

RP-HPLC 法测定乙肝宁颗粒中 3 种成分的含量

赵中霞¹, 刘宏¹, 陈海霞¹, 高向群², 蔡亚琳³ (1. 石家庄市第八医院精神五科, 石家庄 050081; 2. 石家庄市第三医院药剂科, 石家庄 050000; 3. 河北医科大学附属第二医院药剂科, 石家庄 050000)

摘要:目的 建立能同时测定乙肝宁颗粒中绿原酸、槲皮素和咖啡酸含量的 RP-HPLC 法。方法 乙肝宁样品经超声提取后, 采用 Phenomenex SuperLu C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 液相色谱柱; 柱温: 25 °C; 检测波长: 341 nm; 进样体积: 20 μL。流动相: 乙腈(A)-3 mL·L⁻¹ 磷酸(B), 梯度洗脱: 0~5 min, 7% A; 5~26 min, 7% A~65% A; 26~28 min, 65% A~7% A; 28~35 min, 7% A。结果 3 种待测成分质量浓度分别在 3.872~387.200、2.991~299.100、0.399~39.920 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好, r^2 均大于 0.999 0; 平均回收率分别为 100.72%、100.15%、99.71%; 重复性和精密度的 RSD 值($n=6$)均小于 5.0%。结论 该方法操作简单、准确度高、重复性好, 适用于乙肝宁颗粒中 3 种成分的含量测定。

关键词: 乙肝宁颗粒; 绿原酸; 槲皮素; 咖啡酸

DOI: 10.3969/j.issn.1004-2407.2021.04.009

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1004-2407(2021)04-0560-04

Determination of 3 components in Yiganning Granules by RP-HPLC

ZHAO Zhongxia¹, LIU Hong¹, CHEN Haixia¹, GAO Xiangqun², CAI Yalin³ (1. The Fifth Department of Psychiatry, Shijiazhuang Eighth Hospital, Shijiazhuang 050081, China; 2. Department of Pharmacy, Shijiazhuang Third Hospital, Shijiazhuang 050000, China; 3. Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: Objective To establish an analytical method for the determination of chlorogenic acid, quercetin and caffeic acid in Yiganning Granules by RP-HPLC. **Methods** Yiganning Granules samples were treated by ultrasonic extraction. Phenomenex SuperLu C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was selected as chromatographic column. The column temperature was 25 °C. The detection wavelength was 341 nm and sample injection volume was 20 μL. Acetonitrile (A)-3 mL·L⁻¹ phosphoric acid (B) was used as the mobile phase in a gradient elution mode. The gradient elution procedure was as follows: 0-5 min 7% A, 5-26 min 7% A-65% A, 26-28 min 65% A-7% A, 28-35 min 7% A. **Results** The 3 components showed good linear relationships in the concentration ranges of 3.872-387.200, 2.991-299.100 and 0.399-39.920 μg·mL⁻¹, with correlation coefficients (r^2) all above 0.999 0. The average recoveries were 100.72%, 100.15% and 99.71%, respectively with RSD of repeatability and precision less than 5.0% ($n=6$).

Conclusion The method is simple, accurate and reproducible, which is suitable for the determination of the 3 components in Yiganning Granules.

Key words: Yiganning Granules; chlorogenic acid; quercetin; caffeic acid

慢性乙型肝炎是我国常见的慢性传染病之一, 严重危害人民健康, 中药制剂治疗慢性乙型肝炎在我国应用广泛^[1]。乙肝宁颗粒是由黄芪、金钱草、茵陈、蒲公英、制何首乌、牡丹皮和川楝子等 13 味药材经煎煮、过滤、浓缩、制粒等工艺加工制成的中药颗粒剂, 具有补气健脾、活血化瘀、清热解毒的功效, 临床主治慢性肝炎, 属脾气虚弱、血瘀阻络、湿热毒蕴证, 症见胁痛、腹胀、乏力、尿黄, 对急性肝炎属上述证候者有一定疗效; 方中茵陈有清利湿热、利胆退黄等功效^[2-5], 金钱草有利湿退黄、利尿通淋、解毒消肿等功效^[6-9], 蒲公英有清热解毒、消肿散结、利尿通淋等功效^[10-13]; 由于我国慢性乙型肝炎患者众多, 乙肝宁颗粒临床应用极为广泛, 因此加强对乙肝宁颗粒中药制剂的质量控制, 具有积极意义^[14-21]; 乙肝宁颗粒收载于《中国药典》2020 年版中, 质量标准中采用蒸发光散射检测器测定^[22] 黄芪甲苷, 含量测定项目单一, 不能更好地控制乙肝宁颗粒的产品质量; 故本研究采用

