

[质 量]

UPLC 法同时测定银翘解毒合剂中 10 种成分

张 莉, 周娟娟
(江苏省食品药品监督检验研究院, 江苏 南京 210008)

摘要: **目的** 建立 UPLC 法同时测定银翘解毒合剂(金银花、连翘、薄荷等)中连翘酯苷 A、连翘苷、牛蒡苷、甘草酸铵、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的含有量。**方法** 该药物甲醇提取液的分析采用 Shim-pack XR-ODS 色谱柱(3.0 mm×100 mm, 2.2 μm); 流动相乙腈-0.05% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 ℃; 检测波长 250、278、328 nm。**结果** 8 种成分在各自范围内线性关系良好($r=1.000\ 0$), 平均加样回收率 98.71%~104.13%, RSD 0.2%~1.5%。**结论** 该方法灵敏简便, 重复性好, 可用于银翘解毒合剂的质量控制。

关键词: 银翘解毒合剂; 化学成分; UPLC

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2018)08-1748-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.08.015

Simultaneous determination of ten constituents in Yinqiao Jiedu Mixture by UPLC

ZHANG Li, ZHOU Juan-juan
(Jiangsu Provincial Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish a UPLC method for the simultaneous content determination of forsythoside A, forsythin, arctiin, ammonium glycyrrhizinate, chlorogenic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid B and isochlorogenic acid C in Yinqiao Jiedu Mixture (*Lonicerae japonicae* Flos, *Forsythiae Fructus*, *Menthae haplocalycis Herba*, etc.). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 35 ℃ thermostatic Shim-pack XR-ODS column (3.0 mm×100 mm, 2.2 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.05% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 250, 278, 328 nm. **RESULTS** Ten constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r=1.000\ 0$), whose average recoveries were 98.71%–104.13% with the RSDs of 0.2%–1.5%. **CONCLUSION** This sensitive, simple and reproducible method can be used for the quality control of Yinqiao Jiedu Mixture.

KEY WORDS: Yinqiao Jiedu Mixture; chemical constituents; UPLC

银翘解毒合剂来源于清代《温病条辨》中的银翘散方,由金银花、连翘、薄荷、荆芥、淡豆豉、牛蒡子(炒)、桔梗、淡竹叶、甘草制成,具有疏风解表、清热解毒的功效,用于风热感冒,症见发热头痛、咳嗽口干、咽喉疼痛^[1]。方中金银花、连翘辛凉解表,清热解毒,为君药;牛蒡子性味辛凉,助君药疏散风热,为臣药;甘草调和药

性,为使药。但其现行标准中的含有量测定仅针对绿原酸,不够全面^[2-6]。

现代药理研究表明,连翘酯苷 A、连翘苷、牛蒡苷、甘草酸铵、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 为银翘解毒合剂中的活性成分^[7-14]。本实验将建立 UPLC 法同时测定银翘解毒合剂中上述 10 种成分的含有量,

收稿日期: 2017-12-18

作者简介: 张 莉 (1978—), 女, 硕士, 副主任药师, 从事中药质量标准研究。Tel: (025) 86251201, E-mail: crystalsnoopy@sina.cn

以期全面、有效、快速地控制该制剂质量提供科学依据。

1 材料

LC-30AD 超高效液相色谱仪（日本岛津公司）。牛蒡苷（批号 110819-201611，含有量 95.9%）、连翘苷（批号 110821-201615，含有量 94.9%）、连翘酯苷 A（批号 111810-201606，含有量 93.4%）、甘草酸铵（批号 110731-201619，含有量 93.0%）、绿原酸（批号 110753-201716，含有量 99.3%）对照品（中国食品药品检定研究院）；隐绿原酸（批号 Z30A6B2，含有量≥98%）、新绿原酸（批号 P27A6F2713，含有量≥98%）、异绿原酸 A（批号 P28O7F23862，含有量≥98%）、异绿原酸 B（批号 P25J6F1793，含有量≥98%）；异绿原酸 C（批号 CP25J6F1794，含有量≥98%）对照品（上海源叶生物科技有限公司）。银翘解毒合剂，共 37 批（通化金汇药业股份有限公司，10 批；江西远东药业有限公司，8 批；北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂，6 批；陕西中医学院制药厂，2 批；广东万年青制药有限公司，9 批；宝鸡必康嘉隆制药有限公司，2 批）。乙腈、磷酸为色谱纯；其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Shim-pack XR-ODS 色谱柱

