

RP-HPLC 法测定眩晕宁颗粒中 3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸、23-乙酰泽泻醇 B 和 β -蜕皮甾酮

王泳¹, 汪燕^{1*}, 黄灿¹, 陶贤琦¹, 邢薇薇², 齐腊梅¹

1. 安庆市立医院 药事管理科, 安徽 安庆 246003

2. 安徽省食品药品检验研究院, 安徽 合肥 230051

摘要: 目的 建立 RP-HPLC 法测定眩晕宁颗粒中 3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸、23-乙酰泽泻醇 B 和 β -蜕皮甾酮的测定方法。方法 采用 Capcell Pak UG C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.5%磷酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长: 348 nm (3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸)、250 nm (23-乙酰泽泻醇 B)、208 nm (β -蜕皮甾酮); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 28 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L。结果 3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸、 β -蜕皮甾酮和 23-乙酰泽泻醇 B 分别在 0.076 7~7.670 0、0.098 3~9.830 0、0.019 7~1.970 0 μ g/mL 线性良好, 平均回收率分别为 100.05%、98.33%、99.42%, RSD 值分别为 0.7%、1.2%、1.3%。结论 方法具有前处理简单、分析时间短、检测结果准确等优点, 适用于眩晕宁颗粒的质量控制。

关键词: 眩晕宁颗粒; 3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸; 23-乙酰泽泻醇 B; β -蜕皮甾酮; RP-HPLC

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)05-1109-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.05.011

Determination of 3,5-O-dicaffeoyl quinic acid, 23-acetylalisol B, and β -ecdysterone in Xuanyunning Granules by RP-HPLC

WANG Yong¹, WANG Yan¹, HUANG Can¹, TAO Xian-qi¹, XING Wei-wei², QI La-mei¹

1. Department of Pharmacy Management, Anqing Municipal Hospital, Anqing 246003, China

2. Anhui Institute for Food and Drug Inspection, Hefei 230051, China

Abstract: Objective To establish an RP-HPLC method for the determination of 3,5-O-dicaffeoyl quinic acid, 23-acetylalisol B, and β -ecdysteroid in Xuanyunning Granules. **Methods** The separation was carried out on Capcell Pak UG C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m). The mobile phase was acetonitrile - 0.5% phosphoric acid solution with gradient elution. The detection wavelength was set at 348 nm (3,5-O-dicaffeoyl quinic acid), 250 nm (23-acetylalisol B), and 208 nm (β -ecdysterone). The flow rate was 1.0 mL/min, temperature of column was set at 28 $^{\circ}$ C, and the volume of injection was 10 μ L. **Results** 3,5-O-dicaffeoyl quinic acid, 23-acetylalisol B, and β -ecdysteroid showed good linear relationships in concentration ranges of 0.076 7 — 7.670 0, 0.098 3 — 9.830 0, and 0.019 7 — 1.970 0 μ g/mL, and their average recoveries were 100.05%, 98.33%, and 99.42% with RSD values of 0.7%, 1.2%, and 1.3%, respectively. **Conclusion** The method has the advantages of simple pretreatment, short analysis time, and accurate detection results, and is suitable for the quality control of Xuanyunning Granules.

Key words: Xuanyunning Granules; 3,5-O-dicaffeoyl quinic acid; 23-acetylalisol B; β -ecdysteroid; RP-HPLC

眩晕宁颗粒是由泽泻、白术、茯苓、陈皮、半夏、女贞子、墨旱莲、菊花、牛膝、甘草 10 味中药经粉碎、提取等工艺加工制得的中药颗粒剂, 具有健脾利湿、益肝补肾的功效, 临床主要用于痰湿中阻、肝肾不足引起的头昏、头晕等病症^[1-5]。随着我

国人口老龄化趋势的加剧和人们工作、生活压力的不断加大, 许多老年人群患有头昏、头晕等症, 因此眩晕宁颗粒在临床上的应用也越来越多。眩晕宁颗粒收载在《卫生部药品标准中药成方制剂》第十六册, 规定了性状、鉴别、检查等, 缺少含量测

收稿日期: 2022-12-29

基金项目: 安徽医科大学科研基金项目 (2020xkj241)

