

UPLC 波长切换法测定复方大青叶合剂中 10 种成分

林林, 刘广楨, 郭东晓, 徐丽华, 林永强*
(山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

[摘要] **目的:**建立同时测定复方大青叶合剂中没食子酸,新绿原酸,绿原酸,隐绿原酸,异绿原酸 A,异绿原酸 B,紫花前胡苷,异绿原酸 C,大黄酚和大黄素的含量测定方法。**方法:**采用 Waters CORTECS-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 2.7 μm), 甲醇(A)-0.4% 甲酸溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~10 min, 10%~3% A; 10~25 min, 3%~35% A; 25~35 min, 35%~36% A; 35~55 min, 36%~80% A), 柱温和流速分别为 30 °C 和 0.3 mL·min⁻¹, 波长切换, 0~10 min, 290 nm; 10~38 min, 330 nm; 38~55 min, 250 nm。**结果:**10 种成分实现完全分离, 并与其他成分均能达到良好的分离; 没食子酸, 新绿原酸, 绿原酸, 隐绿原酸, 异绿原酸 A, 异绿原酸 B, 紫花前胡苷, 异绿原酸 C, 大黄酚和大黄素分别在 0.47~47.02, 1.00~100.14, 1.40~140.18, 1.15~115.11, 0.41~41.17, 0.32~32.11, 0.70~70.48, 0.67~67.22, 0.11~10.53, 0.12~12.29 ng 与色谱峰峰面积呈良好线性关系; 平均回收率(*n* = 6)分别为 99.4%, 99.7%, 99.8%, 99.7%, 99.4%, 99.3%, 99.8%, 99.4%, 99.4%, 99.3%; RSD 分别为 1.0%, 0.6%, 0.6%, 0.6%, 1.0%, 0.9%, 0.8%, 0.9%, 1.2%, 1.0%。**结论:**该方法多种成分同时测定, 操作简便, 准确、重复性好, 可用于复方大青叶合剂的质量控制。

[关键词] 超高压液相色谱法; 复方大青叶合剂; 同时测定; 波长切换

[中图分类号] R917; R284.1; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)12-0047-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180918

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180214.1523.020.html>

[网络出版时间] 2018-02-14 21:29

Simultaneous Determination of Content of 10 Components in Fufang Daqingye Mixture by UPLC

LIN Lin, LIU Guang-zhen, GUO Dong-xiao, XU Li-hua, LIN Yong-qiang*
(Shandong Provincial Institute for Food and Drug Control, Ji'nan 250101, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method for determining 10 components in Fufang Daqingye mixture. **Method:** The quantitative analysis was carried out on a column of Waters CORTECS-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 2.7 μm) by UPLC-PDA, and eluted with a mobile phase of methanol (A) -0.4% formic acid solution (B) in a gradient mode (0-10 min, 10%-3% A; 10-25 min, 3%-35% A; 25-35 min, 35%-36% A; 35-55 min, 36%-80% A) under a flow rate of 0.3 mL·min⁻¹ at 30 °C. The detection wavelength was set at 290 nm in first 10 min, then changed to 330 nm between 10 and 38 min, and later changed to 250 nm between 38 and 55 min. **Result:** The linear ranges of gallic acid, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cyclohexanecarboxylic acid, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid B, nodakenin, isochlorogenic acid C, chrysophanol and emodin were 0.47-47.02, 1.00-100.14, 1.40-140.18, 1.15-115.11, 0.41-41.17, 0.32-32.11, 0.70-70.48, 0.67-67.22, 0.11-10.53, 0.12-12.29 ng. The recoveries were 99.4%, 99.7%, 99.8%, 99.7%, 99.4%, 99.3%, 99.8%, 99.4%, 99.4% and 99.3%, respectively. The relative standard deviations were 1.0%, 0.6%, 0.6%, 0.6%, 1.0%, 0.9%, 0.8%, 0.9%, 1.2% and 1.0%, respectively (*n* = 6). **Conclusion:** This method is simple, accurate,

[收稿日期] 20170811(006)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2014ZX09304307-002); 山东省自然科学基金项目(ZR2013HM074)

[第一作者] 林林, 硕士, 副主任药师, 从事中药质量标准研究工作, Tel: 0531-81216523, E-mail: linlinsfda@163.com

[通信作者] * 林永强, 博士, 副主任药师, 从事中药质量标准研究工作, Tel: 0531-81216521, E-mail: 13864067104@163.com

reproducible and convenient for the quality control over Fufang Daqingye mixture.

