

- [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(2): 355-359; 327.
- [8] Xia L, Li B B, Lu Y, et al. Structural characterization and anticomplement activity of an acidic polysaccharide containing 3-O-methyl galactose from *Juniperus tibetica* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 132: 1244-1251.
- [9] 师景双, 袁超, 程月红, 等. 水提醇沉法提取蛹虫草多糖的工艺优化及体外抗氧化效果研究[J]. 食品与药品, 2020, 22(2): 124-129.
- [10] 来永斌, 王琦, 孙月. 蛹虫草多糖含量的测定与分析[J]. 中成药, 2001, 23(7): 51-52.
- [11] He Z, Li X, Chen Z Y, et al. Decolorization and antioxidant assay of polysaccharide from white wax scale using macroporous resin[J]. *Forest Res*, 2014, 27(1): 31-37.
- [12] Shi Y Y, Liu T T, Han Y, et al. An efficient method for decoloration of polysaccharides from the sprouts of *Toona sinensis* (A. Juss.) Roem by anion exchange macroporous resins [J]. *Food Chem*, 2017, 217: 461-468.
- [13] Cheng X H, Cheng Y W, Zhang N J, et al. Purification of flavonoids from *Carex meyeriana* Kunth based on AHP and RSM: Composition analysis, antioxidant, and antimicrobial activity[J]. *Ind Crop Prod*, 2020, 157: 112900.
- [14] Wang R S, Sun J F, Jin M, et al. Two new phenolic glycosides with anti-complementary activity from the roots of *Sanguisorba officinalis* L[J]. *Nat Prod Res*, 2020, 35(22): 4423-4432.
- [15] Hu Z Y, Zhou H L, Li Y P, et al. Optimized purification process of polysaccharides from *Carex meyeriana* Kunth by macroporous resin, its characterization and immunomodulatory activity[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 132: 76-86.
- [16] Wang Y F, Shu X, Chen Y Y, et al. Enrichment, purification and *in vitro* antioxidant activities of polysaccharides from *Umbilicaria esculenta* macrolichen [J]. *Biochem Eng J*, 2018, 130: 10-20.
- [17] Desbrieres J. Viscosity of semiflexible chitosan solutions: Influence of concentration, temperature, and role of intermolecular interactions [J]. *Biomacromolecules*, 2002, 3(2): 342-349.
- [18] 刘伟, 刘倩楠, 张良, 等. 草莓多糖树脂法脱色工艺优化及其化学性质研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(10): 38-46; 51.
- [19] 张春燕, 吴美儒, 周毅峰, 等. 利用大孔树脂对莼菜多糖脱色的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(15): 154-157; 164.

HPLC法同时测定不同厂家断血流制剂中3种成分

田京歌, 倪倩, 周娟娟, 冯有龙

(江苏省食品药品监督检验研究院, 江苏南京 210019)

摘要: 目的 建立HPLC法同时测定断血流软胶囊、胶囊、片剂中香蜂草苷、蒙花苷、醉鱼草皂苷IVb的含量。
方法 该药物75%乙醇提取液的分析采用Agilent 5 TC-C₁₈₍₂₎色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相甲醇-水, 梯度洗脱;体积流量1.0 mL/min;柱温30℃;检测波长250、283、330 nm。
结果 香蜂草苷、蒙花苷、醉鱼草皂苷IVb分别在10.39~103.9、10.50~105.0、9.985~99.85 μg/mL范围内线性关系良好($r=0.9999$), 平均加样回收率分别为99.37%、99.73%、100.31%, RSD分别为1.11%、1.20%、1.43%。
结论 该方法简便准确, 重复性好, 可用于断血流制剂的质量控制。

关键词: 断血流软胶囊; 断血流胶囊; 断血流片; 香蜂草苷; 蒙花苷; 醉鱼草皂苷IVb; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)06-1978-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.038

断血流为唇形科植物荫风轮或风轮菜的干燥地上部分^[1], 功效清热解毒、凉血止血活血, 其化学成分主要有黄酮、皂苷、挥发油等。研究表明, 断血流醇提物有小剂量止血、大剂量活血的双向作用, 其代表性成分是黄酮、皂苷^[2-4]; 文献[5-6]报道, 不同产地该植物中总黄酮含量为2.09%~2.32%, 总皂苷含量为1.29%~2.13%。

