

# HPLC法同时测定舒肝宁注射液中5种成分的含量<sup>△</sup>

支旭然\*,王 颢,宋浩静,董占军\*(河北省人民医院药学部,石家庄 050051)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)33-4702-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.33.26

**摘要** 目的:建立同时测定舒肝宁注射液中5种成分含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Symmetry<sup>®</sup> C<sub>18</sub>,流动相为甲醇-0.4%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为238 nm(栀子苷、黄芩苷)、327 nm(绿原酸、野黄芩苷、黄芩素),柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷检测质量浓度线性范围分别为0.406 2~26.0 μg/mL( $r=0.999\ 9$ )、2.500 0~160.0 μg/mL( $r=0.999\ 9$ )、6.562 0~420.0 μg/mL( $r=0.999\ 9$ )、0.312 5~20.0 μg/mL( $r=0.999\ 6$ )、0.585 9~37.5 μg/mL( $r=0.999\ 8$ );定量限≤31.20 ng,检测限≤15.60 ng;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为97.72%~101.10%(RSD=1.21%, $n=6$ )、97.67%~102.40%(RSD=1.87%, $n=6$ )、97.64%~101.10%(RSD=1.31%, $n=6$ )、96.45%~100.10%(RSD=1.47%, $n=6$ )、96.16%~101.10%(RSD=1.69%, $n=6$ )。结论:该方法操作简便,精密度、稳定性、重复性好,可用于舒肝宁注射液中5种成分含量的同时测定。

**关键词** 高效液相色谱法;舒肝宁注射液;绿原酸;栀子苷;黄芩苷;黄芩素;野黄芩苷;含量

## Simultaneous Determination of 5 Components in Shuganning Injections by HPLC

ZHI Xuran, WANG Mi, SONG Haojing, DONG Zhanjun (Dept. of Pharmacy, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To develop a method for the simultaneous determination of 5 components in Shuganning injections. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Symmetry<sup>®</sup> C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of methanol-0.4% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were set at 238 nm (geniposide, baicalin) and 327 nm (chlorogenic acid, baicalein, scutellarin). The column temperature was 30 ℃ and the sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges were 0.406 2-26.0 μg/mL for chlorogenic acid ( $r=0.999\ 9$ ), 2.500 0-160.0 μg/mL for geniposide ( $r=0.999\ 9$ ), 6.562 0-420.0 μg/mL for baicalin ( $r=0.999\ 9$ ), 0.312 5-20.0 μg/mL for baicalein ( $r=0.999\ 6$ ), 0.585 9-37.5 μg/mL for scutellarin ( $r=0.999\ 8$ ). The limits of quantify were no higher than 31.20 ng, limits of detection were no higher than 15.60 ng. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; the recoveries were

6.83%~8.12%,总灰分为4.01%~5.01%,酸不溶性灰分为1.06%~1.98%,水浸出物为17.91%~22.65%,醇浸出物为11.29%~15.51%,因此暂定水分、总灰分、酸不溶性灰分分别不得过10.0%、6.0%、2.5%,水和醇浸出物分别不得少于15.0%、10.0%。

通过研究发现,不同产地水柏枝药材中没食子酸含量略有差异,经HPLC法测定,根据结果、药材来源、存放等原因,为保证其临床效果,暂定没食子酸含量不得少于4 mg/g。

综上所述,本研究所建方法可用于水柏枝药材的质量控制。

### 参考文献

- [1] 宇妥·元丹贡波,毛继祖.医学四续[M].上海:上海科学技术出版社,2012:1-13.
- [2] 中国科学院西北高原生物研究所.藏药志[M].西宁:青海

人民出版社,1991:26.