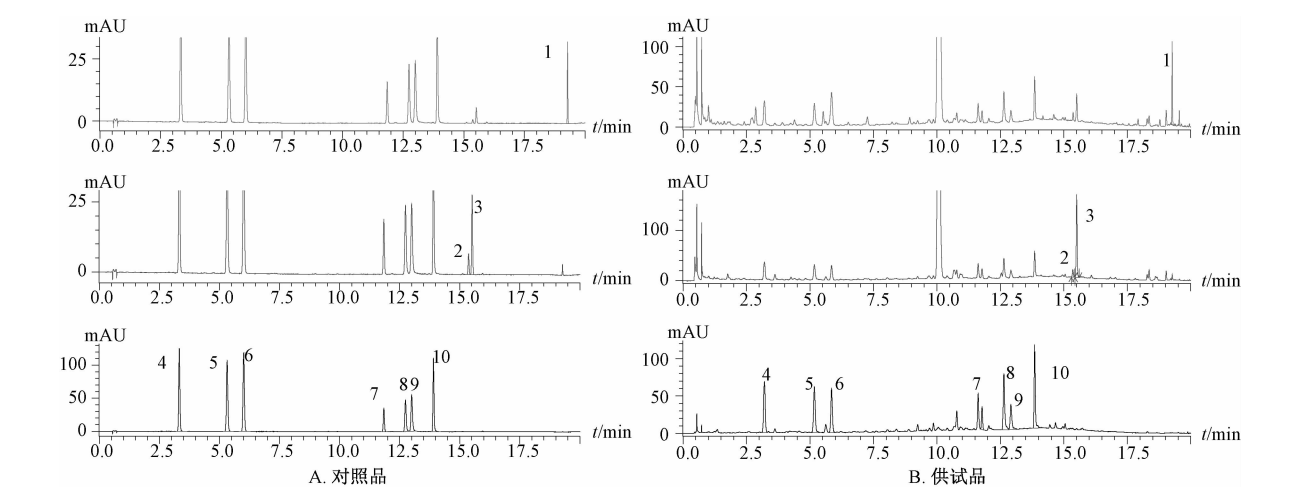
(3.0 mm × 100 mm, 2.2 μm)；体积流量 1.0 mL/min；流动相乙腈（A）-0.05% 磷酸（B），梯度洗脱（0 ~ 5 min, 5% ~ 10% A；5 ~ 12 min, 10% ~ 20% A；12 ~ 18 min, 20% ~ 40% A；18 ~ 20 min, 40% ~ 80% A）；甘草酸铵检测波长 250 nm，连翘苷、牛蒡苷检测波长 278 nm，连翘酯苷 A、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 检测波长 328 nm；进样量 5 μL。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液制备 精密称取连翘酯苷 A、连翘苷、牛蒡苷、甘草酸铵、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 对照品适量，50% 甲醇分别制成 0.2、0.1、0.45、0.2、0.45、0.45、0.5、0.2、0.2、0.3 mg/mL 的溶液，即得。

2.3 供试品溶液制备 精密量取合剂 1 mL，置于 10 mL 量瓶中，甲醇定容至刻度，摇匀，即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密量取对照品溶液适量，50% 甲醇稀释成系列质量浓度，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标（X），峰面积积分值为纵坐标（Y）进行线性回归，结果见表 1，表明各成分在各自范围内的线性关系良好。



注：各小图由上至下，分别为 250、278、328 nm 波长处的色谱图

1. 甘草酸铵 2. 连翘苷 3. 牛蒡苷 4. 新绿原酸 5. 绿原酸 6. 隐绿原酸 7. 连翘酯苷 A 8. 异绿原酸 B 9. 异绿原酸 A 10. 异绿原酸 C
1. ammonium glycyrrhizinate 2. forsythin 3. arctiin 4. neochlorogenic acid 5. chlorogenic acid 6. cryptochlorogenic acid 7. forsythoside A 8. isochlorogenic acid B 9. isochlorogenic acid A 10. isochlorogenic acid C

图 1 各成分 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of various constituents

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
连翘酯苷 A	$Y=4\,651.737\,54X-1\,778.859\,78$	1.000 0	1.27 ~ 210.99
连翘苷	$Y=1\,698.641\,63X+95.594\,38$	1.000 0	0.62 ~ 62.01
牛蒡苷	$Y=1\,494.630\,41X-312.125\,21$	1.000 0	13.33 ~ 444.30
甘草酸铵	$Y=2\,274.758\,90X-689.678\,46$	1.000 0	5.64 ~ 187.86
新绿原酸	$Y=7\,898.731\,90X-486.398\,46$	1.000 0	2.73 ~ 273.36
绿原酸	$Y=8\,062.099\,75X-1\,256.691\,04$	1.000 0	2.72 ~ 272.16
隐绿原酸	$Y=7\,672.863\,73X-2\,058.892\,33$	1.000 0	3.14 ~ 314.29
异绿原酸 B	$Y=8\,871.287\,30X-2\,365.489\,26$	1.000 0	1.11 ~ 111.43
异绿原酸 A	$Y=10\,640.537\,54X-5\,039.188\,72$	1.000 0	1.17 ~ 116.78
异绿原酸 C	$Y=10\,536.635\,62X-2\,958.511\,72$	1.000 0	1.65 ~ 165.23