RP-HPLC 法测定乙肝宁颗粒中绿原酸、槲皮素和咖啡酸的含量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 1260 Infinity II 型高效液相色谱仪, 包括 G1322A 型在线脱气机、G1329A 型自动进样器、G1314B 型 PDA 检测器、OPEN-LAB 色谱工作站 (美国安捷伦公司); Phenomenex SuperLu C₁₈ 液相色谱柱 (美国菲罗门公司); FA2104 型电子分析天平 (上海润昕公司); KQ-600BY 型超声波清洗机 (济宁科强超声检测仪器有限公司); Milli-Q A10 型超纯水处理器 (美国密理博公司)。

1.2 试剂 乙肝宁颗粒 (规格: 17 g·袋⁻¹, 批号分别为 20181106、20190305、20190415), 九芝堂股份有限公司。对照品: 绿原酸 (批号 110753-201817, 质量分数为 96.8%), 槲皮素 (批号 100081-201610, 质量分数为 99.8%), 咖啡酸 (批号 110885-201703, 质量分数为 99.7%), 均购自中国食品药品检定研究院。

<http://XBYZ.cbpt.cnki.net>

甲醇、乙腈为色谱纯,购自美国 Merck 公司;其他试剂均为分析纯,国药集团化学试剂厂;实验用水为自制超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Phenomenex SuperLu C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)。流动相:乙腈(A)-3 mL·L⁻¹磷酸(B),梯度洗脱(0~5 min,7% A;5~26 min,7% A~65% A;26~28 min,65% A~7% A;28~35 min,7% A);检测波长:341 nm;流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:25 °C;进样量:20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品储备液 取3种成分对照品,加体积分数为75%的甲醇制备成质量浓度分别为3 872、2 991、399.2 μg·mL⁻¹的单一对照品溶液,精密移取3种单一对照品溶液各1.0 mL,置于10 mL量瓶中,加体积分数为75%的甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 混合对照品溶液 精密量取2.2.1项下制备的混合对照品储备液1.0 mL,置于10 mL量瓶中,加体积分数为75%的甲醇定容至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 供试品溶液 取乙肝宁颗粒,研成细粉,混匀,精密称取1.0 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入体积分数为75%的甲醇20 mL,称定质量,超声处理20 min(超声功率200 W,频率60 Hz),放冷至室温,再称定质量,用体积分数为75%的甲醇补足减失的质量,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性对照溶液 根据乙肝宁颗粒制备方法和药材配比比例,按照2.2.3项下方法制备缺茵陈、金钱草和蒲公英的单一阳性对照溶液以及分别缺少3种药材的阴性对照溶液。

2.2.5 空白溶液 按照2.2.3项下方法制备不含供试品的空白溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性实验 取2.2项下制备的混合对照品溶液、供试品溶液,按照2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。理论塔板数按照绿原酸峰计算应不低于2 000,分离度均大于1.5,基线分离良好。见图1。

2.3.2 专属性实验 分别取2.2项下制备的混合对照品溶液、阴性对照溶液和供试品溶液,按照2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果发现,阴性对照溶液在与绿原酸、槲皮素和咖啡酸相同保留时间处无干扰峰,表明该方法专属性良好。见图1。

2.3.3 线性关系考察 精密量取2.2.1项下制备的混合对照品储备液,分别加体积分数为75%的甲醇

定容至刻度,摇匀,制成系列混合对照品溶液;按照2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图;以待测成分峰面积为纵坐标(y)、质量浓度为横坐标(x)进行线性回归,绘制标准曲线。结果见表1。

