6109	100.99		

精密量取上述不同浓度的供试品溶液和对照品溶液各 10μL,分别注入高效液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮的回收率。结果见表 5。

结果表明:在此色谱条件下,采用加样回收率法,按《中国药典》2010 年版附录^[10]要求,在 80%、100%、120%三个浓度范围内,每组浓度平行 3 次检测回收率总平均值为 100.71%,RSD 为 0.91%,符合回收率要求。

4 讨论

色谱柱的选择:考察了 Luna 柱、氨基柱,结果都有较好的重现性,故选用 Luna 柱;检测波长的选择:配制一定浓度的 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮对照品,用紫外分光光度计进行光谱扫描,结果 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮在 254nm 处有吸收,仅次于最大吸收,为了兼顾有关物质,故选用 254nm 为本品测定的波长;溶剂的选择:考察了甲醇、乙腈,由于样品的低极性导致甲醇会使得峰宽,后者乙腈峰形很好,对样品的测定无干扰;进样体积的选择:考察了 20μL、10μL 发现进样量大的 20μL 会

导致峰形变宽,故使用 10 μ L;流速的选择:考察了 0.8mL/min、1 mL/min、0.8mL/min 的流速不能很好地达到基线分离,分离度不够,故选用 1 mL/min。

经方法学验证^[10]结果可以看出:在 102.1 μ g/mL~715.0 μ g/mL 范围内 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮浓度和峰面积有较好的线性关系, $R^2=1$;平均加样回收率为 100.71%,RSD 为 0.91%($n=7$);该结果显示此方法简便、快速和准确,可用于 5,6,7,4'-四乙酰氧基黄酮原料药含量的测定。

参考文献:

- [1] 吴俊珠,严亚,高鹏飞. 灯盏花素吸收与促进吸收策略的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(9):219.
- [2] 刘伟东,盛宝英,乔香兰. 灯盏花素改善脑梗塞病人血液流变学、甲襞微循环的临床研究 [J]. 黑龙江医药科学,2004,24(3):52.
- [3] 李年贵,梁凤珍,张家容. 灯盏花素对急性脑梗塞患者血液流变性与甲襞微循环的影响[J]. 中国血液流变学杂志,1998,8(3):42.
- [4] 毛俊琴,邱彦,蔡如珏,等. 灯盏花素对大鼠脑创伤的保护作用[J]. 药学服务与研究,2007,7(2):100-102.
- [5] 许立,方泰惠,周玲玲,等. 灯盏花素对离体家兔心脏缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中药新药与临床药理,2005,16(6):422-424.
- [6] 刘晓健,王欣楠,马岩,等. 灯盏花素注射液对大鼠心肌缺血再灌注心律失常的影响 [J]. 中药药理与临床,2008,24(1):33-34.
- [7] 王艳芳,张钰,郝冠中. 灯盏花素的临床应用进展[J]. 疾病监测与控制杂志,2010,4(3):138.
- [8] 谢淑英,牛凤珍,张锐,等. 灯盏花素注射液治疗心绞痛 45 例——附灯盏花素注射液对血浆纤溶活性的影响[J]. 辽宁中医杂志,1997,24(1):21.
- [9] 周莉. 灯盏花素的心脑血管药理及临床研究进展[J]. 中药药信息,2013,30(6):136.
- [10] 国药药典委员会. 中华人民共和国药典 (二部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录 194.

(编辑:杨阳)

HPLC Determination the Content of 5,6,7,4'-four Acetoxy of Flavonoids

ZHANG Juan^{1,2}, ZHANG Wei², WANG Jun², YANG Zhao-xiang^{2Δ}

(1. Yunnan University of TCM, Kunming 650500, China;

2. Institute for Drug Research and Development of Kunming Pharmaceutical Corporation, Kunming 650100, China)

ABSTRACT: **Objective** Establishing a HPLC method for the determination of scutellarein tetraacetate. **Methods** Column:Luna C18 (4.6mm $\times$ 150mm, 5 μ); Acetonitrile-0.02% phosphoric acid (50:50) was used as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, column temperature was 35 $^{\circ}$ C. **Results** Methodology validation showed that the precision, stability, repeatability, linear range and average recovery rate all conforms to the requirement. **Conclusion** The method was so convenient, fast and accurate that it can be used in the assay and the quality control of scutellarein tetraacetate.

KEY WORDS: scutellarein tetraacetate; content; HPLC

《云南中医学院学报》欢迎网上投稿

网址:<http://www.xb.ynutcm.edu.cn>