

UPLC法同时测定莲花清瘟胶囊中5种活性成分的含量^Δ

刘敏彦*, 赵韶华, 张利康, 叶晓红, 张永锋, 范文成(石家庄以岭药业股份有限公司, 石家庄 050035)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)44-4201-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.44.23

摘要 目的:建立同时测定莲花清瘟胶囊中绿原酸、隐绿原酸、连翘酯苷A、3,4-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸含量的方法。方法:采用超高效液相色谱法。色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈柱,流动相为甲醇-乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为0.4 ml/min,柱温为40℃,检测波长为237 nm,进样量为5 μl。结果:绿原酸、隐绿原酸、连翘酯苷A、3,4-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸检测质量浓度分别在0.035~0.7、0.011~0.21、0.042~0.83、0.031~0.61、0.009~0.18 mg/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$ 、 $0.999\ 7$ 、 $0.999\ 9$ 、 $0.999\ 8$);精密密度、稳定性、重复性试验的RSD≤2.06%;平均加样回收率分别为97.2%、98.2%、98.1%、97.5%、96.5%,RSD分别为1.62%、2.26%、2.22%、2.05%、1.29%($n=6$)。结论:该方法简单、快速、准确,可用于快速评价莲花清瘟胶囊的质量。

关键词 超高效液相色谱法;莲花清瘟胶囊;绿原酸;隐绿原酸;连翘酯苷A;3,4-二咖啡酰奎宁酸;4,5-二咖啡酰奎宁酸;含量测定

Simultaneous Content Determination of 5 Active Compounds in Lianhua Qingwen Capsules by UPLC

LIU Min-yan, ZHAO Shao-hua, ZHANG Li-kang, YE Xiao-hong, ZHANG Yong-feng, FAN Wen-cheng (Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of 5 active compounds in Lianhua qingwen capsules, including chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, forsythoside A, 3,4-dicaffeoylquinic acid and 4,5-dicaffeoylquinic acid. METHODS: UPLC method was adopted. The separation was performed on Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 0.4 ml/min. The detection wavelength was set at 237 nm and column temperature was 40℃. The injection volume was 5 μl. RESULTS: The linear ranges were 0.035-0.7 mg/ml for chlorogenic acid ($r=0.999\ 9$), 0.011-0.21 mg/ml for cryptochlorogenic acid ($r=0.999\ 9$), 0.042-0.83 mg/ml for forsythoside A ($r=0.999\ 7$), 0.031-0.61 mg/ml for 3,4-dicaffeoylquinic acid ($r=0.999\ 9$) and 0.009-0.18 mg/ml for 4,5-dicaffeoylquinic acid ($r=0.999\ 8$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than ≤2.06%. The average recoveries were 97.2% (RSD=1.62%, $n=6$), 98.2% (RSD=2.26%, $n=6$), 98.1% (RSD=2.22%, $n=6$), 97.5% (RSD=2.05%, $n=6$), 96.5% (RSD=1.29%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and accurate, which provide scientific evidence for quality control of Lianhua qingwen capsules.

KEY WORDS UPLC; Lianhua qingwen capsules; Chlorogenic acid; Cryptochlorogenic acid; Forsythoside A; 3,4-dicaffeoylquinic acid; 4,5-dicaffeoylquinic acid; Content determination

莲花清瘟胶囊由连翘、金银花、炙麻黄、鱼腥草等13味中药组成,具有清瘟解毒、宣肺泄热的作用,临床用于治疗流行性感[1-2]。目前,其主要成分的测定方法有薄层色谱法[3]、毛

细管胶束电动色谱法[4]、高效液相色谱(HPLC)法[5-7]、液相色谱-质谱联用(LC-MS)法[8]等。超高效液相色谱(UPLC)法有着工作效率高、流速低、耐压范围宽等优点,已经成功地应用

的管理机制。

参考文献

- [1] 卫生部.抗菌药物临床应用管理办法[S].2012.
- [2] 卫生部,国家中医药管理局,总后卫生部.抗菌药物临床应用指导原则[S].2004.
- [3] 四川省卫生厅.国家基本药物四川省补充药物目录管理暂行办法[S].2010.