作者简介: 王泳 (1982—), 女, 主管药师, 本科, 研究方向为临床药学、医院药学。

*通信作者: 汪燕, 女, 主任药师, 从事药事管理。E-mail: xiexin2018@yeah.net

定项目。眩晕宁颗粒的组成中药菊花、泽泻和牛膝中有有效成分分别为 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、23-乙酰泽泻醇 B 和 β -蜕皮甾酮^[7-9]，因此本实验建立了 RP-HPLC 法测定眩晕宁颗粒制剂中 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、23-乙酰泽泻醇 B 和 β -蜕皮甾酮。

1 仪器与试药

安捷伦 1290 infinity，配备 G4513A 型自动进样器、G1316C 型柱温箱、G1315 型二极管阵列检测器（美国 Agilent 科技公司）；梅特勒 AE200 型电子天平（精度为万分之一，瑞士 Mettler-Toled 科技公司）；鑫欣 XCD-NS-3C 型多槽超声波清洗机（济宁鑫欣超声电子设备公司）。

3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸（批号为 111782-202208，质量分数以 95.9%计）、 β -蜕皮甾酮（批号为 111638-201907，质量分数以 98.3%计）、23-乙酰泽泻醇 B（批号为 111846-202006，质量分数以 98.3%计）对照品均购自中国食品药品检定研究院。眩晕宁颗粒，规格 8 g/袋，桂林三金药业股份有限公司生产，批号分别为 220321、220341、220424；实验用水为自制超纯水，乙腈、甲醇均为色谱纯（天津市科密欧试剂公司），其他试剂均为分析纯（上海化学试剂厂）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Capcell Pak UG C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μ m）；流动相为乙腈（A）-0.5%磷酸溶液（B），梯度洗脱（0~5 min，13%A；5~15 min，13%~45%A；15~24 min，45%~86%A；24~30 min，86%A；30~35 min，86%~13%A）；检测波长：348 nm（3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸）、250 nm（23-乙酰泽泻醇 B）、208 nm（ β -蜕皮甾酮）；体积流量：1.0

mL/min；柱温：28 $^{\circ}$ C；进样量：10 μ L。

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品储备液的制备 取 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸对照品适量，置 10 mL 棕色量瓶中，加甲醇制成 76.7 μ g/mL 的溶液，即得对照品储备液。同法制备含 23-乙酰泽泻醇 B、 β -蜕皮甾酮分别为 98.3、19.7 μ g/mL 的对照品储备液。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密移取各对照品储备液 1.0 mL，置 10 mL 棕色量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，即得 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、23-乙酰泽泻醇 B 和 β -蜕皮甾酮质量浓度分别为 7.67、9.83、1.97 μ g/mL 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取眩晕宁颗粒供试品适量，置研钵中研成细粉，准确称取约 0.5 g，置 25 mL 棕色量瓶中，加甲醇约 20 mL，超声提取 20 min（超声功率设定 220 W、频率 75 Hz），提取完毕后，置室温下放冷，加甲醇至刻度，摇匀，0.45 μ m 滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.2.4 阴性样品溶液的制备 按眩晕宁颗粒的质量标准中的处方组成和制备方法，分别制备缺菊花、泽泻和牛膝的阴性样品，并按照供试品溶液的制备项下方法分别制得缺菊花、泽泻和牛膝的阴性样品溶液。

2.3 专属性试验

取对照品、供试品和阴性样品溶液，待色谱仪基线稳定后分别进样 10 μ L，收集谱图，见图 1。结果表明，在与对照品溶液谱图中 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、23-乙酰泽泻醇 B 和 β -蜕皮甾酮相应的保留时间位置上，供试品溶液谱图中均有相对应的吸收峰，而在阴性样品溶液对应位置无干扰峰。3 种成分分离良好，理论塔板数均大于 2 000。

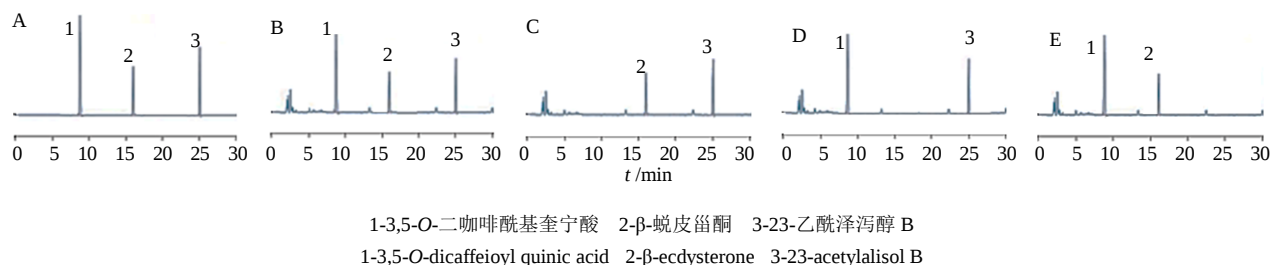


图 1 混合对照品（A）、眩晕宁颗粒（B）、缺菊花阴性样品（C）、缺牛膝阴性样品（D）和缺泽泻阴性样品（E）的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substances (A), Xuanyunning Granules sample (B), negative sample without *Chrysanthemi Flos* (C), negative sample without *Achyranthis Bidentatae Radix* (D), and negative sample without *Alismatis Rhizoma* (E)

