

HPLC 同时测定复方鱼腥草片中 4 个有效成分的含量

关潇滢^{1,2}, 陈雪莲³, 王淑红^{1,2}, 肖丽和^{1,2}, 王铁杰^{1,2*} (1.深圳市药品检验研究院, 广东 深圳 518057; 2.深圳药品质量标准研究重点实验室, 广东 深圳 518057; 3.暨南大学, 广州 510632)

摘要: 目的 建立 HPLC 同时测定复方鱼腥草片中绿原酸、连翘酯苷 A、槲皮苷和黄芩苷含量的方法。方法 采用 CAPCELL PAK MG(4.6 mm×250 mm, 5μm)色谱柱, 流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~12 min, 9%A; 12~15 min, 9%→15%A; 15~32 min, 15%A; 32~48 min, 15%→29%A; 48~60 min, 29%A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 ℃, 检测波长: 330 nm。结果 绿原酸、槲皮苷浓度在 2~100 μg·mL⁻¹ 内, 连翘酯苷 A 浓度在 4~200 μg·mL⁻¹ 内, 黄芩苷浓度在 12~600 μg·mL⁻¹ 内, 与峰面积均呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$); 平均回收率($n=6$)分别为 98.0%, 99.8%, 99.1% 和 98.3%, RSD 均<2.0%。结论 建立的 HPLC 可实现同时测定绿原酸、连翘酯苷 A、槲皮苷和黄芩苷 4 种有效成分, 方法快速、简便、结果准确, 可为复方鱼腥草片提供更全面、可靠的质量控制方法。

关键词: 复方鱼腥草片; 绿原酸; 连翘酯苷 A; 槲皮苷; 黄芩苷; 质量控制; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)09-1300-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.09.018

引用本文:关潇滢, 陈雪莲, 王淑红, 等. HPLC 同时测定复方鱼腥草片中 4 个有效成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(9): 1300-1303.

Simultaneous Determination of 4 Effective Components in Fufang Yuxingcao Tablets by HPLC

GUAN Xiaoying^{1,2}, CHEN Xuelian³, WANG Shuhong^{1,2}, XIAO Lihe^{1,2}, WANG Tiejie^{1,2*} (1.Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen 518057, China; 2. Shenzhen Key Laboratory of Drug Quality Standard Research, Shenzhen 518057, China; 3.Jinan University, Guangzhou 510632, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for simultaneous determination of chlorogenic acid, forsythoside A, quercitroside and baicalin in Fufang Yuxingcao tablets. **METHODS** The samples were separated on a CAPCELL PAK MG (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column, by a gradient elution using acetonitrile(A) and 0.1% phosphoric acid(B) (0~12 min, 9%A; 12~15 min, 9%→15%A; 15~32 min, 15%A; 32~48 min, 15%→29%A; 48~60 min, 29%A) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was set at 35 ℃. The wavelength was set on 330 nm. **RESULTS** The linear ranges of chlorogenic acid, quercitroside, forsythoside A and baicalin were 2~100 μg·mL⁻¹, 2~100 μg·mL⁻¹, 4~200 μg·mL⁻¹ and 12~600 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$), the average recoveries($n=6$) were 98.0%, 99.8%, 99.1% and 98.3%, respectively, and RSDs were < 2.0%. **CONCLUSION** A rapid, simple, accurate HPLC method is successfully established for simultaneous determine 4 effective components in Fufang Yuxingcao tablets. The method herein described is helpful for the quality control of Fufang Yuxingcao tablets.

KEY WORDS: Fufang Yuxingcao tablets; chlorogenic acid; forsythoside A; quercitroside; baicalin; quality control; HPLC

复方鱼腥草片收载于中国药典 2015 年版一部^[1], 由鱼腥草、黄芩、板蓝根、连翘、金银花 5 味药组成, 现行质量标准规定了性状、鉴别、检查和黄芩苷的含量测定项目。目前, 该制剂的质量控制方法已有一些报道, 李长新等^[2]采用 HPLC 测定复方鱼腥草片中黄芩苷的含量; 黎小伟等^[3]采用 HPLC 测定复方鱼腥草片中绿原酸的含量; 金永新等^[4]采用 HPLC 同时测定复方鱼腥草片中绿原酸、连翘苷、黄芩苷的含量。本实验以方中金银花有效成分绿原酸、连翘有效成分连翘酯苷 A、鱼腥草有效成分槲皮苷和黄芩有效成分黄芩苷为指标, 采用 HPLC 同时检测这 4 个有效成分, 与文献报道的复方鱼腥草

