

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.21.016

高效液相色谱波长切换法同时测定黄疸茵陈颗粒中8种指标性成分的含量

毛淑倩

(中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院, 福建 福州 350000)

摘要:目的 建立同时测定黄疸茵陈颗粒中绿原酸、滨蒿内酯、黄芩苷、汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩苷、大黄酚、甘草酸铵8种指标性成分含量的高效液相色谱(HPLC)波长切换法。方法 色谱柱为 Supfex JX C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.12% 甲酸溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 0~44 min 时 325 nm(绿原酸、滨蒿内酯、黄芩苷、汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩苷)、44~50 min 时 237 nm(甘草酸铵)、50~60 min 时 258 nm(大黄酚), 柱温为 35 ℃, 进样量为 10 μL。结果 绿原酸、滨蒿内酯、黄芩苷、汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩苷、大黄酚、甘草酸铵的质量浓度分别在 12.080~120.80 μg/mL($r=0.9998$)、2.986~29.86 μg/mL($r=0.9995$)、9.753~97.53 μg/mL($r=0.9997$)、3.611~36.11 μg/mL($r=0.9993$)、6.114~61.14 μg/mL($r=0.9994$)、3.707~37.07 μg/mL($r=0.9991$)、5.665~56.65 μg/mL($r=0.9996$)、5.819~58.19 μg/mL($r=0.9995$)范围内与峰面积线性关系良好; 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 1.5% ($n=6$); 平均加样回收率分别为 100.11%, 98.81%, 99.37%, 98.52%, 98.83%, 98.55%, 99.72%, 99.56%, RSD 分别为 1.26%, 0.44%, 0.63%, 0.93%, 1.01%, 1.11%, 0.91%, 0.72% ($n=6$)。结论 该方法操作简便、准确度高、重复性好, 可用于同时测定黄疸茵陈颗粒中 8 种指标性成分的含量。

关键词: 黄疸茵陈颗粒; 高效液相色谱法; 波长切换法; 指标性成分; 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(2022)21-0069-04

Simultaneous Determination of Eight Index Components in Huangdan Yinchén Granules by HPLC with Wavelength Switching

MAO Shuqian

(The 900th Hospital of the Joint Logistics Support Force of Chinese PLA, Fuzhou, Fujian, China 350000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) with wavelength switching method for the simultaneous determination of eight index components in Huangdan Yinchén Granules, including chlorogenic acid, scoparone, baicalin, wogonin, baicalein, wogonoside, chrysophanol and ammonium glycyrrhizinate. **Methods** The chromatographic column was Supfex JX C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.12% formic acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min. The detection wavelengths were 325 nm for chlorogenic acid, scoparone, baicalin, wogonin, baicalein and wogonoside at 0-44 min, 237 nm for ammonium glycyrrhizinate at 44-50 min, 258 nm for chrysophanol at 50-60 min. The column temperature was 35 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of chlorogenic acid, scoparone, baicalin, wogonin, baicalein, wogonoside, chrysophanol and ammonium glycyrrhizinate were 12.080-120.80 μg/mL ($r=0.9998$), 2.986-29.86 μg/mL ($r=0.9995$), 9.753-97.53 μg/mL ($r=0.9997$), 3.611-36.11 μg/mL ($r=0.9993$), 6.114-61.14 μg/mL ($r=0.9994$), 3.707-37.07 μg/mL ($r=0.9991$), 5.665-56.65 μg/mL ($r=0.9996$) and 5.819-58.19 μg/mL ($r=0.9995$), respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were lower than 1.5% ($n=6$). The average recoveries of the

第一作者: 毛淑倩, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为药物分析与质量标准, (电子信箱)360961991@qq.com。

科技, 2017, 33(1): 34-35.

[10] 刘波, 沙妙清, 张艳秋, 等. 中药西红花中重金属元素分析[J]. 绿色科技, 2019(10): 182-184.

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 234-236, 275-279.

[12] 孙茜, 袁浩, 徐艳梅, 等. QuEChERS 结合气相色谱-串联质谱法测定吐根药材中 38 种农药残留[J]. 中国药业, 2018, 27(10): 19-22.

[13] 孙仟, 林林, 郭东晓, 等. UPLC-MS/MS 在中药材农残分析中的应用[J]. 药学研究, 2020, 39(7): 420-423.

[14] YBZ05082018, 国家食品药品监督管理局国家药品标准: 喉痛灵颗粒[S].

