

UPLC 测定银翘散中的多指标性成分

刘利辉¹, 徐剑^{2*}, 张永萍²
(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的:建立 UPLC 同时测定银翘散中绿原酸、甘草苷、橙皮苷、牛蒡子苷、连翘苷含量的方法。方法:采用 UPLC 系统, ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 甲醇-0.15% 甲酸溶液梯度洗脱, 流速 0.25 mL·min⁻¹, 检测波长 279 nm, 柱温 40 °C, 同时测量 5 种活性成分的含量。结果:绿原酸、连翘苷、牛蒡子苷、橙皮苷、甘草苷分别在 0.018 76 ~ 0.043 77, 0.002 37 ~ 0.011 85, 0.011 21 ~ 0.056 06, 0.001 34 ~ 0.006 71, 0.001 71 ~ 0.012 38 μg 线性关系良好($r \geq 0.999 1$), 平均回收率分别为 97.12% (RSD 0.9%), 101.40% (RSD 2.1%), 100.61% (RSD 1.6%), 100.79% (RSD 0.7%), 101.04% (RSD 1.7%)。结论:该方法简便、快速、专属性强, 可用于银翘散的质量控制。

[关键词] 超高压液相色谱; 银翘散; 绿原酸; 连翘苷; 牛蒡子苷; 橙皮苷; 甘草苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)24-0067-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240067

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141106.1450.016.html>

[网络出版时间] 2014-11-06 14:50

Determination of Multiple Index Components in Yinqiao Powder by UPLC

LIU Li-hui¹, XU Jian^{2*}, ZHANG Yong-ping²

(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to establish a method for the content determination of chlorogenic acid, liquiritin, hesperidin, arctiin and phillyrin in Yinqiao Powder. **Method:** UPLC system was performed on ACQUITY UPLC BEH Shield RP₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) at 40 °C. The mobile phase was consisted of methanol-0.15% formic acid solution in gradient elution mode. The flow rate was set at 0.25 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was set at 279 nm. **Result:** Chlorogenic acid, phillyrin, arctiin, hesperidin and liquiritin had good linear relationship in the ranges of 0.018 76-0.043 77, 0.002 370-0.011 85, 0.011 21-0.056 06, 0.001 34-0.006 71 and 0.001 71-0.012 38 μg, respectively. The correlation coefficients were all more than 0.999 1. The average recoveries were 97.12% (RSD 0.9%), 101.40% (RSD 2.1%), 100.61% (RSD 1.6%), 100.79% (RSD 0.7%) and 101.04% (RSD 1.7%), respectively. **Conclusion:** The method is simple, rapid, specific, and can be used for quality control of Yinqiao powder.

[Key words] UPLC; Yinqiao powder; chlorogenic acid; phillyrin; arctiin; hesperidin; liquiritin

银翘散系温病初起及外感表热证的常用方,由金银花、连翘、薄荷、荆芥穗、桔梗、淡竹叶、牛蒡子、淡豆豉、甘草、芦根 10 味中药组成,具有辛凉解表、清热解毒的功效。方中金银花甘寒、清热解毒、辟秽祛浊,连翘苦寒、清热解毒、轻宣透表,共为君药,牛

蒡子疏散风热、清利头目、解毒利咽,荆芥穗能助君药发散表邪、透热外出,共为臣药,甘草能调和诸药,是佐使之用。在质量控制方面的研究,主要集中在以 HPLC 测定其中的绿原酸、牛蒡子苷、连翘苷等单个成分的含量^[1-4]。由于银翘散药味较多,单一成

[收稿日期] 20140627(008)

[第一作者] 刘利辉,从事中药制剂研究, Tel:15285028547, E-mail:1055380384@qq.com

[通讯作者] * 徐剑, 硕士, 副教授, 从事中药制剂研究, Tel:0851-5652056, E-mail:tw8489@126.com

分难以表达制剂的物质组特征,因此选择其主要活性成分绿原酸、橙皮苷、连翘苷、牛蒡子苷、甘草苷为指标,建立了 UPLC 同时测定 5 种成分含量的方法,为更好的评价和控制银翘散的质量提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 ACQUITY 型 UPLC(包括 Empower 3 色谱数据工作站,美国 Waters 公司),AE240 型电子分析天平(Mettler 公司),TGL-16C 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂制造)。

1.2 试药 银翘散购于贵阳同仁堂(批号 20120743, 20120922, 20121126, 20130306, 20130801,20131112,购自贵阳德昌祥药业有限公司)。绿原酸(批号 110753-201314)、甘草苷(批号 111610-201106)、橙皮苷(批号 0721-200010)对照品均购于中国食品药品检定研究院,连翘苷(批号 487-41-2,纯度 > 98%)、牛蒡子苷(批号 20362-31-6,纯度 > 98%)对照品均购于成都植标化纯生物技术有限公司,5 种对照品均供含量测定用,规格为 20 mg/瓶。甲醇、甲酸为色谱纯,屈臣氏蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