片含量测定方法相比, 具有操作简便、可同时检测多个有效成分以及专属性强的优势。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

SHIMADZU LC-20AD 高效液相色谱仪, DAD 检测器(日本岛津公司); XS205 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); SCIENTZ SB-25-12DT 超声波清洗仪(宁波新芝生物); 纯水器(美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂

乙腈(色谱纯, 德国 MERCK 公司); 甲醇、磷酸(分析纯, 广州化学试剂厂); 水为超纯水; 对照品: 绿原酸(批号: 110753-201314, 纯度: 96.6%)、

作者简介: 关潇滢, 女, 硕士, 主管中药师 Tel: (0755)26031745
主任药师 Tel: (0755)26031728 E-mail: wangtj88@163.com

E-mail: guanxy1213@163.com *通信作者: 王铁杰, 女, 博士,

连翘酯苷 A(批号: 111810-201405, 纯度: 94.1%)、槲皮苷(批号: 111538-200403, 纯度: 100%)、黄芩苷(批号 110715-201318, 纯度: 93.3%), 均购于中国食品药品检定研究院; 20 批不同生产企业复方鱼腥草片样品为全国范围抽样得到。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 CAPCELL PAK MG(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱, 以乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B)为流动相, 梯度洗脱(0~12 min, 9%A; 12~15 min, 9%→15%A; 15~32 min, 15%A; 32~48 min, 15%→29%A; 48~60 min, 29%A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 ℃, 检测波长为 330 nm, 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品储备液的制备 取绿原酸和槲皮苷对照品各约 10 mg, 精密称定, 分别置 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得; 取连翘酯苷 A 和黄芩苷对照品各约 10 mg, 精密称定, 分别置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密吸取绿原酸、槲皮苷的对照品储备液各 2 mL, 连翘酯苷 A

的对照品储备溶液 3 mL, 黄芩苷的对照品储备液 10 mL, 置同一 20 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品 20 片, 除去包衣(糖衣/薄膜衣片), 精密称定, 研细, 取约 1.0 g, 精密称定, 精密加入 70%甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理(功率 500 W, 频率 40 kHz)1 h, 放冷, 再称定质量, 用 70%甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 阴性供试品溶液的制备 按复方鱼腥草片的处方及制法, 分别制成不含鱼腥草、黄芩、连翘和金银花的阴性样品, 按“2.2.3”项下方法操作, 分别制得阴性样品溶液。

2.3 系统适用性试验

取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液各 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图, 见图 1。结果阴性样品的色谱图中, 在与对照品色谱图相同的保留时间位置上未见色谱峰, 说明阴性无干扰。理论板数按绿原酸、连翘酯苷 A、槲皮苷、黄芩苷峰计算, 均≥8 000; 各色谱峰峰形对称, 分离度良好; 阴性样品无干扰。

