

杨雪苗, 康松松, 冯智翱, 等. HPLC 波长切换法同时测定蒙药钦汤中 5 种活性成分的含量[J]. 环境化学, 2021, 40(12): 3986-3988.
YANG Xuemiao, KANG Songsong, FENG Zhiao, et al. Simultaneous determination of five active components of Qintang through wavelength conversion by HPLC[J]. Environmental Chemistry, 2021, 40 (12): 3986-3988.

HPLC 波长切换法同时测定蒙药钦汤中 5 种活性成分的含量*

杨雪苗 康松松 冯智翱 邬国栋 安明** 薄彧坤**

(包头医学院, 包头, 014040)

摘要 本文建立 HPLC 波长切换法同时测定蒙药钦汤中没食子酸、原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、栀子苷和鞣花酸的含量的方法. 试验结果表明, 测定的没食子酸、原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、栀子苷、鞣花酸分别在检测范围内 (0.358—0.954 μg 、0.066—0.175 μg 、0.386—1.031 μg 、1.685—4.493 μg 、0.308—0.822 μg) 保持良好的线性关系; 平均加样回收率为 98.8%—101.8%, RSD < 2.0%; 3 批样品中 5 个成分的含量分别是 1.0399—1.0629、0.0778—0.0863、1.0986—1.1844、6.5152—6.836 3、1.2444—1.3098 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$. 该方法简便、准确, 可同时测定钦汤中 5 种活性成分, 适用于钦汤质量的控制.

关键词 钦汤, 没食子酸, 原儿茶酸, 羟基红花黄色素 A, 栀子苷, 鞣花酸, 高效液相色谱法, 波长切换法.

Simultaneous determination of five active components of Qintang through wavelength conversion by HPLC

YANG Xuemiao KANG Songsong FENG Zhiao WU Guodong
AN Ming** BO Yukun**

(Baotou Medical College, Baotou, 014040, China)

Abstract An analytical method for determining gallic acid, protocatechuic acid, hydroxysafflor yellow A, gardenoside and ellagic acid in Qintang of Mongolian medicine was established by high performance liquid chromatography (HPLC) wavelength switching. The results showed that the five components of gallic acid, protocatechuic acid, hydroxyl safflower yellow A, gardenoside and ellagic acid were maintain a good linear relationship within the detection range (0.358—0.954 μg 、0.066—0.175 μg 、0.386—1.031 μg 、1.685—4.493 μg 、0.308—0.822 μg). The average recoveries were 98.8%—101.8%, RSD < 2.0%. The contents of 5 components in 3 batches of samples were 1.0399—1.0629, 0.0778—0.0863, 1.0986—1.1844, 6.5152—6.8363, 1.2444—1.3098 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively. The method is simple, accurate, and can simultaneously determine five active ingredients in Qintang, and is suitable for the quality control of Qintang.

Keywords Qintang, gallic acid, protocatechuic acid, hydroxysafflor yellow A, gardenoside, ellagic acid, HPLC, wavelength switching method.

钦汤是由诃子、川楝子、栀子、瞿麦、红花、五灵脂、川木通、人工牛黄 8 味药材混合制成的蒙药经典处方, 主要用于治疗肝胆热, 肝肿大, 肝区痛. 蒙药复方制剂成分复杂, 在临床应用中往往是多组分间的协同作用达到治疗效果.

* 内蒙古自治区科技创新引导项目 内蒙古自治区财政厅 (00120209), 包头医学院大学生创新创业训练计划 (29), 内蒙古自治区高等学校科学研究项目 (NJZY19193) 和内蒙古自然科学基金 (2021MS08011) 资助.

