HPLC 法同时测定复方利胆解毒颗粒中绿原酸和连翘酯苷 A

刘 毅[1]，刘素香[1]，白 雪[1]，吕佳媛[2]
1. 天津药物研究院，天津 300193
2. 天津中医药大学，天津 300193

摘 要：目的 建立复方利胆解毒颗粒中绿原酸和连翘酯苷 A 的定量测定方法。**方法** 采用 HPLC 法，Diamonsil-C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），以甲醇-0.05%磷酸水（33∶67）为流动相，在 330 nm 检测波长下同时对复方利胆解毒颗粒中有效成分绿原酸和连翘酯苷 A 进行定量测定。**结果** 绿原酸在 0.044 72～0.894 4 μg 线性关系良好，r=1.000 0，平均回收率为 98.92%，RSD 为 1.56%；连翘酯苷 A 在 0.052 16～1.043 2 μg 线性关系良好，r=0.999 9；平均回收率为 98.36%，RSD 为 1.44%。**结论** 本方法专属性强、简便、准确，可有效控制该制剂的质量。

关键词：复方利胆解毒颗粒；绿原酸；连翘酯苷 A；HPLC
中图分类号：R917 **文献标志码：**A **文章编号：**1674 - 6376 (2014) 03 - 0263 - 03
DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.03.017

Simultaneous quantitative determination of chlorogenic acid and forsythoside A in Compound Lidanjiedu Granule by HPLC

LIU Yi[1], LIU Su-xiang[1], BAI Xue[1], LV Jia-yuan[2]
1 Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China
2 Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract Objective To establish a method for detecting the quantity of chlorogenic acid and forsythoside A in Compound Lidanjiedu Granule. **Methods** The HPLC method was carried out using a Diamonsil-C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) eluted with the mobile phases of methanol-0.05% phosphoric acid (33:67). The method could detect the quantity of chlorogenic acid and forsythoside A in Compound Lidanjiedu Granule simultaneously with the detective wavelength of 330 nm. **Results** The linear range of chlorogenic acid was 0.044 72 — 0.894 4 μg (r = 1.000 0), the recovery was 98.92%. and the RSD value was 1.56%; The linear range of forsythoside A was 0.052 16 — 1.043 2 μg (r = 1.000 0),, the recovery was 98.36%, and the RSD value was 1.44%. **Conclusion** The method is specific, simple, and accurate, which could control the quality of Compound Lidanjiedu Granule.
Key words: Compound Lidanjiedu Granule; chlorogenic acid; forsythoside A; HPLC

复方利胆解毒颗粒是由茵陈、连翘、当归等多味中药制成的复方制剂，其主要组成药味茵陈具有清利湿热、利胆退黄的功效，绿原酸为其主要活性成分，药理研究表明[1]，绿原酸具有抗菌、抗病毒活性。连翘具有清热解毒、消肿散结、疏散风热的功效，其有效成分连翘苷和连翘酯苷 A 具有抗菌、抗病毒活性[2-3]，也是 2010 年版《中国药典》中连翘药材的测定指标，考虑到本品的提取工艺，因此选取水溶性强的连翘酯苷 A 作为含量测定指标。采用高效液相色谱法对本品中绿原酸和连翘酯苷 A 进行定量分析，建立了该产品的质量标准定量控制方法。该方法具有专属性强，分离效果好，灵敏、准确等优点。

1 仪器和试药

HP1100 系列高效液相色谱仪，G1310A 泵，G1313A 自动进样器，G1316A 柱温箱，G1314A 紫外检测器，HP1100 色谱工作站。AB204—N 电子分析天平（万分之一，瑞士 Mettler-Toledo 公司）；BT25S 电子分析天平（十万分之一，德国赛多利斯公司）；AS3120 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

