

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.5.06

HPLC 法同时测定连花柴芩可溶性粉中 4 种有效成分含量

张丽先¹, 魏悦¹, 曹静亚¹, 王志尧², 王学方², 李晓^{2*}

(1. 河南科高中标检测技术有限公司, 郑州 450002; 2. 河南省科高植物天然产物开发工程技术有限公司, 郑州 450002)

[收稿日期] 2016-11-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 05-0027-06 [中图分类号] S859.2

[摘要] 建立了 HPLC 法同时测定连花柴芩可溶性粉中绿原酸、甘草苷、连翘酯苷 A 及黄芩苷的含量。采用 Venusil XBP C18 分析柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈~0.1% 磷酸水为流动相, 1.0 mL/min 的流速下进行梯度洗脱, 320 nm 波长处对 4 种成分进行含量测定。结果表明, 在此色谱条件下, 4 种组分分离度良好, 分别在 3.28~26.24 μg/mL、3.17~25.36 μg/mL、6.08~48.64 μg/mL 及 8.81~70.48 μg/mL 范围内线性关系良好, 加样回收率均大于 96.61%, RSD 均小于 1.75%。该方法简便、快速、准确, 重复性良好, 可用于连花柴芩可溶性粉中绿原酸、甘草苷、连翘酯苷 A 及黄芩苷的同时测定。

[关键词] 连花柴芩可溶性粉; 含量测定; 高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Four Active Components in Lian-hua-chai-qin Soluble Power by HPLC

ZHANG Li-xian¹, WEI Yue¹, CAO Jing-ya¹, WANG Zhi-yao², WANG Xue-fang², LI Xiao^{2*}

(1. Cogotesting International Company Limited, Zhengzhou 450000, China;

2. Henan Plant Natural-Products Development Engineering Technology Company, Zhengzhou 450002, China)

Corresponding author: LI Xiao E-mail: 67430218@qq.com

Abstract: A new HPLC method was firstly established for simultaneous determination of caffeotannic acid,

基金项目: 河南省科技攻关项目 (152102110115)

作者简介: 张丽先, 硕士, 从事中药质量控制研究。

通讯作者: 李晓. E-mail: 67430218@qq.com

People's Republic of China. Volume II [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010.

[3] The United States Pharmacopeial Convention. U.S.P38-NF33 [S].

[4] European Pharmacopoeia Commission. EP 8 [S].

[5] British Pharmacopoeia Commission. BP 2015 [S].

[6] 马秋冉, 张璐, 戴青, 等. 柱前衍生化-高效液相色谱法检测疫苗中游离甲醛含量[J]. 中国兽药杂志. 2016, 50(8): 20-23.

Ma Q R, Zhang L, Dai Q, et al. Determination of Free Formaldehyde Content in Vaccine by Pre-column Derivatization HPLC [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(8): 20-23.

(编辑: 侯向辉)

liquiritin, forsythoside A and baicalin in Lian-hua-chai-qin soluble power. Analysis was performed on a venusil XBP C18 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was considered of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid solution, the flow rate set at 1.0 mL/min and the detected wavelength was 320 nm. Results showed four substances were separated effectively, caffeotannic acid, liquiritin, forsythoside A and baicalin had good linearity over the range of 3.28 ~ 26.24 μg/mL, 3.17 ~ 23.36 μg/mL, 6.08 ~ 48.64 μg/mL and 8.81 ~ 70.48 μg/mL, respectively. The average recoveries were higher than 96.61% and RSD all below 1.75%. The method is accurate, rapid and repeatable, can be used for simultaneous determination of caffeotannic acid, liquiritin, forsythoside A and baicalin in Lian-hua-chai-qin soluble power.

