

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.15.020

高效液相色谱法同时测定和肝利胆颗粒中3种黄酮类成分含量*

吴远波, 吴克勤, 刘宇政, 王伟, 吴靓, 张鸿[△]

(江西省医学科学院, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 建立同时测定和肝利胆颗粒中柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷3种黄酮类成分含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.2%磷酸溶液(20:80, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 283 nm, 柱温为 20℃, 进样量为 10 μL。结果 柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷的进样量分别在 0.039 98~0.799 60 μg, 0.039 94~0.798 80 μg, 0.099 58~1.991 60 μg 范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.999 5$, $n=6$); 精密度、重复性、稳定性试验的 RSD 均不超过 2.0% ($n=6$); 平均回收率分别为 101.26%, 98.74%, 98.08%, RSD 分别为 1.21%, 0.78%, 1.26% ($n=6$)。结论 该方法操作简便, 结果准确, 重复性好, 可用于同时测定和肝利胆颗粒中柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷3种黄酮类成分的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 和肝利胆颗粒; 柚皮苷; 新橙皮苷; 黄芩苷; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)15-0071-03

Simultaneous Determination of Three Flavonoids in Hegan Lidan Granules by HPLC

WU Yuanbo, WU Keqin, LIU Yuzheng, WANG Wei, WU Jing, ZHANG Hong

(Jiangxi Academy of Medical Science, Nanchang, Jiangxi, China 330006)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography(HPLC) method for the simultaneous determination of three flavonoids(naringin, neohesperidin and baicalin) in Hegan Lidan Granules. **Methods** The chromatographic column was Agilent Zorbax SB C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution(20:80, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 283 nm, the column temperature was 20℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of naringin, neohesperidin and baicalin were 0.039 98-0.799 60 μg, 0.039 94-0.798 80 μg, 0.099 58-1.991 60 μg, respectively($r \geq 0.999 5$, $n=6$). The RSDs of precision, repeatability and stability tests were less than 2.0% ($n=6$). The average recoveries of naringin, neohesperidin and baicalin were 101.26%, 98.74%, 98.08% with RSDs of 1.21%, 0.78%, 1.26% ($n=6$), respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the simultaneous determination of three flavonoids(naringin, neohesperidin and baicalin) in Hegan Lidan Granules.

Key words: HPLC; Hegan Lidan Granules; naringin; neohesperidin; baicalin; content determination

和肝利胆颗粒是由金钱草、茵陈、枳壳(炒)、黄芩等8味中药制成的颗粒剂,具有清热利湿、舒肝理气功效,用于治疗急性黄疸型肝炎、慢性肝炎活动期、急性胆囊炎^[1],是治疗肝胆病的常用药^[2]。现行标准收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第七册)》^[1],但仅有化学鉴别项,无含量测定项,质量控制水平低,难以有效控制产品质量。枳壳、黄芩为方中主药,枳壳的有效成分为柚皮苷、新橙皮苷^{[3]246},黄芩的有效成分为黄芩苷^{[3]301},均为黄酮类成分,且含量较高,均为药材的质控指标。参考文献[4-6],柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷可在同一条件下被检出。已有对黄芩中的黄芩苷^[7],对栀子、黄芩中的栀子苷和黄芩苷^[2],以及对和肝利胆糖浆中柚皮苷^[8]含量测定的报道,但尚未见同时检测枳壳、黄芩中多种黄酮类成分的研究。本研究建立了同时测定和肝利胆颗粒中柚皮苷、新橙皮苷、黄芩

苷3种黄酮类成分含量的高效液相色谱法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Thermo Scientific UltiMate 3000 型高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher 公司),配有四元梯度泵、WPS-3000SL 型自动进样器、TCC-3000RS 型柱温箱、DAD-3000 型检测器;EX125ZH 型电子天平(精度为十万分之一),FR124CN 型电子天平(精度为万分之一),均购自奥豪斯仪器有限公司;KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 500 W,频率为 40 kHz);DK-98-IIA 型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试剂

