

HPLC 法测定乙肝宁颗粒中鸡矢藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素

李季梅¹, 唐 铖², 高 森^{3*}

1. 天津市宁河区医院 药剂科, 天津 301500

2. 天津医科大学 药学院 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070

3. 天津医科大学总医院 药剂科, 天津 300052

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定乙肝宁颗粒中鸡矢藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素。方法 采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 甲酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长分别为 238 nm (0~21.0 min 检测鸡矢藤次苷甲酯、车叶草苷酸和车叶草苷)、280 nm (21.0~40.0 min 检测丹参素、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A) 和 254 nm (40.0~55.0 min 检测毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量为 10 μL。结果 鸡矢藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素分别在 1.49~37.25、0.76~19.00、1.07~26.75、0.99~24.75、12.61~315.25、2.43~60.75、0.69~17.25、1.86~46.50 μg/mL 线性关系良好 ($r \geq 0.999$); 各成分平均加样回收率分别为 98.44%、98.12%、99.36%、97.44%、100.00%、99.19%、96.98%、98.93%, RSD 值分别为 0.71%、1.47%、0.98%、1.35%、0.85%、1.13%、1.02%、1.29%。结论 该方法操作简便、重复性好, 可用于乙肝宁颗粒中多指标性成分的质量控制。

关键词: 乙肝宁颗粒; 鸡矢藤次苷甲酯; 车叶草苷酸; 车叶草苷; 丹参素; 丹酚酸 B; 丹参酮 II_A; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 芒柄花素; 高效液相色谱

中图分类号: R284.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2020)08-1527-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.08.005

Determination of feretoside, asperulosidic acid, asperuloside, danshensu, salvianolic acid B, tanshinone II_A, calycosin 7-*O*-β-*D*-glucopyranoside, and formononetin in Yiganing Granules by HPLC

LI Ji-mei¹, TANG Cheng², GAO Sen³

1. Department of Pharmacy, Tianjin Ninghe Hospital, Tianjin 301500, China

2. Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics (Theranostics), College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

3. Department of Pharmacy, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of feretoside, asperulosidic acid, asperuloside, danshensu, salvianolic acid B, tanshinone II_A, calycosin 7-*O*-β-*D*-glucopyranoside and formononetin in Yiganing Granules. **Methods** The chromatographic separation was carried out on Kromasil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase consisting of acetonitrile - 0.1% formic acid solution with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 30 °C. The detection wavelength were set at 238 nm for feretoside, asperulosidic acid and asperuloside, 280 nm for danshensu, salvianolic acid B and tanshinone II_A, and 254 nm for calycosin 7-*O*-β-*D*-glucopyranoside and formononetin. **Results** Feretoside, asperulosidic acid, asperuloside, danshensu, salvianolic acid B, tanshinone II_A, calycosin 7-*O*-β-*D*-glucopyranoside and formononetin showed good linear relationships within the ranges of 1.49 — 37.25, 0.76 — 19.00, 1.07 — 26.75, 0.99 — 24.75, 12.61 — 315.25, 2.43 — 60.75, 0.69 — 17.25, 1.86 — 46.50 μg/mL ($r \geq 0.999$), whose average recoveries were 98.44%, 98.12%,

收稿日期: 2020-05-24

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目 (18JCYBJC95100)

作者简介: 李季梅 (1975—), 女, 副主任药师, 本科, 主要从事药物质量控制、药物评价、临床药学等医院药学研究。

*通信作者 高 森 (1980—), 男, 副主任药师, 本科, 主要从事中西药质量控制、药物评价等医院药学研究。E-mail: gaosenyjk@163.com

99.36%, 97.44%, 100.00%, 99.19%, 96.98%, and 98.93% with the RSD values of 0.71%, 1.47%, 0.98%, 1.35%, 0.85%, 1.13%, 1.02%, and 1.29%, respectively. **Conclusion** The method is easy to operate and repeatable, can be used for quality control of multiple indicator components in Yiganning Granules.

Key words: Yiganning Granules; feretoside; asperulosidic acid; asperuloside; danshensu; salvianolic acid B; tanshinone II_A; calycosin 7-*O*-β-*D*-glucopyranoside; formononetin; HPLC

