

中图分类号: R917; R927

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2023)06-0075-03

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.06.018



高效液相色谱法同时测定复方赤红颗粒中 没食子酸和原儿茶酸含量*

郑小丽^{1,2}, 胡晓波², 郑志昌², 李明², 杨继红², 廖尚高^{1△}

(1. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550001; 2. 贵州医科大学附属医院, 贵州 贵阳 550001)

摘要:目的 建立同时测定复方赤红颗粒中没食子酸和原儿茶酸含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Elite Supersil ODS-B C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 醋酸溶液(8:92, V/V), 流速为 0.9 mL/min, 检测波长为 260 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果 没食子酸和原儿茶酸质量浓度分别在 50~1 600 μg/mL ($R^2 = 0.999\ 8, n = 6$) 和 2.625~84.000 μg/mL ($R^2 = 0.999\ 9, n = 6$) 范围内与峰面积线性关系良好;精密性、稳定性和重复性试验结果的 RSD 均小于 2% ($n = 6$);平均加样回收率分别为 101.56% 和 100.23%, RSD 分别为 1.88% 和 2.19% ($n = 9$)。结论 该方法操作简单, 结果准确可靠, 重复性好, 适用于同时测定复方赤红颗粒中没食子酸和原儿茶酸的含量。

关键词: 复方赤红颗粒; 没食子酸; 原儿茶酸; 高效液相色谱法; 含量测定

Simultaneous Determination of Gallic Acid and Protocatechuic Acid in Compound Chihong Granules by HPLC

ZHENG Xiaoli^{1,2}, HU Xiaobo², ZHENG Zhichang², LI Ming², YANG Jihong², LIAO Shanggao¹

(1. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China 550001; 2. Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China 550001)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of gallic acid and protocatechuic acid in Compound Chihong Granules. **Methods** The chromatographic column was Elite Supersil ODS-B C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% acetic acid solution (8:92, V/V), the flow rate was 0.9 mL/min, the detection wavelength was 260 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of gallic acid and protocatechuic acid were 50-1 600 μg/mL ($R^2 = 0.999\ 8, n = 6$) and 2.625-84.000 μg/mL ($R^2 = 0.999\ 9, n = 6$), respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were lower than 2% ($n = 6$). The average recoveries of gallic acid and protocatechuic acid were 101.56% and 100.23% with RSDs of 1.88% and 2.19% ($n = 9$), respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, reliable and reproducible, which is suitable for the simultaneous determination of gallic acid and protocatechuic acid in Compound Chihong Granules.

Key words: Compound Chihong Granules; gallic acid; protocatechuic acid; HPLC; content determination

复方赤红颗粒为贵州医科大学附属医院名中医王光义教授的经验方,该方由赤芍、川续断、伸筋草、鸡血藤、红花、路路通、牛膝、独活、杜仲、防风、川芎、秦艽、细辛和没药经现代工艺制备而成,有活血化瘀、舒筋活络、抗炎止痛等功效^[1-3],临床多用于治疗风湿痹症、关节疼痛、手脚冰冷等症,疗效较好。为进一步保证制剂质量稳定、使用安全性及临床疗效,本研究中参考文献[4-5],选择制剂中没食子酸和原儿茶酸为定量指标成分,并采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定两者含量,旨在为该制剂的质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher 公司);SPD-10A 型紫外检测器、WML-2006C-4 型威玛龙色谱数据工作站、TG332A 型分析天平(精度为 0.01 mg),均购于岛津仪器(苏州)有限公司;LIBROR AEL-160 型电子分析天平(常熟市双杰测试仪器厂,精度为 0.1 mg);HS10260D 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

复方赤红颗粒(贵州医科大学附属医院,批号分别

*基金项目:白求恩·医学科学研究基金资助项目[B19263DS]。

第一作者:郑小丽,女,大学本科,主管药师,研究方向为药物制剂与临床药物治疗,(电子信箱)zhengxiaoli1225@163.com。

△通信作者:廖尚高,男,博士,教授,研究方向为中草药药效物质基础及药物开发,(电子信箱)lshangg@163.com。

为20210301, 20210302, 20210303, 规格为每袋10 g); 没食子酸对照品(批号为110831-201906, 含量91.5%), 原儿茶酸对照品(批号为110809-201906, 含量97.7%), 均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇为色谱纯, 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: Elite Supersil ODS-B C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-1%醋酸溶液(8:92, V/V); 流速: 0.9 mL/min; 检测波长: 260 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液: 取干燥至恒重的原儿茶酸对照品10 mg, 精密称定, 加甲醇溶解并定容至10 mL, 取1 mL, 用甲醇定容至100 mL, 得溶液I。取干燥至恒重的没食子酸对照品10 mg, 精密称定, 置100 mL容量瓶中, 加溶液I溶解并定容, 即得。

