

超高效液相色谱法测定热炎宁颗粒中大黄素、咖啡酸、绿原酸、野黄芩苷、木犀草素和虎杖苷

王冬¹, 雷勇胜², 王晨^{1*}

1. 天津医科大学肿瘤医院 国家肿瘤临床医学研究中心 天津市肿瘤防治重点实验室, 天津 300060

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 目的 建立超高效液相色谱(UPLC)同时测定热炎宁颗粒中大黄素、咖啡酸、绿原酸、野黄芩苷、木犀草素、虎杖苷 6 种成分的方法。方法 采用 UPLC 法, Acquity UPLC HSS C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为[甲醇-乙腈(35:65)]-0.1%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 0.5 mL/min, 分段变波长测定, 柱温 35 °C; 进样量 1.0 μL。结果 6 种成分在选定的范围内线性关系良好($r \geq 0.9993$); 平均加样回收率在 99.08%~102.31%, RSD 值均小于 2.53% ($n=6$)。结论 采用 UPLC 法对热炎宁颗粒中大黄素、咖啡酸、绿原酸、野黄芩苷、木犀草素、虎杖苷 6 种成分进行测定, 方法操作快速, 高效, 准确, 可用于热炎宁颗粒的质量控制。

关键词: 热炎宁颗粒; 大黄素; 咖啡酸; 绿原酸; 野黄芩苷; 木犀草素; 虎杖苷; 超高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2014)12-1365-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2014.12.008

Determination of emodin, caffeic acid, chlorogenic acid, scutellarin, luteolin, and polydatin in Reyaning Granules by UPLC

WANG Dong¹, LEI Yong-sheng², WANG Chen¹

1. Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To develop a UPLC method for simultaneous determination of emodin, caffeic acid, chlorogenic acid, scutellarin, luteolin, and polydatin in Reyaning Granules. **Methods** UPLC chromatography was used. The chromatographic separation was carried out on an Acquity UPLC HSS C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) with [methanol - acetonitrile (21 : 79)] - 0.1% phosphoric acid as mobile phases at the flow rate of 0.5 mL/min for gradient elution. Detection with variable wavelength was used, and the column temperature was 35 °C with injection volume of 1.0 μL. **Results** There were good separations for six components in the specific ranges ($r \geq 0.9993$). The average recovery was in the range of 99.08% — 102.31% with RSD value less than 2.53% ($n = 6$). **Conclusion** Simultaneous determination method of emodin, caffeic acid, chlorogenic acid, scutellarin, luteolin, and polydatin in Reyaning Granules by UPLC is established, and is accurate, sensitive, credible, and repeatable which can be applied to the quality control for Reyaning Granules.

Key words: Reyaning Granules; emodin; caffeic acid; chlorogenic acid; scutellarin; luteolin; polydatin; UPLC

热炎宁颗粒是《中国药典》2010 年版一部收载的品种, 由蒲公英、虎杖、北败酱、半枝莲制成, 具有清热解毒之功效, 临床用于外感风热、内郁化火所致的风热感冒, 发热, 咽喉肿痛, 口苦咽干,

咳嗽痰黄, 尿黄便结; 急性咽炎、急性支气管炎见上述症候者^[1]。蒲公英的指标成分为咖啡酸, 虎杖的主要指标成分为大黄素和虎杖苷, 北败酱文献报道的指标成分为木犀草素和绿原酸, 半枝莲的主要

收稿日期: 2014-07-16

基金项目: 天津市中医药管理局中医中西医结合科研项目(13140)

作者简介: 王冬, 男, 主管药师, 硕士研究生, 研究方向: 药物分析。Tel: (022) 23340123-5104 E-mail: lvn1314@126.com