乙肝宁颗粒现收载于《中国药典》2015 年版一部, 由白花蛇舌草、白芍、白术、川楝子、丹参、党参、茯苓、黄芪、金钱草、茵陈、牡丹皮、蒲公英、制何首乌组成, 具有补气健脾、活血化瘀、清热解毒的功效, 用于胁痛、腹胀、乏力、尿黄等慢性肝炎属脾气虚弱、血瘀阻滞, 湿热毒蕴证的治疗, 对急性肝炎属上述证候者亦有一定的疗效。多指标成分质量控制模式已逐步应用于中药及其复方制剂的质量控制中, 但质量标准^[1]和文献报道^[2-4]中仅对乙肝宁颗粒所含单一成分进行定量研究。本实验选取乙肝宁颗粒方中黄芪所含主要活性成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素, 丹参所含特征成分丹参素、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 以及白花蛇舌草所含代表性成分鸡矢藤次苷甲酯、车叶草苷酸和车叶草苷为指标, 采用 HPLC 梯度洗脱法实现对乙肝宁颗粒中多指标成分的同时测定, 为全面科学地评价乙肝宁颗粒内在质量提供理论基础。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); AP125WD 型分析天平 (日本 Shimadzu 公司); SB-5200DT 型超声波提取器 (宁波新芝生物科技股份有限公司)。

丹参酮 II_A (批号 110766-201721, 质量分数 99.5%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号 111920-201606, 质量分数 97.6%)、丹参素钠 (批号 110855-201915, 质量分数 97.8%) 和丹酚酸 B (批号 111562-201716, 质量分数 94.1%) 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 车叶草苷酸 (批号 PRF8050928, 质量分数 98.2%)、车叶草苷 (批号 PRF8032722, 质量分数 99.7%)、芒柄花素 (批号 PRF8091225, 质量分数 99.9%)、鸡矢藤次苷甲酯 (批号 PRF8091244, 质量分数 99.7%) 对照品均购自成都普瑞法科技开发有限公司。乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯; 乙肝宁颗粒由九芝堂股份有限公司提供, 规格 17 g/袋, 批号 201811001、201902002、201905001。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

各精密称取鸡矢藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车

叶草苷、丹参素钠、丹酚酸 B、丹参酮 II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素对照品适量, 用 50% 甲醇溶解制成质量浓度分别为 0.298、0.152、0.214、0.198、2.522、0.486、0.138、0.372 mg/mL 的 8 种单组分对照品贮备液。精密吸取 8 种单组分对照品贮备液各 2.5 mL, 用 50% 甲醇溶液制成混合对照品溶液 (含鸡矢藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷、丹参素钠、丹酚酸 B、丹参酮 II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素分别为 14.9、7.6、10.7、9.9、126.1、24.3、6.9、18.6 μg/mL)。

2.2 供试品溶液的制备

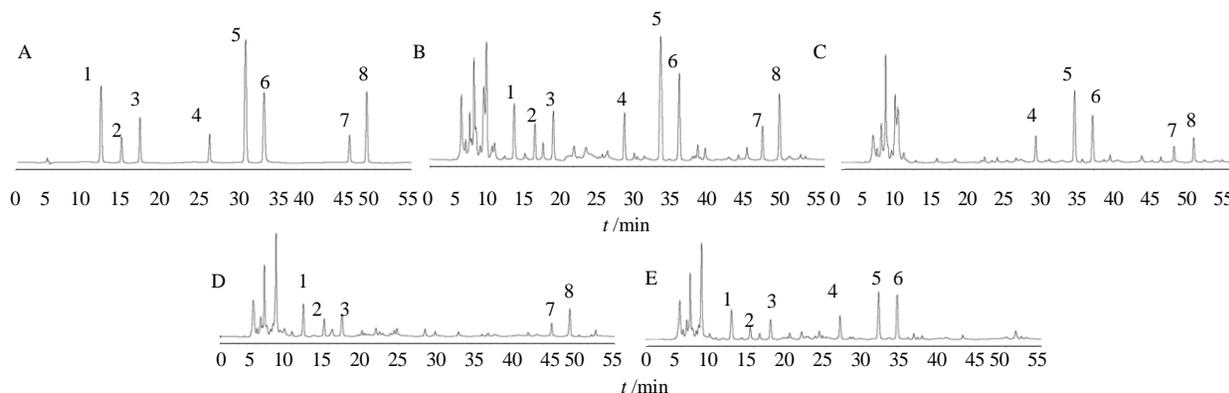
取乙肝宁颗粒适量, 除去内包装, 研成细粉, 精密称取约 2.0 g, 精密加入 50% 甲醇溶液 25 mL, 称定质量, 超声提取 30 min, 放冷后称定质量, 用 50% 甲醇溶液补重, 滤过, 制成供试品溶液。按《中国药典》2015 年版一部乙肝宁颗粒项下的处方工艺分别制备缺白花蛇舌草、丹参、黄芪的阴性样品, 按上述方法制成阴性样品溶液。

2.3 色谱条件

Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 乙腈, 流动相 B: 0.1% 甲酸溶液, 梯度洗脱 (0~10.0 min, 23.0% A; 10.0~21.0 min, 23.0%→35.0% A; 21.0~40.0 min, 35.0%→42.0% A; 40.0~51.0 min, 42.0%→48.0% A; 51.0~55.0 min, 48.0%→23.0% A); 检测波长分别为 238 nm (0~21.0 min 检测鸡矢藤次苷甲酯、车叶草苷酸和车叶草苷)^[5]、280 nm (21.0~40.0 min 检测丹参素、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A)^[6-8] 和 254 nm (40.0~55.0 min 检测毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素)^[9-10]; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量为 10 μL。

