

HPLC法测定灯盏花素注射液中野黄芩苷含量及有关物质*

郑金凤^{1,2}, 李文莉^{1*}, 冯芳²

(1. 湖南省药品检验所, 长沙 410001; 2. 中国药科大学, 南京 210009)

摘要 目的: 建立用高效液相色谱法测定灯盏花素注射液中野黄芩苷含量及其有关物质。 **方法:** 采用 Agilent TC C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) 色谱柱, 以甲醇 - 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液 (用磷酸调节 pH 3.0) (32:68) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 335 nm。 **结果:** 主峰和相邻杂质峰能较好地分离; 野黄芩苷浓度在 26.02~312.24 μg·mL⁻¹ 范围内具有良好的线性关系 ($r = 0.9994$, $n = 5$); 最低检出量为 2 ng 灯盏花素注射液中的主要有关物质为灯盏花甲素。 **结论:** 本法专属准确, 可用于灯盏花素注射液的质量控制。

关键词: 灯盏花素注射液; 含量; 有关物质; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)01-0034-05

HPLC determination of scutellarin and its related substances in breviscapine injection*

ZHENG Jin-feng^{1,2}, LI Wen-li^{1**}, FENG Fang²

(1. Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract Objective To establish an RP-HPLC method for the determination of breviscapine injection and its related substances. **Methods** In this HPLC method Agilent TC C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) column was adopted, the mobile phase consisted of methanol-0.1 mol·L⁻¹ ammonium acetate (adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid) (32:68) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ with the detection wavelength of 335 nm. **Results** The prominent peak and the neighbor subsidiary peak could be completely separated by the method. The standard curve was linear in the range of 26.02-312.24 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9994$, $n = 5$), with the detection limit of 2 ng. The prominent related substance was 4'-hydroxybaicalin-7-O-β-D-pyrangluconatemethyl ester. **Conclusion** The method is proved to be selective, accurate and suitable for the quality control of breviscapine injection.

Key words breviscapine injection; assay; related substance; HPLC

灯盏花素是从菊科植物短葶飞蓬 [*Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand. - Mazz.] 中提取的黄酮成分, 主要用于治疗心血管疾病, 改善血液循环。灯盏花素注射液为灯盏花素的灭菌水溶液, 主成分为野黄芩苷。《中华人民共和国卫生部药品标准》中药成方制剂 (第二十册)^[1] 记载了该品种, 标准中的含量测定采用紫外分光光度法, 有关物质采用 HPLC 法, 但实验中发现有关物质项下的色谱条件中主峰峰形拖尾较严重。依据文献报道^[2-5], 本文对色谱条件进行了优化, 完善了检测方法, 可同时用于含量测定。本文还对注射液中的主要有关物质之一进

行了研究, 并分离制备得到单体, 经结构确证为灯盏花甲素。

1 仪器与试剂

Waters Alliance 高效液相色谱仪 (包括 DAD 检测器, 脱气机, 四元泵, 柱温箱, Empower 色谱工作站及自动进样系统)。

野黄芩苷对照品 (中国药品生物制品检定所提供, 批号 110842-200605)。甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。灯盏花素注射液为国内 10 个企业的样品 (规格 5 mL: 20 mg 或 2 mL: 5 mg)。

* “十一五”国家科技支撑计划重点项目“药品安全关键技术研究”子课题 1 (2006BAI14B01)

** 通讯作者 Tel: (0731) 82275866 E-mail: eileen67@tm.com

2 色谱条件

采用 Agilent TC C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) 色谱柱, 以甲醇 - 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液 (用磷酸调节 pH 3.0) (32:68) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 335 nm, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL。