柚皮苷对照品(批号为 110722-201815,含量为 91.7%,中国食品药品检定研究院);新橙皮苷对照品(批号为 wkq20020402,含量为 99.0%),黄芩苷对照品

*基金项目:江西省青年科学基金资助项目[20192BAB215044];江西省卫生计生委中医药科研课题[2018A313];江西省教育厅科学技术研究项目[180166]。

第一作者:吴远波,男,硕士,研究实习员,研究方向为中药制剂工艺及质量标准,(电子信箱)wybtyt@126.com。

[△]通信作者:张鸿,男,硕士,助理实验师,研究方向为药物新剂型,(电子信箱)838157308@qq.com。

(批号为 wkq20010908, 含量为 98.7%), 均购自四川省维克奇生物科技有限公司; 和肝利胆颗粒(企业 A, 批号分别为 181032, 190345, 200215; 企业 B, 批号为 9H010972057; 企业 C, 批号分别为 190201, 191201); 乙腈为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 0.2% 磷酸溶液(20:80, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 283 nm; 柱温: 20 °C; 进样量: 10 μL。在此色谱条件下, 供试品溶液色谱中, 柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷峰的分度均大于 1.5, 理论板数按柚皮苷峰计不低于 5 000。色谱图见图 1。

2.2 溶液制备

分别取柚皮苷对照品、新橙皮苷对照品、黄芩苷对照品适量, 精密称定, 用甲醇溶解, 制成含柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷质量浓度分别为 399.81, 399.44, 497.89 μg/mL 的对照品贮备液。分别精密量取上述贮备液各适量, 置同一容量瓶中, 加甲醇稀释, 制成含柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷质量浓度分别为 39.98, 39.94, 99.58 μg/mL 的混合对照品溶液。取样品, 研细, 取 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 50 mL, 称定质量, 超声(功率为 500 W, 频率为 40 kHz)处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。按样品处方比例制备不含枳壳和黄芩的阴性样品, 按供试品溶液制备方法分别制备缺枳壳和黄芩的阴性样品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验: 分别取 2.2 项下 3 种溶液各 10 μL, 按 2.1 项下色谱条件注入液相色谱仪测定, 并记录色谱图。结果柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷均能与其他杂质峰基线分离, 阴性样品溶液对测定结果均无干扰。

线性关系考察: 精密吸取对照品溶液 1, 3, 5, 8, 10, 20 μL, 按 2.1 项下色谱条件注入液相色谱仪测定, 以峰

面积(Y)为纵坐标、对照品进样量(X, μg)为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y_{\text{柚}} = 26.0890 X_{\text{柚}} + 0.4794$ ($r = 0.9995, n = 6$), $Y_{\text{新}} = 29.0190 X_{\text{新}} + 0.3790$ ($r = 0.9995, n = 6$), $Y_{\text{黄}} = 52.1090 X_{\text{黄}} - 0.3994$ ($r = 0.9998, n = 6$)。结果表明, 柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷的进样量分别在 0.039 98 ~ 0.799 60 μg, 0.039 94 ~ 0.798 80 μg, 0.099 58 ~ 1.991 60 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

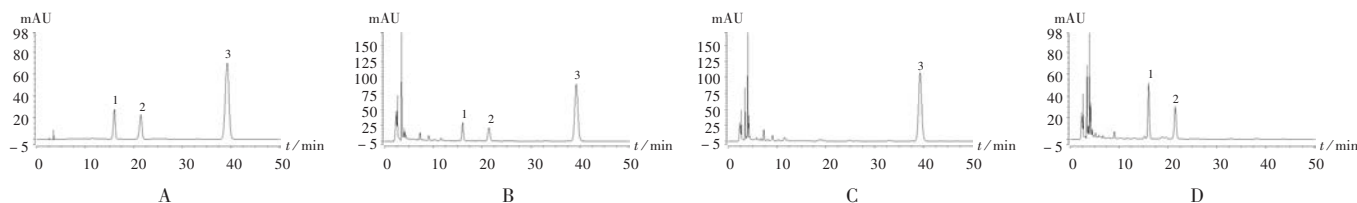
精密度试验: 精密吸取混合对照品溶液 10 μL, 按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录色谱图。结果柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 0.15%, 0.15%, 0.14% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