** 通讯联系人 Corresponding author, Tel: 13847201181; E-mail: 610283014@qq.com; Tel: 15044987255; E-mail: 26210781@qq.com

目前钦汤质量标准中仅有性状、鉴别和检查项,无含量测定,而单一成分测定不能反映钦汤的整体化学信息,难以控制和评价制剂质量^[4],为更全面地完善其质量标准体系,本研究采用多组分同时测定的方法对多个成分进行质量评价从而对复方制剂实现综合、整体的评价模式。

1 实验部分

1.1 仪器与试药

Thermo Ultimate 3000 高效液相色谱仪(美国赛默飞世尔科技有限公司)、BSA224S-CW 万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)、SQP 型十万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)、超纯水仪(美国赛默飞世尔科技有限公司)、AS10200 超声波清洗机(40/60 Hz,北京华瑞博远科技发展有限公司)、TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

钦汤(规格:每袋 3g,批号 910281、910282、910283,包头市蒙医中医医院院内制剂);对照品没食子酸(批号 110831-201605,含量 $\geq 90.8\%$)、羟基红花黄色素 A(批号 111637-201810,含量 $\geq 93.1\%$)、栀子苷(批号 110749-201919,含量 $\geq 97.6\%$)、鞣花酸(批号 111959-201602,含量 $\geq 89.3\%$)购自中国食品药品检定研究院;对照品原儿茶酸(批号 AF9062921,含量 $\geq 98\%$)购自于埃法生物科技有限公司;乙腈为色谱纯,甲醇为色谱纯或分析纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

对照品溶液的制备 精密称取没食子酸、原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、栀子苷、鞣花酸适量,甲醇溶解得各对照品储备液。加 80% 甲醇制成以下不同质量浓度的没食子酸(39.402、52.536、65.670、78.804、91.938、105.072 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、原儿茶酸(6.690、8.920、11.150、13.380、15.610、17.840 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、羟基红花黄色素 A(41.508、55.344、69.180、83.016、96.852、110.688 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、栀子苷(172.62、230.16、287.7、345.24、402.78、460.32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、鞣花酸(34.530、46.040、57.550、69.060、80.570、92.080 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的混合对照品溶液。

供试品溶液的制备 精密称定 2.0 g 钦汤粉末于锥形瓶,加入 80% 甲醇 40 mL,称定质量超声提取 40 min,取出放冷,减失的重量用 80% 甲醇补足。提取液于离心机离心 10 min(5000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),取上清液,微孔滤膜滤过(0.22 μm),收集续滤液,即得。

阴性对照溶液的制备 根据钦汤处方比例制备缺诃子、红花、栀子的阴性样品。

1.2 分析方法

色谱柱采用 Thermo Synchronis C₁₈(250 mm \times 4.6 mm,5 μm);以乙腈(A)-0.05% 磷酸水(B)为流动相,梯度洗脱,见表 1;流速:1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;进样量:10 μL ;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;254 nm(0—12 min,检测没食子酸、原儿茶酸)、403 nm(12—17 min,检测羟基红花黄色素 A)、238 nm(17—20 min,检测栀子苷)、254 nm(20—45 min,检测鞣花酸),进样前用甲醇溶液冲洗色谱柱 10 min,再用流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸水(B)平衡 8 min。该色谱条件下各峰峰型良好,分离度均大于 1.5。

表 1 梯度洗脱表
Table 1 Gradient elution

洗脱时间/min	0—6	6—10	10—16	16—22	22—25	25—32	32—38	45
流动相(A)/%	9—9	9—13	13—15	15—18	18—18	18—28	28—48	48

2 结果与讨论

2.1 系统适用性和专属性试验

精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL 注入高效液相色谱仪,按照上述色谱条件进行检测,记录色谱图。结果表明,在该色谱条件下,5 个成分明显被准确分离($R > 1.5$),理论塔板数大于 3000,阴性溶液对 5 个待测组分无干扰,表明该方法专属性好。

2.2 线性关系考察

不同质量浓度的混合对照品溶液按上述色谱条件进样测定,以溶液浓度为横坐标(X , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线。得到 5 个组分的回归方程及线性范围,结果显示没食子酸、原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、栀子苷、鞣花酸均保持良好的线性关系,结果见表 2。