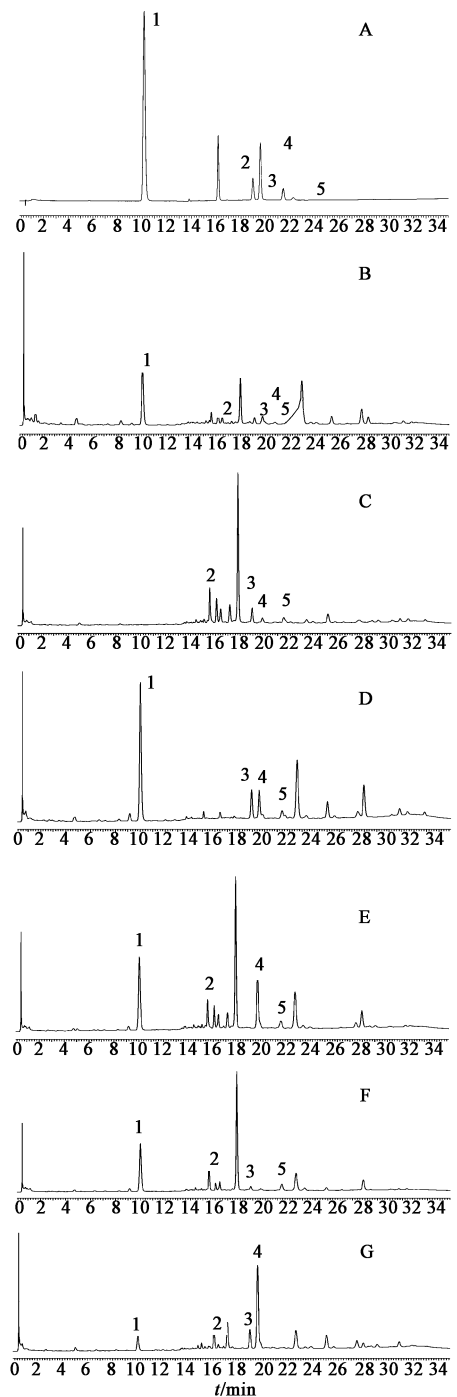
2.1 色谱条件 BEH Shield RP18 色谱柱(2.1 mm × 50 mm,1.7 μm),流动相 0.15% 甲酸水溶液(A)-甲醇(B)梯度洗脱(0 ~ 12 min,2% ~ 13% B;12 ~ 13 min,13% ~ 24% B;13 ~ 18 min,24% ~ 27% B;18 ~ 32 min,27% ~ 38% B),流速 0.25 mL · min⁻¹,柱温 40 °C,检测波长 279 nm,进样量 2 μL。

2.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取绿原酸、甘草苷、橙皮苷、牛蒡子苷、连翘苷对照品适量,置 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得每 1 mL 含绿原酸 0.390 8 mg,连翘苷 0.029 6 mg,牛蒡子苷 0.215 6 mg,橙皮苷 0.033 6 mg,甘草苷 0.047 6 mg 的单个对照品储备液。再分别精密移取上述各对照品储备液 1.2,0.9,1.0,1.3,2.0 mL 置同一 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至记得度,摇匀,得到混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取银翘散粉末约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 75% 甲醇 50 mL,称定质量,回流提取 1 h,放冷,再称定质量,用 75% 甲醇补足缺失的质量,摇匀,过滤,取续滤液,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.4 系统适用性试验 分别取混合对照品溶液、银翘散供试品溶液及各阴性样品溶液各 2 μL,注入色谱仪,按 2.1 项下色谱条件进行检测,记录色谱图

(图 1)。结果表明,在此色谱条件下,绿原酸、甘草苷、橙皮苷、牛蒡子苷、连翘苷的理论塔板数分别为 17 249,128 179,92 977,103 788,90 294;各所测成分分离度均大于 2.4;阴性无干扰。