绿原酸对照品购自中国食品药品检定研究院

收稿日期：2013-11-20
作者简介：刘 毅，助理研究员。E-mail: liuy@tjipr.com

（批号 110753-200413，归一化法检查质量分数＞98%）；连翘酯苷 A 对照品购自四川省维克奇生物科技有限公司（批号 201011，归一化法检查质量分数＞98%）。复方利胆解毒颗粒及空白样品由本实验室自制。甲醇为色谱纯，磷酸为分析纯，水为去离子水，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil-C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为甲醇-0.05%磷酸水（33∶67），检测波长 330 nm，体积流量 1.0 mL/min，柱温 30 ℃。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取绿原酸对照品 11.18 mg 和连翘酯苷 A 对照品 13.04 mg，置 50 mL 量瓶中，加 50%甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，制成含绿原酸 0.223 6 mg/mL 和连翘酯苷 A 0.260 8 mg/mL 的溶液，作为对照品贮备液。分别精密吸取对照品贮备液 1 mL，置 10 mL 量瓶中，加 50%甲醇稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取复方利胆解毒颗粒，研细，约 0.4 g，精密称定，置 25 mL 量瓶中，加入 50%甲醇适量，超声 20 min，取出，放至室温，用 50%甲醇稀释至刻度，摇匀；滤过，弃去初滤液，取续滤液作为供试品溶液。

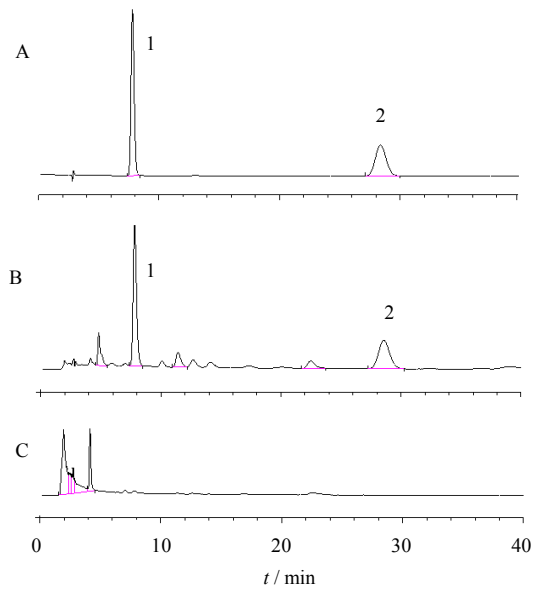
2.2.3 阴性对照溶液 取除去茵陈和连翘的其余药味，按处方配比，照制备工艺制成阴性对照样品，按供试品溶液的制备方法处理，作为阴性对照溶液。

2.3 专属性试验

分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 10 μL，按上述色谱条件测定，见图 1，结果表明，阴性对照溶液在绿原酸和连翘酯苷 A 色谱峰相应位置上无色谱峰，阴性对照无干扰，方法专属性良好。

2.4 线性关系考察

分别精密量取对照品贮备液（即含绿原酸 0.223 6 mg/mL 和连翘酯苷 A 0.260 8 mg/mL）0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL 置 10 mL 量瓶中，用 50%甲醇稀释至刻度，摇匀，分别进样 10 μL，测定峰面积。以绿原酸的量（μg）为横坐标，峰面积为纵坐标，计算回归方程 Y＝3 065.4X－0.033 8，r＝1.000；以连翘酯苷 A 的量（μg）为横坐标，峰面积为纵坐标，计算回归方程 Y＝1 654.5X－3.619 0，r＝0.999 9。结果表明，绿原酸在 0.044 72～0.894 40 μg 与峰面积值呈良好的线性关系；连翘酯苷 A 在 0.052 16～1.043 20 μg 与峰面积值呈良好的线性关系。



1-绿原酸 2-连翘酯苷 A
1- chlorogenic acid 2- forsythoside A

图 1 混合对照品（A）、复方利胆解毒颗粒（B）和阴性对照（C）的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC of reference substance (A), Compound Lidanjiedu Granule (B), and negative sample (C)

