

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.20.022

反相高效液相色谱法同时测定泌炎宁颗粒中绿原酸和蒙花苷含量*

李庆德¹, 蓝献泉², 郑锦坤¹, 冯波², 陈华龙², 彭晶¹

(1. 粤北人民医院, 广东 韶关 512026; 2. 广东省韶关市食品药品检验所, 广东 韶关 512028)

摘要:目的 建立同时测定泌炎宁颗粒中绿原酸、蒙花苷含量的反相高效液相色谱法。方法 色谱柱为 ACE Excel C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 334 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果 绿原酸、蒙花苷质量浓度分别在 11.33 ~ 135.91 μg/mL ($r=0.999\ 2$, $n=5$) 和 5.48 ~ 65.75 μg/mL ($r=0.999\ 0$, $n=5$) 范围内与峰面积线性关系良好; 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2.0%; 平均加样回收率分别为 99.44% 和 99.31%, RSD 分别为 1.87% 和 5.34% ($n=9$)。结论 该方法操作简便, 重复性好, 准确度高, 可用于同时测定泌炎宁颗粒中绿原酸、蒙花苷的含量。

关键词: 反相高效液相色谱法; 泌炎宁颗粒; 绿原酸; 蒙花苷; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)20-0081-03

Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid and Buddleoside in Miyanning Granules by RP-HPLC

LI Qingde¹, LAN Xianquan², ZHENG Jinkun¹, FENG Bo², CHEN Hualong², PENG Jing¹

(1. Yuebei People's Hospital, Shaoguan, Guangdong, China 512026; 2. Shaoguan Institute for Food and Drug Control, Shaoguan, Guangdong, China 512028)

Abstract: Objective To establish a reverse phase-high performance liquid chromatography(RP-HPLC) method for the simultaneous determination of chlorogenic acid and buddleoside in Miyanning Granules. **Methods** The chromatographic column was ACE Excel C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 334 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** Chlorogenic acid and buddleoside showed a good linear relationship in the ranges of 11.33-135.91 μg/mL ($r=0.999\ 2$, $n=5$) and 5.48-65.75 μg/mL ($r=0.999\ 0$, $n=5$), respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0%. The average recoveries of chlorogenic acid and buddleoside were 99.44% and 99.31% with RSDs of 1.87% and 5.34% ($n=9$), respectively. **Conclusion** The method is simple, reproducible and accurate, which can be used for the simultaneous determination of chlorogenic acid and buddleoside in Miyanning Granules.

Key words: RP-HPLC; Miyanning Granules; chlorogenic acid; buddleoside; content determination

泌炎宁颗粒由金银花、野菊花、白茅根、广金钱草、等中药组方, 常用于治疗肾盂肾炎、膀胱炎、尿道炎、盆腔炎及尿路结石等, 可显著促进肛肠类疾病术后尿潴留患者排尿及改善腹胀情况, 缩短术后首次排尿时间^[1]。泌炎宁颗粒质量标准中仅有白茅根和金银花的薄层色

谱鉴别。方中金银花、野菊花具有清热解毒、散瘀通经等功效; 白茅根凉血止血, 既能“引火下行”, 又能“利尿通淋”。绿原酸和蒙花苷是上述 3 味药材的重要活性化合物, 分属有机酸类和黄酮类, 二者均有抗菌、抗炎、免疫、抗肿瘤等药理学作用^[2-5]。本研究中采用反相高效液相

*基金项目: 广东省韶关市卫生计生科研项目[Y18080]; 广东省韶关市科技计划项目[2019sn125]。

第一作者: 李庆德, 男, 大学本科, 主任药师, 研究方向为临床药学、医院药学, (电话)0751-6913461(电子信箱)6117744@qq.com。

- [8] 徐 硕, 金鹏飞, 邱咏梅, 等. HPLC 法测定复合维生素 B 片中的微量叶酸、维生素 B₁₂ 和生物素[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(6): 1091-1097.
- [9] 解瑞辉, 郭社民, 申利平. 高效液相色谱法测定乙酰乌头碱片含量及含量均匀度[J]. 中国药业, 2019, 28(15): 36-38.
- [10] 李 宇, 田海燕, 崔晓雨, 等. 阿司匹林双嘧达莫片的含量测定及含量均匀度研究[J]. 中国药业, 2019, 28(18): 27-29.
- [11] 李 放, 陈 蓓, 朱 峰, 等. 高效液相色谱法快速测定多维片中的维生素 B₁₂[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(5): 1785-1788.
- [12] 何 文, 李非非, 马业菲, 等. 液相色谱法测定奶粉中维生

素 B₁₂ 的研究[J]. 山东化工, 2019, 48(23): 97-100.

- [13] 涂勋良, 寇 芯, 马晓丽, 等. HPLC 法同时测定柠檬中 6 种水溶性维生素含量[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(12): 1936-1942.
- [14] 黄东萍, 张国柱, 周永丽, 等. 反相高效液相色谱法测定维生素 B₁₂ 片的含量[J]. 中国药业, 2010, 19(23): 30-31.
- [15] 董爱军, 杨 鑫, 张英春, 等. 反相高效液相色谱法测定牦牛乳中的 B 族维生素含量[J]. 食品工业科技, 2017, 38(3): 314-316.
- [16] 顾娅楠, 战 虎. 液相色谱法测定固体饮料中维生素 B₁₂ 的含量[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(16): 149-152.