2.4 线性关系考察

分别准确移取 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、β-蜕皮甾酮和 23-乙酰泽泻醇 B 对照品储备液 0.01、0.05、0.1、0.5、1 mL，分别置 5 个 10 mL 棕色量瓶

中，加甲醇至刻度，摇匀，分别进样 10 μL，收集谱图。分别以 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、β-蜕皮甾酮和 23-乙酰泽泻醇 B 的质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标进行线性回归，计算方程，结果见表 1。

表 1 各成分回归方程、相关系数和线性范围
Table 1 Curve equation, linear coefficient, and range of components

成分	方程	r^2	线性范围/(μg mL ⁻¹)
3,5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	$Y=16.18 X+11.21$	0.999 2	0.076 7~7.670 0
β-蜕皮甾酮	$Y=12.28 X+13.62$	0.999 3	0.098 3~9.830 0
23-乙酰泽泻醇 B	$Y=12.79 X+14.95$	0.999 1	0.019 7~1.970 0

2.5 精密度试验

取对照品溶液，连续进样 6 次，收集谱图，结果 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、β-蜕皮甾酮和 23-乙酰泽泻醇 B 峰面积的 RSD 值分别为 1.41%、0.98%、1.16%。

2.6 重复性试验

取批号 220321 眩晕宁颗粒供试品适量，置研钵中研成细粉，准确称取约 0.5 g，平行取样 6 份，分别置 25 mL 棕色量瓶中，制备供试品溶液，分别进样 10 μL，收集谱图。根据谱图中收集的 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、β-蜕皮甾酮和 23-乙酰泽泻醇 B 峰面积，计算得 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、β-蜕皮甾酮和 23-乙酰泽泻醇 B 质量分数的 RSD 值分别为 1.21%、2.33%、1.47%。

2.7 稳定性试验

取批号 220321 眩晕宁颗粒供试品适量，制备供试品溶液，于常温下放置，在 0、2、4、8、12、24 h 分别取样检测，收集谱图，结果 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、β-蜕皮甾酮和 23-乙酰泽泻醇 B 峰面

积的 RSD 值分别为 1.35%、1.52%、1.17%，表明在 24 h 内供试品溶液稳定。

2.8 回收率试验

取批号 220321 眩晕宁颗粒供试品适量，平行取样 6 份，分别准确称取约 0.25 g，置 25 mL 棕色量瓶中，分别加入 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、β-蜕皮甾酮和 23-乙酰泽泻醇 B 对照品 0.490 5、0.245 8、0.098 5 mg，制备供试品溶液，分别进样 10 μL，收集谱图，计算回收率，结果 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、β-蜕皮甾酮和 23-乙酰泽泻醇 B 的平均回收率分别为 100.05%、98.33%、99.42%，RSD 值分别为 0.7%、1.2%、1.3%。

2.9 样品测定

取批号分别为 220321、220341、220424 眩晕宁颗粒样品适量，置研钵中研成细粉，每批 2 份平行，制备供试品溶液，分别进样 10 μL，收集色谱谱图，以外标法计算供试品中 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、β-蜕皮甾酮和 23-乙酰泽泻醇 B 的质量分数，结果见表 2。

表 2 眩晕宁颗粒中 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、23-乙酰泽泻醇 B 和 β-蜕皮甾酮的测定结果 (n=2)
Table 2 Determination of 3,5-*O*-dicaffeoyl quinic acid, 23-acetylalisol B, and β-ecdysterone in Xuanyunning Granules (n=2)

批号	质量分数/(mg g ⁻¹)		
	3,5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	β-蜕皮甾酮	23-乙酰泽泻醇 B
220321	1.423	0.846	0.324
220341	1.501	0.827	0.319
220424	1.442	0.815	0.332