Key words: Lian-hua-chai-qin soluble power; content determination; HPLC

连花柴芩可溶性粉是针对禽病毒性呼吸道疾病、以“清热解毒、宣肺止咳”为治疗原则,通过临床筛选、科学组方,研制的纯中药制剂,由连翘、山银花、柴胡、黄芩、甘草等药味组成。前期研究表明,连花柴芩可溶性粉具有明显的抗炎解热、止咳祛痰以及免疫增强等作用^[1-2],临床用于畜禽病毒性呼吸道疾病的预防和治疗,效果良好。连花柴芩可溶性粉药味众多,成分复杂,建立可靠的方法对其进行质量控制势在必行,多指标含量测定质量控制体系在增加复方制剂质量可控性、保证产品质量、确保制剂稳定性、安全性及有效性方面具有重要现实意义^[3],本试验采用高效液相方法对连花柴芩可溶性粉中 4 种有效成分的含量进行同时测定,为该产品的质量可控性提供了重要的技术依据,以期为进一步建立其质量标准提供重要参考。

1 材料

1.1 仪器 岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪(包括 CMA-20A 系统、LC-20AT 二元高压泵、SIL-20A 自动进样器、CTO-20A 柱温箱、SPD-M20A 检测器、LC Soulation 工作站),ME204 梅特勒电子天平,岛津 AUW 220D 十万分之一天平,昆山 KQ-500 超声仪。

1.2 试剂与样品 3 批连花柴芩可溶性粉(由河南科高植物天然产物开发工程技术有限公司提供,批号为 20140324、20140325、20140326)。绿原酸对照品(批号为 110753-200413)、甘草苷对照品(批号为 111610-201106)、连翘酯苷 A 对照品(批号为 111810-201001)、黄芩苷对照品(批号为 110715-200815),均购自中国药品生物制品检定所。甲醇、乙腈(色谱纯),磷酸(分析纯),水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸 5.12 mg,甘草苷 4.96 mg,连翘酯苷 A 9.50 mg,黄芩苷

13.76 mg,置 50 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度为 102.4 μg/mL 绿原酸,99.2 μg/mL 甘草苷,190 μg/mL 连翘酯苷 A 和 275.2 μg/mL 黄芩苷的混合对照品储备液,精密移取上述储备液 3.2 mL 至 10 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度为 32.77 μg/mL 绿原酸,31.74 μg/mL 甘草苷,60.8 μg/mL 连翘酯苷 A 和 88.06 μg/mL 黄芩苷的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备方法 取本品 0.2 g,置 50 mL 容量瓶中,加入 50% 甲醇,定容摇匀,超声处理 30 min,摇匀,滤过,取续滤液,过 0.45 μm 膜,得供试品溶液。

2.3 色谱条件 Venusil XBP C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),以乙腈(B)~0.1% 磷酸水溶液(A)为流动相,梯度洗脱程序为:0~10 min 9%~13.5% B,10~13 min 13.5%~16.2% B,13~25 min 保持 16.2% B,25~27 min 16.2%~19.8% B,27~32 min 19.8%~21.6% B,32~38 min 21.6%~31.5% B,38~40 min 31.5%~36% B,40~55 min 36%~45.9% B,55~60 min 45.9%~75% B;流速为 1.0 mL/min,柱温为 35 °C,检测波长为 320 nm,进样量为 10 μL。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性范围 精密移取 1、2、4、6、8 mL 的混合对照品溶液,分别置于 10 mL 容量瓶中,用 50% 甲醇稀释至刻度。按 2.3 项色谱条件分别进样,记录色谱图(图 1),以峰面积(y)对进样浓度(x)进行线性回归,得到 4 种有效成分的线性回归方程(表 1)。

2.4.2 精密度考察 取同一混合对照溶液,连续重复进样 6 次,记录峰面积,并计算相对标准偏差(RSD)。绿原酸的 RSD 为 0.64%,甘草苷的 RSD 为 1.26%,连翘酯苷 A 的 RSD 为 0.89%,黄芩苷的 RSD 为 0.92%,表明仪器精密度良好,满足检测需要。