目前, 断血流相关制剂主要有胶囊剂、片剂、颗粒剂等, 但其质量控制标准仅以醉鱼草皂苷IVb为指标^[1,7-8], 并且相关文献对其皂苷类成分的研究较多, 鲜有涉及黄酮类成分。因此, 本实验首次对断血流软胶囊、胶囊、片剂中香蜂草苷、蒙花苷、醉鱼草皂苷IVb含量同时进行测定, 以期为该类制剂全面质量控制研究提供参考。

收稿日期: 2022-06-25

基金项目: 江苏省市场监管局2020年度第2批科技计划项目(KJ204121)

作者简介: 田京歌(1988—), 男, 硕士, 主管药师, 从事药品检验与质量研究。Tel: (025) 86251210, E-mail: tianjingge2011@163.com

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); BS21S 型电子天平 (北京赛多利斯天平有限公司)。

1.2 试剂与药物 醉鱼草皂苷IVb (批号 110782-200602, 纯度 99.5%)、蒙花苷 (批号 111528-201710, 纯度 96.6%) 对照品均购于中国食品药品检定研究院; 香蜂草苷 (批号 J5690010, 纯度>98%) 对照品购于上海安谱实验科技股份有限公司。断血流软胶囊购于江苏康缘药业股份有限公司; 断血流胶囊、片剂均购于药店。甲醇、乙腈为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent 5 TC-C₁₈₍₂₎ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相甲醇 (A)-水 (B), 梯度洗脱 (0~5 min, 40% A; 5~30 min, 40%~50% A; 30~40 min, 50% A; 40~65 min, 50%~90% A; 65~73 min, 90% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 283 nm (香蜂草苷)、330 nm (蒙花苷)、250 nm (醉鱼草皂苷IVb); 进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 供试品溶液 取软胶囊 10 粒, 倾出内容物混匀, 精密称取 0.25 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 乙醇 20 mL, 称定质量, 水浴加热回流 30 min, 放冷, 75% 乙醇补足减失的质量, 摆匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

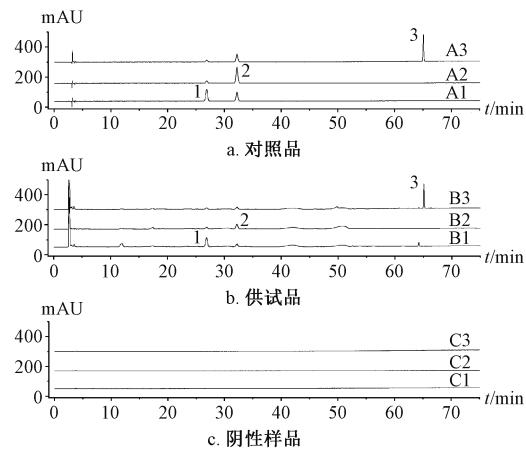
2.2.2 对照品溶液 精密称取香蜂草苷、蒙花苷、醉鱼草皂苷IVb (置于盛有五氧化二磷的减压干燥器中干燥 12 h) 对照品适量, 75% 乙醇制成质量浓度分别为 1.039、1.050、0.9985 mg/mL 的溶液, 即得。

2.2.3 阴性样品溶液 取不含断血流的阴性样品适量 (辅料基质), 按“2.2.1”项下方法制备, 即得。

2.3 专属性试验 精密量取对照品、供试品、阴性样品溶液各 10 μL, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 结果见图 1。由此可知, 阴性无干扰, 主峰保留时间分别在 27、32、65 min 左右, 理论塔板数按醉鱼草皂苷IVb 峰计均大于 3 000, 表明该方法专属性良好。