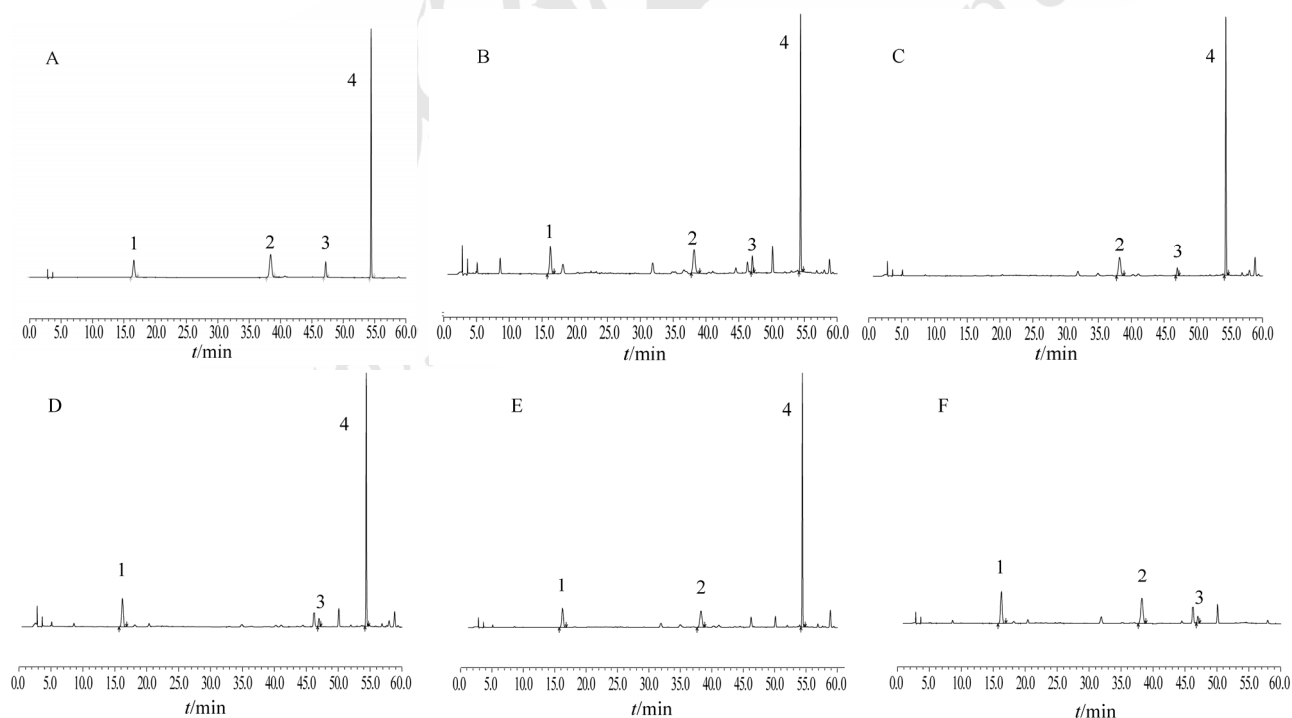


图 1 对照品、复方鱼腥草片和阴性样品的 HPLC 色谱图

A-对照品; B-样品; C-缺金银花阴性样品; D-缺连翘阴性样品; E-缺鱼腥草阴性样品; F-缺黄芩阴性样品; 1-绿原酸; 2-连翘酯苷 A; 3-槲皮苷; 4-黄芩苷。

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances, Fufang Yuxingcao tablets and negative samples

A-reference substances; B-sample; C-negative sample without Lonicerae Japonicae Flos; D-negative sample without Forsythiae Fructus; E-negative sample without Houttuyniae Herba; F-negative sample without Scutellariae Radix; 1-chlorogenic acid; 2-forsythoside A; 3-quercitroside; 4-baicalin.

2.4 线性关系考察

取绿原酸、槲皮苷对照品各约 10 mg, 精密称定, 置同一 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为绿原酸、槲皮苷混合对照品溶液; 取连翘酯苷 A 对照品约 10 mg、黄芩苷对照品约 30 mg, 精密称定, 置同一 50 mL 量瓶中, 精密加入上述绿原酸、槲皮苷混合对照品溶液 25 mL, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1, 2, 5, 10, 25 mL 分别置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 以对照品的浓度 $X(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 为横坐标, 测得的峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得绿原酸、连翘酯苷 A、槲皮苷、黄芩苷的回归方程分别为: $Y=3.10\times 10^4X+3.54\times 10^2$, $r=0.999\ 9$; $Y=3.39\times 10^4X+2.63\times 10^2$, $r=0.999\ 9$; $Y=1.70\times 10^4X+8.66\times 10^2$, $r=0.999\ 9$; $Y=9.55\times 10^4X+1.99\times 10^3$, $r=0.999\ 9$ 。结果表明, 绿原酸、槲皮苷浓度在 2~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 连翘酯苷 A 浓度在 4~200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 黄芩苷浓度在 12~600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内均与其峰面积呈良好的线性关系。

2.5 仪器精密度试验

取混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算绿原酸、连翘酯苷 A、槲皮苷、黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 0.5%, 0.2%, 0.3%, 0.3%, 结果表明该方法仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一份复方鱼腥草片供试品溶液, 分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12 h 进样测定, 测得的绿原酸、连翘酯苷 A、槲皮苷、黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%。结果表明溶液自制备后 12 h 内基本稳定。