- [4] 李玲,廖赞,袁波,等.抗菌药物合理使用信息管理系统在抗菌药物管理中的实践[J].中国药房,2013,24(17):1545.
- [5] 卫生部办公厅.关于抗菌药物临床应用管理有关问题的通知[S].2009.
- [6] 卫生部医政司.国家抗微生物治疗指南[M].北京:人民卫生出版社,2012:51-53.
- [7] 卫生部.2012年全国抗菌药物临床应用专项整治活动督导检查手册[S].2012.

Δ基金项目:国家科技重大专项子课题(No.2011ZX09201-201-27)

*副主任中药师,博士。研究方向:中药质量控制和药动学。E-mail: liuminyan75@163.com

(收稿日期:2013-06-25 修回日期:2013-08-31)

在了化学成分复杂的中药的分析领域。故本试验尝试采用UPLC法对莲花清瘟胶囊中绿原酸、隐绿原酸、连翘酯苷A、3,4-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸5种活性成分进行含量测定。

1 材料

ACQUITY UPLC H-CLASS型UPLC仪,包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Empower3色谱工作站(美国Waters公司);KQ5200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AG135型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

绿原酸、连翘酯苷A对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110753-200413、111810-201001);隐绿原酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号: MUST-11112203、MUST-11083102、MUST-11081803,质量分数>98%);莲花清瘟胶囊(石家庄以岭药业股份有限公司,批号:110121、110601、110807、110610、110710、110220、110725、110147、110817、110910、110241、120515);乙腈、甲醇(色谱纯,美国Fisher公司);磷酸(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);其他试剂均为分析纯,水为重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm);流动相:流动相A为甲醇,流动相B为乙腈,流动相C为0.1%磷酸溶液,采用梯度洗脱(0~2 min为3%A和3%B, >2~3 min为3%→5%A、3%→5%B, >3~10 min为5%→20%A、5%B, >10~13.5 min为20%A、5%B, >13.5~22.5 min为20%→85%A、5%B);流速:0.4 ml/min;柱温:40℃;检测波长:237 nm;进样量:5 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 称取莲花清瘟胶囊内容物,研细,取约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 ml,称定质量,超声处理30 min(功率:250 W,频率:40 kHz),放冷,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,即得。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸、隐绿原酸、连翘酯苷A、3,4-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸对照品适量,置于同一50 ml棕色量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得5种成分质量浓度分别为0.70、0.21、0.83、0.61、0.18 mg/ml的对照品溶液。

2.3 系统适用性试验

精密吸取“2.2”项下供试品溶液和对照品溶液各5 μl,注入UPLC仪,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。在该色谱条件下,5种成分可达到基线分离,理论板数按绿原酸峰计应不低于3 000。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液0.5、1.0、2.0、5.0、8.0、10 ml,置于10 ml量瓶中,分别以甲醇定容至刻度,摇匀,得到不同质量浓度的系列溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以检测质量浓度(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标进行线