[15] 王国海, 郭耀武, 乔蓉霞. 药材煎煮前后重金属及有害元素转移率的研究[J]. 安徽医药, 2014, 18(11): 2072-2074.

[16] 左甜甜, 张磊, 金红宇, 等. 中药材提取前后重金属及有害元素转移率和分级别风险评估的研究[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(8): 1398-1405.

[17] 聂黎行, 钱秀玉, 蒋沁悦, 等. 中成药中重金属及有害元素残留分析、风险评估和限量制定建议[J]. 药学学报, 2020, 55(11): 2695-2701.

[18] 王晓蕾, 刘永利, 苏建, 等. 中药有害残留物分析中质量控制指导原则[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(10): 1877-1881.

(收稿日期: 2022-01-10; 修回日期: 2022-04-31)

above index components were 100.11%, 98.81%, 99.37%, 98.52%, 98.83%, 98.55%, 99.72% and 99.56% with RSDs of 1.26%, 0.44%, 0.63%, 0.93%, 1.01%, 1.11%, 0.91% and 0.72% respectively ($n = 6$). **Conclusion** The method is simple, accurate and repeatable, which can be used for the simultaneous determination of eight index components in Huangdan Yinchen Granules.

Key words: Huangdan Yinchen Granules; HPLC; wavelength switching; index component; content determination

黄疸茵陈颗粒由茵陈、黄芩、大黄、甘草组方,具有清热利湿、退黄疸功效,临床用于治疗急、慢性黄疸型传染性肝炎^[1]。方中,茵陈为君药,具有清热利湿、利胆退黄等功效,可有效治疗黄疸、湿热型湿疹、胆囊炎及肝内胆汁淤积症等,含有机酚酸类、香豆素类、黄酮类、挥发油等成分^[2-3],2020年版《中国药典(一部)》以滨蒿内酯来评价茵陈中绿原酸及花茵陈的质量^[4]。黄芩为臣药,清肝胆、祛湿,主要有效成分为黄酮类化合物黄芩苷、汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩苷,具有保肝、解毒、解热、抗炎等药理作用^[5-7]。大黄为佐药,清湿热、逐瘀通经以退黄疸,其蒽醌类成分大黄酚可抑制脂质过氧化反应及改善肝细胞凋亡,从而发挥保肝利胆作用^[8-9]。甘草为使药,性温,调和诸药,主要活性成分为甘草酸铵^[10]。黄疸茵陈颗粒载于《中华人民共和国卫生部颁药品标准·中药成方制剂(第四册)》,其质量标准无含量测定项^[1],现有文献仅以该制剂中茵陈、黄芩及大黄的有效成分进行定量分析^[11-13]。本研究中建立了同时测定黄疸茵陈颗粒中绿原酸、滨蒿内酯、黄芩苷、汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩苷、大黄酚、甘草酸铵8种指标性成分含量的高效液相色谱(HPLC)波长切换法,为有效控制黄疸茵陈颗粒的质量提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),配有紫外可变波长检测器;BT25S 型电子天平(赛多利斯科学仪器 <北京> 有限公司,精度为 0.01 mg);DTA-25 型超声波清洗器(湖北鼎泰高科有限公司,功率为 600 W,频率为 40 kHz)。

1.2 试药

绿原酸对照品(批号为 110753-202118,纯度为 96.1%),滨蒿内酯对照品(批号为 111511-202004,纯度为 99.9%),黄芩苷对照品(批号为 110715-202122,纯度为 94.2%),汉黄芩素对照品(批号为 111514-202006,纯度为 95.9%),黄芩素对照品(批号为 111595-201808,纯度为 97.9%),汉黄芩苷对照品(批号为 112002-201902,纯度为 98.5%),大黄酚对照品(批号为 10796-201922,纯度为 99.4%),甘草酸铵对照品(批号为 110731-202119,纯度为 97.8%),均购自中国食品药品检定研究院;黄疸茵陈颗粒(福建省泉州罗裳

山制药厂,批号分别为 201001054, 201012061, 202102029,甘肃岷海制药有限责任公司,批号分别为 20210117, 20210305, 20210528,兰州佛慈制药股份有限公司,批号分别为 190919, 191127, 201112,规格均为每袋 20 g);甲醇、甲酸均为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[14-16]

色谱柱:Supfex JX C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A) - 0.12% 甲酸溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 15 min 时 16%A, 15 ~ 44 min 时 16%A → 58%A, 44 ~ 60 min 时 58%A → 70%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:0 ~ 44 min 时 325 nm(绿原酸、滨蒿内酯、黄芩苷、汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩苷),44 ~ 50 min 时 237 nm(甘草酸铵),50 ~ 60 min 时 258 nm(大黄酚);柱温:35 °C;进样量:10 μL。