[Key words] UPLC; Fufang Daqingye mixture; simultaneous determination; wavelengths switching

复方大青叶合剂收载于 2015 年版《中国药典》一部,由大青叶、金银花、羌活、拳参和大黄 5 味药组成,具有疏风清热、解毒消肿、凉血利胆功效,用于外感风热或瘟毒所致的发热头痛、咽喉红肿、耳下肿痛、胁痛黄疸;流感、腮腺炎、急性病毒性肝炎见上述证候者。2015 年版《中国药典》现行质量标准中,仅对大黄中大黄酚和大黄素进行了定量控制,但是从中药药理作用进行分析,大黄中的蒽醌类成分非主要药效成分^[1]。韩梅海等^[2]、崔丽华等^[3]分别对复方大青叶合剂中的靛玉红、绿原酸进行了测定,控制指标较少,无法全面反映产品的质量。为了更好地控制复方大青叶合剂的产品质量,本实验参考相关文献^[4-14],建立了本品中没食子酸,新绿原酸,绿原酸,隐绿原酸,异绿原酸 A,异绿原酸 B,紫花前胡苷,异绿原酸 C,大黄酚和大黄素 10 种成分的含量测定方法,用于对复方大青叶合剂进行质量控制。

1 材料

Acquity H-class 型 UPLC 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司, PDA 检测器), Mettler AE240 型 1/10 万电子天平(瑞士梅特勒公司)。

绿原酸对照品(批号 110753-201415, 纯度 96.2%), 没食子酸对照品(批号 110831-201605, 纯度 90.8%), 紫花前胡苷对照品(批号 111821-201604, 纯度 99.6%), 大黄酚对照品(批号 110796-201621, 纯度 99.2%), 大黄素对照品(批号 110756-201512, 纯度 98.7%), 均购自中国食品药品检定研究院; 新绿原酸对照品(批号 ps100603-07), 隐绿原酸(批号 ps100512-06), 异绿原酸 A(批号 ps100623-01), 异绿原酸 B(批号 ps100623-02), 异绿原酸 C(批号 ps100623-03), 均购自成都普思生物科技有限公司, 纯度均 > 98%。试验中所用试剂, 除甲醇为色谱纯外, 其他均为分析纯; 复方大青叶合剂样品由荣昌制药(淄博)有限公司提供, 批号分别为 161001, 161002, 161003。

2 方法与结果

2.1 混合对照品储备液的制备 分别精密称取没食子酸, 新绿原酸, 绿原酸, 隐绿原酸, 异绿原酸 A, 异绿原酸 B, 紫花前胡苷, 异绿原酸 C, 大黄酚和大黄素对照品适量, 加甲醇制得质量浓度分别为 47.02, 100.14, 140.18, 115.11, 41.17, 32.11, 70.48, 67.22, 10.53, 12.29 mg·L⁻¹ 的混合溶液, 作