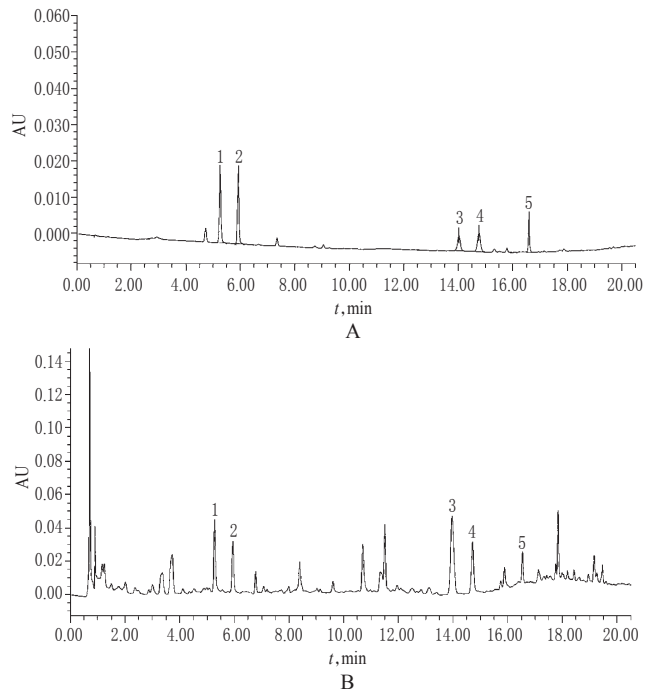


图1 超高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; 1. 绿原酸; 2. 隐绿原酸; 3. 3,4-二咖啡酰奎宁酸; 4. 连翘酯苷A; 5. 4,5-二咖啡酰奎宁酸

Fig 1 UPLC chromatograms

A. substance control; B. test sample; 1. chlorogenic acid; 2. cryptochlorogenic acid; 3. 3,4-dicaffeoylquinic acid; 4. forsythoside A; 5. 4,5-dicaffeoylquinic acid

性回归,回归方程及线性范围详见表1。

表1 回归方程及线性范围

Tab 1 Results of regression equation and linear range

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg/ml
绿原酸	$y=810\ 289x-4\ 519.6$	0.999 9	0.035~0.7
隐绿原酸	$y=3\ 000\ 356x-1\ 253.7$	0.999 9	0.011~0.21
连翘酯苷A	$y=604\ 169x-3\ 316.1$	0.999 7	0.042~0.83
3,4-二咖啡酰奎宁酸	$y=2\ 000\ 321x-2\ 420.8$	0.999 9	0.031~0.61
4,5-二咖啡酰奎宁酸	$y=1\ 005\ 132x-1\ 065.3$	0.999 8	0.009~0.18

2.5 精密度试验

取“2.2.2”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次。结果,绿原酸、隐绿原酸、连翘酯苷A、3,4-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸的RSD分别为1.48%、1.30%、1.09%、1.20%、2.06%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.1”项下供试品溶液适量,分别在放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,绿原酸、隐绿原酸、连翘酯苷A、3,4-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸的RSD分别为1.10%、1.15%、1.47%、1.56%、1.71%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取样品(批号:110121)内容物适量,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,共6份,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,绿原酸、隐绿原酸、连翘酯苷A、3,4-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸的RSD分别为1.77%、1.94%、1.48%、0.97%、

1.07%,表明本方法的重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号:110121)内容物约0.5 g,共6份,精密称定,分别加入一定量的绿原酸、隐绿原酸、连翘酯苷A、3,4-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸对照品溶液,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率,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, g	所含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
绿原酸	0.501	1.659	1.610	3.237	98.01	97.2	1.62
	0.503	1.665	1.610	3.207	95.80		
	0.506	1.674	1.610	3.219	95.97		
	0.504	1.667	1.610	3.212	95.97		
	0.502	1.662	1.610	3.234	97.64		
	0.504	1.669	1.610	3.275	99.76		
隐绿原酸	0.501	0.361	0.420	0.790	102.06	98.2	2.26
	0.503	0.363	0.420	0.764	95.57		
	0.506	0.365	0.420	0.781	99.14		
	0.504	0.363	0.420	0.775	98.07		
	0.502	0.362	0.420	0.769	96.90		
	0.504	0.364	0.420	0.774	97.73		
连翘酯苷A	0.501	2.175	2.250	4.362	97.19	98.1	2.22
	0.503	2.183	2.250	4.347	96.20		
	0.506	2.195	2.250	4.417	98.77		
	0.504	2.186	2.250	4.341	95.79		
	0.502	2.179	2.250	4.464	101.55		
	0.504	2.188	2.250	4.423	99.32		
3,4-二咖啡酰奎宁酸	0.501	1.559	1.570	3.124	99.70	97.5	2.05
	0.503	1.564	1.570	3.131	99.81		
	0.506	1.573	1.570	3.068	95.24		
	0.504	1.566	1.570	3.103	97.89		
	0.502	1.562	1.570	3.063	95.63		
	0.504	1.568	1.570	3.084	96.56		
4,5-二咖啡酰奎宁酸	0.501	0.452	0.520	0.964	98.48	96.5	1.29
	0.503	0.454	0.520	0.961	97.59		
	0.506	0.456	0.520	0.952	95.40		
	0.504	0.454	0.520	0.951	95.57		
	0.502	0.453	0.520	0.952	95.96		
	0.504	0.455	0.520	0.955	96.10		