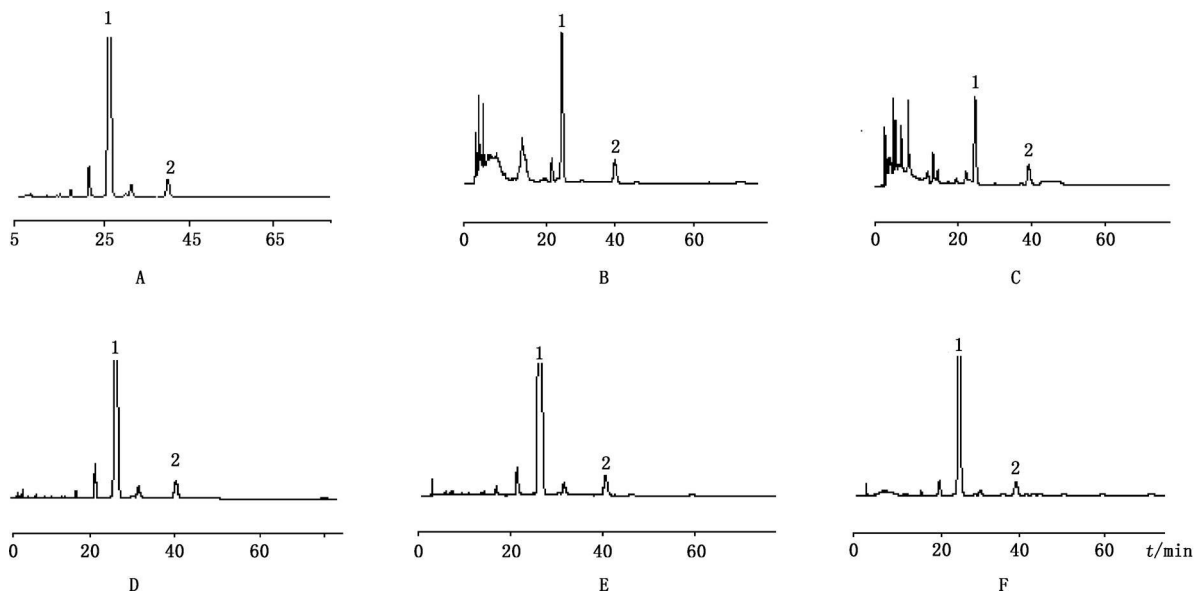


图 1 破坏试验的色谱图

Fig 1 Chromatograms of destructive test

A. 未破坏样品 (undestroyed) B. 酸破坏 (acid destroy) C. 碱破坏 (base destroy) D. 氧化破坏 (oxidation destroy) E. 热破坏 (heat destroy) F. 光破坏 (illumination destroy)

1. 野黄芩苷 (scutellarin) 2. 灯盏花甲素 (4'-hydroxybaicalin-7-O-β-D-pyranoglucuronate ethylester)

3.1.2 酸破坏性试验 取本品 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加 0.5 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 2 mL, 室温放置 2 h, 加 0.5 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2 mL, 加磷酸二氢钾约 5 mg, 加水定容至刻度, 摇匀, 取 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果见图 1-B。

3.1.3 碱破坏性试验 取本品 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加 0.5 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2 mL, 室温放置 0.5 h, 加 0.5 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 2 mL, 加磷酸二氢钾约 5 mg, 加水定容至刻度, 摇匀, 取 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果见图 1-C。

3.1.4 氧化破坏试验 取本品 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加 3% 过氧化氢溶液 2 mL, 置室温下放置 1 h, 加水稀释至刻度, 摇匀, 取 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果见图 1-D。

3.1.5 热破坏试验 取本品 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 130 °C 放置 5 h, 放冷, 加水稀释至刻度, 摇匀, 取 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果见图 1-E。

3 有关物质检测

3.1 破坏试验 以 A 药厂的批号为 08012241 (规格 5 mL: 20 mg) 的灯盏花素注射液进行以下试验。

3.1.1 供试品溶液 取本品 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 取 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果见图 1-A。

3.1.6 光破坏试验 取本品 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 于光照度 4500 lx 下放置 3 d, 取 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果见图 1-F。

3.1.7 结论 试验结果表明本品对酸、碱不太稳定, 对氧化、光、热较稳定, 该色谱条件能将野黄芩苷与各破坏条件下产生的降解产物进行有效的分离。

3.2 最低检出量 取野黄芩苷对照品适量, 定量稀释制成 0.1 μg·mL⁻¹ 的溶液, 精密量取 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 野黄芩苷色谱峰 *S/N* ≈ 3, 最低检出量为 2 ng。

3.3 溶液稳定性试验 取“3.1.1”项下的供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 精密量取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。结果表明供试品溶液于 12 h 内, 总杂质峰面积无明显变化, *RSD* 为 0.36%。

3.4 耐用性考察 采用 3 根不同品牌的色谱柱 Agilent TC C₁₈ 柱 (5 μm, 4.6 mm × 250 mm)、Zorbax SB C₁₈ 柱 (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) 和 Diamonsil C₁₈