2.5 精密度试验

精密吸取同一供试品溶液 10 μL，重复进样 6 次，记录绿原酸和连翘酯苷 A 峰面积值，计算其 RSD 值分别为 0.61%和 0.54%，。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液于 0、2、4、8、12、16、24 h 分别测定，每次进样 10 μL，记录绿原酸和连翘酯苷 A 的峰面积，结果其 RSD 值分别为 1.49%和 1.20%，表明，供试品溶液在室温避光放置 24 h 内保持稳定。

2.7 重复性试验

按供试品溶液的制备方法，对同一批号的样品分别制备 6 份供试品溶液，进样 10 μL 测定，计算绿原酸和连翘酯苷 A 的质量分数，结果，绿原酸的质量分数的 RSD 值为 1.46%；连翘酯苷 A 质量分数的 RSD 值为 0.50%。

2.8 回收率试验

取已知绿原酸和连翘酯苷 A 质量分数（即绿原酸 1.29 mg/g 和连翘酯苷 A 1.54 mg/g）的同一批本品 0.2 g，精密称定 9 份，精密加入对照品贮备液 0.9、1.2、1.4 mL 各 3 份，照供试品溶液制备方法制备，

进样 10 μL 测定，结果，绿原酸的平均回收率为 98.92%，RSD 值为 1.56%；连翘酯苷 A 的平均回收率为 98.36%，RSD 值为 1.44%。

2.9 样品的测定

取 3 批样品，按供试品溶液制备方法操作，即得供试品溶液，分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液 10 μL，按上述色谱条件测定绿原酸和连翘酯苷 A 的含量，结果见表 1。

表 1 复方利胆解毒颗粒中绿原酸和连翘酯苷 A 的含量测定结果 (n = 2)

Table 1 Determination of chlorogenic acid and forsythoside A in Compound Lidanjiedu Granule (n = 2)

批号	绿原酸/(mg·g^{-1})	连翘酯苷 A/(mg·g^{-1})
20121201	1.18	1.82
20121202	1.29	1.54
20121203	1.37	1.63

3 讨论

在流动相选择中，比较了甲醇-0.05%磷酸溶液、甲醇-0.1%磷酸溶液，以及各溶液不同配比，试验发现流动相以甲醇-0.05%磷酸溶液（33∶67）时色谱峰形状及对称性较好，因此选用为流动相。

2010 年版《中国药典》中茵陈和连翘药材含量测定项下[4]，绿原酸的检测波长为 327 nm，连翘酯苷 A 的检测波长为 330 nm。本实验采用紫外分光光度计，在 200～400 nm 波长分别对绿原酸、连翘酯苷 A 的对照品溶液进行扫描，结果显示绿原酸在 329.5 nm 处有最大吸收，连翘酯苷 A 的最大吸收波长为 330 nm，因此选择 2 种物质均有较高吸收的 330 nm 作为检测波长。

对样品提取溶剂进行考察，结果，用甲醇作提取溶剂，含量较低，峰形不佳；70%甲醇和 50%甲醇作提取溶剂，含量结果没有显著性差异，考虑到本品中有水提醇提两种工艺，因此采用 50%甲醇作为提取溶剂。

在本实验色谱条件下，制剂中绿原酸和连翘酯苷 A 与其他组分间有较好的分离度，而且专属性强，样品分析时间短，准确度、精密度均较好，可用于该产品的定量控制方法。

参考文献

[1] 吴卫华, 康 桢, 欧阳冬生, 等. 绿原酸的药理学研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(4): 691-694.

[2] 付鹏亮, 王东强, 李志军. 连翘酯苷药理作用研究进展 [J]. 长春中医药大学学报, 2011, 27(6): 1062-1063.

[3] 冯淑怡, 李先荣, 孙建宁. 连翘酯苷抗感染、解热作用研究 [J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(10): 73-75.

[4] 中国药典 [S]. 一部. 2010.