*通信作者 王晨, 女, 主任药师, 研究方向: 医院药学。Tel: (022) 23340123-5104 E-mail: jieyi789@126.com

主要指标成分为野黄芩苷。目前对于热炎宁颗粒中活性成分测定的研究较少^[2-4]。超高效液相色谱法 (ultra performance liquid chromatography, UPLC) 是近年来发展起来的新型液相色谱技术, 其特点是分析时间短、分离效果好、分析灵敏度高, 特别是在中药分析中具有很多优势^[5-7]。本研究采用 UPLC 法同时测定热炎宁颗粒中大黄素、咖啡酸、绿原酸、野黄芩苷、木犀草素、虎杖苷 6 种指标成分, 为更全面地控制热炎宁颗粒的质量提供参考依据。

1 仪器与材料

Acquity UPLC 超高效液相色谱系统, 包括四元低压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Empower 2 工作站 (Waters 公司); Mettler 电子分析天平 (美国 Mettler 公司)。

乙腈、甲醇、磷酸 (色谱纯), 水 (超纯水)。大黄素 (批号 110756-200110)、咖啡酸 (批号 110885-200102)、绿原酸 (批号 111739-201115)、野黄芩苷 (批号 110842-201106)、木犀草素 (批号 111520-200504)、虎杖苷 (批号 111575-200502) 对照品均购于中国食品药品检定研究院。热炎宁颗粒 (规格 4 g/袋, 批号 20130515、20130516、20130517, 四川旭华制药有限公司提供)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Acquity UPLC HSS C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 [甲醇 - 乙腈 (35 : 65)] (A) - 0.1% 磷酸水溶液 (B) 为流动相, 体积流量 0.5 mL/min, 梯度洗脱: 0~4.0 min, 93% B; 4.0~9.0 min, 93%~87% B; 9.0~12.0 min, 87%~77% B; 12.0~15.0 min, 77%~67% B; 15.0~16.0 min, 67% B; 分段变波长测定: 0~4.0 min 为 254 nm, 4.0~16.0 min 为 320 nm; 柱温 35 °C; 进样量 1.0 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取大黄素 2.97 mg、咖啡酸 2.96 mg、绿原酸 5.98 mg、野黄芩苷 4.98 mg、木犀草素 4.98 mg、虎杖苷 4.99 mg, 分别置 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 得各对照品储备液, 备用。再精密吸取各对照品储备液适量, 置 10 mL 量瓶中, 流动相稀释至刻度, 得含大黄素 50.0 μg/mL、咖啡酸 60.0 μg/mL、绿原酸 200.0 μg/mL、野黄芩苷 120.0 μg/mL、木犀草素 160.0 μg/mL、虎杖苷 120.0 μg/mL 的混合对照品储备液, 备用。

2.3 供试品溶液的制备

取热炎宁颗粒, 研成细粉, 取约 0.5 g, 精密称定, 置 50 mL 圆底烧瓶中, 精密加入 70% 甲醇溶液 25 mL, 称定质量, 水浴回流 30 min, 放冷, 称定质量, 用 70% 甲醇溶液补足损失质量, 摇匀, 滤过, 即得。

2.4 线性关系考察

精密量取混合对照品溶液 0.10、0.25、0.5、1.0、2.5 mL 于 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 得系列混合对照品溶液。分别吸取上述溶液各 1.0 μL, 在上述色谱条件下进样, 记录色谱峰峰面积。以峰面积积分值为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程。大黄素: $Y=12\ 356 X-38\ 392$, $r=0.999\ 3$, 线性范围 0.8~12.5 μg/mL; 咖啡酸: $Y=3\ 678.3 X-998.5$, $r=0.999\ 8$, 线性范围 0.079 2~15.0 μg/mL; 绿原酸: $Y=6\ 861.2 X-638.5$, $r=0.999\ 8$, 线性范围 0.079 6~50.0 μg/mL; 野黄芩苷: $Y=56\ 421 X-5\ 537$, $r=0.999\ 5$, 线性范围 0.238~30.0 μg/mL; 木犀草素: $Y=39\ 653 X-265.3$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 0.242~40.0 μg/mL; 虎杖苷: $Y=2\ 238 X-5\ 362.1$, $r=0.999\ 8$, 线性范围 0.12~40.0 μg/mL。