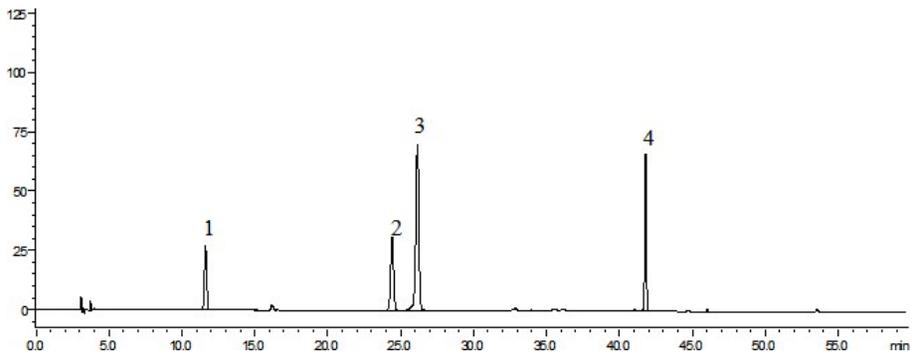


图 1 混合对照品的 HPLC 色谱图 (1:绿原酸,2:甘草苷,3:连翘酯苷 A,4:黄芩苷)

Fig 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances
(1. chlorogenic acids, 2. liquiritin, 3. forsythoside A, 4. baicalin)

表 1 连花柴芩可溶性粉中 4 种有效成分线性关系考察

Tab 1 Linear relationship of four active components in Lian-hua-chai-qin soluble power

成分名称	保留时间/min	标准曲线	线性范围/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	相关系数 R^2
绿原酸	11.621	$y = 31921x - 5678$	3.28~26.24	0.9999
甘草苷	24.417	$y = 6636x + 99$	3.17~25.36	0.9998
连翘酯苷 A	26.146	$y = 14754x - 4343$	6.08~48.64	0.9999
黄芩苷	41.790	$y = 23201x + 15198$	8.81~70.48	0.9999

2.4.3 重复性考察 取 20140324 批次连黄柴芩粉,按 2.2 项平行制备供试品溶液 6 份,分别按 2.3 项中色谱条件测定绿原酸、甘草苷、连翘酯苷 A 和黄芩苷含量。结果绿原酸的含量分别为 3.82、3.79、3.85、3.81、3.86、3.88 mg/g,甘草苷的含量为 1.03、1.06、1.02、1.06、1.05、1.02 mg/g,连翘酯苷 A 含量为 3.28、3.19、3.31、3.26、3.28、3.35 mg/g,黄芩苷含量为 14.42、14.45、14.35、14.28、14.37、14.49 mg/g, RSD 分别为 0.88%、1.82%、1.63%、0.52%, RSD 均小于 1.82%,表明该方法重复性良好。

2.4.4 稳定性考察 取同一份供试品溶液,分别于配制完成后 0、4、8、12、24 h 进样 1 次,记录峰面积。结果绿原酸峰面积的 RSD 为 1.98%,甘草苷峰面积的 RSD 为 1.65%,连翘酯苷 A 峰面积的 RSD 为 1.24%,黄芩苷峰面积的 RSD 为 0.87%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 加样回收率 准确称取同一已测知含量的连花柴芩可溶性粉样品 6 份,各 0.1 g,置于 50 mL 量瓶中,分别准确加入相应量的绿原酸、甘草苷、连翘酯苷 A 及黄芩苷对照品溶液,加 50% 甲醇至刻

度,摇匀,超声 30 min,放冷,定容并摇匀,过 0.45 μm 滤膜,得加样回收率供试品溶液,进行含量测定,计算加样回收率及 RSD ,结果见表 2~表 5。绿原酸、甘草苷、连翘酯苷 A 及黄芩苷平均回收率分别为 97.44%、96.91%、96.61%、98.61%, RSD 分别为 1.52%、1.18%、1.75%、1.67%,结果表明该方法准确度良好。