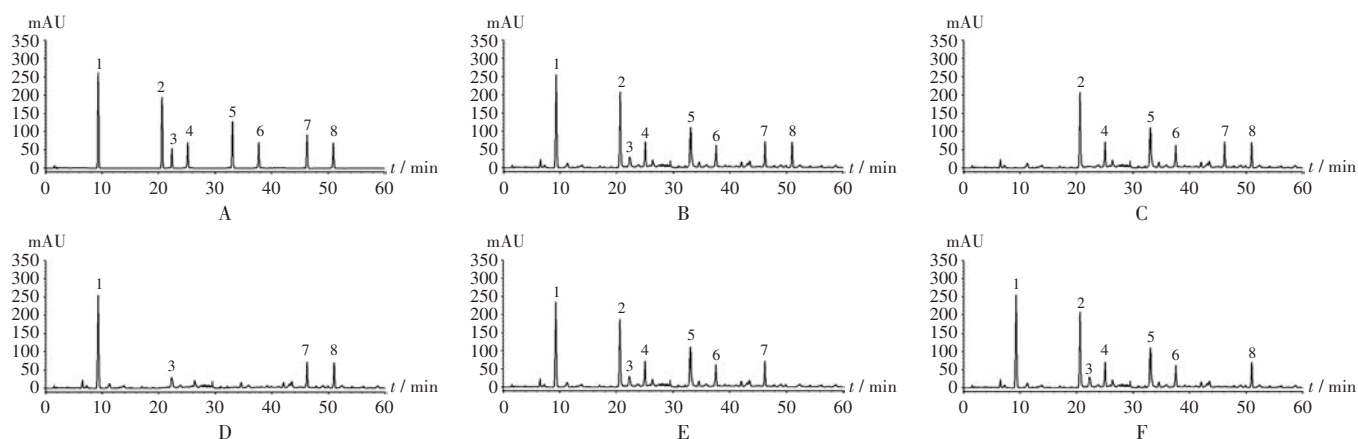
2.2 溶液制备

分别取绿原酸、滨蒿内酯、黄芩苷、汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩苷、大黄酚、甘草酸铵对照品各适量,精密称定,加甲醇适量,超声(功率为 500 W,频率为 40 kHz)使溶解,配制成每 1 mL 含绿原酸 1 208.0 μg、黄芩苷 975.3 μg、滨蒿内酯 298.6 μg、汉黄芩素 361.1 μg、黄芩素 611.4 μg、汉黄芩苷 370.7 μg、甘草酸铵 581.9 μg、大黄酚 566.5 μg 的混合对照品溶液。取样品 10 袋,研匀,取细粉 2.0 g,精密称定,置 250 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 100 mL,称定质量,超声(功率为 500 W,频率为 40 kHz)40 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。按处方工艺分别制备缺茵陈、黄芩、大黄、甘草的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:分别吸取 2.2 项下 3 种溶液各 10 μL,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果 8 种指标性成分与相邻色谱峰的分度均大于 1.52,对称因子均小于 1.11。色谱图见图 1。

线性关系考察与检测限和定量限确定:分别精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,置 50 mL 容量瓶中,加甲醇稀释并定容,得系列质量浓度的混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样



1. 绿原酸 2. 黄芩苷 3. 滨蒿内酯 4. 汉黄芩素 5. 黄芩素 6. 汉黄芩苷 7. 甘草酸铵 8. 大黄酚
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C-F. 阴性对照品溶液(分别缺茵陈、黄芩、大黄、甘草)

图1 高效液相色谱图

1. Chlorogenic acid 2. Baicalin 3. Scoparone 4. Wogonin 5. Baicalein 6. Wogonoside 7. Ammonium glycyrrhizinate 8. Chrysophanol
A. Mixed reference solution B. Test solution C-F. Negative reference solution (lack of Artemisiae Scopariae Herba, Scutellariae Radix, Rhei Radix et Rhizoma and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, respectively)

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 8种指标性成分方法学考察结果(n=6)

Tab. 1 Results of the methodological investigation of eight index components (n=6)