- [3] 帝玛尔·丹增彭措,毛继祖.晶珠本草[M].上海:上海科学技术出版社,2012:108.
- [4] 青海省药品检验所,青海省藏医药研究所.中国藏药:第一卷[M].上海:上海科学技术出版社,1996:1-203.
- [5] Li S, Dai SJ, Chen RY, *et al.* Triterpenoids from the stems of *Myricaria paniculata*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2005, 7(3):253-257.
- [6] 喇晓琴,曾阳,许敏,等.藏药翁布的黄酮类化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2011,23(4):596-599.
- [7] 刘佳宝,张瑛,崔保松,等.宽苞水柏枝化学成分研究[J].中草药,2013,44(19):2661-2665.
- [8] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草:藏药卷[M].上海:上海科学技术出版社,2002:1-125.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:57、103、202、204.
- [10] 田荣,隋忠国,曹玉,等.牛蒡根药材的质量标准研究[J].中国药房,2014,25(31):2934-2936.

(收稿日期:2017-03-28 修回日期:2017-08-08)

(编辑:张 静)

<sup>△</sup>基金项目:政府资助省级临床医学优秀人才项目

\*药师,硕士。研究方向:药物分析与药动学。E-mail: zhixuran@163.com

#通信作者:主任药师,硕士生导师。研究方向:医院药事管理、中药质量控制。电话:0311-85988604。E-mail:hbghyxb123@163.com

97.72% -101.10% (RSD=1.21% , n=6) , 97.67% -102.40% (RSD=1.87% , n=6) , 97.64% -101.10% (RSD=1.31% , n=6) , 96.45% -100.10% (RSD=1.47% , n=6) , 96.16% -101.10% (RSD=1.69% , n=6) , respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, precise, stable and reproducible, and can be used for simultaneous determination of 5 components in Shuganning injection.

**KEYWORDS** HPLC; Shuganning injections; Chlorogenic acid; Geniposide; Baicalin; Baicalein; Scutellarin; Content

舒肝宁注射液是一种用于治疗急、慢性病毒性肝炎的纯中药复方注射剂,具有清热解毒、利湿退黄、益气扶正和保肝护肝的功效<sup>[1-2]</sup>。舒肝宁注射液是依据《伤寒论》中茵陈蒿汤剂组方加减而成,经临床使用多年,疗效显著。作为全新的治疗急慢性病毒性肝炎的纯中药制剂,舒肝宁注射液以其高效、安全的特点成为临床保肝的较好选择<sup>[3]</sup>,在保护肝脏正常结构与功能方面有特效<sup>[4-5]</sup>。现代药学研究证明,舒肝宁注射液含多种黄酮类成分,水溶性强,生物利用度好,但目前关于舒肝宁注射液成分研究的报道较少<sup>[6-7]</sup>,且相关报道也仅检测了其中1~2种成分,显然不利于产品的质量控制。本研究采用高效液相色谱法(HPLC)测定舒肝宁注射液中绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷的含量,以为其质量控制提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

2695型HPLC仪,包括2487双通道紫外-可见检测器(美国Waters公司);BP211D型电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司);XW-80A型旋涡混合器(上海精科实业有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

舒肝宁注射液(贵州瑞和制药有限公司,批号:20150912、20150711、20160919、20160311、20160910,规格:2 mL/支);绿原酸对照品(批号:LYS2015041901)、黄芩素对照品(批号:HQS2015071302)、野黄芩苷对照品(批号:YHQG2015032301)均购自南京春秋生物工程有限公司;栀子苷对照品(批号:MUST-16020401)、黄芩苷对照品(批号:MUST-16031811)均购自成都曼思特生物科技有限公司,所有对照品纯度均>98%;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Symmetry® C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相:甲醇(A)-0.4%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~23 min, 25%→75% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:238 nm(栀子苷、黄芩苷)、327 nm(绿原酸、野黄芩苷、黄芩素);柱温:30℃;进样量:10 μL。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称定待测成分对照品各适量,加甲醇制成绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷质量浓度分别为1.3、1.6、1.2、1.0、1.5 mg/mL的单一对照品贮备溶液。分别量取上述单一对照品贮备溶液适量,加甲醇制成绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷质量浓度分别为26.0、160.0、420.0、20.0、37.5 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取样品200 μL,置于10 mL量瓶内,加甲醇定容,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按舒肝宁注射液处方和工艺制备缺茵陈、栀子、黄芩苷、野黄芩苷、黄芩苷的阴性样品,并按“2.2.2”项下方法制成缺绿原酸、缺栀子苷、缺黄芩苷和缺野黄芩苷、黄芩素的阴性对照溶液。