2.4.6 专属性考察 取按 2.2 项方法分别制备的连花柴芩可溶性粉去除山银花、甘草、连翘、黄芩的阴性供试液,上述色谱条件下分别进样分析(图 2),从图中箭头指向的相应目标物出峰处可看出,山银花、甘草、连翘、黄芩阴性供试液分别在绿原酸、甘草苷、连翘酯苷 A、黄芩苷出峰处无干扰,表明该方法可以用于 4 种有效成分定量。

2.5 样品测定 取批号为 20140324、20140325、20140326 的 3 批连花柴芩可溶性粉,分别按 2.1 项制备 3 份平行供试品溶液,按上述方法进行含量测定,HPLC 色谱图见图 3,外标法计算绿原酸、甘草苷、连翘酯苷 A 及黄芩苷的含量,并计算其 RSD ,结果见表 6, RSD 值均小于 2.0%。

表 2 绿原酸加样回收试验结果 ($n=6$)Tab 2 Recovery results of chlorogenic acids ($n=6$)

编号	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.8408	0.8800	1.7024	97.90		
2	0.8476	0.8800	1.6989	96.74		
3	0.8417	0.8800	1.7235	100.21		
4	0.8442	0.8800	1.6921	96.35	97.44	1.52
5	0.8467	0.8800	1.7018	97.17		
6	0.8425	0.8800	1.6896	96.26		

表 3 甘草苷加样回收试验结果

Tab 3 Recovery results of liquiritin ($n=6$)

编号	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.2212	0.2800	0.4923	96.81		
2	0.2230	0.2800	0.4912	95.79		
3	0.2214	0.2800	0.4909	96.24		
4	0.2221	0.2800	0.4967	98.07	96.91	1.18
5	0.2228	0.2800	0.4987	98.55		
6	0.2217	0.2800	0.4905	96.01		

表 4 连翘酯苷 A 加样回收试验结果

Tab 4 Recovery results of forsythoside A ($n=6$)

编号	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.7247	0.7152	1.4366	99.54		
2	0.7305	0.7152	1.4122	95.31		
3	0.7254	0.7152	1.4149	96.40		
4	0.7276	0.7152	1.4206	96.89	96.61	1.75
5	0.7298	0.7152	1.4226	96.87		
6	0.7262	0.7152	1.4031	94.65		

表 5 黄芩苷加样回收试验结果

Tab 5 Recovery results of baicalin ($n=6$)

编号	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	3.2432	3.528	6.7302	98.84		
2	3.2692	3.528	6.6812	96.71		
3	3.2465	3.528	6.6716	97.08		
4	3.2562	3.528	6.8309	101.32	98.61	1.67
5	3.2659	3.528	6.7598	99.03		
6	3.2497	3.528	6.7314	98.69		

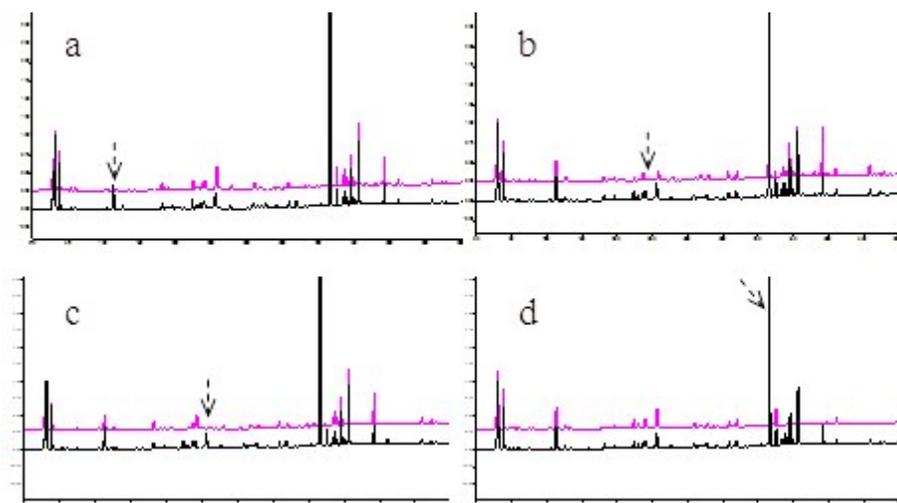


图 2 阴性对照 HPLC 色谱图 (a. 山银花阴性, b. 甘草阴性, c. 连翘阴性, d. 黄芩阴性)

Fig 2 HPLC chromatograms of negative control.