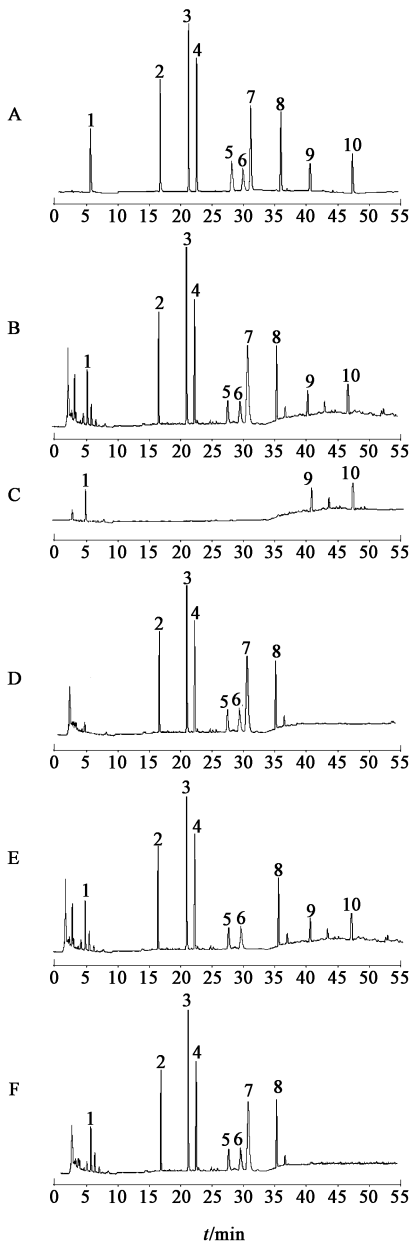
为储备液。

2.2 供试品溶液的制备 精密量取本品 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 阴性对照溶液的制备 没食子酸以及绿原酸类成分在自然界分布广泛, 因此制备阴性对照前分别按照供试品溶液的制备方法制备大青叶、金银花、羌活、拳参和大黄的对照药材溶液进行试验, 结果发现金银花、大青叶、羌活和拳参中均含有绿原酸类成分; 而大黄和拳参中均含有没食子酸, 因此按 2.2 项下供试品溶液的制备方法制得缺大青叶、金银花、羌活、拳参阴性对照溶液; 缺大黄、拳参阴性对照溶液; 缺大黄阴性对照溶液和缺羌活阴性对照溶液进行试验。

2.4 色谱条件 CORTECS-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 2.7 μm); 流动相甲醇(A)-0.4% 甲酸溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 10 min, 10% ~ 3% A; 10 ~ 25 min, 3% ~ 35% A; 25 ~ 35 min, 35% ~ 36% A; 35 ~ 55 min, 36% ~ 80% A), 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C。采用波长切换方法, 0 ~ 10 min, 在 290 nm 波长下测定没食子酸; 10 ~ 38 min, 在 330 nm 波长下测定新绿原酸, 绿原酸, 隐绿原酸, 异绿原酸 A, 异绿原酸 B, 紫花前胡苷, 异绿原酸 C; 38 ~ 55 min, 在 250 nm 波长下测定大黄酚和大黄素。见图 1。

2.5 线性关系考察 分别取混合对照品储备液 1 mL, 置 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别进样 1 μL, 由进样量(C)对峰面积(A)求得工作曲线, 得到回归方程。没食子酸 $A = 7\ 757.13C + 10\ 778.5$ ($r = 0.999\ 8$), 线性范围 0.47 ~ 47.02 ng; 新绿原酸 $A = 5\ 380.86C - 6\ 771.04$ ($r = 0.999\ 8$), 线性范围 1.00 ~ 100.14 ng; 绿原酸 $A = 6\ 513.75C - 8\ 196.63$ ($r = 0.999\ 8$), 线性范围 1.40 ~ 140.18 ng; 隐绿原酸 $A = 6\ 586.71C - 8\ 288.43$ ($r = 0.999\ 8$), 线性范围 1.15 ~ 115.11 ng; 异绿原酸 A $A = 6\ 458.82C - 8\ 127.51$ ($r = 0.999\ 8$), 线性范围 0.41 ~ 41.17 ng; 异绿原酸 B $A = 6\ 252.81C - 7\ 868.27$ ($r = 0.999\ 8$), 线性范围 0.32 ~ 32.11 ng; 紫花前胡苷 $A = 5\ 380.86C - 6\ 771.04$ ($r = 0.999\ 8$), 线性范围 0.70 ~ 70.48 ng; 异绿原酸 C $A = 5\ 540.17C - 6\ 971.51$ ($r = 0.999\ 8$), 线性范围 0.67 ~ 67.22 ng; 大黄酚 $A = 12\ 851.44C -$



1. 没食子酸; 2. 新绿原酸; 3. 绿原酸; 4. 隐绿原酸; 5. 异绿原酸 A; 6. 异绿原酸 B; 7. 紫花前胡苷; 8. 异绿原酸 C; 9. 大黄酚; 10. 大黄素; A. 混合对照品; B. 供试品; C. 缺大青叶、金银花、羌活、拳参阴性样品; D. 缺大黄、拳参阴性样品; E. 缺大黄阳性样品; F. 缺拳参阴性样品