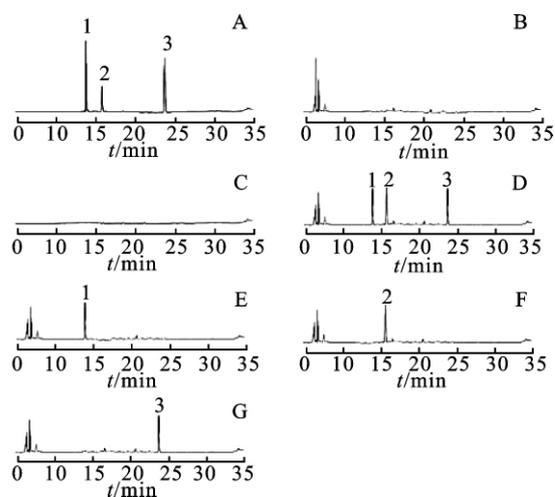


图1 HPLC图

A. 混合对照品溶液;B. 阴性对照溶液;C. 空白溶液;D. 供试品溶液;E. 缺茵陈药材溶液;F. 缺金钱草药材溶液;G. 缺蒲公英药材溶液;1. 绿原酸;2. 咖啡酸;3. 槲皮素。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A. mixed reference substance solution; B. negative reference substance solution; C. blank solution; D. sample solution; E. artemisiae negative reference solution; F. lysimachiae negative reference solution; G. taraxaci negative reference solution; 1. chlorogenic acid; 2. caffeic acid; 3. quercetin

表1 3种成分线性方程、线性范围及相关系数

Tab. 1 Linear equations, linear ranges and correlation coefficients of the 3 components

待测成分	线性方程	线性范围 /μg·mL ⁻¹	r ²
绿原酸	$y_1 = 342.883x_1 + 215.279$	3.872~387.200	0.999 2
咖啡酸	$y_2 = 229.506x_2 + 302.148$	2.991~299.100	0.999 1
槲皮素	$y_3 = 31.617x_3 + 263.714$	0.399~39.920	0.999 0

2.3.4 回收率实验 取乙肝宁颗粒(批号20181106),研成细粉,混匀,精密称取1.0 g,共6份,置于具塞锥形瓶中;分别加入2.2.1项下制备的3种单一对照品溶液,后续按照2.2.3项下方法进行前处理,得加标供试品溶液6份,按照2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,根据峰面积计算3种成分的平均回收率,结果见表2。

2.3.5 稳定性实验 取乙肝宁颗粒(批号20181106),按照2.2.3项下方法制备供试品溶液,室温下放置0、2、4、6、12、24 h,按照2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,计算得3种成分峰面积RSD值分别为1.5%、1.2%、1.8%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

表2 回收率实验结果 ($n=6$)Tab. 2 The results of recovery test ($n=6$)

成分	称样量/mg	原含量/mg	加入量/mg	检测量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
绿原酸	0.997 5	0.573 4	0.482 0	1.041 1	97.03	100.72	2.6
	1.114 3	0.492 2	0.482 0	0.986 4	102.53		
	1.034 2	0.528 3	0.482 0	1.015 3	101.04		
	0.978 1	0.553 5	0.482 0	1.044 3	101.83		
	1.006 8	0.519 8	0.482 0	0.992 2	98.01		
	1.063 1	0.507 6	0.482 0	1.008 2	103.86		
咖啡酸	0.997 5	2.147 4	1.996 0	4.124 2	99.04	100.15	0.8
	1.114 3	2.016 8	1.996 0	4.021 1	100.42		
	1.034 2	1.993 1	1.996 0	3.977 7	99.43		
	0.978 1	1.875 7	1.996 0	3.874 6	100.15		
	1.006 8	2.077 9	1.996 0	4.101 2	101.37		
	1.063 1	1.951 3	1.996 0	3.956 8	100.48		
槲皮素	0.997 5	1.103 1	0.997 0	2.122 3	102.23	99.71	1.7
	1.114 3	1.118 2	0.997 0	2.115 7	100.05		
	1.034 2	1.057 4	0.997 0	2.028 4	97.39		
	0.978 1	1.120 3	0.997 0	2.106 1	98.88		
	1.006 8	1.081 3	0.997 0	2.085 6	100.73		
	1.063 1	1.106 2	0.997 0	2.092 8	98.96		

2.3.6 重复性实验 取同一批次乙肝宁颗粒(批号20181106),按照2.2.3项下方法制备供试品溶液,按照2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,计算3种待测成分的含量,根据6次检测结果计算RSD值。结果3种成分含量的RSD值分别为1.9%、1.6%、2.1%,

表明该方法重复性良好。

2.3.7 精密度实验 取2.2.2项下制备的混合对照品溶液,按照2.1项下色谱条件进样测定,连续进样6次,记录色谱图;根据6次峰面积测定值计算RSD值,结果3种成分峰面积RSD值分别为1.7%、1.3%、2.0%,表明仪器精密度良好。

2.4 样品含量检测 取乙肝宁颗粒,按照2.2.3项下方法制备供试品溶液,按照2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,根据峰面积计算样品中3种成分的含量,结果见表3。