2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液适量, 置于 10 mL 量瓶中, 75% 乙醇稀释成分别含香蜂草苷 10.39、20.78、31.17、41.56、51.95、103.9 μg/mL, 蒙花苷 10.50、21.00、31.50、42.00、52.50、105.0 μg/mL, 醉鱼草皂苷IVb 9.985、19.97、29.95、39.94、49.92、99.85 μg/mL 的溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归, 得到回归方程分别为香蜂草苷 $Y = 17.3359X + 2.4632$ ($r = 0.9999$), 在 10.39~103.9 μg/mL 范围内线性关系良好; 蒙花苷 $Y = 23.3649X - 3.3371$ ($r = 0.9999$), 在 10.50~105.0 μg/mL 范围内线性关系良好; 醉鱼草皂苷IVb $Y = 16.6414X + 10.1843$ ($r = 0.9999$), 在 9.985~99.85 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验 取同一份供试品溶液, 在“2.1”项色



注: A1、B1、C1 检测波长为 283 nm, A2、B2、C2 检测波长为 330 nm, A3、B3、C3 检测波长为 250 nm。

1. 香蜂草苷 2. 蒙花苷 3. 醉鱼草皂苷IVb

图 1 各成分 HPLC 色谱图

谱条件下进样测定 6 次, 测得香蜂草苷、蒙花苷、醉鱼草皂苷IVb 峰面积 RSD 分别为 1.37%、1.28%、1.27%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 精密称取软胶囊 6 份, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得香蜂草苷、蒙花苷、醉鱼草皂苷IVb 含量 RSD 分别为 1.78%、1.64%、1.61%, 表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 室温 (25 °C) 下于 0、2、4、6、8、10、12 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得香蜂草苷、蒙花苷、醉鱼草皂苷IVb 峰面积 RSD 分别为 1.41%、1.75%、1.81%, 表明溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 取各成分含量已知的软胶囊 6 份, 每份约 0.125 g, 精密称定, 精密加入适量对照品, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 计算回收率, 结果见表 1。

2.9 耐用性试验 取同一份供试品溶液, 在不同柱温 (25、35 °C)、体积流量 (0.9、1.1 mL/min)、流动相比例 (38 : 62 ~ 42 : 58)、色谱柱 [Agilent 5 TC-C₁₈₍₂₎、Phenomenex Luna C₁₈₍₂₎、Waters Symmetry C₁₈] 下, 测得香蜂草苷、蒙花苷、醉鱼草皂苷IVb 含量 RSD 分别为 1.20%、1.94%、1.01%, 表明该方法耐用性良好。

2.10 样品含量测定 取不同厂家样品, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 计算含量, 结果见表 2。

3 讨论

3.1 提取方法选择 本实验考察了不同提取溶剂 (甲醇、50% 乙醇、75% 乙醇、乙醇)、提取方式 (超声、水浴回流)、提取时间 (30、60、90 min), 最终确定提取条件为 75% 乙醇水浴回流提取 30 min。

3.2 流动相选择 本实验考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 磷酸、乙腈-0.1% 磷酸, 发现以甲醇-水洗脱时各成分

表1 各成分加样回收率试验结果 (n=6)

成分	取样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
香蜂草苷	0.121 6	0.790 6	0.817 7	1.612 3	100.48	99.37	1.11
	0.123 9	0.805 6	0.817 7	1.618 5	99.41		
	0.125 8	0.818 0	0.817 7	1.650 3	98.02		
	0.124 4	0.808 9	0.817 7	1.626 6	100.01		
	0.124 5	0.809 5	0.817 7	1.611 2	98.04		
	0.124 6	0.810 2	0.817 7	1.630 2	100.28		
蒙花苷	0.121 6	0.317 9	0.325 0	0.641 8	99.66	99.73	1.20
	0.123 9	0.324 0	0.325 0	0.652 0	100.95		
	0.125 8	0.328 9	0.325 0	0.647 2	97.93		
	0.124 4	0.325 3	0.325 0	0.649 6	99.80		
	0.124 5	0.325 5	0.325 0	0.647 1	98.95		
	0.124 6	0.325 8	0.325 0	0.654 3	101.08		
醉鱼草皂苷IVb	0.121 6	0.871 8	0.889 9	1.776 6	101.67	100.31	1.43
	0.123 9	0.888 3	0.889 9	1.775 5	99.69		
	0.125 8	0.901 9	0.889 9	1.799 0	100.80		
	0.124 4	0.891 9	0.889 9	1.800 4	102.09		
	0.124 5	0.892 6	0.889 9	1.769 6	98.55		
	0.124 6	0.893 3	0.889 9	1.775 0	99.07		