(a. *Lonicera confusa* negative control, b. *Glycyrrhiza uralensis* negative control, c. *fructus forsythiae* negative control, d. *Scutellaria baicalensis* negative control)

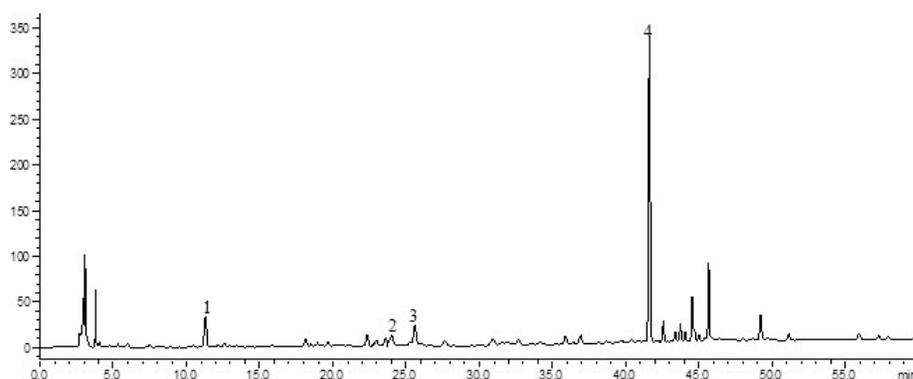


图 3 连花柴芩可溶性粉 HPLC 色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of Lian-hua-chai-qin soluble power

表 6 3 批连花柴芩可溶性粉含量测定结果

Tab 6 Content determination results of three batch Lian-hua-chai-qin soluble power

批号	绿原酸		甘草苷		连翘酯苷 A		黄芩苷	
	含量/(mg · g ⁻¹)	RSD/%						
20140324	3.84	1.52	1.04	1.86	3.28	0.92	14.40	0.68
20140325	5.60	0.67	1.52	1.69	5.26	1.34	15.01	1.16
20140326	8.40	0.79	1.96	1.78	7.24	1.20	21.70	1.48

3 讨论与小结

3.1 测定成分的选择 复方制剂的药效是多组分共同作用的结果,单一成分的含量不能整体综合的

反映复方制剂的质量^[4],在选择定量指标时综合考虑连花柴芩可溶性粉所含的活性成分、君药的特征成分等特点^[5-6],有针对性的选择了绿原酸、甘草

苷、连翘酯苷 A、黄芩苷 4 个指标成分,以多方面监控连花柴芩可溶性粉的质量。

3.2 样品前处理方法的选择 提取方法的选择,考察了回流法和超声法,鉴于回流法操作烦琐,且绿原酸受热不稳定^[7],采用操作简便的超声法。对比了 30% 甲醇、50% 甲醇和纯甲醇为提取溶剂以及 10、20、30 min 超声时间对 4 目标分析物的提取效率,结果以 50% 甲醇为溶剂,超声 30 min 效果最好。

3.3 检测波长的选择 由 4 种目标成分的紫外图谱可得,绿原酸的最大吸收在 326 nm,连翘酯苷 A 最大吸收波长为 328 nm,甘草苷最大吸收在 276 nm 处,次吸收波长在 312 nm,黄芩苷在 277 nm 处有最大吸收,次吸收在 317 nm,综合考虑色谱峰响应值及分离度,最终选择 320 nm 作为检测波长。

