

HPLC 法测定苍耳丸中连翘酯苷 A 和绿原酸

于 和, 陈双璐*

天津市儿童医院 药剂科, 天津 300074

摘要: 目的 建立同时测定苍耳丸中连翘酯苷 A 和绿原酸的 HPLC 法。方法 采用 HPLC 法测定。色谱柱: Shim-pack VP-ODS (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.2%磷酸溶液, 梯度洗脱; 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 330 nm; 进样量: 10 μL; 柱温: 40 ℃。结果 连翘酯苷 A 在 0.232~1.856 μg 与峰面积积分值呈现良好的线性关系 ($r=0.999\ 6$), 平均回收率为 97.82%, RSD 值为 1.55%; 绿原酸在 0.25~2.00 μg 与峰面积积分值呈现良好的线性关系 ($r=0.999\ 8$), 平均回收率为 101.1%, RSD 值为 1.18%。结论 该方法简便, 结果准确, 重现性好, 可作为苍耳丸的质量控制方法。

关键词: 苍耳丸; 连翘酯苷 A; 绿原酸; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)03-0341-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.03.020

Determination of forsythoside A and chlorogenic acid in Canger Pill by HPLC

YU He, CHEN Shuang-lu

Department of Pharmacy, Tianjin Children Hospital, Tianjin 300074, China

Abstract: Objective To establish a method for the simultaneous determination of forsythoside A and chlorogenic acid in Canger Pill. **Methods** HPLC method was adopted. A Shim-pack VP-ODS C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted with mobile phase consisted of acetonitrile - 0.2% phosphoric acid solution in gradient elution. Detection wavelength was set at 330 nm. The flow rate was 1.0 mL/min. The injection volume was 10 μL at column temperature 40 ℃. **Results** The linear ranges of forsythoside A and chlorogenic acid were 0.232 — 1.865 μg ($r=0.999\ 6$) and 0.25 — 2.00 μg ($r=0.999\ 8$), respectively. The average recoveries were 97.82% (RSD=1.55%) and 101.1% (RSD=1.18%), respectively. **Conclusion** The method is simple, practicable, and accurate, which could be used for the quality control of Canger Pill.

Key words: Canger Pill; forsythoside A; chlorogenic acid; HPLC

苍耳丸作为医院制剂已经在临床上使用了 40 余年。苍耳丸由菊花、金银花、连翘、苍耳子、白芷等 7 味中药组成, 具有清热解毒、通鼻窍的功效, 对鼻窦炎有治疗作用^[1]。绿原酸作为金银花和菊花中主要活性成分, 具有抗菌、抗病毒、抗氧化作用^[2]; 连翘酯苷 A 作为连翘中主要的活性成分之一, 同样具有很强的抗菌活性, 并且体外抗病毒作用较强, 尤其对呼吸道最常见的合胞病毒具有明显的抑制作用^[3-4]。本实验参考有关文献报道^[5-7], 优化了色谱条件, 建立了利用梯度洗脱法同时测定绿原酸和连翘酯苷 A 的高效液相色谱 (HPLC) 法, 提高了苍耳丸的质量控制标准。

1 仪器与试剂

LC-2010A 高效液相色谱仪 (日本岛津公司), LC Solution 色谱工作站; 双频恒温数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

绿原酸对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 110753-200413, 供含量测定用), 连翘酯苷 A 对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 111810-201103, 供含量测定用), 乙腈 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司), 磷酸 (色谱纯, 天津市科密欧化学试剂开发中心), 水为娃哈哈纯净水, 其余试剂均为分析纯。苍耳丸 (天津市儿童医院自制, 规格 3 g/丸, 批号为 20121101、20121102、20121103)。

收稿日期: 2013-03-08

作者简介: 于 和, 女, 副主任药师, 1989 年毕业于天津第二医学院药理学系, 从事医院药学工作。E-mail: fishriver2003@163.com