化合物	回归方程	r	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	定量限 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	检测限 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	加样回收试验(%, n=6)	
						\bar{X}	RSD
绿原酸	$Y=56.39X+3.521$	0.9998	12.080~120.80	3.39	1.21	100.11	1.26
滨蒿内酯	$Y=31.47X+6.036$	0.9995	2.986~29.86	1.02	0.33	98.81	0.44
黄芩苷	$Y=82.26X-10.43$	0.9997	9.753~97.53	2.71	0.92	99.37	0.63
汉黄芩素	$Y=22.09X+5.569$	0.9993	3.611~36.11	1.15	0.36	98.52	0.93
黄芩素	$Y=42.18X+2.275$	0.9994	6.114~61.14	1.97	0.65	98.83	1.01
汉黄芩苷	$Y=25.15X+1.937$	0.9991	3.707~37.07	1.28	0.39	98.55	1.11
大黄酚	$Y=60.33X+4.032$	0.9996	5.665~56.65	1.81	0.57	99.72	0.91
甘草酸铵	$Y=44.05X+2.028$	0.9995	5.819~58.19	1.86	0.58	99.56	0.72

测定,以质量浓度($X, \mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,结果见表1。分别以信噪比(S/N)为10:1和3:1时混合对照品溶液的质量浓度为定量限和检测限,结果见表1。

精密度试验:精密量取2.2项下混合对照品溶液1.0 mL,置25 mL棕色容量瓶中,用甲醇稀释并定容,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次。结果绿原酸、滨蒿内酯、黄芩苷、汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩苷、大黄酚、甘草酸铵峰面积的RSD分别为0.25%,0.99%,0.51%,0.63%,0.44%,0.82%,0.59%,0.72%($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为190919)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于0,5,10,15,20,25 h时进样测定。结果绿原酸、滨蒿内酯、黄芩苷、汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩苷、大黄酚、甘草酸铵峰面积的RSD分别为0.87%,1.09%,0.91%,1.02%,0.84%,0.76%,0.91%,

0.59%($n=6$),表明供试品溶液25 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(批号为190919)6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。采用外标法计算得绿原酸、滨蒿内酯、黄芩苷、汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩苷、大黄酚、甘草酸铵的平均含量分别为3.861 0,0.319 7,1.545 0,0.507 2,0.869 3,0.501 5,0.718 6,0.759 1 mg/g,RSD分别为0.79%,0.97%,0.86%,1.04%,1.17%,1.05%,1.25%,0.66%($n=6$),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190919)1.0 g,精密称定,共6份,置具塞锥形瓶中,精密加入混合对照品溶液适量,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,并计算回收率。结果见表1。

2.4 样品含量测定

取9批样品,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3次,采用外标法计算样品中8种指标性成分的含量。结果见表2。

表2 样品中8种指标性成分含量测定结果(mg/g, n=3)

Tab. 2 Results of content determination of eight index components in samples (mg/g, n=3)

批号	绿原酸	滨蒿内酯	黄芩苷	汉黄芩素	黄芩素	汉黄芩苷	大黄酚	甘草酸铵
201001054	3.591 0	-	1.718 0	0.472 3	0.611 5	0.412 7	0.701 4	0.702 1
201012061	3.604 0	-	1.726 0	0.480 9	0.623 6	0.419 9	0.708 8	0.711 5
202102029	3.588 0	-	1.701 0	0.465 2	0.609 8	0.404 3	0.700 1	0.700 8
20210117	3.312 0	-	1.587 0	0.489 7	0.710 8	0.452 4	0.690 7	0.730 7
20210305	3.309 0	-	1.591 0	0.491 1	0.711 6	0.451 6	0.693 1	0.731 2
20210528	3.337 0	-	1.543 0	0.490 6	0.712 3	0.453 3	0.698 8	0.726 9
190919	3.861 0	0.319 7	1.545 0	0.507 2	0.869 3	0.501 5	0.718 6	0.759 1
191127	3.923 0	0.300 5	1.482 0	0.500 1	0.812 4	0.498 6	0.700 3	0.713 7
201112	3.907 0	-	1.494 0	0.501 3	0.835 7	0.500 1	0.714 9	0.728 4

注: - 表示未检出。

Note: - indicates that the corresponding component is not detected.