2.4.2 精密度试验 精密吸取同一份对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得连翘酯苷 A、连翘苷、牛蒡苷、甘草酸铵、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 峰面积 RSD 分别为 0.07%、1.16%、0.76%、0.10%、0.04%、0.03%、0.03%、0.10%、0.18%、0.13%，表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液，于 0、2、4、8、12、16、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得连翘酯苷 A、连翘苷、牛蒡苷、甘草酸铵、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 峰面积 RSD 分别为 0.85%、1.84%、1.83%、0.67%、0.78%、0.74%、0.74%、1.60%、1.23%、0.86%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 取同一批样品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，平行 6 份，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得连翘酯苷 A、连翘苷、牛蒡苷、甘草酸铵、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 含有量 RSD 分别 1.48%、1.57%、1.05%、0.84%、

1.67%、0.74%、1.71%、1.19%、1.75%、1.11%，表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 取同一批样品 0.5 mL，置于 10 mL 量瓶中，精密加入对照品溶液 1 mL（连翘酯苷 A 0.119 mg/mL、连翘苷 0.155 mg/mL、牛蒡苷 1.035 mg/mL、甘草酸铵 0.283 mg/mL、新绿原酸 0.183 mg/mL、绿原酸 0.182 mg/mL、隐绿原酸 0.161 mg/mL、异绿原酸 B 0.153 mg/mL、异绿原酸 A 0.189 mg/mL、异绿原酸 C 0.134 mg/mL），按“2.3”项下方法制备供试品溶液，平行 6 份，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率，结果，连翘酯苷 A、连翘苷、牛蒡苷、甘草酸铵、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 平均加样回收率分别为 100.01%、100.75%、102.22%、101.03%、104.13%、98.71%、102.03%、101.65%、102.60%、101.82%、RSD 分别为 0.9%、0.8%、0.7%、0.2%、0.2%、1.1%、1.0%、0.8%、0.9%、1.5%。

2.5 样品含有量测定 取 37 批样品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算含有量，结果见表 2。

表 2 各成分含有量测定结果 (mg/mL)

Tab. 2 Results of content determination of various constituents (mg/mL)

成分	单位					
	宝鸡必康嘉隆制药有限公司(<i>n</i> = 2)	北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂(<i>n</i> = 6)	广东万年青制药有限公司(<i>n</i> = 9)	江西远东药业有限公司(<i>n</i> = 8)	陕西中医学院制药厂(<i>n</i> = 2)	通化金汇药业股份有限公司(<i>n</i> = 10)
连翘酯苷 A	0.029	0.11	0.41	0.15	0.23	0.32
连翘苷	0.069	0.19	0.17	0.065	0.3	0.052
牛蒡苷	0.85	2.99	1.47	0.74	2.6	1.46
甘草酸铵	0.16	0.68	0.69	0.12	0.64	0.23
新绿原酸	0.29	0.89	0.65	0.11	0.38	0.28
绿原酸	0.23	0.88	0.73	0.12	0.36	0.29
隐绿原酸	0.23	0.77	0.58	0.092	0.32	0.23
异绿原酸 B	0.12	0.39	0.33	0.041	0.33	0.17
异绿原酸 A	0.057	0.18	0.17	0.03	0.15	0.092
异绿原酸 C	0.1	0.34	0.31	0.039	0.3	0.15