柱 (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) 及不同仪器 Agilent 1100和 Waters Alliance, 对方法的耐用性进行考察。在不同条件下进行分析, 均能够保证主峰和杂质峰完全分离, 且保留时间也比较合理。因此方法的耐用性好。

3.5 样品的测定 经过上述的方法学研究, 表明本文拟定的有关物质检测方法, 专属性强, 适合本品的有关物质检查。抽取不同企业共 10批样品, 用水稀

释制成浓度为 0.2 mg·mL⁻¹ 的溶液, 作为供试品溶液, 精密量取 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图至主成分保留时间的 3倍。供试品溶液色谱图如显杂质峰, 除溶剂峰外, 各杂质峰峰面积之和不得过主峰峰面积的 10%。同时用现行质量标准方法^[1]检测, 结果见表 1, 从表 1可见采用新拟定方法的结果明显高于原检测方法, 说明新拟定方法的检出概率及分离效果更优。

表 1 有关物质和野黄芩苷含量测定结果 (%)

Tab 1 Results of related substances and determination of scutellarin

生产厂家 (manufacturer)	批号 (Lot No.)	有关物质 (related substances)		野黄芩苷 (scutellarin)	
		本法 (the method)	原方法 (the origin method)	本法 (the method)	原方法 (the origin method)
A	08012141	6.20	3.5	81.5	99.7
B	08012301	9.72	4.6	78.9	97.3
C	0801021	29.19	15.6	75.2	95.8
D	20060401	16.95	6.9	78.5	100.9
E	070601	16.17	8.1	77.9	96.7
F	070703	9.89	6.5	76.3	96.8
G	070801	7.85	5.3	78.0	97.5
H	20080407	7.53	4.5	80.0	100.4
I	0804251	19.90	8.1	75.4	100.6
J	20081063	3.53	2.8	95.6	96.3

3.6 有关物质的鉴定 对本品有关物质中的峰 2 (见图 2-A) 进行分析, 根据文献报道^[6-7] 及 ESI 负离子化 LC-MS 法 [仪器: Waters Quattro premier XE

三重四级杆串联质谱联用仪; 色谱条件: 色谱柱 Agilent TC C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm), 流动相 0.1% 甲酸水溶液 (A) 和甲醇 (B), 梯度洗脱 (0~60.0 min,

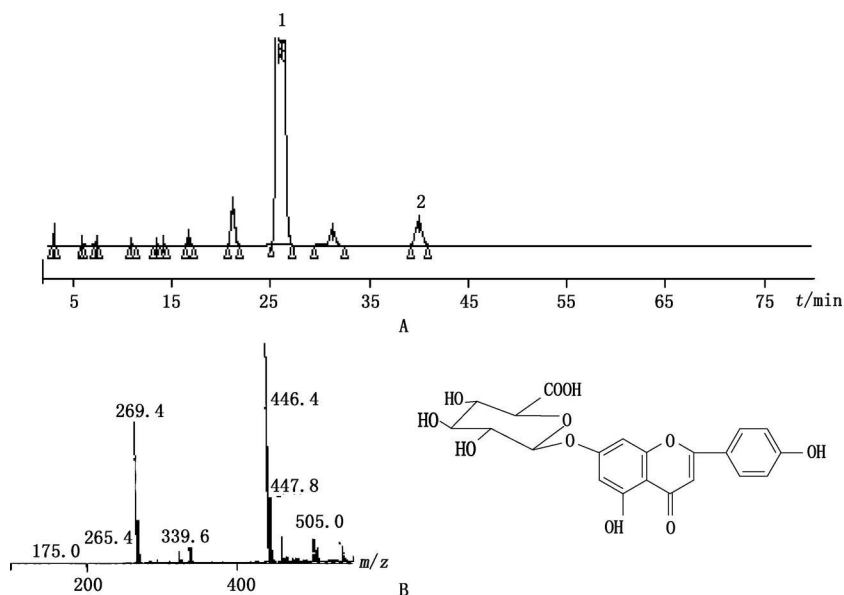


图 2 灯盏花素注射液中有关系物质分析鉴定图谱

Fig 2 Test of related substances for breviscapine injection

A. 灯盏花素注射液 HPLC 图 (HPLC chromatogram of breviscapine injection) B. 灯盏花甲素的 ESI-MS 数据和分子结构 (ESI-MS spectrum and the corresponding structure of 4'-hydroxybaicalein-7-O-β-D-pyrangluconate ethylester)