2.5 精密度试验

取混合对照品溶液 (含大黄素 50.0 μg/mL、咖啡酸 60.0 μg/mL、绿原酸 200.0 μg/mL、野黄芩苷 120.0 μg/mL、木犀草素 160.0 μg/mL、虎杖苷 120.0 μg/mL) 适量, 在上述色谱条件下连续进样 6 次, 记录色谱峰面积, 计算得大黄素、咖啡酸、绿原酸、野黄芩苷、木犀草素、虎杖苷峰面积的 RSD 值分别为 0.23%、0.34%、1.51%、1.56%、1.23%、2.34%。

2.6 稳定性试验

取批号 20130515 热炎宁颗粒供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 按上述色谱条件进样测定, 记录色谱峰面积。结果大黄素、咖啡酸、绿原酸、野黄芩苷、木犀草素、虎杖苷峰面积的 RSD 值分别为 0.39%、0.84%、1.18%、1.45%、1.56%、2.76%, 结果表明供试品溶液中 6 种成分在室温条件下 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取批号 20130515 热炎宁颗粒样品 6 份, 平行制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进样, 记录色谱峰面积, 计算各成分的质量分数, 结果大黄素、咖

啡酸、绿原酸、野黄芩苷、木犀草素、虎杖苷质量分数的 RSD 值分别为 0.31%、0.46%、1.35%、1.65%、1.11%、2.78%。

2.8 加样回收率试验

取批号 20130515 热炎宁颗粒样品 6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 分别精密加入大黄素 (0.27 μg/mL)、咖啡酸 (7.5 ng/mL)、绿原酸 (0.009 μg/mL)、野黄芩苷 (1.99 μg/mL)、木犀草素 (19 ng/mL)、虎杖苷 (52 ng/mL) 对照品溶液各 1.0 mL, 制备供试品溶液, 进样测定, 记录色谱峰峰面积, 计算回收率。结果大黄素、咖啡酸、绿原酸、野黄芩苷、木犀草素、虎杖苷的平均回收率分别为 100.44%、100.78%、101.45%、102.31%、101.25%、99.08%, RSD 值分别为 1.89%、2.99%、0.56%、0.45%、2.53%、1.22%。

2.9 样品测定

取 3 批热炎宁颗粒样品, 每批平行 2 份, 制备供试品溶液。取混合对照品溶液和热炎宁颗粒供试品溶液, 按以上色谱条件进样, 结果 6 种被测定成分均能达到基线分离, 与相邻色谱峰的分度均大于 2.0, 以各成分色谱峰计算理论塔板数均超过 100 000, 峰形较好。色谱图见图 1。记录色谱峰面

积, 计算每批样品中 6 种成分的质量分数, 结果见表 1。

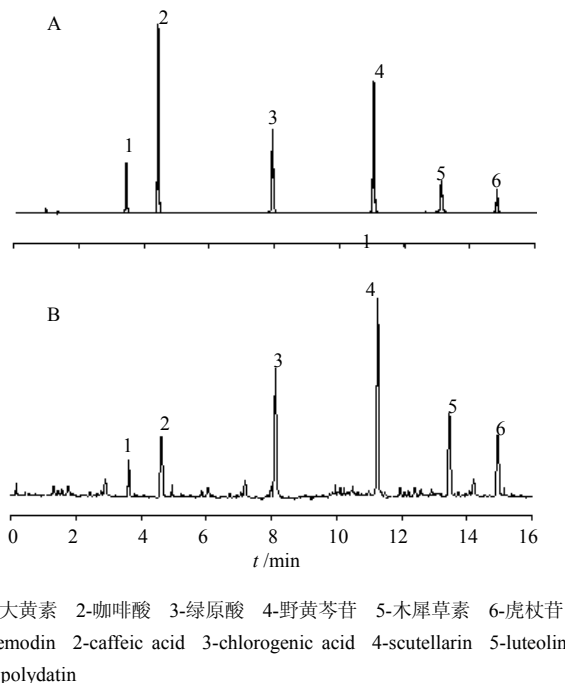


图 1 混合对照品 (A) 和热炎宁颗粒 (B) 的 UPLC 色谱图
Fig. 1 UPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and Reyaning Granules (B)