表3 含量检测结果

Tab. 3 The results of content determination

样品批号	含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$		
	绿原酸	咖啡酸	槲皮素
20181106	0.524	2.116	1.201
20190305	0.619	2.327	1.048
20190415	0.597	2.194	1.175

3 讨论

3.1 检测波长的选择 分别取3种成分对照品,按照2.2.1项下方法配制成质量浓度均为 $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单一对照品溶液,在200~400 nm波长范围内进行全波长扫描,结果3种成分分别在328、324、359 nm波长处有最大吸收。分别取2.2项下制备的混合对照品溶液、阴性对照溶液和供试品溶液,按照2.1项下色谱条件,设定采集波长范围为320~360 nm,分别采集色谱图;实验证明,检测波长为341 nm时,3种待测成分响应良好,定量结果准确,阴性对照无干扰。光谱图见图2。

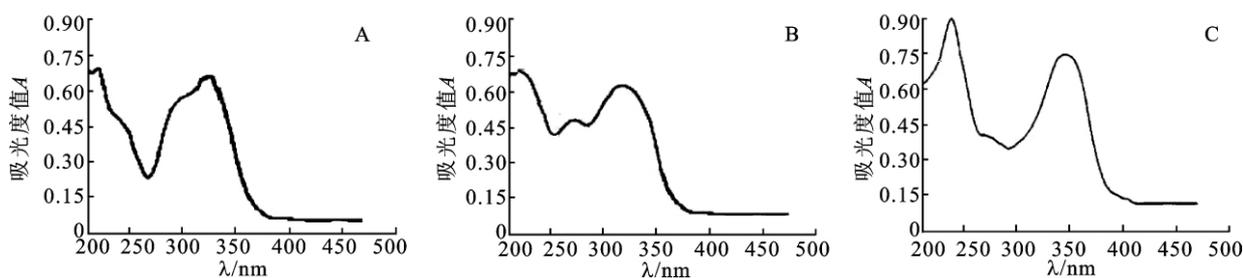


图2 紫外光谱图

注:A. 绿原酸;B. 咖啡酸;C. 槲皮素。

Fig. 2 UV spectra

Notes: A. chlorogenic acid; B. caffeic acid; C. quercetin.

3.2 流动相的选择 保持其他色谱条件不变,分别选择甲醇-水、乙腈-水、甲醇-3 mL·L⁻¹磷酸和乙腈-3 mL·L⁻¹磷酸作为流动相体系进行比较,结果采用等度条件时,待测成分与未知杂质峰重叠,且分析时间较长,故实验采用梯度洗脱法。选择乙腈-3 mL·L⁻¹磷酸作为流动相时,3种成分色谱峰形尖

锐,分离度均大于1.5,阴性对照溶液无干扰。因此实验选择乙腈-3 mL·L⁻¹磷酸作为流动相。

3.3 提取方法的选择 实验分别选择甲醇以及体积分数分别为95%、75%、50%的甲醇作为提取溶剂,超声10、15、20、25、30 min进行提取效果比较,结果发现,采用体积分数为75%的甲醇超声20 min时,

对乙肝宁颗粒中3种成分的提取效果最佳,提取率大于90%,且基质干扰较小,定量结果准确。

综上所述,本研究建立了能同时测定乙肝宁颗粒中3种成分含量的RP-HPLC法,该方法操作简单、检测结果准确、重复性好、稳定性高,可用于乙肝宁颗粒的质量控制,为国家标准的完善提供参考。

参考文献:

- [1] 蓝熠. 乙肝宁颗粒微生物限度检查法验证研究[J]. 饮食保健, 2017, 4(16): 49-50.
- [2] 王守军. 药用植物茵陈的化学成分及药理研究[J]. 系统医学, 2019, 4(9): 149-150, 153.
- [3] 骆云, 余毅. 不同产地茵陈高效液相色谱法对绿原酸含量的检测分析[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(30): 170-171.
- [4] 张淑霞, 霍文博, 苏莹, 等. 茵陈提取物对糖尿病大鼠肾组织中PTEN蛋白表达的影响及其肾脏保护作用[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2019, 45(4): 779-783.
- [5] 杨艳秋, 刘森, 王丹, 等. 绿原酸改善 db/db 小鼠血管内皮功能障碍的作用初探[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(3): 400-405.
- [6] 黄彭, 曲佳琳, 常乐, 等. 金钱草治疗胆囊相关疾病作用机制的网络药理学研究[J]. 中国药房, 2019, 30(9): 1220-1225.
- [7] 陶婷婷, 赵凡, 叶妙勇, 等. 金钱草总黄酮对草酸钙结石模型大鼠肾组织骨桥蛋白表达的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2019, 29(8): 623-626.
- [8] 杜毅, 丁德英, 吕磊, 等. 基于GC-MS技术的金钱草干预结晶肾损伤小鼠血清代谢组学研究[J]. 药学实践杂志, 2019, 37(4): 332-336.
- [9] 黄超, 黄庆华, 尤荻, 等. 槲皮素在创伤性脑损伤治疗中潜在分子机制和临床应用的可行性[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(23): 3760-3766.
- [10] 金伟, 高俊, 蒋中仁, 等. 蒲公英提取物缓解小鼠体力疲