2.4 系统适应性试验

精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液进样检测, 记录色谱图, 结果供试品溶液色谱图中鸡矢藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素色谱峰峰形对称, 各成分分离度均大于 1.5, 理论塔板数按各成分色谱峰均大于 4 000, 阴性样品对各成分的测定无干扰, 见图 1。



1-鸡矢藤次苷甲酯 2-车叶草苷酸 3-车叶草苷 4-丹参素 5-丹酚酸 B 6-丹参酮 II_A 7-毛蕊异黄酮葡萄糖苷 8-芒柄花素
 1-feretoside 2-asperulosidic acid 3-asperulose 4-danshensu 5-salvianolic acid B 6-tanshinone II_A 7-calycosin 7-O-β-D-glucopyranoside
 8-formononetin

图1 混合对照品(A)、乙肝宁颗粒(B)、缺白花蛇舌草阴性样品(C)、缺丹参阴性样品(D)和缺黄芪阴性样品(E)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substances(A), Yiganning Granules (B), negative sample without *Hedysotis Herba* (C), negative sample without *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (D) and negative sample without *Astragal Radix* (E)

2.5 线性关系考察

分别精密吸取8种单组分对照品贮备液各0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,用50%甲醇溶液制成系列质量浓度混合对照品溶液,依法进样检测鸡矢

藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷、丹参素、丹酚酸B、丹参酮II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的峰面积,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,结果见表1。

表1 各成分线性关系

Table 1 Linear relationships of various constituents

成分	线性方程	r	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
鸡矢藤次苷甲酯	$A=1.2996 \times 10^6 C+990.5$	0.999 1	1.49~37.25
车叶草苷酸	$A=9.1367 \times 10^5 C-457.8$	0.999 3	0.76~19.00
车叶草苷	$A=1.3279 \times 10^6 C+871.6$	0.999 9	1.07~26.75
丹参素	$A=1.1502 \times 10^6 C+662.4$	0.999 8	0.99~24.75
丹酚酸 B	$A=5.8573 \times 10^5 C+573.9$	0.999 7	12.61~315.25
丹参酮 II _A	$A=1.6131 \times 10^6 C-1003.2$	0.999 5	2.43~60.75
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$A=7.8129 \times 10^5 C+285.7$	0.999 2	0.69~17.25
芒柄花素	$A=1.4017 \times 10^6 C+740.3$	0.999 6	1.86~46.50

2.6 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液连续进样6次,测定鸡矢藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷、丹参素、丹酚酸B、丹参酮II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素峰面积,结果峰面积的RSD值分别为1.03%、1.11%、0.99%、1.06%、0.55%、0.76%、1.27%、0.82%。

2.7 重复性试验

取批号201811001乙肝宁颗粒样品,平行制备

6份供试品溶液,依法进样,测定鸡矢藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷、丹参素、丹酚酸B、丹参酮II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的峰面积,计算得8种成分质量分数的RSD值分别为1.20%、1.38%、1.41%、1.35%、1.47%、0.96%、0.86%、1.13%。

2.8 稳定性试验

取批号201811001乙肝宁颗粒样品,制备供试品溶液,于0、2、4、8、12、18h进样检测鸡矢藤

次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的峰面积, 结果 8 种成分峰面积的 RSD 值分别为 1.01%、1.14%、0.95%、1.03%、0.57%、0.73%、1.25%、0.79%, 表明供试品溶液 18 h 内稳定。

2.9 回收率试验

取批号 201811001 乙肝宁颗粒样品, 除去内包装, 研成细粉, 取 9 份, 每份约 1.0 g, 精密称定, 随机分成 3 组, 精密加入混合对照品溶液 (含鸡矢藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素 0.172、0.114、0.162、0.138、1.854、0.318、0.096、0.252 mg/mL) 0.5、1.0、1.5 mL 各 1 组, 制成供试品溶液, 依法进样测定鸡矢藤次苷甲酯、车叶草苷

酸、车叶草苷、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的峰面积, 计算得 8 种成分的平均加样回收率分别为 98.44%、98.12%、99.36%、97.44%、100.00%、99.19%、96.98%、98.93%, RSD 值分别为 0.71%、1.47%、0.98%、1.35%、0.85%、1.13%、1.02%、1.29%。

2.10 样品测定

取 3 批乙肝宁颗粒样品适量, 除去内包装, 研成细粉, 每个批次取 3 份, 每份约 2.0 g, 精密称定, 制备供试品溶液, 依法进样测定鸡矢藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的峰面积, 采用外标法计算乙肝宁颗粒中 8 种成分的质量分数, 结果见表 2。