### 2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果,理论板数以绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷峰计均>5 000;分离度>1.5,各成分基线分离良好。

### 2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液,采用倍比稀释法,用甲醇逐级稀释,制成系列对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷质量浓度(x, μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归。回归方程与线性关系见表1。

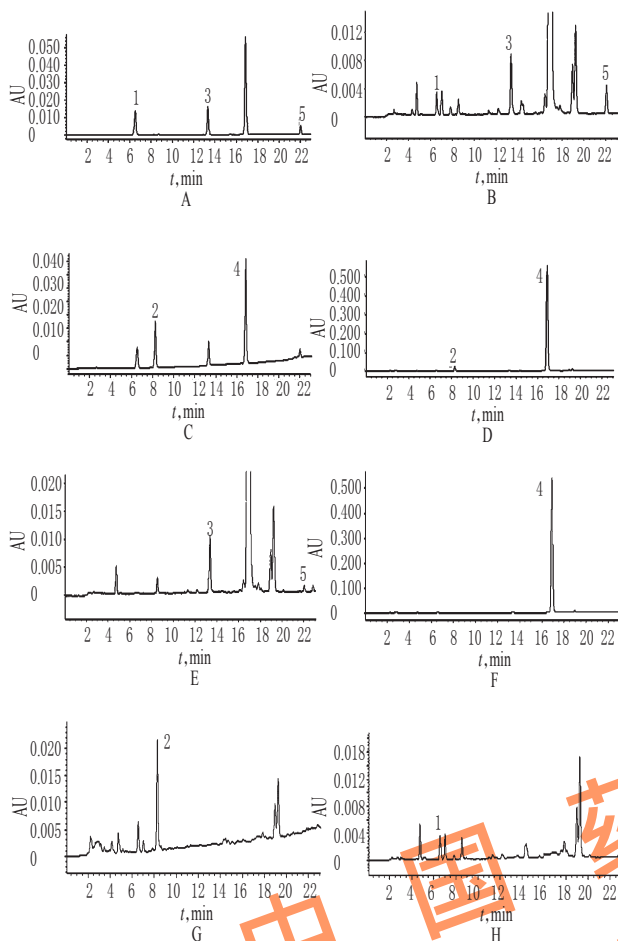
### 2.5 定量限与检测限考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,并按“2.1”项下色谱条件进样测定,当信噪比为10:1时,得定量限;当信噪比为3:1时,得检测限,详见表1。

### 2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下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,绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷峰面积的RSD分别为1.80%、1.02%、0.59%、1.34%、0.85%(n=6),表明仪

器精密度良好。



A. 混合对照品 (327 nm); B. 供试品 (327 nm); C. 混合对照品 (238 nm); D. 供试品 (238 nm); E. 缺绿原酸的阴性对照 (327 nm); F. 缺栀子苷的阴性对照 (238 nm); G. 缺黄芩苷的阴性对照 (238 nm); H. 缺野黄芩苷、黄芩素的阴性对照 (327 nm); 1. 绿原酸; 2. 栀子苷; 3. 野黄芩苷; 4. 黄芩苷; 5. 黄芩素

A. mixed control (327 nm); B. test sample (327 nm); C. mixed control (238 nm); D. test sample (238 nm); E. negative control without chlorogenic acid (327 nm); F. negative control without geniposide (238 nm); G. negative control without baicalin (238 nm); H. negative control without baicalin and scutellarin (327 nm); 1. chlorogenic acid; 2. geniposide; 3. scutellarin; 4. baicalin; 5. baicalein

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

表1 回归方程、线性范围与定量限、检测限

Tab 1 Regression equation, linear ranges and limits of quantify, limits of detection