表2 各成分含量测定结果 [mg/粒(片), $\bar{x}\pm s$, n=3]

制剂	厂家	香蜂草苷	蒙花苷	醉鱼草皂苷IVb
断血流软胶囊	江苏康缘药业股份有限公司	4.22±0.08	1.70±0.03	4.66±0.07
断血流胶囊	吉林省银诺克药业有限公司	5.74±0.06	1.20±0.02	2.24±0.04
断血流胶囊	江西银涛药业有限公司	12.57±0.23	1.37±0.02	1.71±0.02
断血流胶囊	江苏晨牌药业集团股份有限公司	13.61±0.25	1.67±0.03	2.49±0.02
断血流胶囊	长春银诺克药业有限公司	4.55±0.08	0.97±0.02	2.07±0.04
断血流胶囊	芜湖张恒春药业有限公司	11.57±0.17	1.40±0.02	1.57±0.03
断血流胶囊	吉林敖东集团力源制药股份有限公司	8.70±0.07	1.42±0.02	1.89±0.02
断血流片	安庆回音必制药股份有限公司	4.80±0.02	1.50±0.01	2.06±0.02

分离度较好, 色谱柱损耗小, 易于配制, 故以其为流动相。

3.3 检测波长选择 本实验对各成分对照品溶液进行紫外吸收全波长扫描, 最终分别以 283、330、250 nm 为检测波长。

3.4 含量分析 不同厂家断血流制剂中各成分含量差异较大, 以香蜂草苷最明显。另外, 除了软胶囊外其余厂家样品中香蜂草苷含量均大于醉鱼草皂苷IVb, 蒙花苷含量均不低于醉鱼草皂苷IVb 含量的一半。

4 结论

断血流制剂具有多种药理活性^[3-4,9], 临幊上广泛用于治疗出血性症状^[10-12], 黄酮类成分作为该类制剂含量较高的物质, 有可能成为其质量控制指标之一。本实验建立HPLC 法同时测定断血流软胶囊、胶囊、片剂中香蜂草苷、蒙花苷、醉鱼草皂苷IVb 含量, 该方法简便准确, 重复性好, 可为全面提高该类制剂质量控制标准提供实验依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 340.
- [2] 陈靖宇. 风轮菜属植物荫风轮和风轮菜的有效成分研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 1997.
- [3] 朱海琳, 孟兆青, 丁 岗, 等. 断血流的研究进展 [J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2013, 15(9): 2002-2010.
- [4] 刘 遥, 刘丽敏, 熊远根, 等. 风轮菜属植物研究进展

[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(18): 4349-4357.

[5] 年四辉, 刘丽敏, 廖启元, 等. 断血流及其制剂中总黄酮的含量测定研究 [J]. 中国民族民间医药, 2012, 21(4): 37-38.

[6] 皆丽霞. 超声提取-分光光度法测定断血流总皂苷含量 [J]. 西北大学学报 (自然科学版), 2007, 37(6): 1016-1018.

[7] 王振中, 周恩丽, 徐连明. HPLC 测定断血流软胶囊中断血流皂苷 A 的含量 [J]. 中成药, 2008, 30(11): 1726-1727.

[8] 林凡友, 孙永喜, 陈仁燕. HPLC 法测定断血流口服液中断血流皂苷 A 的含量 [J]. 药学研究, 2020, 39(9): 517-519.

[9] Zhang H J, Chen R C, Sun G B, et al. Protective effects of total flavonoids from *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Ktze on myocardial injury *in vivo* and *in vitro* via regulation of Akt/Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Phytomedicine*, 2018, 40: 88-97.

[10] 张冬玲, 何极衡, 黄 雁, 等. 基于系统药理学分析断血流治疗出血性疾病的机制 [J]. 西北药学杂志, 2020, 35(6): 839-845.

[11] 李 征. 改良 B-Lynch 缝合术联合断血流颗粒治疗剖宫产术后出血疗效观察 [J]. 新乡医学院学报, 2017, 34(5): 402-404.

[12] 刘丽娜, 危娟萍, 赖春红. 米非司酮联合断血流对药物流产后孕妇进行预防性治疗的临床研究 [J]. 药品评价, 2019, 16(21): 70-71.