2.7 重复性试验

取同一批复方鱼腥草片(序号 01, 平均片重 0.295 6 g)6 份, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 测得绿原酸、连翘酯苷 A、槲皮苷、黄芩苷含量平均值及其 RSD 分别为 1.22 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (0.3%), 3.54 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (0.7%), 1.11 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (0.5%), 21.39 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (0.4%), 结果表明该方法的重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取同一批已知含量(序号 01)的复方鱼腥草片粉末约 0.5 g, 共 6 份, 根据复方鱼腥草片

中绿原酸、连翘酯苷 A、槲皮苷、黄芩苷的含量, 按表 1 分别精密加入绿原酸、连翘酯苷 A、槲皮苷和黄芩苷对照品, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算绿原酸、连翘酯苷 A、槲皮苷、黄芩苷的平均回收率($n=6$)分别为 98.0%(RSD=0.9%), 99.8%(RSD=1.5%), 99.1%(RSD=1.7%), 98.3%(RSD=1.0%)。

表 1 加样回收率测定结果($n=6$)

Tab. 1 Recoveries of 4 effective components in samples ($n=6$)

成分	取样量/ g	样品含 量/mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
绿原酸	0.500 6	0.610 7	0.605 6	1.214 7	99.73	98.0	0.9
	0.501 5	0.611 8	0.605 6	1.201 6	97.39		
	0.501 0	0.611 2	0.605 6	1.202 2	97.59		
	0.502 4	0.612 9	0.605 6	1.206 3	97.98		
	0.502 9	0.613 5	0.605 6	1.203 1	97.35		
	0.503 9	0.614 8	0.605 6	1.208 1	97.98		
连翘酯苷 A	0.500 6	1.772 1	1.579 7	3.344 9	99.56	99.8	1.5
	0.501 5	1.775 3	1.579 7	3.359 3	100.27		
	0.501 0	1.773 5	1.579 7	3.366 4	100.83		
	0.502 4	1.778 5	1.579 7	3.308 8	96.87		
	0.502 9	1.780 3	1.579 7	3.367 3	100.46		
	0.503 9	1.783 8	1.579 7	3.378 4	100.94		
槲皮苷	0.500 6	0.555 7	0.500 5	1.053 4	99.45	99.1	1.7
	0.501 5	0.556 7	0.500 5	1.043 1	97.19		
	0.501 0	0.556 1	0.500 5	1.045 9	97.86		
	0.502 4	0.557 7	0.500 5	1.058 7	100.11		
	0.502 9	0.558 2	0.500 5	1.067 6	101.77		
	0.503 9	0.559 3	0.500 5	1.051 7	98.38		
黄芩苷	0.500 6	10.707 8	9.003 4	19.564 9	98.37	98.3	1.0
	0.501 5	10.727 1	8.938 1	19.633 1	99.64		
	0.501 0	10.716 4	9.022 1	19.631 9	98.82		
	0.502 4	10.746 3	10.309 6	20.926 7	98.75		
	0.502 9	10.757 0	10.151 0	20.620 1	97.16		
	0.503 9	10.778 4	9.553 9	20.055 6	97.10		

2.9 样品的测定

取不同生产企业复方鱼腥草片 20 批, 分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 以外标法计算绿原酸、连翘酯苷 A、槲皮苷、黄芩苷的含量, 结果见表 2。

3 讨论

3.1 测定成分的选择

复方鱼腥草片的功能主治为清热解毒, 而此次测定的金银花中的绿原酸、连翘中的连翘酯苷 A、鱼腥草中的槲皮苷和黄芩中的黄芩苷, 4 个成分均具有抗炎、抗病毒^[5-9]的药理作用, 与复方鱼腥草片的功能主治相符合, 故同时测定此 4 个成分的含量进而控制中成药的质量优劣是具有重要意义的。

表 2 样品含量测定结果($n=2$)

Tab. 2 Results of content tests($n=2$)				mg
序号	绿原酸	连翘酯苷 A	槲皮苷	黄芩苷
01	0.36	1.05	0.33	6.32
02	0.36	0.18	0.02	3.44
03	0.14	0.50	0.01	3.35
04	0.13	0.27	0.01	3.81
05	0.52	0.38	0.01	5.65
06	0.14	0.75	0.10	3.59
07	0.48	0.28	0.05	2.68
08	0.33	0.56	0.11	3.27
09	0.17	0.36	0.11	4.23
10	0.04	0.07	0.03	4.95
11	0.41	0.26	0.03	2.85
12	0.08	0.44	0.04	3.68
13	0.73	0.28	0.07	3.92
14	0.52	0.40	0.12	5.81
15	1.09	1.02	0.35	6.73
16	0.18	0.05	0.24	4.00
17	0.74	0.43	0.04	5.10
18	0.41	1.06	0.01	5.51
19	0.15	0.71	0.05	9.40
20	0.30	0.21	0.13	4.31