- 劳实验研究[J]. 预防医学情报杂志, 2019, 35(3): 280-283.
- [11] 刘民厚. 蒲公英铁观音茶汤坐浴治疗慢性前列腺炎[J]. 中国民间疗法, 2019, 27(8): 85.
- [12] 赵峻秀, 蔡文卓, 蔡瑜, 等. 金银花、益母草和蒲公英提取液对胰脂肪酶活性的影响[J]. 吉林医药学院学报, 2019, 40(2): 81-85.
- [13] 姚娜, 黄燕明, 李雪银, 等. HPLC同步测定泽兰配方颗粒指纹图谱与咖啡酸、迷迭香酸含量[J]. 中医药信息, 2019, 36(4): 26-29.
- [14] 王冬艳, 肖望书, 陈雁, 等. HPLC法测定蒲地蓝口服液中咖啡酸的含量[J]. 临床医药实践, 2019, 28(3): 218-221.
- [15] 叶方, 梅琼, 黄良永, 等. HPLC法同时测定毛连菜中咖啡酸和木犀草苷含量[J]. 中国药师, 2019, 22(3): 558-560.
- [16] 桂兰, 于瑞涛, 吴楠, 等. HPLC法同时测定乳白香青中3种黄酮醇苷[J]. 中成药, 2019, 41(1): 214-216.
- [17] 高敏, 白音夫, 周雪梅, 等. HPLC法同时测定民族习用药材猫眼草中金丝桃苷、槲皮素苷的含量分析[J]. 内蒙古医科大学学报, 2019, 41(2): 166-168, 174.
- [18] 武秀丽. RP-HPLC法同时测定野菊花中绿原酸、木犀草苷和蒙花苷的含量[J]. 临床研究, 2019, 27(5): 1-4.
- [19] 陈雪琴, 贾文江, 周仔莉, 等. 五灵脂的质量标准研究[J]. 西北药学杂志, 2019, 34(4): 469-473.
- [20] 刘东东, 孟盈盈, 叶军, 等. 绿原酸长循环脂质体中绿原酸含量测定方法的建立[J]. 中国药师, 2019, 22(3): 429-433.
- [21] 徐向平, 胡展晴, 叶惠焯, 等. 金梅清暑颗粒的定性定量方法研究[J]. 西北药学杂志, 2019, 34(1): 9-12.
- [22] 国家药典委员会. 中国药典: 2020年版: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 448-449.

(收稿日期: 2020-10-15)

《西北药学杂志》编辑部 2020 年度获佳绩

2020年度,《西北药学杂志》编辑部按期完成目标任务,出版6期,发表论文210篇,连续被中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)收录。

《西北药学杂志》编辑部2020年度获评多项奖(见表1)。编辑部人员将继续努力,再接再厉,不断提高期刊质量。

表1 《西北药学杂志》编辑部 2020 年度获奖情况

序号	期刊名称/编辑姓名	获奖名称	授奖单位
1	西北药学杂志	中国高校优秀科技期刊	中国高校科技期刊研究会
2	西北药学杂志	第六届陕西省科技期刊优秀期刊	陕西省科技期刊编辑学会
3	西北药学杂志	陕西省高校优秀期刊	陕西省高等学校学报研究会
4	西北药学杂志	高校期刊优秀编辑部	陕西省高等学校学报研究会
5	屈清慧	第六届陕西省科技期刊优秀编辑	陕西省科技期刊编辑学会
6	屈清慧	高校期刊优秀编辑	陕西省高等学校学报研究会
7	屈清慧	优秀药师	西安药学会
8	屈清慧	优秀论文二等奖	陕西省高等学校学报研究会
9	屈清慧等	优秀论文二等奖	西安药学会

<http://XBYZ.cbpt.cnki.net>