待测成分	回归方程	r	线性范围, $\mu\text{g/mL}$	定量限, ng	检测限, ng
绿原酸	$y=4.114 \times 10^4 x + 2.176 \times 10^3$	0.999 9	0.406 2~26.0	20.30	13.50
栀子苷	$y=1.722 \times 10^4 x + 1.037 \times 10^3$	0.999 9	2.500 0~160.0	25.00	12.50
黄芩苷	$y=1.760 \times 10^4 x - 6.542 \times 10^3$	0.999 9	6.562 0~420.0	13.10	6.56
黄芩素	$y=3.914 \times 10^4 x + 2.391 \times 10^3$	0.999 6	0.312 5~20.0	31.20	15.60
野黄芩苷	$y=3.424 \times 10^4 x - 1.603 \times 10^3$	0.999 8	0.585 9~37.5	29.30	11.72

## 2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液 (批号: 20150912) 适量, 分别于室温下放置 0、2、4、6、8、10、12 h 时按“2.1”项下色

谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 0.89%、1.03%、1.89%、1.20%、1.25% ( $n=7$ ), 表明供试品溶液室温放置 12 h 内基本稳定。

## 2.8 重复性试验

精密称取样品 (批号: 20150912) 适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 共 6 份, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 0.78%、0.69%、1.54%、1.13%、1.18% ( $n=6$ ), 表明本方法重复性良好。

## 2.9 加样回收率试验

取已知含量样品 (批号: 20150912) 适量, 共 6 份, 分别加入一定质量的待测成分对照品, 按“2.2.2”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, 记录峰面积并计算加样回收率, 结果见表 2。

表2 加样回收率试验结果 ( $n=6$ )

Tab 2 Results of recovery tests ( $n=6$ )

待测成分	取样量, $\mu\text{L}$	样品含量, $\mu\text{g}$	加入量, $\mu\text{g}$	测得量, $\mu\text{g}$	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %			
绿原酸	100	3.412	3.422	6.756	97.72	98.95	1.21			
	100	3.412	3.422	6.812	99.36					
	100	3.412	3.422	6.872	101.10					
	100	3.412	3.422	6.772	98.19					
	100	3.412	3.422	6.791	98.74					
	100	3.412	3.422	6.785	98.57					
	栀子苷	100	58.09	57.14	115.20			99.95	99.74	1.87
		100	58.09	57.14	113.90			97.67		
		100	58.09	57.14	116.60			102.40		
		100	58.09	57.14	114.70			99.07		
		100	58.09	57.14	114.10			98.02		
		100	58.09	57.14	116.00			101.40		
黄芩苷	100	1.896	1.865	3.741	98.93	98.80	1.31			
	100	1.896	1.865	3.729	98.28					
	100	1.896	1.865	3.717	97.64					
	100	1.896	1.865	3.745	99.14					
	100	1.896	1.865	3.718	97.69					
	100	1.896	1.865	3.782	101.10					
	黄芩素	100	5.159	5.216	10.230			97.22	98.31	1.47
		100	5.159	5.216	10.190			96.45		
		100	5.159	5.216	10.380			100.10		
		100	5.159	5.216	10.360			99.71		
		100	5.159	5.216	10.310			98.75		
		100	5.159	5.216	10.250			97.60		
野黄芩苷		100	13.92	13.82	27.71	99.78	98.82	1.69		
		100	13.92	13.82	27.89	101.10				
		100	13.92	13.82	27.21	96.16				
		100	13.92	13.82	27.46	97.97				
		100	13.92	13.82	27.63	99.20				
		100	13.92	13.82	27.56	98.70				

## 2.10 样品含量测定

取 5 批样品各适量, 分别按“2.2.2”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含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果( $n=3, \mu\text{g/g}$ )

Tab 3 Results of content determination of samples ( $n=3, \mu\text{g/g}$ )

样品批号	绿原酸	栀子苷	黄芩苷	黄芩素	野黄芩苷
20150912	33.62	592.2	19 295	48.27	141.3
20150711	34.12	580.9	18 964	51.59	139.2
20160919	31.24	615.4	19 551	45.08	132.4
20160311	32.66	607.1	18 556	47.01	135.7
20160910	32.66	591.6	19 090	47.82	138.6