图1 复方大青叶合剂的 UPLC

Fig.1 UPLC chromatograms of Fufang Daqingye mixture

9 237. 25 ($r = 0.9998$), 线性范围 0.11 ~ 10.53 ng; 大黄素 A = 18 514. 62C - 7 347. 48 ($r = 0.9998$), 线性范围 0.12 ~ 12.29 ng。

2.6 精密度试验 取混合对照品溶液, 连续进样 6 次测定, 每次 1 μ L, 测定峰面积值, 结果没食子酸, 新绿原酸, 绿原酸, 隐绿原酸, 异绿原酸 A, 异绿原酸 B, 紫花前胡苷, 异绿原酸 C, 大黄酚和大黄素的 RSD

分别为 0.8% , 1.1% , 0.3% , 0.4% , 0.4% , 0.8% , 1.3% , 0.6% , 0.9% , 0.8% 。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液分别于 0, 3, 6, 9, 12, 15 h 测定, 结果没食子酸, 新绿原酸, 绿原酸, 隐绿原酸, 异绿原酸 A, 异绿原酸 B, 紫花前胡苷, 异绿原酸 C, 大黄酚和大黄素的 RSD 分别为 0.3% , 0.6% , 0.7% , 0.8% , 0.6% , 0.7% , 1.4% , 0.5% , 1.1% , 1.1% 。

2.8 重复性试验 取同一批复方大青叶合剂 (批号 161001), 按照供试品溶液的制备方法, 平行制备 6 份供试品溶液, 在上述色谱条件下进行测定并计算, 结果没食子酸平均质量分数为 0.047 $g \cdot L^{-1}$, RSD 1.5%; 新绿原酸平均质量分数为 0.102 $g \cdot L^{-1}$, RSD 0.6%; 绿原酸平均质量分数为 0.141 $g \cdot L^{-1}$, RSD 0.9%; 隐绿原酸平均质量分数为 0.115 $g \cdot L^{-1}$, RSD 0.6%; 异绿原酸 A 平均质量分数为 0.042 $g \cdot L^{-1}$, RSD 0.7%; 异绿原酸 B 平均质量分数为 0.030 $g \cdot L^{-1}$, RSD 1.1%; 紫花前胡苷平均质量分数为 0.074 $g \cdot L^{-1}$, RSD 0.6%; 异绿原酸 C 平均质量分数为 0.067 $g \cdot L^{-1}$, RSD 0.7%; 大黄酚平均质量分数为 0.010 $g \cdot L^{-1}$, RSD 1.5%; 大黄素平均质量分数为 0.012 $g \cdot L^{-1}$, RSD 1.2% 。

2.9 加样回收率试验 取已测得含量的复方大青叶合剂 (批号 161001) 适量, 精密量取 1 mL (含没食子酸 0.047 1 mg, 新绿原酸 0.102 2 mg, 绿原酸 0.141 4 mg, 隐绿原酸 0.115 4 mg, 异绿原酸 A 0.042 1 mg, 异绿原酸 B 0.030 3 mg, 紫花前胡苷 0.074 4 mg, 异绿原酸 C 0.067 1 mg, 大黄酚 0.010 2 mg 和大黄素 0.012 1 mg), 置 10 mL 量瓶中, 再精密加入混和对照品浓溶液 1 mL (没食子酸, 新绿原酸, 绿原酸, 隐绿原酸, 异绿原酸 A, 异绿原酸 B, 紫花前胡苷, 异绿原酸 C, 大黄酚, 大黄素质量浓度分别为 47.0, 100.1, 140.2, 115.1, 41.2, 32.1, 70.5, 67.2, 10.5, 12.3 $mg \cdot L^{-1}$), 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 制得供试品溶液, 平行制备 6 份。测定, 计算回收率及 RSD。结果, 没食子酸, 新绿原酸, 绿原酸, 隐绿原酸, 异绿原酸 A, 异绿原酸 B, 紫花前胡苷, 异绿原酸 C, 大黄酚和大黄素平均回收率 ($n = 6$) 分别为 99.4% , 99.7% , 99.8% , 99.7% , 99.4% , 99.3% , 99.8% , 99.4% , 99.4% 和 99.3% ; RSD 分别为 1.0% , 0.6% , 0.6% , 0.6% , 1.0% , 0.9% , 0.8% , 0.9% , 1.2% 和 1.0% 。表明该方法的回收率良好。见表 1。