(收稿日期: 2021-02-22; 修回日期: 2021-04-18)

色谱法同时测定泌炎宁颗粒中绿原酸和蒙花苷的含量,为控制制剂质量提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

20A 型高效液相色谱仪,包括 SPD-20A 型紫外检测器(日本 Shimadzu 公司);MSA225S-ICE-DU 型电子天平(德国 Sartorius 公司,精度为十万分之一);AS10200ADT 型超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 试剂

泌炎宁颗粒(粤北人民医院,批号分别为 20190729, 20191129, 20191219, 20200428);绿原酸对照品(批号为 110753-201817,含量为 96.8%),蒙花苷对照品(批号为 110821-201816,含量为 97.50%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:ACE Excel C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min 时 9% A, 10~35 min 时 9% A→30% A, 35~40 min 时 30% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:334 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

取绿原酸和蒙花苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为 0.453 0, 0.219 2 mg/mL 的混合对照品贮备液;分别精密量取 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 6.00 mL,置 20 mL 容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得混合对照品溶液。取样品 3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲

醇 20 mL,称定质量,室温下超声(功率为 250 W,频率为 40 kHz,下同)处理 30 min,放冷,补足减失的质量,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。按泌炎宁处方和工艺制备缺金银花、野菊花和白茅根的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性及专属性试验:取 2.2 项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各 10 μL,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果理论板数按绿原酸峰计应不低于 10 000,分离度均大于 1.5,基线分离良好;阴性对照品溶液色谱中,在与混合对照品溶液色谱相同保留时间处无干扰峰,表明专属性良好。详见图 1。

线性关系考察:精密量取混合对照品溶液各适量,制成系列混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定。以待测成分质量浓度为横坐标(X , μg/mL)、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得绿原酸和蒙花苷的回归方程 $Y_1 = 29\,813 X_1 + 7\,917$ ($r = 0.999\,2$, $n = 5$), $Y_2 = 22\,051 X_2 + 7\,549$ ($r = 0.999\,0$, $n = 5$)。结果表明,绿原酸和蒙花苷质量浓度分别在 11.33~135.91 μg/mL 和 5.48~65.75 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取 2.2 项下混合对照品溶液适量,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积。结果绿原酸和蒙花苷峰面积的 RSD 分别为 0.16%, 0.15% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取 2.2 项下供试品溶液,分别于室温下放置 0, 2, 4, 6, 8, 16, 24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果绿原酸和蒙花苷峰面积的 RSD 分别为 0.80% 和 1.04% ($n = 7$),表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为 20200428)3 g,精密称