表 2 乙肝宁颗粒中鸡矢藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的测定结果 ($n=3$)

Table 2 Determination of feretoside, asperulosidic acid, asperuloside, danshensu, salvianolic acid B, tanshinone II_A, calycosin 7-O-β-D-glucopyranoside, and formononetin in Yiganing Granules ($n=3$)

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)							
	鸡矢藤次苷甲酯	车叶草苷酸	车叶草苷	丹参素	丹酚酸 B	丹参酮 II _A	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	芒柄花素
201811001	0.171	0.113	0.158	0.139	1.862	0.317	0.095	0.253
201902002	0.157	0.104	0.170	0.147	1.787	0.291	0.103	0.276
201905001	0.182	0.126	0.137	0.129	2.016	0.345	0.082	0.232

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的选择

在供试品溶液制备时, 参考相关文献首先对比考察了不同提取溶剂 (甲醇、70% 甲醇溶液、50% 甲醇溶液、95% 乙醇溶液、70% 乙醇溶液、水), 以乙肝宁颗粒中鸡矢藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的提取率为指标, 同时兼顾色谱图中杂质峰的影响, 结果显示以 50% 甲醇溶液为提取溶剂时, 8 种待测成分提取率最佳, 杂质成分干扰较小。依次对不同提取方式 (超声提取法、回流提取法) 和提取时间 (15、30、45 min) 进行考察, 结果显示两种提取方式对 8 种待测成分综合提取率无显著差异, 可能与乙肝宁颗粒中 13 味中药材均经提取、浓缩的生产制备工艺有关, 超声提取 30 min 所测各成分均能提取完全。故最终确定采用 50% 甲醇超声提取 30 min 对乙肝宁颗粒进行供试品溶液制备。

3.2 流动相洗脱系统的选择

实验对乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸水溶液^[11]、乙腈-0.1% 甲酸水溶液^[12]3 种流动相系统进行考察, 以乙肝宁颗粒中鸡矢藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的峰形、分离效果和色谱图中基线平稳、杂质干扰为指标, 结果显示乙腈-0.1% 甲酸水溶液流动相系统优于其他 2 种流动相体系, 通过对流动相中有机相和水相比比例的不断摸索, 最终确定采用乙腈-0.1% 甲酸水溶液流动相系统对乙肝宁颗粒中鸡矢藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素进行同时检测, 在此流动相体系条件下, 8 种待测成分峰形对称, 分离度符合要求, 杂质成分干扰较小。

本实验采用 HPLC 梯度洗脱法对乙肝宁颗粒中鸡矢藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄

花素进行了同时测定,建立了乙肝宁颗粒中多指标质量控制模式,所建立的方法操作便捷、专属性强,结果准确,为全面评价乙肝宁颗粒的整体质量提供了参考依据。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 428-429.

[2] 张秋蓉,周 浓,杨 敏. HPLC 测定乙肝宁颗粒中川楝素 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 78-79, 82.

[3] 李 丹,姜家书,付 彬. 高效液相色谱法测定乙肝宁颗粒中芍药苷含量 [J]. 河南中医, 2010, 30(5): 450-451.

[4] 尹思泳,陈钟扬,梁华伦,等. HPLC 法测定乙肝宁颗粒中二苯乙烯苷含量 [J]. 中国民族民间医药, 2015, 24(15): 11-12.

[5] 杨培民,曹广尚,李 芳,等. 基于高效液相色谱-二极管阵列检测法测定白花蛇舌草中 5 个环烯醚萜成分的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(1): 9-12.

[6] 翟学佳,徐锦凤. 高效液相色谱法同时测定丹参药材水溶性和脂溶性成分的含量 [J]. 医药导报, 2009, 28(10): 1345-1348.

[7] 杨 菲,王智民,张启伟,等. “一测多评”法测定丹参酚酸类成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(17): 2372-2379.

[8] 程 沛,韩东岐,胡伟慧,等. 高效液相色谱法同时测定丹参中 10 种水溶性和 4 种脂溶性成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(6): 991-996.

[9] 付 娟,杨世海,黄林芳. 超高效液相色谱法同时测定黄芪中 6 种黄酮类成分的含量 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(11): 916-919.

[10] 张 妍,董 琳,雍婧姣,等. HPLC 法同时测定黄芪药材中 10 种黄酮类成分的含量 [J]. 中国药房, 2017, 28(21): 2970-2973.

[11] 杨 健,郭书台,窦建卫. 白花蛇舌草 HPLC 指纹图谱的研究 [J]. 西北药学杂志, 2018, 33(5): 575-580.

[12] 李存满,张志英,王文淑. HPLC 同时测定白花蛇舌草注射液中 5 种成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4): 89-92.