表 2 5 种成分的回归方程及线性关系

Table 2 The regression equations linear ranges of five components

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
没食子酸(gallic acid)	$Y=0.309 1X+0.187 7$	0.999 9	0.358—0.954
原儿茶酸(protocatechuic acid)	$Y=0.557 8X+0.021 7$	0.999 9	0.066—0.175
羟基红花黄色素 A(hydroxysafflor yellow A)	$Y=0.514 2X+0.106 5$	0.999 9	0.386—1.031
栀子苷(gardenoside)	$Y=0.257 2X+0.444 9$	0.999 9	1.685—4.493
鞣花酸(ellagic acid)	$Y=1.420 1X-0.472 1$	0.999 9	0.308—0.822

2.3 精密度、稳定性和重复性

同一混合对照品溶液,按上述色谱条件进样 6 次,测得 5 个组分的峰面积 RSD 分别为 0.30%、0.38%、0.37%、0.33%、0.78%, RSD < 2%,表明仪器精密度良好。

精密称定钦汤粉末 2.0 g(批号 910281),按上述方法制备供试品溶液,分别于 0、3、6、9、12、24 h 进样检测,记录峰面积. 5 个成分的峰面积 RSD 分别为 0.68%、0.63%、0.46%、0.30%、1.17%,表明供试品溶液在 24 h 内保持良好的稳定性。

精密称取同一批次钦汤样品 2.0 g(批号 910281),按上述方法制备 6 份供试品溶液,根据上述色谱条件进样检测,记录峰面积.按照回归方程计算 5 个成分的含量,没食子酸、原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、栀子苷、鞣花酸分别为 1.0629、0.0875、1.172 2、6.8014、1.2776 mg·g⁻¹, RSD 值分别为 0.37%、2.35%、0.88%、0.93%、0.46%, RSD 值均在规定值范围内,结果表明该方法重复性良好。

2.4 加样回收试验

取已知含量的钦汤粉末 9 份(批号 910281),每份约 1.0 g,精密称定,分为 3 组,每组 3 份.每份精密加入适量对照品溶液,相当于标示量的 50%、100%、150%.用 80% 甲醇溶液定容至 40 mL,摇匀.按上述方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进样检测.计算 5 个成分的平均加样回收率,测得没食子酸、原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、栀子苷、鞣花酸的平均加样回收率分别为 100.9%、98.8%、101.4%、101.8%、100.7%, RSD 分别为 0.57%、1.07%、0.95%、0.39%、0.64%,均 < 2.0%。

2.5 样品含量测定

取 3 个不同批次的钦汤样品(910281、910282、910283),每个批次 3 份,共 9 份.制备供试品溶液,根据上述色谱条件进样检测,记录各组峰面积,按外标法计算 5 个成分的含量,结果见表 3。

表 3 钦汤样品含量测定结果(mg·g⁻¹, n=3)

Table 3 The results of sample content determination of Qintang

批号	没食子酸	原儿茶酸	羟基红花黄色素 A	栀子苷	鞣花酸
910281	1.047 1	0.077 8	1.098 6	6.515 2	1.244 4
910282	1.039 9	0.081 4	1.136 5	6.642 6	1.287 3
910283	1.062 9	0.086 3	1.184 4	6.836 3	1.309 8

3 结论

本实验采用 HPLC 波长切换法同时完成了钦汤中 5 种活性成分的含量测定,该方法简便、快捷,测定结果准确度高、重复性好,可用于钦汤质量的控制.该方法的建立为钦汤质量标准的提升提供了数据支持。

参考文献 (References)

- [1] 冯建安,施崇精,李希,等. HPLC法同时测定济川合剂中7个药效成分 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(8): 1349-1354.
FENG J A, SHI C J, LI X, et al. Simultaneous determination of seven effective constituents in Jichuan mixture by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal, 2020, 40(8): 1349-1354 (in Chinese).