供试品溶液: 取样品细粉0.5 g, 精密称定, 置100 mL具塞锥形瓶内, 精密加入2%醋酸溶液0.5 mL, 再加入乙酸乙酯20 mL, 超声(功率260 W, 频率40 kHz)20 min, 滤过, 挥干乙酸乙酯, 残渣加2 mL甲醇溶解, 滤过, 取续滤液, 即得。

空白对照溶液: 按供试品溶液制备方法制备不加样品的空白对照溶液^[6-12]。

2.3 方法学考察

专属性试验: 分别取2.2项下3种溶液各适量, 按2.1项下色谱条件进样测定。空白对照溶液色谱图中, 在与混合对照品溶液色谱相应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: 精密量取没食子酸对照品溶液适量, 加甲醇稀释成质量浓度分别为50, 100, 200, 400, 800, 1 600 μg/mL的没食子酸系列对照品溶液; 精密量取原儿茶酸对照品溶液, 加甲醇稀释成质量浓度分别为

2. 625, 5. 250, 10. 500, 21. 000, 42. 000, 84. 000 μg/mL的原儿茶酸系列对照品溶液; 均按2.1项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以待测成分质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y_{\text{没}} = 24\,154 X_{\text{没}} - 453\,988$ ($R^2 = 0.999\,8$, $n = 6$) 和 $Y_{\text{原}} = 38\,964 X_{\text{原}} - 12\,458$ ($R^2 = 0.999\,9$, $n = 6$)。结果表明, 没食子酸和原儿茶酸质量浓度分别在50~1 600 μg/mL和2. 625~84. 000 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 精密量取混合对照品溶液适量, 按2.1项下色谱条件连续进样测定6次, 记录峰面积。结果没食子酸和原儿茶酸峰面积的RSD分别为1.79%和1.41% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取2.2项下供试品(批号为20210301)溶液适量, 分别于0, 1, 2, 3, 4, 5 h时按2.1项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果没食子酸和原儿茶酸峰面积的RSD分别为1.35%和1.42% ($n = 6$), 表明供试品溶液室温下放置5 h内基本稳定。

重复性试验: 取样品(批号为20210301)适量, 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, 并计算含量。结果没食子酸和原儿茶酸平均含量分别为0.936 8 mg/g和0.043 3 mg/g, RSD分别为0.95%和1.52% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 取样品(批号为20210301)适量, 共9份, 每份约0.25 g, 精密称定, 分别置100 mL容量瓶内, 分别精密加入混合对照品溶液(含没食子酸234.2 μg/mL、原儿茶酸10.82 μg/mL)0.8, 1.0, 1.2 mL, 按2.2项下方法制备供试品溶液, 再按2.1项下色谱条件分别进样测定, 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3批样品各适量, 平行2份, 每份约0.5 g, 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中没食子酸和原儿茶酸的含量, 结果见表2。

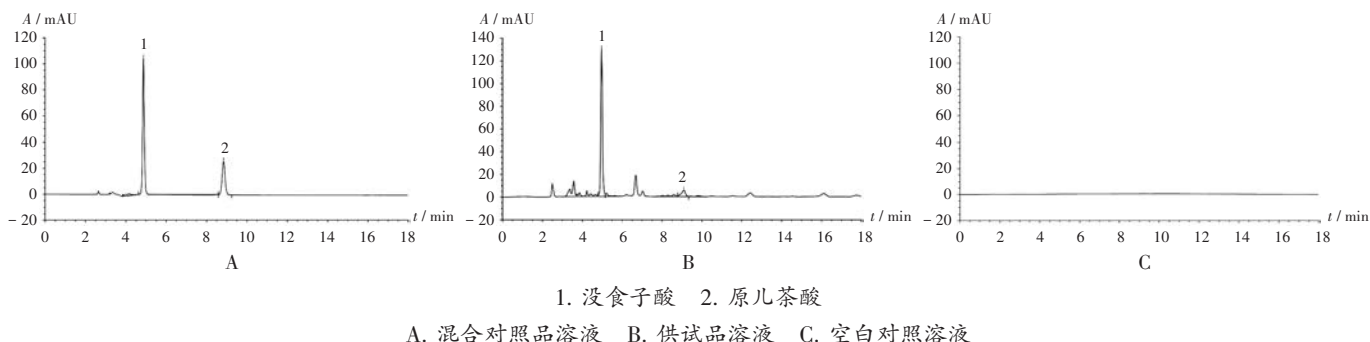


图1 高效液相色谱图

1. Gallic acid 2. Protocatechuic acid

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Blank 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 ($n=9$)

样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.234 9	0.010 9	0.187 4	0.008 6	0.421 4	0.019 3	99.52	97.67				
0.234 3	0.010 8	0.187 4	0.008 6	0.421 5	0.019 6	99.89	102.33				
0.234 7	0.010 8	0.187 4	0.008 6	0.424 2	0.019 8	101.12	104.65				
0.234 4	0.010 8	0.234 2	0.010 8	0.466 7	0.021 6	99.19	100.00				
0.234 3	0.010 8	0.234 2	0.010 8	0.472 9	0.021 6	101.88	100.00	101.56	100.23	1.88	2.19
0.234 8	0.010 9	0.234 2	0.010 8	0.477 0	0.021 5	103.42	98.15				
0.235 2	0.010 9	0.281 0	0.013 0	0.528 7	0.023 9	104.45	100.00				
0.234 2	0.010 8	0.281 0	0.013 0	0.517 9	0.023 6	100.96	98.46				
0.234 2	0.010 8	0.281 0	0.013 0	0.525 3	0.023 9	103.59	100.77				

注:A为没食子酸,B为原儿茶酸。
Note:A refers to gallic acid,and B refers to protocatechuic acid.