重复性试验: 取同一批(批号为 9H010972057)样品, 按 2.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 分别计算含量。结果柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷的平均含量分别为 0.855, 0.793, 2.942 mg/g, RSD 分别为 1.02%, 0.78%, 0.60% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

稳定性试验: 取重复性试验项下供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 并计算 RSD。结果柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 0.78%, 0.82%, 0.66% ($n = 6$), 表明供试品溶液在室温条件下 24 h 内稳定。

加样回收试验: 取同一批(批号为 9H010972057)已知含量样品适量, 研细, 平行取 6 份, 每份 1 g, 精密称定, 分别精密加入柚皮苷对照品贮备液、新橙皮苷对照品贮备液各 2 mL, 黄芩苷对照品贮备液 6 mL, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 并计算加样回收率。结果见表 1。

耐用性试验: 考察了不同品牌色谱柱(Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱、Capcell Pak C₁₈ 柱、Thermo Scientific Synchronis C₁₈ 柱)对检测结果的影响, 结果供试品溶液在 3 种色谱柱上均能得到较好分离; 考察了不同柱温(20, 25, 30 °C)对检测结果的影响, 结果柱温对色谱行为有较大影响, 柱温在 20 °C 时分离效果最佳; 考察了不同比例流动



1. 柚皮苷 2. 新橙皮苷 3. 黄芩苷

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 缺枳壳阴性样品溶液 D. 缺黄芩阴性样品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. naringin 2. neohesperidin 3. baicalin

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution lacking *Fructus aurantii*

D. Negative reference solution lacking *Scutellaria baicalensis*

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 1 Results of the recovery tests ($n=6$)

成分	取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
柚皮苷	1.002 2	0.856 9	0.799 6	1.650 1	99.20	101.26	1.21
	1.002 6	0.857 2	0.799 6	1.675 2	102.30		
	1.000 4	0.855 3	0.799 6	1.660 2	100.66		
	1.001 3	0.856 1	0.799 6	1.676 5	102.60		
	1.002 0	0.856 7	0.799 6	1.667 1	101.35		
	1.002 4	0.857 1	0.799 6	1.668 4	101.46		
新橙皮苷	1.002 2	0.794 7	0.798 9	1.580 8	98.40	98.74	0.78
	1.002 6	0.795 1	0.798 9	1.589 7	99.46		
	1.000 4	0.793 3	0.798 9	1.582 5	98.79		
	1.001 3	0.794 0	0.798 9	1.575 8	97.86		
	1.002 0	0.794 6	0.798 9	1.592 0	99.81		
	1.002 4	0.794 9	0.798 9	1.578 8	98.12		
黄芩苷	1.002 2	2.948 5	2.987 3	5.820 1	96.13	98.08	1.26
	1.002 6	2.949 6	2.987 3	5.891 8	98.49		
	1.000 4	2.943 2	2.987 3	5.925 7	99.84		
	1.001 3	2.945 8	2.987 3	5.856 4	97.43		
	1.002 0	2.947 9	2.987 3	5.882 4	98.23		
	1.002 4	2.949 1	2.987 3	5.887 1	98.35		

相乙腈-0.2%磷酸溶液(18:82,20:80,22:82,25:75,30:70, V/V)对检测结果的影响,结果使用前3种比例的流动相均能达到分离要求,使用后2种比例的流动相时柚皮苷峰与杂质峰无法有效分离,故最终选择乙腈-0.2%磷酸溶液(20:80, V/V)作为流动相。