3 讨论

3.1 检测波长选择

实验选取眩晕宁颗粒组成药材菊花、牛膝和泽

泻 3 种药材，通过控制这 3 种药材中药效活性成分作为其质量控制的指标。取 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、β-蜕皮甾酮和 23-乙酰泽泻醇 B 对照品溶液，

分别进样 10 μL , 设置波长扫描为 200~600 nm, 采集 3 种成分的光谱图。结果 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、 β -蜕皮甾酮和 23-乙酰泽泻醇 B 最大吸收波长分别在 348、250、208 nm, 差异较大, 为提高检测效率, 实验采用程序波长切换技术实现了在同一色谱条件下 3 种成分最大吸收波长处分别测定。

3.2 流动相选择

高效液相色谱法常用的流动相有甲醇体系和乙腈体系, 实验分别选择水-甲醇、水-乙腈、甲醇-0.5%磷酸溶液和乙腈-1.0%磷酸溶液作为流动相体系时, 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、 β -蜕皮甾酮和 23-乙酰泽泻醇 B 3 种待测成分的出峰时间、分离效果的影响情况。结果选择甲醇体系时, 3 种目标物出峰时间较长, 检测效率偏低; 选择水-乙腈体系时, 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸色谱峰发生分叉, 可能原因是其在纯化水状态下, 存在 2 种分子状态, 这 2 种分子状态在该色谱条件下微弱分离, 导致定量结果不准确; 选择乙腈-0.5%磷酸溶液时, 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、 β -蜕皮甾酮和 23-乙酰泽泻醇 B 分离良好, 分析时间较短, 且无基质干扰。故实验选择乙腈-0.5%磷酸溶液作为流动相体系。

3.3 前处理条件优化

眩晕宁颗粒由 10 味中药组成, 药材种类较多, 基质复杂, 为提高检测准确度和缩短分析时间, 有必要对前处理方法进行优化。取眩晕宁颗粒供试品, 分别设置提取溶剂为甲醇、85%甲醇溶液和 70%甲醇溶液时, 对 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、 β -蜕皮甾酮和 23-乙酰泽泻醇 B 3 种成分提取的影响, 再分别考察超声功率 (240、250、260 W) 和提取时间 (10、15、20 min) 的影响, 结果选择甲醇作为提取剂, 超声功率设置 250 W, 时间 15 min 为最佳提取条件。

实验以眩晕宁颗粒为研究对象, 选取其组成药材菊花、牛膝和泽泻中活性成分作为研究目标, 建立 RP-HPLC 法测定眩晕宁颗粒中 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、23-乙酰泽泻醇 B 和 β -蜕皮甾酮, 结果方法具有前处理简单、分析时间短、检测结果准确等优点, 适用于眩晕宁颗粒的质量控制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘传, 程常福, 王嵘. 眩晕宁颗粒剂治疗颈性眩晕 70 例疗效观察 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2010, 18(1): 24-25.
- [2] 刘喜花, 刘强. 眩晕宁颗粒联合长春西汀治疗椎-基底动脉供血不足性眩晕症疗效观察 [J]. 中国药业, 2018, 27(17): 54-56.
- [3] 张龙. 眩晕宁颗粒联合天麻素注射液治疗颈性头痛的效果观察 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(71): 140-141.
- [4] 冉文峰, 冯东宁, 李继红, 等. 天麻素胶囊联合眩晕宁颗粒治疗椎基底动脉迂曲扩张症合并后循环缺血性眩晕的近远期疗效 [J]. 临床医学研究与实践, 2022, 7(10): 130-133.
- [5] 宋鑫, 晋舒, 刘佳, 等. 眩晕宁颗粒联合天麻素注射液治疗眩晕的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(8): 1437-1440.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 74-75, 239-240, 323-324.
- [7] 敖敦格日乐, 阿如汗, 郝俊生, 等. HPLC 法测定猪毛蒿中绿原酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸成分的含量 [J]. 中国民族医药杂志, 2021, 27(9): 59-61.
- [8] 黄牧坤, 王卫东, 李明杰. RP-HPLC 法测定胃得安胶囊中 23-乙酰泽泻醇 B、辛弗林和厚朴酚 3 种成分的含量 [J]. 广东药科大学学报, 2022, 38(5): 66-69.
- [9] 胡亮, 方磊, 李瑞莲, 等. 特色民族药土牛膝中 β -蜕皮甾酮的含量测定 [J]. 中国药师, 2022, 23(8): 1625-1627.

[责任编辑 解学星]