3.2 提取溶剂及提取方式的选择

为保证绿原酸、连翘酯苷 A、槲皮苷、黄芩苷 4 种成分都可提取完全,作者考察了甲醇、70% 甲醇、乙醇、70%乙醇 4 种提取溶剂,0.5, 1, 1.5 h 3 个提取时间,超声、回流 2 种提取方式,最终确定提取方式为 70%甲醇超声提取 1 h, 4 个成分的提取效率最高。

3.3 检测波长的选择

分别取绿原酸、连翘酯苷 A、槲皮苷、黄芩苷对照品储备溶液,在 200~400 nm 内进行扫描,绿原酸、连翘酯苷 A 均在 330 nm 有最大吸收、槲皮苷和黄芩苷在此波长也有较大吸收,故最终确定以 330 nm 作为检测波长。

3.4 流动相的选择

比较了乙腈-0.1%磷酸溶液和乙腈-6 mmol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液 2 个系统,结果乙腈-0.1%磷酸溶液梯度洗脱条件下 4 个成分的分离效果更好,出峰时间更适宜。

3.5 阴性溶液的制备

绿原酸为金银花的指标成分之一,但有文献^[10]报道鱼腥草中也含有绿原酸,故同时制备了金银花阴性和金银花、鱼腥草双阴性溶液,分析显示

金银花阴性样品色谱图中仅有一峰面积极小的绿原酸峰,含量极微,表明复方鱼腥草片中的绿原酸主要来源于金银花药材。

3.6 含量测定结果

实验从全国范围抽取的样品中,随机选取了不同厂家的 20 批复方鱼腥草片进行含量测定,结果可见,除现行质量标准中已控制的黄芩苷的测定结果较稳定外,其余 3 个指标成分含量差异较大,故增加此 3 个指标成分的含量测定方法,以更全面地监控复方鱼腥草片的质量。

本实验建立了 HPLC 同时测定复方鱼腥草片中绿原酸、连翘酯苷 A、槲皮苷和黄芩苷的含量,经方法学验证,所建立的测定方法符合定量分析要求,且实现同时对方中金银花、连翘、鱼腥草和黄芩的质量控制,为更全面提升该品种质量标准、保障产品质量,提供了一种可靠的检测方法。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 1234-1235
- [2] LI C X, QI X P. Determination of baicalia content in Compound Houttuynia Herb tablets HPLC [J]. Heilongjiang Med J(黑龙江医药), 2005, 18(5): 320-321.
- [3] LI X W, YE X Q. Determination of chlorogenic acid content in Compound Houttuynia Herb tablets by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2003, 25(1): 66-67.
- [4] JIN Y X, YAO L Q. Determination of chlorogenic acid, phillyrin and baicalin in Compound Houttuynia Herb tablets by RP-HPLC [J]. China Pharm(中国药师), 2004, 7(7): 524-526.
- [5] LIUY, GUO M Y, BAI G B. Research progress of chlorogenic acid [J]. J Chin Med Mater(中成药), 2012, 35(7): 1180-1185.
- [6] XING L N, ZHOU M M, LI Y, et al. Recent progress of potential effects and mechanisms of chlorogenic acid and its intestinal metabolites on central nervous system diseases [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40(6): 1044-1047.
- [7] FU P L, WANG D Q, LI Z J. Research progress of forsythoside [J]. J Changchun Univ Tradit Chin Med(长春中医药大学学报), 2011, 27(12): 1062-1063.
- [8] YANG L. Research development of pharmacology activities of quercitroside [J]. Asia-Pacific Tradit Med(亚太传统医药), 2016, 11(6): 61-63.
- [9] WEN M, LI X, FU S T. New Research progress in pharmacological activities of baicalin [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2008, 25(2): 158-162.
- [10] HE B, LIU Y, et al. Simultaneous determination of six active constituent in different parts of Houttuyniae Herba by quantitative analysis of multi-components by single marker [J]. Chin Tradit Herb Drags(中草药), 2013, 43(15): 2160-2164.

收稿日期: 2017-01-11

(本文责编: 曹粤锋)