A. 混合对照品;B. 银翘散;C. 绿原酸阴性;
D. 甘草苷阴性;E. 橙皮苷阴性;F. 牛蒡子阴性;
G. 连翘苷阴性;1. 绿原酸;2. 甘草苷;
3. 橙皮苷;4. 牛蒡子苷;5. 连翘苷

图 1 银翘散的 UPLC

2.5 线性关系的考察 分别精密吸取绿原酸储备

液、连翘苷储备液、牛蒡子苷储备液、橙皮苷储备液、甘草苷储备液不同量配成6个不同浓度的混合对照品溶液,混合对照品溶液中绿原酸的浓度分别为9.38,18.75,22.51,28.14,37.52,43.77 mg·L⁻¹;连翘苷的浓度分别为1.18,2.37,2.84,3.56,4.74,5.92 mg·L⁻¹;牛蒡子苷的浓度分别为5.60,11.21,13.45,16.82,22.42,28.03 mg·L⁻¹;橙皮苷的浓度分别为0.67,1.34,1.61,2.01,2.68,3.36 mg·L⁻¹;甘草苷的浓度分别为0.86,1.71,2.06,2.57,3.43,6.18 mg·L⁻¹。注入UPLC测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,得回归方程(见表1)。结果表明,绿原酸、连翘苷、牛蒡子苷、橙皮苷、甘草苷分别在范围内线性关系良好。

表1 5种指标性成分的回归方程

名称	回归方程	r	线性范围/μg
绿原酸	$Y = 6 \times 10^6 X + 4 476.70$	0.999 5	0.018 76 ~ 0.043 77
连翘苷	$Y = 2 \times 10^6 X - 399.11$	0.999 7	0.002 37 ~ 0.011 85
牛蒡子苷	$Y = 2 \times 10^6 X - 611.33$	0.999 6	0.011 21 ~ 0.056 06
橙皮苷	$Y = 7 \times 10^6 X - 728.00$	0.999 4	0.001 34 ~ 0.006 71
甘草苷	$Y = 8 \times 10^6 X - 740.90$	0.999 1	0.001 71 ~ 0.012 38

2.6 精密度试验 取同一份供试品溶液(批号

20130306),连续进样6次,测定峰面积,结果绿原酸、连翘苷、牛蒡子苷、橙皮苷、甘草苷峰面积的RSD分别为0.6%,0.9%,0.7%,0.4%,1.0%,表明精密度良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号20130306),于0,2,4,8,12,24 h进样,测定峰面积。结果绿原酸、连翘苷、牛蒡子苷、橙皮苷、甘草苷峰面积的RSD分别为0.7%,0.9%,0.7%,0.6%,1.2%,表明样品溶液在24 h内稳定。

2.8 重复性试验 分别取银翘散(批号20130306)6份,按2.3项下方法制备供试品溶液。结果绿原酸、连翘苷、牛蒡子苷、橙皮苷、甘草苷的平均质量分数分别为4.846 4,0.721 0,3.427 1,0.287 3,0.452 9 mg·g⁻¹,RSD分别为0.7%,0.6%,0.6%,1.3%,1.2%,表明该方法的重复性良好。

2.9 加样回收率试验 精密称取已知含量的银翘散(批号20130306)0.1 g,共6份,加入一定量对照品溶液,按2.3项下方法制备供试品溶液,计算结果(见表2)。结果表明,银翘散中各指标性成分加样回收的回收率在97.12%~101.40%,RSD均小于3.0%,说明此方法能够准确测定银翘散中5种指标性成分的含量。

表2 银翘散中5种成分的加样回收率试验

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
绿原酸	0.100 2	0.487 9	0.520 8	0.995 0	97.37	97.12	0.9
	0.100 1	0.479 9	0.520 8	0.984 4	96.88		
	0.100 3	0.487 8	0.520 8	0.995 2	97.42		
	0.100 1	0.483 3	0.520 8	0.984 7	96.27		
	0.100 2	0.489 6	0.520 8	1.002 3	98.45		
	0.100 1	0.483 8	0.520 8	0.984 7	96.18		
连翘苷	0.100 2	0.072 3	0.077 3	0.152 3	103.44	101.40	2.1
	0.100 1	0.072 1	0.077 3	0.151 2	102.32		
	0.100 3	0.073 1	0.077 3	0.152 9	103.22		
	0.100 1	0.071 7	0.077 3	0.147 6	98.16		
	0.100 2	0.072 1	0.077 3	0.150 9	101.88		
	0.100 1	0.072 0	0.077 3	0.148 8	99.40		
牛蒡子苷	0.100 2	0.345 6	0.323 0	0.674 6	101.86	100.61	1.6
	0.100 1	0.342 2	0.323 0	0.662 8	99.25		
	0.100 3	0.344 9	0.323 0	0.671 6	101.15		
	0.100 1	0.340 0	0.323 0	0.656 8	98.09		
	0.100 2	0.345 9	0.323 0	0.672 1	101.39		
	0.100 1	0.342 4	0.323 0	0.671 6	101.93		
橙皮苷	0.100 2	0.029 5	0.031 8	0.061 4	100.19	100.79	0.7
	0.100 1	0.028 6	0.031 8	0.060 8	101.10		
	0.100 3	0.028 8	0.031 8	0.061 2	101.73		