2.10 样品的测定 市面上销售的本品种企业较

表 1 10 种成分加样回收率试验

Table 1 Results of recovery tests of 10 components

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%	成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
没食子酸	0.047 1	0.047 0	0.093 3	98.30	99.4	1.0	异绿原酸 B	0.030 3	0.032 1	0.062 1	99.07	99.3	0.9
	0.047 1	0.047 0	0.094 2	100.21				0.030 3	0.032 1	0.061 9	98.44		
	0.047 1	0.047 0	0.094 3	100.43				0.030 3	0.032 1	0.062 6	100.62		
	0.047 1	0.047 0	0.094 0	99.79				0.030 3	0.032 1	0.061 9	98.44		
	0.047 1	0.047 0	0.093 2	98.09				0.030 3	0.032 1	0.062 3	99.69		
	0.047 1	0.047 0	0.093 8	99.36				0.030 3	0.032 1	0.062 2	99.38		
新绿原酸	0.102 2	0.100 1	0.202 1	99.80	99.7	0.6	紫花前胡苷	0.074 4	0.070 5	0.145 1	100.28	99.8	0.8
	0.102 2	0.100 1	0.201 3	99.00				0.074 4	0.070 5	0.144 2	99.01		
	0.102 2	0.100 1	0.202 7	100.40				0.074 4	0.070 5	0.145 4	100.71		
	0.102 2	0.100 1	0.202 4	100.10				0.074 4	0.070 5	0.145 1	100.28		
	0.102 2	0.100 1	0.201 6	99.30				0.074 4	0.070 5	0.144 5	99.43		
	0.102 2	0.100 1	0.201 8	99.50				0.074 4	0.070 5	0.144 1	98.87		
绿原酸	0.141 4	0.140 2	0.281 1	99.64	99.8	0.6	异绿原酸 C	0.067 1	0.067 2	0.134 1	99.70	99.4	0.9
	0.141 4	0.140 2	0.282 0	100.29				0.067 1	0.067 2	0.133 4	98.66		
	0.141 4	0.140 2	0.280 9	99.50				0.067 1	0.067 2	0.133 6	98.96		
	0.141 4	0.140 2	0.280 4	99.14				0.067 1	0.067 2	0.134 2	99.85		
	0.141 4	0.140 2	0.281 4	99.86				0.067 1	0.067 2	0.134 8	100.74		
	0.141 4	0.140 2	0.282 3	100.50				0.067 1	0.067 2	0.133 4	98.66		
隐绿原酸	0.115 4	0.115 1	0.231 1	100.52	99.7	0.6	大黄酚	0.010 2	0.010 5	0.020 7	100.00	99.4	1.2
	0.115 4	0.115 1	0.230 7	100.17				0.010 2	0.010 5	0.020 6	99.05		
	0.115 4	0.115 1	0.229 4	99.04				0.010 2	0.010 5	0.020 5	98.10		
	0.115 4	0.115 1	0.230 1	99.65				0.010 2	0.010 5	0.020 7	100.00		
	0.115 4	0.115 1	0.229 8	99.39				0.010 2	0.010 5	0.020 5	98.10		
	0.115 4	0.115 1	0.229 7	99.30				0.010 2	0.010 5	0.020 8	100.95		
异绿原酸 A	0.042 1	0.041 2	0.083 1	99.51	99.4	1.0	大黄素	0.012 1	0.012 3	0.024 5	100.81	99.3	1.0
	0.042 1	0.041 2	0.082 5	98.06				0.012 1	0.012 3	0.024 2	98.37		
	0.042 1	0.041 2	0.083 6	100.73				0.012 1	0.012 3	0.024 3	99.19		
	0.042 1	0.041 2	0.083 0	99.27				0.012 1	0.012 3	0.024 4	100.00		
	0.042 1	0.041 2	0.082 8	98.79				0.012 1	0.012 3	0.024 2	98.37		
	0.042 1	0.041 2	0.083 2	99.76				0.012 1	0.012 3	0.024 3	99.19		

