

HPLC 同时测定白花蛇舌草注射液中 5 种成分的含量

李存满^{1*}, 张志英², 王文淑¹
(1. 河北科技大学 河北省分析测试研究中心, 石家庄 050018;
2. 石药集团 欧意药业有限公司, 石家庄 050051)

[摘要] 目的:利用 HPLC 同时测定白花蛇舌草注射液中 5 种成分的含量。这 5 种成分包括环烯醚萜苷类(10-乙酰鸡矢藤苷、鸡矢藤苷甲酯、去乙酰车叶草苷酸甲酯)和黄酮苷类[槲皮素-3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-*E*-阿魏酰基)-*D*-吡喃葡萄糖基]- β -*D*-吡喃半乳糖苷、山柰酚-3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-*E*-阿魏酰基)- β -*D*-吡喃葡萄糖基]- β -*D*-吡喃半乳糖苷}。方法:采用 SunFireTM C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m),以乙腈-水(含 0.1% 甲酸)为流动相,梯度洗脱,柱温 30 $^{\circ}$ C,流速 1.0 mL·min⁻¹。结果:各对照品在线性范围内线性关系良好,相关系数均 $\geq$ 0.999 5;加样回收率为 98.1% ~ 101.2%,RSD 均 $\leq$ 3.3%。结论:该方法操作简便,结果可靠,重复性好,可作为白花蛇舌草注射液质量评价的参考依据。

[关键词] 白花蛇舌草注射液;高效液相色谱法;多成分;含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)04-0089-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017040089

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161130.0912.014.html>

[网络出版时间] 2016-11-30 9:12

Simultaneous Determination of Five Compounds in *Hedyotis diffusa* Injection by HPLC

LI Cun-man^{1*}, ZHANG Zhi-ying², WANG Wen-shu¹
(1. Hebei Research Centre of Analysis and Testing, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China; 2. Shiyao Group Ouyi Pharmaceutical Co. Ltd., Shijiazhuang 050051, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for simultaneous determination of five compounds, including three iridoid glucosides (10-acetyl-scandoside, scandoside methyl ester, and deacetylasperuloside methyl ester) and two flavonoid glucosides { quercetin-3-*O*- [2-*O*- (6-*O*-*E*-ferloyl) - β -*D*-glucopyranosyl] - β -*D*-galactopyranoside and kaempferol-3-*O*- [2-*O*- (6-*O*-*E*-ferloyl) - β -*D*-glucopyranosyl] - β -*D*-galactopyranoside} in *Hedyotis diffusa* injection. **Method:** The separation of targeted compounds was performed on SunFireTM C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m) with acetonitrile-0.1% formic acid solution as the mobile phase for gradient elution. The column temperature was 30 $^{\circ}$ C and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** The method showed good linearity ($r > 0.999\ 5$) within the linear range. The recoveries were in the range of 98.1% -101.2% with RSD < 3.3%. **Conclusion:** The method is reliable, simple and reproducible, and it can be used to control the quality of *Hedyotis diffusa* injection.

[Key words] *Hedyotis diffusa* injection; HPLC; multi-components; simultaneous determination

白花蛇舌草注射液是中药材白花蛇舌草经提取而制成的灭菌水溶液,具有清热解毒、活血化瘀、消肿止痛之功效,临床上用于湿热蕴毒所致的呼吸道感染、扁桃体炎、肺炎、阑尾炎以及术后感染等的治疗,也常用于肿瘤的辅助治疗^[1-2]。白花蛇舌草中含有萜醌类、黄酮类、环烯醚萜苷类、甾醇类、酚酸类

[收稿日期] 20160308(014)
[基金项目] 河北省自然科学基金项目(B2013208018)
[通讯作者] *李存满,博士,副研究员,从事复杂体系的分离分析研究,Tel: 0311-81669045,E-mail: lcm_hebei@sina.com