*通信作者 陈双璐 (1967—), 女, 主任药师, 1989 年毕业于天津第二医学院药物分析专业, 从事药品检验工作。

Tel: (022) 23962655 E-mail: a93302@163.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Shim-pack VP-ODS (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A) - 0.2%磷酸溶液 (B), 梯度洗脱, 梯度洗脱程序: 0~5 min, 4%→8% A, 5~10 min, 8%→10% A, 10~15 min, 10%→15% A, 15~20 min, 15%→18% A, 20~35 min, 18%→25% A; 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 330 nm; 进样量: 10 μL; 柱温: 40 ℃。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品 1.25 mg, 连翘酯苷 A 对照品 1.16 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加 70%甲醇至刻度, 制成含连翘酯苷 A 116 μg/mL、绿原酸 125 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取苍耳丸样品适量, 剪

碎, 取 1 g, 精密称定, 精密加入 70%甲醇 30 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 240 W, 频率 45 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 70%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按处方配比, 制备缺金银花、菊花和连翘的苍耳丸阴性样品, 再按“2.2.2”项下制备方法, 制得阴性对照溶液。

2.3 专属性试验

分别吸取供试品溶液、混合对照品溶液和阴性对照溶液, 按照上述色谱条件进样, 记录色谱图, 见图 1。结果表明, 供试品溶液与对照品溶液在相同保留时间处有连翘酯苷 A 和绿原酸色谱峰, 而阴性对照溶液在该处未出现色谱峰, 对测定无干扰。理论塔板数按连翘酯苷 A 和绿原酸峰计算均大于 5 000, 分离度符合要求。

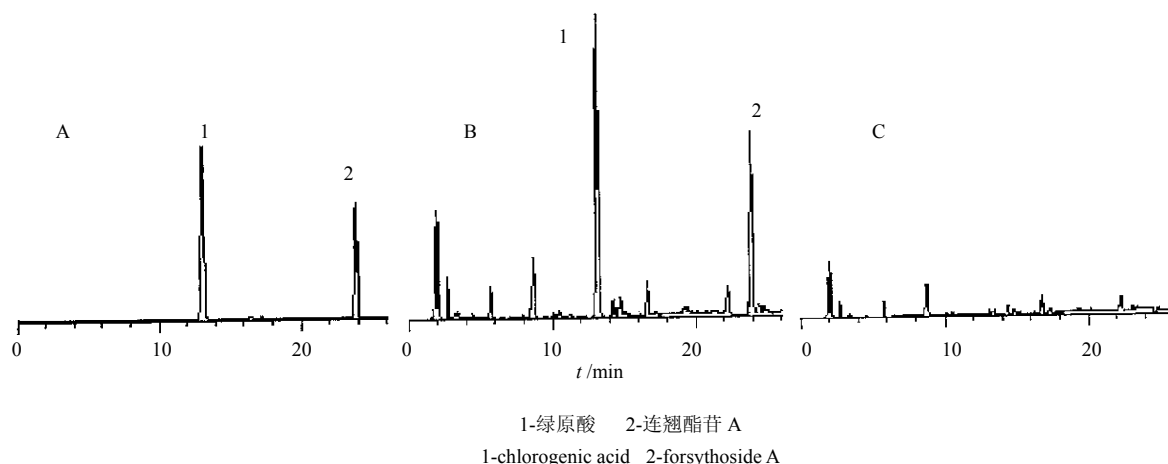


图 1 混合对照品 (A)、苍耳丸 (B) 和阴性对照 (C) 的高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Canger Pill (B), and negative sample (C)

2.4 线性关系考察

分别精密量取混合对照品溶液 2.0、6.0、10.0、12.0、14.0、16.0 μL, 依次注入高效液相色谱仪, 按照上述色谱条件进样, 测定各自峰面积。分别以连翘酯苷 A 和绿原酸的进样质量为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 进行线性回归分析, 得回归方程。连翘酯苷 A: $Y=93\,007.12X+431.5$, $r=0.999\,6$, 结果表明连翘酯苷 A 在 0.232~1.856 μg 时与峰面积呈现良好的线性关系; 绿原酸: $Y=1\,569\,691.2X+1\,927.9$, $r=0.999\,8$, 结果表明绿原酸在 0.25~2.00 μg 时与峰面积呈现良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液适量, 微孔滤膜滤过,

取续滤液 10 μL 注入高效液相色谱仪, 连续进样 6 次, 按照上述色谱条件分析, 测定峰面积, 结果混合对照品溶液中连翘酯苷 A 峰面积的 RSD 值为 0.68%, 绿原酸峰面积的 RSD 值为 0.53%。