注:取样量均为 1 mL。

少,仅从生产企业荣昌制药收集到 3 批样品。按上述方法进行测定,结果见表 2。

3 讨论

在提取溶剂的考察中,由于本品为合剂,所以供试品溶液的制备较为简单,曾分别以水,50% 甲醇,甲醇作为提取溶剂进行考察,结果显示 3 种溶剂提取效果相当,因为使用 UPLC 进行试验,为了方便过滤,选择甲醇作为提取溶剂。

在提取方式的考察中,曾分别采用振摇、超声、加热回流 3 种方式进行试验,结果显示加热回流会导致绿原酸类成分损失,而振摇与超声提取基本无差别,故选择振摇作为提取方式。

针对含量测定结果,曾考虑参考 2015 年版《中国药典》相关药材的含量限值对相关结果进行分析,但是实验中发现绿原酸类成分在大青叶、拳参、金银花中均存在,没食子酸在拳参、大黄中均存在,

表 2 复方大青叶合剂中 10 种成分的测定

Table 2 Determination of 10 components in Fufang Daqingye mixture

批号	没食子酸	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 A	异绿原酸 B	紫花前胡苷	异绿原酸 C	大黄酚	大黄素
161001	0.047	0.102	0.141	0.115	0.042	0.030	0.074	0.067	0.010	0.012
161002	0.041	0.113	0.134	0.101	0.051	0.032	0.068	0.069	0.008	0.014
161003	0.052	0.103	0.146	0.105	0.047	0.036	0.072	0.064	0.013	0.011

g·L⁻¹

故无法进行相关分析。观察 3 批样品的测定结果, 10 种成分的含量测定结果均比较稳定, 批间稳定性较好, 说明该产品质量稳定。

曾考虑过采用 HPLC 测定该 10 种成分, 结果反复尝试各种类型以及规格的色谱柱均无法达到完全的色谱分离。使用该方法操作简便, 准确、重复性好, 可同时测定复方大青叶合剂中 10 种成分的含量, 可用于复方大青叶合剂的进一步质量控制。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1208.

[2] 韩梅海, 成爱华. 复方大青叶合剂中的鞣玉红、绿原酸含量测定方法的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(6): 45-46.

[3] 崔丽华, 林晓, 徐丽华. 高效液相色谱法测定复方大青叶合剂中绿原酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(5): 371-372.

[4] 刘晋仙, 林永强, 郭东晓. 基于 HPLC 指纹图谱抗感颗粒质量评价研究[J]. 药学研究, 2016, 35(11): 19-22.

[5] 李森, 王永香, 孟谨, 等. HPLC 法测定金银花中新绿原酸等 8 种成分的量[J]. 中草药, 2014, 45(7): 1006-1010.

[6] 封美慧, 邸欣, 王鑫, 等. RP-HPLC 同时测定金银花、

连翘药对提取物中 6 个成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(16): 75-78.

[7] 王芳, 蒋跃平, 王晓良, 等. 金银花的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(9): 1378-1385.

[8] 邱新建, 赵海鹏, 刘向东, 等. 不同纯化方法对金银花提取物中咖啡酰奎宁酸类成分含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 83-86.

[9] 王春秋, 李雯霞. RP-HPLC 法同时测定金银花中 10 种化学成分[J]. 中成药, 2015, 37(9): 1973-1977.

[10] 李石平, 沙龙, 赵祎武, 等. 近 30 年来中药羌活化学成分研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(15): 2952-2963.

[11] 罗鑫, 王雪晶, 赵祎武, 等. 羌活化学成分研究[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1492-1495.

[12] 黄文平, 肖光清, 宋永贵, 等. 不同产地拳参中没食子酸和绿原酸的含量比较[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(1): 207-209.

[13] 张子龙, 魏刚, 刘东辉, 等. 大黄及其醇提液 HPLC 特征图谱相关性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21): 69-72.

[14] 杨佩磊, 蔡咏梅. HPLC 法同时测定厚朴排气合剂和厚朴酚、厚朴酚、大黄素和大黄酚的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(5): 922-926.

[责任编辑 顾雪竹]