化合物等^[3-4]。目前文献报道,对于白花蛇舌草注射液质量控制的指标较单一,主要是针对白花蛇舌草注射液中的一类物质的单一或 2 种成分进行测定,如对黄酮类的芦丁^[5]、酚酸类的 3, 4-二羟基苯甲酸甲酯^[6]和环烯醚萜类的去乙酰基车叶草苷酸和鸡屎藤次苷^[7]以及有机酸类的对香豆酸^[8]等;郭云珍等^[9]利用 HPLC 法同时测定了白花蛇舌草注射液中的对香豆酸(有机酸类)和反式-6-*O*-对香豆酰鸡矢藤苷甲酯(环烯醚萜类)。为了更有效控制白花蛇舌草注射液的质量,本文建立了 HPLC 同时测定白花蛇舌草注射液中两类主要物质的 5 种成分的分析方法。这 5 种成分包括环烯醚萜苷类 10-乙酰鸡矢藤苷(ASD),鸡矢藤苷甲酯(SME),去乙酰车叶草苷酸甲酯(DAME)和黄酮苷类(槲皮素-3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-*E*-阿魏酰基)- β -*D*-吡喃葡萄糖基]- β -*D*-吡喃半乳糖苷(QGS),山柰酚-3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-*E*-阿魏酰基)- β -*D*-吡喃葡萄糖基]- β -*D*-吡喃半乳糖苷(KGS))。

1 材料

Alliance 2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司,包括二极管阵列检测器)。
甲醇、乙腈(HPLC 级,美国 Fisher 公司),超纯水经美国 Millipore 公司超纯水系统制备。对照品鸟苷(GS),ASD,SME,DAME,反式-咖啡酸(CA),反式-阿魏酸(FA),QGS,KGS(中科院大连化学物理研究所提取分离,经 UV, NMR 及 MS 鉴定结构, HPLC 面积归一化法测定,纯度分别为 91.3%, 94.5%, 98.3%, 97.7%, 98.0%, 98.0%, 97.5% 和 97.1%)。

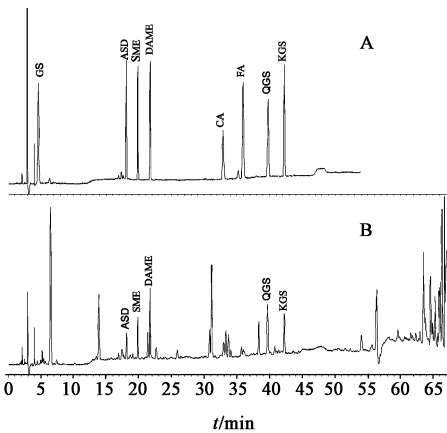
白花蛇舌草注射液(市售,批号分别为 131226D,140312,140325)。

2 方法和结果

2.1 供试品溶液的制备 精密量取白花蛇舌草注射液 0.50 mL 于 10 mL 量瓶中,用水定容至刻度,摇匀,过 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.2 色谱条件 SunFireTM C₁₈ 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m),流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 15 min, 5% ~ 15% A; 15 ~ 40 min, 15% ~ 35% A; 40 ~ 60 min, 35% ~ 75% A; 60 ~ 65 min, 75% ~ 95% A; 65 ~ 67 min, 95% A),流速 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹,柱温 30 $^{\circ}$ C,检测波长 254 nm,进样量 10 μ L。8 个对照品(GS, ASD, SME, DAME, CA, FA, QGS, KGS)混合工作溶液分离良好,但在供试品溶液中 CA 和 FA 分离不是太完全,而 GS 未检测出,

故本实验放弃了对 CA 和 FA 的定量分析。对照品混合溶液和供试品溶液的 HPLC 见图 1。



A. 对照品;B. 供试品
图 1 白花蛇舌草注射液的 HPLC
Fig. 1 HPLC chromatograms of *Hedyotis diffusa* injection

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系和检出限 分别精密量取各对照品储备液适量,置于 10 mL 量瓶中,加 30% 甲醇定容,摇匀,得混合对照品溶液,然后逐级稀释得一系列混合对照品工作溶液。按照 2.2 项下色谱条件对其进行分析,以峰面积-对照品质量浓度进行线性回归。以信噪比(S/N)为 3 计算检出限,以 S/N 为 10 计算定量限,各对照品的线性方程、线性范围、线性相关系数及检出限见表 1。各对照品线性相关系数在 0.999 5 ~ 1.000 0,说明其线性关系良好。见表 1。

表 1 5 种对照品的线性方程、线性范围、相关系数、检出限
Table 1 Linearity, regression equation and LODs of five compounds

成分	线性范围 /mg $\cdot$ L ⁻¹	线性方程	<i>r</i>	检出限 /mg $\cdot$ L ⁻¹	定量限 /mg $\cdot$ L ⁻¹
ASD	5.0 ~ 80.0	$Y = 4\,397X - 568.7$	0.999 5	0.30	1.00
SME	2.0 ~ 120.6	$Y = 6\,162.2X + 11.307$	0.999 9	0.25	0.83
DAME	1.0 ~ 120.0	$Y = 7\,143.8X - 287.60$	1.000 0	0.12	0.40
QGS	2.0 ~ 120.4	$Y = 15\,641X - 4\,995.9$	0.999 9	0.02	0.067
KGS	2.0 ~ -150.1	$Y = 12\,739X + 3\,310.0$	0.999 9	0.02	0.067