### 3 讨论

查阅文献[8-9]可知,绿原酸检测波长为327 nm,栀子苷为238 nm,黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷可在275 nm检测定量。通过预试验发现,黄芩苷和野黄芩苷在238 nm和327 nm均可被检测,但黄芩苷在327 nm响应太高,标准曲线受影响;黄芩素在238 nm响应比较低,含量少时不易被检测。因此,本研究选用双波长238 nm(栀子苷、黄芩苷)和327 nm(绿原酸、黄芩素、野黄芩苷)检测,在此条件下,所需检测的各成分色谱峰分离度及峰形均佳,灵敏度较高。

舒肝宁注射液是由茵陈提取物、栀子提取物、黄芩苷、板蓝根提取物、灵芝提取物组合而成的中药注射液。茵陈药材中主要成分为绿原酸<sup>[10]</sup>;栀子药材中主要成分为栀子苷<sup>[11]</sup>;板蓝根药材中含有表依告春和腺苷<sup>[12]</sup>,预试验中表依告春没有检测到,腺苷同时也是灵芝的有效成分,不具有专一代表性<sup>[13]</sup>;本研究在测定黄芩苷的同时也检测到了野黄芩苷和黄芩素,从样品测定结果可以看出,野黄芩苷和黄芩素在不同批次中含量变化不大,猜测原料药黄芩苷不纯。因此,经过筛选,确定本试验检测绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷作为舒肝宁注射液质量控制的主要研究成分。

本试验分别以甲醇-磷酸(0.05%、0.1%、0.4%)、甲醇-甲酸为流动相进行预试验。结果显示,采用甲醇-0.4%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱时,待测成分的分离效果和峰形良好,干扰成分少,基线平稳。

综上所述,本方法操作简便,精密度、稳定性、重复性好,可用于舒肝宁注射液中5种成分含量的同时测定。

### 参考文献

- [1] 梁海雄,黎丽群.舒肝宁注射液治疗慢性乙型病毒性肝炎临床研究Meta分析[J].世界中西医结合杂志,2016,11(8):1057-1066.
- [2] 关妮.舒肝宁注射液临床应用进展[J].医学理论与实践,2014,27(10):1291-1295.
- [3] 张瑾.舒肝宁注射液对顺铂中毒小鼠肝脏损伤的保护作用[J].中国药房,2016,27(7):920-922.
- [4] 张斌,赵巍,王立蓉.舒肝宁注射液对慢性乙型病毒性肝炎高胆红素血症患者肝功能及胆红素的影响[J].中医药导报,2014,20(16):71-73.
- [5] 陈端进.脱氧核苷酸钠联合舒肝宁注射液治疗肝损害的临床效果分析[J].海峡药学,2013,25(9):130-132.
- [6] 曲彩虹,孟小斌,罗宇燕.HPLC测定舒肝宁注射液中绿原酸的含量[J].中药材,2013,36(6):1014-1016.
- [7] 何峰,张昀.HPLC法同时测定舒肝宁注射液中表依告春和腺苷的含量[J].贵阳医学院学报,2015,40(12):1338-1340.
- [8] 赵亮,王新霞,吕磊,等.HPLC法测定清肝散结颗粒中黄芩苷、汉黄芩苷、野黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素[J].中成药,2014,36(2):313-318.
- [9] 徐强.HPLC法同时测定茵栀黄分散片、颗粒、胶囊中绿原酸、栀子苷与黄芩苷[J].中成药,2013,35(5):967-970.
- [10] 曹锦花.茵陈的化学成分和药理作用研究进展[J].沈阳药科大学学报,2013,30(6):489-494.
- [11] 孟祥乐,李红伟,李颜,等.栀子化学成分及其药理作用研究进展[J].中国新药杂志,2011,20(11):959-967.
- [12] 任国萍,李铮,傅欣彤,等.HPLC法同时测定板蓝根药材中尿苷、鸟苷、(R,S)-告依春和腺苷[J].中国新药杂志,2012,21(19):2330-2334.
- [13] 席桂同.高效液相色谱法测定灵芝提取物中尿苷和腺苷含量[J].世界中医药,2014,9(7):934-940.

(收稿日期:2017-02-28 修回日期:2017-04-25)

(编辑:张静)