续表 2

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
甘草苷	0.100 1	0.028 3	0.031 8	0.060 1	99.84	101.04	1.7
	0.100 2	0.028 7	0.031 8	0.060 7	100.63		
	0.100 1	0.028 8	0.031 8	0.061 0	101.23		
	0.100 2	0.045 8	0.042 0	0.089 0	102.62		
	0.100 1	0.044 8	0.042 0	0.086 9	100.09		
	0.100 3	0.045 8	0.042 0	0.088 1	100.79		
	0.100 1	0.044 7	0.042 0	0.086 4	99.33		
	0.100 2	0.046 0	0.042 0	0.089 5	103.66		
	0.100 1	0.045 2	0.042 0	0.087 2	99.77		

2.10 样品的含量测定 取 6 个不同批次的银翘散制剂各 3 份,每份 0.2 g,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,在 2.1 项色谱条件进行测定,测得该批样品中绿原酸、甘草苷、橙皮苷、牛蒡子苷、连翘苷的平均含量,结果见表 3。结果表明,各批次银翘散制剂的指标性成分在含量上有一定差异,可能是由于每个批次的制剂不是来自同一批次的药材造成。

表 3 银翘散中 5 种成分含量测定 (n=3) mg·g⁻¹

批号	绿原酸	甘草苷	橙皮苷	牛蒡子苷	连翘苷
20120743	5.371 3	0.399 3	0.253 1	5.083 7	1.321 5
20120922	4.069 3	0.400 3	0.294 8	6.386 6	0.623 7
20121126	4.977 7	0.457 0	0.206 6	7.558 5	0.728 7
20130306	5.074 6	0.476 8	0.286 4	4.448 9	0.732 5
20130801	4.563 0	0.573 0	0.334 3	5.070 9	0.636 7
20131112	5.092 2	0.628 9	0.171 1	7.039 5	0.599 5

3 讨论

3.1 色谱条件的确定 由于银翘散的药味较多,化学成分复杂,且各成分间的极性差别较大,因此本实验采用梯度洗脱的方法,同时检测银翘散中的 5 种指标性成分。实验中分别比较了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.03% 甲酸水、甲醇-0.03% 甲酸水、甲醇-0.1% 甲酸水、甲醇-0.15% 甲酸水、甲醇-0.2% 甲酸水等不同的流动相系统,选择了分离度好、峰形佳、分析时间短的甲醇-0.15% 甲酸水最佳流动相组成。同时考察了不同流速、不同柱温以及不同检测波长对图谱的影响,最终确定了本文所述的色谱条件。在此条件下,5 种指标性成分吸收值较大、峰形较好、分离效果好。

3.2 供试品制备方法的选择 比较了回流提取和超声提取对银翘散中 5 种指标性成分的提取效果,结果表明,回流提取优于超声提取。通过单因素比

较,依次考察了不同提取溶剂(甲醇,75% 甲醇,50% 甲醇,乙醇,75% 乙醇,50% 乙醇)、不同溶剂的用量、不同提取时间(1,2,3,4 h)对图谱峰型和 5 种指标性成分含量的影响。最终选择了 75% 甲醇 50 mL,回流提取 1 h 作为供试品溶液的制备方法。

3.3 不同批次银翘散含量的比较 在银翘散的质量控制方面,目前还没有统一标准^[5-7]。本实验测定了 6 个不同批次银翘散中 5 个指标性成分的含量,各批次的银翘散制剂在指标性成分的含量上有一定差异,可能与每个批次的制剂不是来自同一批次的原料药以及生产工艺有关。因此控制银翘散制剂的质量,应该从原料药的质量及生产工艺等方面着手。本实验所建立的银翘散 5 种指标性成分含量测定方法,可以为银翘散质量的客观评价提供科学依据。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:1086.
- [2] 马兴玲. 银翘解毒丸中绿原酸含量测定的研究[J]. 北方药学,2012,9(7):7.
- [3] 刘雅茹,王雪峰,孟宪生,等. HPLC 测定银翘散中牛蒡子苷的含量[J]. 中国中药杂志,2006,31(13):1113.
- [4] 王力宁,王志萍,贺颖,等. HPLC 法测定银翘汤剂中连翘苷、牛蒡子苷、绿原酸[J]. 中成药,2013,35(4):725.
- [5] 罗云,张婧,赵海平,等. 高效液相色谱法同时测定银翘散中绿原酸、连翘苷、牛蒡子苷、甘草苷、甘草酸的含量[J]. 中国药理学杂志,2013,48(6):473.
- [6] 王文丽,王雪峰,郝欧美,等. 银翘散提取工艺及指纹图谱初步研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2009,11(7):174.
- [7] 罗曼,周兰,申璐,等. 银翘解毒丸特征图谱初步研究[J]. 中成药,2012,34(11):2162.

[责任编辑 顾雪竹]