2.6 重复性试验

取同一批苍耳丸样品 (批号为 20121101) 适量, 平行 6 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 结果测得样品中连翘酯苷 A 平均质量分数为 3.408 mg/g, RSD 值为 1.32%; 样品中绿原酸的平均质量分数为 3.814 mg/g, RSD 值为 0.98%。

2.7 稳定性试验

取同一批苍耳丸样品 (批号为 20121101) 适量, 制成供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8 h 进样测

定连翘酯苷 A 和绿原酸峰面积,结果连翘酯苷 A 峰面积的 RSD 值为 1.15%,绿原酸峰面积的 RSD 值为 1.04,表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

取批号为 20121101 苍耳丸样品 0.5 g,共 9 份,精密称定,分别加入含连翘酯苷 A 131.2 $\mu\text{g/mL}$ 、绿原酸 0.15 mg/mL 的混合溶液 8、10、12 mL,每一质量浓度的溶液各 3 份,制备供试品溶液,按上述色谱条件测定,结果连翘酯苷 A 的平均加样回收率为 97.82%,RSD 值为 1.55%;绿原酸的平均加样回收率为 101.1%,RSD 值为 1.18%。

2.9 样品测定

取 3 批苍耳丸样品(批号为 20121101、20121102、20121103),按上述供试品溶液的制备方法操作,按上述色谱条件进样 10 μL ,测定,结果见表 1。

表 1 苍耳丸中连翘酯苷 A 和绿原酸的测定结果 ($n=2$)

Table 1 Determination of forsythoside A and chlorogenic acid in Canger Pill ($n=2$)

批 号	连翘酯苷 A/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	绿原酸/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
20121101	3.408	3.814
20121102	3.329	3.752
20121103	3.245	3.701

3 讨论

3.1 提取条件的选择

连翘酯苷 A 是一种酚性成分,结构较为复杂,遇酸、碱或高温不稳定,易分解,因此本实验选用了超声提取法,而不用加热回流法。分别考察了甲醇、70%甲醇、50%甲醇的提取效果,结果选用 70%甲醇提取率最高。分别提取 20、30、40 min,结果显示提取 30 min 与 40 min 的结果基本一致,表明

经 30 min 有效成分已基本提取完全。

3.2 色谱条件的选择

《中国药典》2010 年版一部收载的金银花中绿原酸的测定波长为 327 nm,连翘中连翘酯苷 A 的测定波长为 330 nm,因此本实验选用 330 nm 为测定波长。

3.3 流动相的选择

在流动相筛选时,曾考虑甲醇-1%醋酸溶液、乙腈-1%醋酸溶液、甲醇-0.4%磷酸溶液、乙腈-0.4%磷酸溶液、乙腈-0.2%磷酸溶液。结果乙腈系统的柱效优于甲醇系统,选用乙腈-醋酸溶液系统时连翘酯苷 A 峰存在拖尾现象,采用乙腈-0.2%磷酸溶液系统时各待测物质的柱效和相邻两物质峰之间的分离度均达到测定要求。

参考文献

- [1] 林 宏. 苍耳丸的质量标准研究 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 68-70.
- [2] 王 乐, 李多伟. 元宝枫中绿原酸的研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2009, 24(3): 230-232.
- [3] 李仲兴, 王秀华, 赵建宏, 等. 连翘对金黄色葡萄球菌及表皮葡萄球菌的体外抗菌活性研究 [J]. 天津中医药, 2007, 24(4): 328-331.
- [4] 肖会敏, 王四旺, 王剑波, 等. 连翘抗病毒的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2010, 7(2): 9-10.
- [5] 周 燕, 俞 秀. HPLC 法测定双黄连胶囊中绿原酸、黄芩苷、连翘苷的含量 [J]. 中国药师, 2012, 15(1): 72-74.
- [6] 方海红, 赵柳入, 吴杰连, 等. HPLC 法同时测定双黄连制剂中绿原酸、连翘苷、黄芩苷 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(2): 113-116.
- [7] 李玉兰, 高美华. HPLC 测定不同产地连翘中连翘苷和连翘酯苷的含量 [J]. 中国医学工程, 2010, 18(2): 46-49.