1. 野黄芩苷 (scutellarin) 2. 灯盏花甲素 (4'-hydroxybaicalein-7-O-β-D-pyrangluconate ethylester)

流动相 A 从 75% 线性变化到 30%; 60.0 ~ 60.1 min, 流动相 A 从 30% 直接变化到 15%; 60.1 ~ 65.0 min, 15% 流动相 A; 65.0 ~ 75.0 min, 流动相 A 从 15% 线性变化到 75%, 保持 5 min, 流速 0.5 mL · min⁻¹, 柱温 35 °C; 质谱条件: 毛细管电压 3.0 kV, 锥孔电压 35 V, 离子源温度 110 °C, 脱溶剂气温度 350 °C, 脱溶剂气流量 500 L · h⁻¹] 测得的准分子离子峰 [M - H]⁻ 为 *m/z* 445, 主要碎片离子峰 [M - H - 176(葡萄糖醛酸)]⁻ 为 *m/z* 269, 经分离制备得到单体后 NMR 测定, 确证它为灯盏花甲素(芹菜素 7-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸苷)。由于在所选用的 LC-MS 法的条件下, 主峰前和后的杂质峰未出现明显的色谱峰, 且其质谱行为分子离子峰不稳定, 我们将在课题的下一步研究中作进一步的分析。

4 含量测定

4.1 线性关系考察 精密称取经五氧化二磷减压干燥 24 h 的野黄芩苷对照品 0.1041 g 置 200 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为储备液, 精密量取上述溶液 0.5 1.0 2.0 4.0 6.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 取上述溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以浓度 (*C*) 为横坐标, 峰面积 (*A*) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归方程为:

$$A = 6.444 \times 10^4 C + 1.994 \times 10^5 \quad r = 0.9994$$

试验结果表明, 野黄芩苷浓度在 26.02 ~ 312.24

μg · mL⁻¹ 范围内, 线性关系良好。

4.2 重复性试验 取样品 (A 药厂, 批号 0801224; 规格 5 mL: 20 mg) 5 mL 共 6 份, 分别置 200 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液; 另取线性关系考察试验项下的第 3 份溶液, 作为对照品溶液。取上述 2 种溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 依法测定。6 份样品中野黄芩苷平均含量为 3.30 mg · mL⁻¹, RSD 为 0.29%。

4.3 加样回收率试验 精密量取“4.2”项下已测含量的 A 药厂样品 (3.30 mg · mL⁻¹) 2.5 mL, 共 6 份, 分别置 100 mL 量瓶中, 各精密加入野黄芩苷对照品约 10 mg 加 70% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制得供试溶液; 另取线性关系考察试验项下的第 3 份溶液, 作为对照品溶液。取上述 2 种溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 依法测定, 计算回收率。结果平均回收率为 99.60%, RSD 为 0.33%。

4.4 样品的测定 取表 1 所列的样品, 分别用 70% 甲醇稀释制成 0.1 mg · mL⁻¹ 的溶液, 摇匀, 即得供试品溶液; 精密称取经五氧化二磷减压干燥 24 h 的野黄芩苷对照品约 10 mg 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇 70 mL 溶解后, 加水稀释至刻度, 即得对照品溶液。精密量取 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图 (见图 3), 按外标法以峰面积计算。同时用现行质量标准方法^[1]检测, 结果见表 1, 从表 1 可见, 新拟定的方法 (HPLC 法) 的含量测定结果明显低于原方法 (UV 法), 说明新拟定的方法专属性更强。

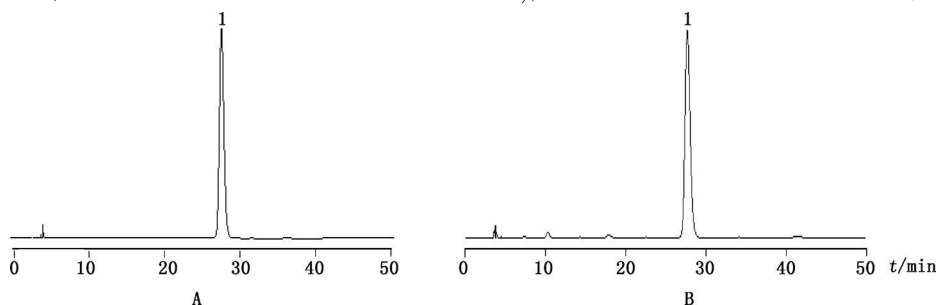


图 3 含量测定的 HPLC 色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of determination