2.4 样品含量测定

取6批样品适量,研细,取2g,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果见表2。

表2 每袋和肝利胆颗粒样品含量测定结果(mg)

Tab. 2 Content determination of three flavonoids in each bag of Hegan Lidan Granules(mg)

企业	批号	柚皮苷	新橙皮苷	黄芩苷
A	181032	15.78	16.01	51.92
A	190345	13.68	13.54	52.42
A	200215	8.93	9.06	65.06
B	9H010972057	21.72	20.14	74.76
C	190201	5.14	3.20	18.52
C	191201	3.66	1.74	13.04

3 讨论

3.1 波长选择

采用二极管阵列检测器在190~400 nm波长范围检测^[9-10],结果最大吸收波长柚皮苷和新橙皮苷均为283 nm,黄芩苷为277 nm。样品中柚皮苷、新橙皮苷的含量相对较低,为了提高柚皮苷、新橙皮苷的检测灵敏

度,故检测波长选择283 nm。在此波长下,3种黄酮类成分的色谱峰形均较好,检测灵敏度均能达到检测要求,且无其他杂质峰干扰。

3.2 提取条件选择

选择超声提取60 min,对不同提取溶剂(30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、乙醇)进行考察,以样品中柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷的综合提取率为指标,结果以70%甲醇为提取溶剂时,3种成分的提取效果最佳。对不同提取方式(超声处理和加热回流提取)和不同提取时间(15,30,45,60 min)进行考察,最终确定提取条件为70%甲醇超声提取30 min。

3.3 流动相选择

比较甲醇-磷酸溶液和乙腈-磷酸溶液下柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷的峰形和分离效果,结果以乙腈-0.2%磷酸溶液(20:80, V/V)为流动相时,样品中3种成分均能有效分离,且峰形较好,符合方法学要求。

3.4 方法评价

试验中测得各企业生产的产品中3种黄酮类成分含量差异较大,这可能与投料时药材的质量及生产工艺的质量控制有关,故控制该3种黄酮类成分的含量对于保证产品的质量有积极意义。本研究中建立的方法操作简便,结果准确,重复性好,可用于同时测定样品中柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷的含量。

参考文献

- [1] WS₃-B-1358-93, 中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第七册)[S].
- [2] 熊丽,肖英华. HPLC法同时测定和肝利胆颗粒中栀子苷和黄芩苷的含量[J]. 中国药师,2015,18(7):1221-1222.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [4] 陈丽姑,杨丽,王冬梅,等. HPLC法同时测定舒胆胶囊中4种黄酮类成分的含量[J]. 药物分析杂志,2008,28(8):1234-1237.
- [5] 程庆兵,徐小梅. 高效液相色谱法同时测定益气和胃胶囊中4种成分的含量[J]. 医药导报,2017,36(1):70-72.
- [6] 王鸽,张洪霞,薛秋霞,等. RP-HPLC法测定复方百部止咳颗粒中5种黄酮类成分[J]. 中草药,2011,42(3):498-501.
- [7] 胡北,马宏达,张朝坤,等. 和肝利胆颗粒的质量标准研究[J]. 中国药房,2014,25(39):3679-3681.
- [8] 罗泉珍,周松. 和肝利胆糖浆中柚皮苷的含量测定[J]. 现代中西医结合杂志,2012,21(6):648-649.
- [9] 薛磊冰,周燕,金佩芬. HPLC法测定妇炎康复片中黄芩苷和橙皮苷的含量[J]. 西北药学杂志,2010,25(6):405-406.
- [10] 张捷,谭生建,王欢,等. 高效液相色谱法测定小儿润肺止咳口服液橙皮苷和黄芩苷的含量[J]. 药物分析杂志,2010,30(8):1451-1453.

(收稿日期:2020-10-12;修回日期:2021-02-02)