2.3.2 精密度试验 取混合对照品溶液,连续进样 6 次,记录各对照品的峰面积,其 RSD 分别为 ASD, 0.2%; SME, 1.3%; DAME, 1.5%; QGS, 1.2%; KGS, 1.1%。表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取混合对照品溶液,室温放置,分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12 h 进样分析,记录各对照

品的峰面积，其 RSD 分别为 ASD,3.1% ;SME,2.1% ;DAME,2.3% ;QGS,1.3% ;KGS,1.5%。表明各对照品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.3.4 重复性试验 按 2.1 项下方法分别制备 5 份白花蛇舌草注射液供试品溶液,按 2.2 项下方法进行 HPLC 分析,供试液中各对照品成分的含量分别为，RSD 分别为 ASD,2.0% ;SME,2.2% ;DAME,1.9% ;QGS,1.1% ;KGS,1.7。说明该方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 精密量取已知含量的白花蛇舌草注射液 0.5 mL 5 份,置于 10 mL 量瓶中,再分别精密加入各对照品溶液适量,用水定容至刻度,摇匀,作为供试品溶液,按照 2.2 项下方法进行分析,用外标法计算各相应成分的含量,并计算回收率及 RSD,见表 2。结果显示回收率在 98.1% ~ 101.2% ,RSD 均 <3.3% ,符合含量测定的准确性要求。

2.4 样品测定 取白花蛇舌草注射液样品每个批号各 3 份,分别按 2.1 项下方法制备供试品溶液,样品中 5 种待测成分的含量见表 3。

3 讨论

3.1 洗脱系统的选择 本实验对甲醇-水,乙腈-水,甲醇-水(含 0.1% 甲酸)和乙腈-水(含 0.1% 甲酸)不同洗脱系统进行了考察。结果显示以乙腈-水(含 0.1% 甲酸)为洗脱系统时,供试品中对照品分离效果较好。

3.2 色谱柱的选择 为了进一步提升分离效果,本实验考察了以下 2 种色谱柱的分离效果①Inertsil ODS-3 色谱柱 (2.1 mm × 250 mm, 5 μm);②SunFire™ C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。结果发现,SunFire™ C₁₈ 色谱柱对于 5 个对照品的分离效果较好,同时对梯度洗脱条件进行了优化。

3.3 检测波长的选择 由于环烯醚萜类的 3 种待测物 ASD,SME,DAME 的紫外最大吸收波长(λ_{max}, 介质为流动相)是在 230 ~ 240 nm,而黄酮类的 QGS,KGS 的 λ_{max} 分别为 253,269,332 nm 及 267,327 nm,综合考虑各成分的检测灵敏度,笔者选用了 254 nm 作为本实验用检测波长。

由于对照品比较难得等问题,中药材及其制剂的质量控制相对单一,缺乏多指标、多成分的综合质控方法。本实验采用 HPLC 同时测定白花蛇舌草注射液含有的 2 类主要化合物(环烯醚萜类和黄酮类)中的 5 种成分,10-乙酰鸡矢藤苷、鸡矢藤苷甲酯、去乙酰车叶草酸苷甲酯、槲皮素-3-*O*-[2-*O*-(6-

表 2 白花蛇舌草注射液中 5 种成分的加样回收率试验
Table 2 Recovery test of five compounds in *Hedyotis diffusa* injection

成分	样品中量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
ASD	46.7	45.0	91.8	100.2	98.1	1.4
	46.7	45.0	91.0	98.4		
	46.7	45.0	90.7	97.8		
	46.7	45.0	90.3	96.9		
	46.7	45.0	90.4	97.1		
SME	51.5	51.0	101.9	98.8	99.4	2.2
	51.5	51.0	103.6	102.2		
	51.5	51.0	102.2	99.4		
	51.5	51.0	100.6	96.3		
	51.5	51.0	102.7	100.4		
DAME	42.4	40.0	81.7	98.3	99.7	1.4
	42.4	40.0	83.1	101.8		
	42.4	40.0	81.9	98.8		
	42.4	40.0	82.1	99.3		
	42.4	40.0	82.6	100.5		
QGS	59.5	60.2	120.5	101.3	101.2	3.3
	59.5	60.2	122.4	104.5		
	59.5	60.2	118.7	98.3		
	59.5	60.2	122.5	104.7		
	59.5	60.2	118.1	97.3		
KGS	27.4	30.0	57.5	100.3	99.4	1.7
	27.4	30.0	57.8	101.3		
	27.4	30.0	56.9	98.3		
	27.4	30.0	56.5	97.0		
	27.4	30.0	57.4	100.0		