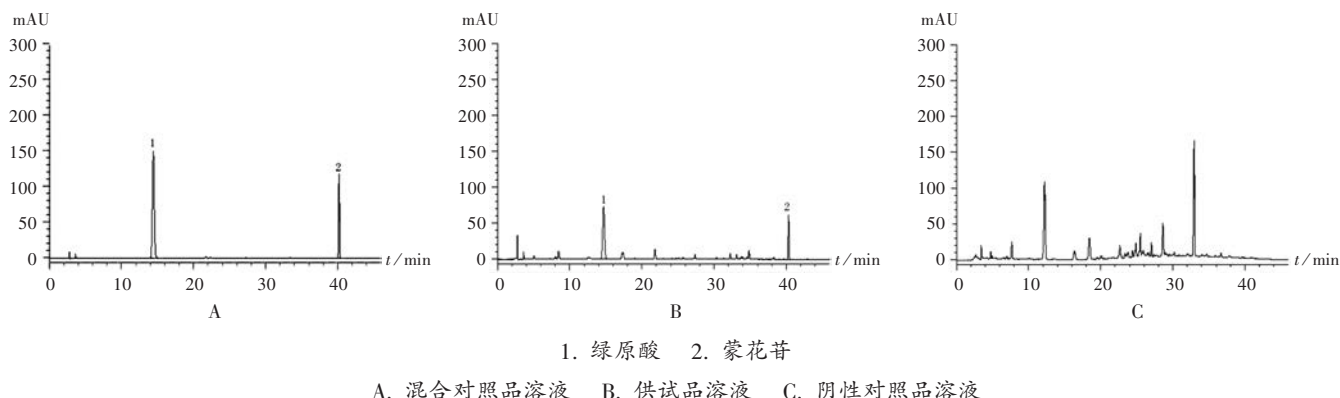


图1 高效液相色谱图

1. chlorogenic acid 2. buddleioside

A. Mix reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 加样回收试验结果($n=9$)
Tab.1 Results of the recovery test($n=9$)

取样量 (g)	样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
	绿原酸	蒙花苷	绿原酸	蒙花苷	绿原酸	蒙花苷	绿原酸	蒙花苷	绿原酸	蒙花苷	绿原酸	蒙花苷
1.506 1	0.454	0.221	0.272	0.132	0.721	0.349	98.16	96.97				
1.524 4	0.460	0.224	0.272	0.132	0.729	0.355	98.90	99.24				
1.519 2	0.458	0.223	0.272	0.132	0.733	0.354	101.10	99.24				
1.524 6	0.460	0.224	0.453	0.219	0.911	0.436	99.56	96.80				
1.507 9	0.455	0.222	0.453	0.219	0.896	0.444	97.35	101.37	99.44	99.31	1.87	5.34
1.513 7	0.456	0.225	0.453	0.219	0.908	0.443	99.78	99.54				
1.532 3	0.462	0.222	0.634	0.307	1.102	0.533	100.95	101.30				
1.520 5	0.459	0.223	0.634	0.307	1.083	0.535	98.42	101.63				
1.526 8	0.460	0.224	0.634	0.307	1.099	0.524	100.79	97.72				

定,共6份,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定。结果绿原酸和蒙花苷含量的RSD分别为0.88%和1.27%($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为20200428)适量,共9份,分别精密加入混合对照品贮备液0.60,1.00,1.40 mL,各3份,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,并计算加样回收率。结果见表1。

2.4 样品含量测定

取4批样品各适量,分别按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量。结果批号分别为20190729,20191129,20191219,20200428的样品中绿原酸和蒙花苷含量分别为0.296 mg/g和0.083 mg/g,0.247 mg/g和0.121 mg/g,0.399 mg/g和0.115 mg/g,0.302 mg/g和0.147 mg/g。

3 讨论

泌炎宁颗粒组方中白茅根化学成分主要有白茅素和芦竹素等三萜类、绿原酸等有机酸类、白头翁素等内酯类,路金才等^[6]的研究结果表明,并非所有产地的白茅根均含有芦竹素和白茅素(如天津产的印度白茅根)。综合文献[7-8]及金银花的含量测定其成分,本研究中以绿原酸和蒙花苷作为定量指标。

参考文献[9-11],预试验中分别以100%,70%,50%甲醇作提取溶剂,考察对泌炎宁颗粒中绿原酸和蒙花苷提取率的影响,结果表明,以100%甲醇作溶剂时蒙花苷提取率明显优于另2种溶剂,而绿原酸无明显差异。确定提取溶剂后,分别考察了超声(15,30,60 min)和加热回流(30,60,120 min)对提取率的影响,结果表明,超声30 min与加热回流60 min的提取效果无明显差异,考虑到试验操作的简便性,故选择超声30 min为最佳提取方法。

由含量测定结果可见,各批样品中绿原酸和蒙花苷的含量差异较大,其原因除了与原材料产地有关外,还与生产工艺有较大关系。预试验中以同一批原料对生产工艺进行考察,发现在制粒时由于绿原酸^[3]和蒙花苷^[12]对热不稳定,两种成分含量随烘干温度的升高和烘干时间的延长而逐渐减少,最终确定70℃烘干2 h为最优烘干条件。

综上所述,该方法操作简便,重复性好,准确度高,可用于同时测定泌炎宁颗粒中绿原酸、蒙花苷的含量。

参考文献

- [1] 黄燕,刘成伟,职雁雄,等.泌炎宁颗粒治疗肛肠疾病术后尿滞留的效果观察[J].广西中医药大学学报,2020,23(3):32-34.
- [2] 张浩超,郝宝燕,孙皓熠,等.绿原酸研究进展[J].食品与药品,2017(3):222-226.
- [3] 王庆华,杜婷婷,张智慧,等.绿原酸的药理作用及机制研究进展[J].药科学报,2020,55(10):2273-2280.
- [4] 袁慧杰,赖志辉,管艳艳,等.野菊花主要活性成分的药理作用研究进展[J].中华中医药学刊,2018,36(3):651-653.
- [5] 刘磊磊,肖卓炳.野菊花的化学成分研究[J].中草药,2018,49(22):5254-5258.
- [6] 路金才,孙启时,王明雷,等.白茅根中芦竹素和白茅素的含量测定[J].沈阳药科大学学报,1996,13(4):59-60.
- [7] 童培珍,李振雨,曹斯琼,等.白茅根标准汤剂超高效液相色谱指纹图谱研究[J].中国中医药信息杂志,2020,27(12):70-75.
- [8] 王海侠,姚青春,时维静,等.白茅根中绿原酸的提取与含量测定[J].中国中医药科技,2010,17(4):331-332.
- [9] 王福成,冯祥瑞,杨玲霞,等.HPLC法同时测定止血宝片中绿原酸、蒙花苷和芹菜素的含量[J].甘肃医药,2018,37(5):449-451.
- [10] 林超,毛菊华.HPLC法同时测定鼻炎愈合剂中阿魏酸、绿原酸和蒙花苷含量[J].中国药师,2018,21(8):1488-1490.
- [11] 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.
- [12] 刘承萍,曾元儿,高峰,等.999感冒灵浓缩过程蒙花苷热降解规律研究[J].中国中药杂志,2016,41(8):1380-1382.

(收稿日期:2020-12-31;修回日期:2021-04-20)