3 讨论

3.1 检测波长选择

全波段扫描8种活性成分,结果甘草酸铵在237 nm波长处有最大吸收,大黄酚在258 nm波长处有最大吸收,黄芩苷、汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩苷的最大吸收波长相似,滨蒿内酯于345 nm波长处有最大吸收,且出峰时间接近黄芩苷。2020年版《中国药典(一部)》中茵陈含量测定项下绿原酸的检测波长为327 nm。故采用波长切换法,最终确定为2.1项下检测波长,在同一信号的不同时间段设置不同的检测波长,使黄疸茵陈颗粒中8种指标性成分均可被灵敏、准确地检出,并节省了分析时间。

3.2 耐用性考察

分别考察了不同体积分数(0.1%, 0.12%, 0.15%)的甲酸溶液,不同品牌的色谱柱[Supfex JX C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), Waters XTERRA MS C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), Thermo Hypersil Gold C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)],不同柱温(30, 35, 40 °C),不同流速(0.8, 1.0, 1.1 mL/min)对黄疸茵陈颗粒中8种指标性成分色谱峰分离的影响。结果各成分均能达到有效分离,表明方法耐用性良好。且按2.1项下色谱条件检测时色谱峰分离效果最佳。

3.3 含量测定结果分析

考察了3家生产企业的9批样品中绿原酸、滨蒿内酯、黄芩苷、汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩苷、大黄酚、甘草酸铵的含量。由表3可知,不同生产企业的样品中各成分含量存在差异,其中滨蒿内酯的含量差异最明显,仅1家生产企业检出滨蒿内酯,且生产年份为2019年,其

他生产企业均未检出。原因可能为该生产企业投料时选择了花茵陈。黄疸茵陈颗粒中茵陈占处方总量的49%,茵陈药材包括绵茵陈和花茵陈,滨蒿内酯主要存在于花茵陈,在绵茵陈中含量极微,这与传统习惯采用绵茵陈投料一致^[17]。

3.4 方法评价

所建立的方法操作简便、准确度高、重复性好,可用于同时测定黄疸茵陈颗粒中8种指标性成分的含量。

参考文献

- [1] WS₃-B-0828-91, 中华人民共和国卫生部颁药品标准中药成方制剂(第四册)[S].
- [2] 刘玉萍, 邱小玉, 刘 焯, 等. 茵陈的药理作用研究进展[J]. 中草药, 2019, 50(9): 2235-2241.
- [3] 黄丽平, 许远航, 邓敏贞, 等. 茵陈的化学成分、药理作用机制与临床应用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(4): 676-690.
- [4] 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: 250-251.
- [5] 姚 雪, 程云霞, 陈 龙, 等. 黄芩化学成分的研究[J]. 中成药, 2020, 42(11): 2935-2940.
- [6] 房 城, 于兴博, 郑秀茜, 等. 黄芩的化学成分及药理作用研究进展[J]. 化学工程师, 2021, 35(3): 52-54.
- [7] 张晓娟, 吕勃川. 黄芩研究新进展[J]. 中医药学报, 2017, 45(1): 96-99.
- [8] 王亦君, 冯舒涵, 程锦堂, 等. 大黄蒽醌类化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13): 227-234.
- [9] 赵明宇. 大黄的药理作用与临床应用[J]. 北方药学, 2018, 15(5): 160.
- [10] 李 想, 李 冀. 甘草提取物活性成分药理作用研究进展[J]. 江苏中医药, 2019, 51(5): 81-86.
- [11] 杨 丹, 朱旭江, 徐旭坤, 等. 高效液相色谱法同时测定黄疸茵陈颗粒中黄芩苷等6种成分含量[J]. 转化医学杂志, 2016, 5(4): 206-209.
- [12] 黎碧云, 林碧英. HPLC法测定黄疸茵陈颗粒中绿原酸含量[J]. 海峡药学, 2012, 24(11): 71-74.
- [13] 华晓东, 王智华, 王菊美, 等. HPLC同时测定黄疸茵陈颗粒中大黄素、大黄酸、大黄酚的含量[J]. 中成药, 2002, 24(5): 340-341.
- [14] 沈 晗, 黄玉宇, 陈 汀, 等. 正交试验设计优选茵陈蒿汤水煎煮工艺[J]. 中国药业, 2020, 29(11): 14-17.
- [15] 张玉珊, 孙一斐, 罗 莉, 等. HPLC测定茵栀黄方剂中4味药材的主要成分及含量[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2020, 40(5): 500-509.
- [16] 曲颂扬, 毛清雯. HPLC法同时测定肝炎康复丸中6种成分的含量[J]. 中国药师, 2018, 21(1): 79-81.
- [17] 陶玉杰. 绵茵陈与花茵陈的现代药理对比及临床应用[J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(19): 193-194.

(收稿日期: 2021-12-19; 修回日期: 2022-04-15)