表 1 热炎宁颗粒中各成分的测定

Table 1 Determination of components in Reyaning Granules

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	大黄素	咖啡酸	绿原酸	野黄芩苷	木犀草素	虎杖苷
20130515	0.533	0.015	0.018	3.985	0.038	0.104
20130516	0.539	0.014	0.018	4.050	0.038	0.103
20130517	0.542	0.014	0.018	4.127	0.039	0.103

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

对 UPLC 各种填料的色谱柱进行了对比, 包括 Acquity UPLC HSS C₁₈ 色谱柱、Acquity UPLC CSH C₁₈ 色谱柱、Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱、Acquity UPLC HSS T3 色谱柱、Acquity UPLC HSS T3 色谱柱、Acquity UPLC HSS 氰基色谱柱和 Acquity UPLC HSS PFP 色谱柱, 最后选择 Acquity UPLC HSS C₁₈ 色谱柱。

3.2 提取方法考察

采用甲醇、70%甲醇、50%甲醇、30%甲醇作为

提取溶剂, 加热回流, 并对提取溶剂用量和提取时间进行考察, 结果表明, 加入 70% 甲醇 25 mL 置水浴上加热回流 30 min, 可将样品提取完全。

3.3 检测波长选择

采用二极管阵列检测器在 190~400 nm 分别扫描混合对照品溶液中大黄素、咖啡酸、绿原酸、野黄芩苷、木犀草素、虎杖苷色谱峰的紫外吸收, 因为各成分的最大吸收波长有差异, 其中大黄素在 254 nm 下检测, 其他成分由于最大吸收波长都在 300 nm 以上, 最后确定在 254、320 nm 进行测定, 采用分段变波长检测法对 6 种成分进行测定, 根据

各成分保留时间差异, 在 0~4.0 min 设定检测波长为 254 nm 以测定大黄素; 在 4.0~16.0 min 设定检测波长为 320 nm。

3.4 流动相选择

比较了以甲醇-水、乙腈-水、乙腈-甲酸水、乙腈-磷酸水、乙腈-乙酸水、甲醇-甲酸水、甲醇-磷酸水、甲醇-乙酸水构成的洗脱系统。结果表明, 以乙腈-水(或酸水)和甲醇-水(或酸水)为洗脱系统各成分的分离效果不理想, 经优化后的甲醇-乙腈-磷酸水系统各成分的分离效果较好, 各色谱峰的分度度和理论塔板数均符合要求, 色谱图基线平稳, 6 种指标成分分离效果较好。

本实验建立了 UPLC 法同时测定热炎宁颗粒中大黄素、咖啡酸、绿原酸、野黄芩苷、木犀草素和虎杖苷 6 种成分的方法, 分析时间短, 16 min 内即可同时完成 6 种成分的准确测定, 同时采用 1.7 μm

填料的色谱柱, 分离效果好, 溶剂消耗少。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2010: 991-992.
- [2] 李桂荣, 姜志辉, 刘晓丽. HPLC 法测定热炎宁颗粒中大黄素的含量 [J]. 山东医药工业, 2003, 22(2): 22-23.
- [3] 徐健, 刘建中. 对热炎宁颗粒质量标准修订的建议 [J]. 华西药学杂志, 2007, 22(1): 110.
- [4] 陈冬利, 龙洪. 热炎宁颗粒质量标准研究 [J]. 中医药导报, 2009, 15(2): 72-74.
- [5] 吴剑威, 赵润怀, 陈波, 等. 超高效液相色谱在中药领域的应用 [J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 79-81.
- [6] 刘薇, 杨珂, 王一飞, 等. UPLC 法检测染料木黄酮在 Caco-2 单细胞层模型上的吸收特征 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(2): 127-131.
- [7] 李耿, 王秀丽, 刘金欣, 等. UPLC 法同时测定乐脉颗粒中 11 种成分 [J]. 中草药, 2013, 44(11): 1435-1439.