3.4 流动相的选择 基于绿原酸、连翘酯苷 A、黄芩苷自身的酸碱性,酸性环境中 3 种组分良好的稳定性能^[7-9],以及磷酸对甘草苷良好的分离效果^[10],本试验分别考察了甲醇-磷酸水、乙腈-磷酸水以及不同比例磷酸对指标成分分离度的影响。以甲醇为有机相色谱峰基线不平稳,对于指标成分的准确定量有影响,以乙腈为有机相可避免此问题;分别考察了 0.05%、0.1%、0.2%、0.5% 磷酸水溶液对色谱峰的分离效果,发现 0.1%、0.2% 磷酸下 4 指标成分的分离度、色谱峰对称性较好,考虑到色谱柱对大比例酸的耐受能力较弱,选择 0.1% 磷酸水;最终流动相选择乙腈-0.1% 磷酸水。

本试验建立了同时测定连花柴芩可溶性粉中绿原酸、甘草苷、连翘酯苷 A 及黄芩苷含量的 HPLC 方法,该方法准确、简便,重复性好,为控制连花柴芩可溶性粉质量,确保产品批次间稳定性,建立其质量标准提供重要参考,同时该方法可进一步用于含相同药味的其他复方制剂中绿原酸、甘草苷、连翘酯苷 A 及黄芩苷的定性定量检测。

参考文献:

[1] 王双双.连花柴芩可溶性粉的药效学试验研究[D].郑州:河南农业大学,2015.

Wang S. Pharmacodynamic Study of Lian-hua-chai-qin Soluble

Power[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2015.

[2] 王双双,张俊,杜芳芳,等.连花柴芩可溶性粉解热镇痛止咳祛痰作用的研究[J].中国兽药杂志,2015,49(5):27-31.

Wang S, Zhang J, Du F F, *et al.* Study on Antipyretic, Analgesic, Antitussive and Expectorant Effects of Lian-hua-chai-qin Soluble Power[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2015, 49(5): 27-31.

[3] 郝旭亮,张永文.中药质量标准中建立多指标含量测定的必要性浅析[J].中国执业药师,2009,6(9):31-33.

Hao X L, Zhang Y W. The necessity of multiple index content determination for quality standard establishing of traditional Chinese medicine[J]. China Licensed Pharmacist, 2009, 6(9): 31-33.

[4] Jiang Y, David B, Tu P, *et al.* Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines—a review[J]. Analytica chimica acta, 2010, 657(1): 9-18.

[5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典二部[M].北京:中国农业出版社,2010.

Chinese Pharmacopoeia Commission. Veterinary pharmacopoeia of the People's Republic of China. 2 (2010)[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2010.

[6] Qin K, Wang B, Cai H, *et al.* Simultaneous determination of five marker compounds in Xuanfu Daizhe Tang by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection for quality control[J]. Pharmacognosy magazine, 2012, 8(32): 250.

[7] Dadakova E, Vrchotova N, Chmelová , *et al.* The stability of rutin and chlorogenic acid during the processing of black elder (*Sambucus nigra*) inflorescence[J]. Acta Alimentaria, 2010, 40(3): 327-334.

[8] 王曙宾,郑亚杰.连翘提取物和连翘酯苷 A 原料中连翘酯苷 A 的稳定性研究[J].中草药,2010,41(6):909-911.

Wang S B, Zheng Y J. Study on the stability of forsythoside A in forsythia suspensa extract and forsythoside A material [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2010, 41(6): 909-911.

[9] Xing J, Chen X, Zhong D. Stability of baicalin in biological fluids *in vitro*[J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2005, 39(3): 593-600.

[10] Lee Y C, Huang C Y, Wen K C, *et al.* Determination of liquiritin, glycyrrhizin, hesperidin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, honokiol and magnolol in the traditional Chinese medicinal preparation Wuji-San by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of chromatography A, 1995, 692(1/2): 137-145.

(编辑:侯向辉)