表2 样品含量测定结果(mg/g, $n=2$)

Tab.2 Results of the content determination of gallic acid and protocatechuic acid in samples (mg/g, $n=2$)

批号	没食子酸			原儿茶酸		
	1	2	$\bar{X}$	1	2	$\bar{X}$
20210301	1.101 8	1.096 5	1.099 2	0.043 8	0.044 3	0.044 0
20210302	1.018 4	1.037 7	1.028 0	0.040 5	0.042 0	0.041 2
20210303	0.964 9	0.967 5	0.966 2	0.035 2	0.035 3	0.035 2

3 讨论

3.1 指标性成分选择

复方赤红颗粒由多味中药材组方,成分复杂,目前尚无统一质量标准。没食子酸和原儿茶酸具有抗炎镇痛作用,是治疗风湿痹症的有效成分^[13-14],其含量直接影响该制剂的疗效,故本研究中确定没食子酸和原儿茶酸为该制剂的含量测定指标成分。

3.2 提取溶剂选择

使用不同体积分数的甲醇、乙醇及乙酸乙酯等为提取溶剂,进行筛选和优化。结果显示,以2%醋酸溶液+乙酸乙酯为提取溶剂时,没食子酸和原儿茶酸的提取率均较高,故选择其为提取溶剂。

3.3 超声时间选择

保持提取溶剂不变,考察不同超声时间(10,20,30,40,50,60 min)对结果的影响。结果显示,超声20 min和30 min的提取率和提取效率基本一致,且均高于40,50,60 min时,从提高工作效率及节约能源方面考虑,确定超声时间为20 min。

3.4 方法评价

本研究中建立的HPLC法专属性好,分离度高,重复性好,操作简单,结果准确可靠,可用于同时测定复方赤红颗粒中没食子酸和原儿茶酸的含量,并为下一步更有效地控制该制剂的质量提供参考。

参考文献

[1] 崔亚珊,连凤梅,于同月,等. 鸡血藤的临床应用及其用量探究[J]. 长春中医药大学学报,2022,38(4):374-377.
[2] 陶运霞,王 丽,霍晶晶. 中药复方治疗消渴病痹症的用药分析[J]. 中医药临床杂志,2020,32(11):2098-2104.
[3] 赵本普,赵远伦. 除痹汤治疗风寒湿痹症78例临床观察[J]. 中医临床研究,2016,8(6):12-13.
[4] 李书迪,于景华,齐和日玛,等. HPLC法同时测定七味广枣散中4种成分的含量[J]. 中医药导报,2021,27(1):69-72.
[5] 刘 学,肖 婷,曲书阅,等. 咳清胶囊HPLC特征图谱及多成分含量测定研究[J]. 药物分析杂志,2021,41(5):779-787.
[6] 余捷婧,吴金雄,梁亚凤,等. HPLC同时测定赤芍和白芍中没食子酸等6种成分的量[J]. 中草药,2015,46(11):1673-1677.
[7] 刘晓艳,徐 巍,杨秀伟,等. 鸡血藤非黄酮类化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,2020,45(5):1120-1127.
[8] 吴 晶,杨怀镜,周 萍. 红花中5种成分的含量测定[J]. 亚太传统医药,2019,15(11):82-87.
[9] 封若雨,朱新宇,邢峰丽,等. 路路通的药理作用研究概述[J]. 中国中医基础医学杂志,2019,25(8):1175-1178.
[10] 徐志贫,王彦志,郭 燕,等. 牛膝地上部位化学成分的分 离鉴定[J]. 国际药学研究杂志,2020,47(6):450-455.
[11] 郭 琴,高 焕,李小锋,等. HPLC-MS/MS法同时测定 杜仲饮片及其单方制剂中11种成分的含量[J]. 中国药师, 2022,25(2):369-372.
[12] 邵璐彬. 不同配比赤芍-川芎药对配伍中11个成分提取 率考察[J]. 中国药师,2022,25(1):172-177.
[13] WU H, WANG J, ZHAO Q, et al. Protocatechuic acid inhibits proliferation,migration and inflammatory response in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol,2020,48(1):969-976.
[14] CHANG HX, ZHAO YF. Protocatechuic acid as an inhibitor of the JNK / CXCL1 / CXCR2 pathway relieves neuropathic pain in CCI rats[J]. Bosn J Basic Med Sci,2022,22(2):217-228.

(收稿日期:2022-07-19;修回日期:2022-10-13)