A. 对照品 (reference substance) B 样品 (sample)

1 野黄芩苷 (scutellarin)

5 讨论

5.1 现行质量标准中存在的问题 在现行质量标准中有关物质色谱条件下流动相选择不当, 造成主峰峰形不对称, 不能与杂质峰完全分离, 各杂质峰之间的分离情况也不佳; 且由于供试品溶液浓度偏低 (25 μg · mL⁻¹), 因而有关物质检出率也会降低; 含量测定采用紫外分光光度法测定, 测得的是总黄酮

的量, 而不是其主要成分野黄芩苷的量, 缺乏专属性。因此我们对有关物质项下的色谱条件 (包括流动相的组成、供试品溶液浓度的设置) 进行了优化, 完善了检测方法, 并且可同时用于含量测定。

5.2 溶剂种类的选择 在有关物质项下, 参照现行质量标准仍采用水作为溶剂, 经过试验, 其溶剂峰不干扰样品的测定。含量测定项下, 由于野黄芩苷对

照品水溶性较差, 试验中比较了各种不同比例的甲醇, 最终选用 70% 甲醇作为溶剂。

5.3 检测波长的选择 从灯盏花素注射液的 DAD 的三维图谱反映, 野黄芩苷在 335 nm 有最大吸收, 而且大部分有关物质均在 335 nm 波长处有较强的紫外吸收, 故选择 335 nm 作为有关物质的检测波长。

5.4 流动相的选择 根据文献资料又比较了不同的色谱系统: 甲醇-水-冰醋酸 (30: 70: 1); 甲醇-0.1% 甲酸^[7]; 甲醇-0.1% 磷酸 (40: 60)^[8]; 甲醇-0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液 (32: 68); 甲醇-0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液 (用磷酸调节 pH 3.5) (32: 68); 甲醇-0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液 (用磷酸调节 pH 3.0) (32: 68); 甲醇-0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液 (用磷酸调节 pH 2.5) (32: 68) 等。发现选择甲醇-0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液 (用磷酸调节 pH 3.0) (32: 68) 作为流动相, 主峰出峰时间合适, 峰形较好, 且各杂质峰之间的分离情况较好, 流动相 pH 亦较合适。

参考文献

1 Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health, P R China (中华人民共和国卫生部药品标准). Chinese Traditional Patent Formulation Preparation (中药成方制剂). Vol 20 (第二册), 1998. 102

- 2 DAI Yong (代勇), LIU San-kang (刘三康), FU Chun-mei (付春梅), *et al.* Determination of the contents and the related substances in Dengzhanhuasu injection (灯盏花素注射液的含量测定及有关物质的检查). *West China J Pharm Sci* (华西药科学杂志), 2005, 20(2): 147
- 3 YANG Wen-yu (杨文字), ZHANG Yi (张艺), LI Ling (李玲), *et al.* Comparative analysis of chemical constituents of Injection Erigeronitidis with breviscapine by HPLC-DAD (灯盏细辛注射液和灯盏花素的 HPLC-DAD 对比分析). *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2005, 27(2): 202
- 4 ZHU Hui-ping (朱会萍), XIAO Ya-bao (肖亚宝). Determination of scutellarin in Dengzhan Huasu tablets by HPLC (高效液相色谱法测定灯盏花素片中野黄芩苷的含量). *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药理学), 2005, 22(1): 66
- 5 PENG Jin-xiang (彭金香), ZHAO Ai-hua (赵爱华). Determination of Dengzhanhuasu injection by HPLC (高效液相色谱法测定灯盏花素注射液含量). *Tianjin Pharm* (天津药理学), 2004, 16(1): 24
- 6 ZHANG Wei-dong (张卫东), CHEN Wan-sheng (陈万生), WANG Yong-hong (王永红), *et al.* Studies on the flavone glycosides from the extract of Erigeron breviscapus (灯盏花黄酮苷化学成分的研究). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(8): 565
- 7 FENG Fang (冯芳), SHEN Yu-lan (沈于兰). Determination of trace scutellarin by a SPE-HPLC/MS/MS assay and its pharmacokinetics in human plasma (人血浆中痕量灯盏花素 SPE-HPLC/MS/MS 的建立及药动学研究). *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2006, 41(6): 457
- 8 ChP (中国药典). 2005. Updated edition (增补本): 6

(本文于 2010 年 1 月 7 日收到)