表 3 白花蛇舌草注射液样品中 5 种成分的含量测定
Table 3 Contents of ASE, SME, DAME, QGS and KGS in *Hedyotis diffusa* injection

批号	ASD	SME	DAME	QGS	KGS
131226D	99.0	137	76.9	137	59.3
140312	85.2	112	78.5	134	64.1
140325	93.4	103	84.9	119	54.8

O-*E*-阿魏酰基)-β-*D*-吡喃葡萄糖基]-β-*D*-吡喃半乳糖苷、山柰酚-3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-*E*-阿魏酰基)-β-*D*-吡喃葡萄糖基]-β-*D*-吡喃半乳糖苷的含量,这 5 种成分为该制剂中主要成分。利用多种指标成分测定可以综合反映制剂的内在质量,该方法可用于白花蛇舌草注射液的质量控制。本文未能对该制剂中阿魏酸和

咖啡酸进行定量分析,其分析条件还有待进一步研究,为这三类 7 种化合物甚至更多不同类指标成分同时控制白花蛇舌草注射液的质量提供分析方法。

[参考文献]

[1] 车杭盈. 白花蛇舌草注射液诱导非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡的机制研究 [J]. 中西医结合研究, 2014, 6 (2): 20-22.

[2] LI R, ZHAO H R, LIN Y N. Anti-tumor effect and protective effect on chemotherapeutic damage of water soluble extracts from *Hedyotis diffusa* [J]. J Chin Pharm Sci, 2002, 11(2): 54-58.

[3] 纪宝玉, 范崇庆, 裴莉昕, 等. 白花蛇舌草的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 235-240.

[4] 陈永康. 白花蛇舌草的化学成分研究进展 [J]. 中国实

验方剂学杂志, 2011, 17(17): 290-293.

[5] 王本富, 彭燕, 李冬, 等. HPLC 测定白花蛇舌草注射液中芦丁的含量 [J]. 华西药理学杂志, 2009, 24(5): 532-533.

[6] 马临, 李俊明, 陈玉青, 等. HPLC 法测定白花蛇舌草注射液中 3, 4-二羟基苯甲酸甲酯的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(11): 907-909.

[7] 姚鑫宁, 纪菁, 陈静, 等. HPLC 法测定白花蛇舌草注射液中去乙酰基车叶草苷酸和鸡屎藤次苷 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 580-582.

[8] 汪晓娟, 张亚中. UPLC 法测定白花蛇舌草注射液中对香豆酸的含量 [J]. 安徽医药, 2015, 19(3), 468-470.

[9] 郭云珍, 宝炉丹, 潘永玉, 等. HPLC 法同时测定白花蛇舌草注射液中 2 种成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(8): 1158-1160.

[责任编辑 顾雪竹]

欢迎订阅《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管, 中华中医药学会、中国中医科学院中药研究所主办的学术刊物。本刊创建于 1995 年 10 月, 主要设置栏目包括复方配伍专论、方剂学研究、药剂与炮制、资源与鉴定、化学分析、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘、中医传承及相关综述等。目前为 CSCD 来源期刊、中文核心期刊、科技核心期刊、RCCSE 中国学术期刊排行榜核心期刊、美国《化学文摘》统计源期刊; 并被评为中国中医药优秀期刊及中国学术期刊优秀期刊。

本刊为半月刊, 16 开本, 234 页, 标准刊号 ISSN1005-9903; CN11-3495/R。每期定价 35 元, 全年 840 元。国内外公开发行, 国内由北京市报刊发行局办理总发行, 邮发代号 2-417; 国外由中国国际图书贸易集团有限公司办理发行, 代号 SM4655, 欢迎订阅。读者还可通过本刊编辑部办理邮购, 地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 收件人: 《中国实验方剂学杂志》编辑部, 邮编 100700, Tel: (010) 84076882, E-mail: syfjx_2010@188.com, 网址: www.syfjxzz.com。