2.6 聚类分析 对“2.5”项下结果进行聚类分析,见图2。由图可知,对同一厂家不同批次样品而言,有的各成分含有量比较接近,有的差异很

大,而且不同厂家样品中各成分含有量有明显差异,其原因可能是所用药材质量参差不齐,或生产工艺不稳定。

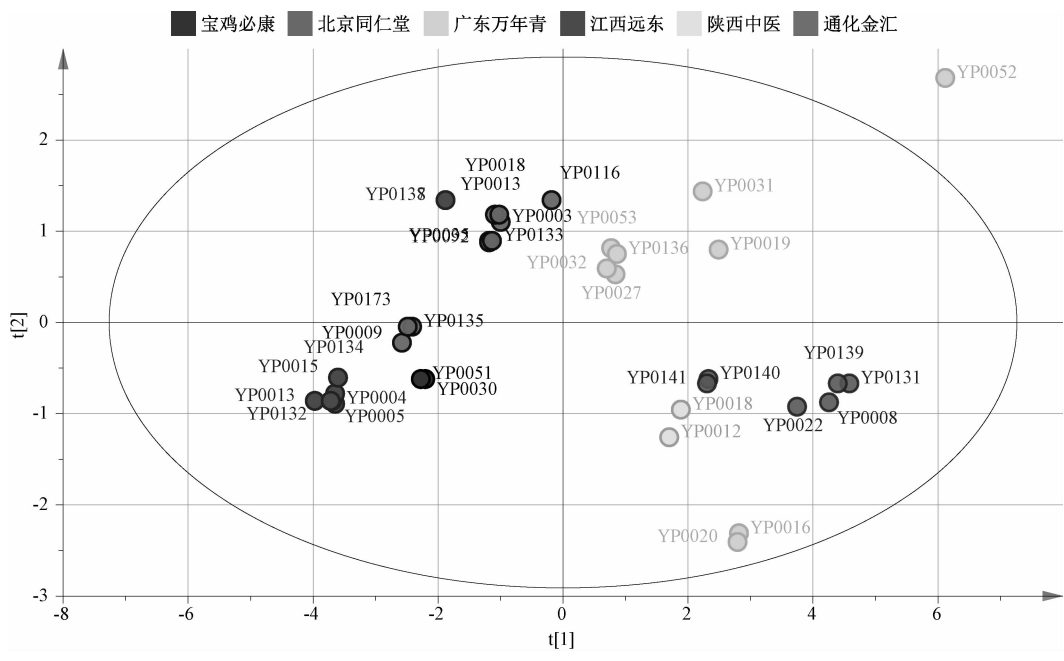


图 2 含有量测定聚类分析图
Fig. 2 Cluster analysis plot for content determination

3 讨论

本实验将各成分对照品溶液在 210 ~ 400 nm 波长处进行扫描,发现甘草酸铵在 250 nm 处,连翘苷、牛蒡苷在 278 nm 处,连翘酯苷 A、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 在 328 nm 处均有较大吸收,而且不受溶剂峰干扰,故选择 250、278、328 nm 作为检测波长。

在各成分达到完全分离的前提下,HPLC、UPLC法分析时间分别为 80、20 min,即后者可大大提高实验效率,同时减少试剂用量,降低分析成本,故本实验选择该方法进行测定。

参考文献:

[1] WS3-B-2783-97, 中药成方制剂第十四册[S].
[2] 盈竞男, 韩新民. 超高效液相色谱在中药及其复方研究中的应用进展[J]. 江苏中医药, 2015, 47(4): 81-84.
[3] 李 锦. UPLC 法测定银翘解毒口服液中牛蒡苷、蒙花苷、绿原酸、隐绿原酸[J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(6): 576-577.
[4] 韩永成, 刘 伟, 陈 宁, 等. UHPLC 法同时测定金银花中 6 种有效成分的含量[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(1): 89-93.
[5] 潘玄玄, 宋粉云, 李 华, 等. UPLC 波长切换法同时测

定沉香化气丸中 7 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(10): 1832-1838.
[6] 连中学, 刘 玉, 柴俊雯, 等. UPLC 法同时测定黄芩中 9 种黄酮类成分的含量[J]. 中国中医药科技, 2017, 24(5): 604-606.
[7] 张天锡, 史 磊, 刘 雯, 等. 连翘化学成分、药理活性现代研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(12): 222-224.
[8] 魏晋宝, 杨光义, 陈 欢, 等. 连翘苷的提取方法、药理毒理及药动学研究进展[J]. 中国药师, 2015, 18(12): 2144-2148.
[9] 范小青, 申云富. 牛蒡苷药理活性研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(4): 113-116.
[10] 冯 月, 吴文夫, 魏建华, 等. 甘草酸及甘草苷的提取纯化方法和药理作用研究进展[J]. 人参研究, 2012, 24(3): 46-50.
[11] 王小记, 郎美琦, 黄佳盛. 复方甘草酸单铵的药理作用及临床应用研究进展[J]. 山西医药杂志, 2014, 43(12): 1379-1382.
[12] 严永旺, 肖 兰, 周 旭, 等. 绿原酸的药理作用及药用研发对策[J]. 中国药房, 2017, 28(19): 2729-2732.
[13] 韩 悦. 金银花活性成分的药理作用及其进展[J]. 科技经济导刊, 2016(1): 148-149.
[14] 王琼琚, 谢伟容, 邵艳妮, 等. 基于 Q-Marker 成分定性与定量的双黄连制剂质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18): 36-46.