2.9 样品含量测定

取12批连花清瘟胶囊样品各适量,分别按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算5种成分含量,结果见表3。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

通过使用二极管阵列检测器进行紫外区全波长扫描,分别提取210、237、254、280、320 nm波长处的色谱图。结果显示,5种待测成分在237 nm波长处均具有较高吸光度,并且分离度良好,满足定量测定要求。因此,选择237 nm作为检测波长。

3.2 流动相的选择

笔者考察了甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液、甲醇-乙腈-0.1%磷酸溶液等不同流动相系统,结果显示以甲醇-

表3 样品含量测定结果(mg/g, n=3)

Tab 3 Results of content determination of samples (mg/g, n=3)

批号	含量				
	绿原酸	隐绿原酸	连翘酯苷A	3,4-二咖啡酰奎宁酸	4,5-二咖啡酰奎宁酸
110121	3.31	0.72	4.34	3.11	0.90
110147	4.52	0.94	3.81	2.17	1.17
110220	2.77	0.96	3.16	2.51	0.69
110241	2.00	0.74	2.93	2.43	0.48
110601	2.48	0.96	3.27	2.88	0.66
110610	2.93	0.99	3.29	2.44	0.78
110710	2.57	0.82	3.65	2.68	0.58
110725	2.67	0.87	2.85	2.02	0.68
110807	3.42	1.00	3.47	2.62	0.86
110817	1.97	0.78	3.20	2.76	0.42
110910	2.30	0.91	3.88	3.00	0.49
120515	1.49	0.65	2.42	2.45	0.31

乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱,样品中的待测组分分离度良好。因此,选择甲醇-乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相。

3.3 阴性对照试验的结果

笔者曾对方中连翘和金银花进行了阴性对照试验,结果发现连翘酯苷A阴性对照无干扰;而在金银花阴性样品中,在与4,5-二咖啡酰奎宁酸保留时间相对应的位置上出现一个小峰,经二极管阵列检测器检测,该峰光谱与4,5-二咖啡酰奎宁酸一致,故推测可能方中其他药材中也含有4,5-二咖啡酰奎宁酸,此成分并非金银花的专属性成分。

综上所述,本方法简单、快速、准确,可用于快速评价连花清瘟胶囊的质量。

参考文献

- [1] 杨立波,季振慧,高学东,等.连花清瘟胶囊治疗流行性感冒Ⅱ期临床研究[J].中药新药与临床药理,2005,16(4):290.
- [2] 张金龙,谭亚萍.连花清瘟胶囊治疗肺部感染30例疗效观察[J].世界中医药,2010,5(3):158.
- [3] 赵韶华,许红辉,李晓燕,等.连花清瘟胶囊薄层鉴别与HPLC定量测定[J].中国药品标准,2007,8(1):55.
- [4] 霍鹏,覃莎,黄雨涵,等.连花清瘟胶囊中6种有效成分的毛细管束束电色谱法测定[J].分析测试学报,2011,30(4):396.
- [5] 冯育林,张武岗,孙丽仁,等.HPLC法测定杏香兔耳风中绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和木犀草素[J].中草药,2012,43(3):513.
- [6] 谢秉湘,李志梅,陈善超.连花清瘟胶囊中连翘苷和盐酸麻黄碱的HPLC法测定[J].中国医药工业杂志,2010,41(9):690.
- [7] 陶君彦,张晓昱,黄志军,等.HPLC法同时测定木瓜中绿原酸、咖啡酸的含量[J].中国药房,2007,18(12):912.
- [8] 石蕊,蒋午峻,乔湜,等.连花清瘟胶囊中9种成分的LC-MS/MS-离子扫描切换法测定[J].中国医药工业杂志,2011,42(10):777.

(收稿日期:2013-04-22 修回日期:2013-09-28)