

HPLC-PDA 法同时测定清热利胆合剂中 3 种成分

徐傅能¹, 吴亮¹, 余继英², 陈瑾², 何林^{2*}

(1. 西南交通大学生命科学与工程学院, 四川 成都 610031; 2. 四川省医学科学院, 四川省人民医院药理学部, 四川 成都 610072)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-二极管阵列检测器 (HPLC-PDA) 法同时测定清热利胆合剂 (忍冬藤、茵陈、金钱草等) 中绿原酸、马钱苷、大黄素的含量。**方法** 分析采用 Diamonsil[®]C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相甲醇 (A) -0.1% 磷酸溶液 (B), 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 绿原酸、马钱苷、大黄素检测波长分别为 327、236、287 nm。**结果** 绿原酸、马钱苷、大黄素分别在 43.33 ~ 866.60、84.00 ~ 1 680.00、0.725 ~ 14.50 ng 范围呈良好的线性关系 (r 均为 0.999 9), 平均回收率 ($n=9$) 分别为 97.19%、98.75%、100.18%, RSD 均小于 2%。**结论** 该方法灵敏准确, 可用于清热利胆合剂的质量控制。

关键词: 清热利胆合剂; 绿原酸; 马钱苷; 大黄素; HPLC-PDA

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)07-1509-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.07.015

Simultaneous determination of three constituents in Qingre Lidan Compound Mixture by HPLC-PDA

XU Fu-neng¹, WU Liang¹, YU Ji-ying², CHEN Jin², HE Lin^{2*}

(1. School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China; 2. Sichuan Provincial Academy of Medical Sciences; Pharmaceutical Department, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China)

ABSTRACT: AIM To establish a high performance liquid chromatography coupled with photo-diode array (HPLC-PDA) method for simultaneously determining the contents of chlorogenic acid, loganin and emodin in Qingre Lidan Compound Mixture (*Lonicerae Japonicae Caulis*, *Artemisiae Scopariae Herba*, *Lysimachiae Herba*, etc.). **METHODS** The analysis was performed on a Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), mobile phase was methanol (A) -0.1% phosphoric acid solution (B) in a gradient elution manner, flow rate was 1.0 mL/min, column temperature was maintained at 30 °C, and detection wavelengths were set at 327 nm for chlorogenic acid, 236 nm for loganin, and 287 nm for emodin. **RESULTS** Chlorogenic acid, loganin and emodin showed good linear relationships within the ranges of 43.33 - 866.60 ng, 84.00 - 1 680.00 ng and 0.725 - 14.50 ng ($r = 0.999 9$), whose average recoveries ($n=9$) were 97.19%, 98.75% and 100.18% with the RSDs of less than 2.0%, respectively. **CONCLUSION** This sensitive and accurate method can be used for the quality control of Qingre Lidan Compound Mixture.

KEY WORDS: Qingre Lidan Compound Mixture; chlorogenic acid; loganin; emodin; HPLC-PDA

清热利胆合剂是张仲景《伤寒论》茵陈蒿汤加味, 经精制而得的医院制剂, 由忍冬藤、茵陈、金钱草、大黄等组成, 全方组合, 共奏清热

解毒、利胆通络、泄浊通腑、退黄功效, 具有清热利胆作用^[1], 主要用于治疗胆囊炎, 临床应用多年, 疗效较好。本实验选择具有广泛抗菌作

收稿日期: 2015-09-06

基金项目: 四川省中医药管理局科研项目 (2012-G-033)

作者简介: 徐傅能, 男, 硕士生, 从事药物制剂研究。E-mail: quentinn@yeah.net

* 通信作者: 何林, 男, 博士, 研究员, 硕士生导师, 从事药物新剂型及药代动力学研究。Tel: (028) 87393932, E-mail: helin514@

用、能促进胆汁分泌、保肝利胆、清除自由基、降血压等活性^[2]的绿原酸,有良好的抗炎抗菌、增强免疫功能、镇咳祛痰等作用^[3]的马钱苷,以及具有抗微生物生长等作用^[4]的大黄素作为指标成分进行定量测定,以更好地表征该制剂质量,并首次实现以高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-PDA)法同时测定三者含有量,而且该方法灵敏、准确。

1 仪器与试剂

Waters Alliance 高效液相色谱系统,包括自动进样器、e2695 四元梯度泵、2998 二极管阵列紫外检测器、在线脱气机、Empower3 色谱工作站(美国 Waters 公司);BP 211D 电子天平(德国 Sartorius 公司);KQ-500DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);UPR-11-5T 优普系列超纯水器(成都超纯科技有限公司)。

绿原酸、马钱苷、大黄素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110753-200413、111640-201005、110756-200110)。清热利胆合剂由四川省医学科学院-四川省人民医院药剂部生产(批号 141211、150111、150311)。甲醇为色谱纯(美国 Dikma Technologies 公司,批号 3559161);磷酸为分析纯(成都市科龙化工试剂厂,批号 2014121101);水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil[®]C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相甲醇(A)-0.1% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~20 min, 23% A; 20~22 min, 23%~80% A; 22~30 min, 80% A; 30~31 min, 80%~23% A; 31~40 min, 23% A);体积流量 1.0 mL/min;柱温 30 °C;进样量 5 μL;分析时间 40 min;检测波长 327 nm(绿原酸)、236 nm(马钱苷)、287 nm(大黄素);外标法定量。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取绿原酸、马钱苷、大黄素对照品适量,置于 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得 1 733.20、3 360.00、29.00 μg/mL 对照品贮备液。再分别精密量取 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,制成混合对照品溶液,其中含绿原酸 173.32 μg/mL、马钱苷 336.00 μg/mL、大黄素 2.90 μg/mL。

2.2.2 供试品溶液 精密量取清热利胆合剂

1 mL,置于 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇 8 mL,超声振荡 30 min,室温放置 30 min,50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,续滤液用 0.2 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 阴性供试品溶液制备 按处方及制备工艺,分别制备缺茵陈和忍冬藤(绿原酸阴性)、缺忍冬藤(马钱苷阴性)及缺大黄(大黄素阴性)样品,按“2.2.2”项下方法制得绿原酸、马钱苷、大黄素阴性供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适应性试验 在“2.1”项色谱条件下,分别进样混合对照品、供试品及阴性样品溶液。结果,绿原酸、马钱苷、大黄素的保留时间与对照品一致,各色谱峰与相邻峰的分度均大于 1.5,阴性样品在相应保留时间处无干扰。见图 1。

2.3.2 线性关系考察 分别精密量取混合对照品溶液适量,50% 甲醇稀释成绿原酸、马钱苷、大黄素质量浓度分别为 8.67~173.32、16.80~336.00、0.145~2.90 μg/mL 的系列溶液,在“2.1”项色谱条件下分别进样 5 μL。以进样量(ng)为横坐标(X),峰面积值为纵坐标(Y)进行回归。结果见表 1。

表 1 3 种成分的线性关系 (n=7)

Tab. 1 Linear relationships of three constituents (n=7)

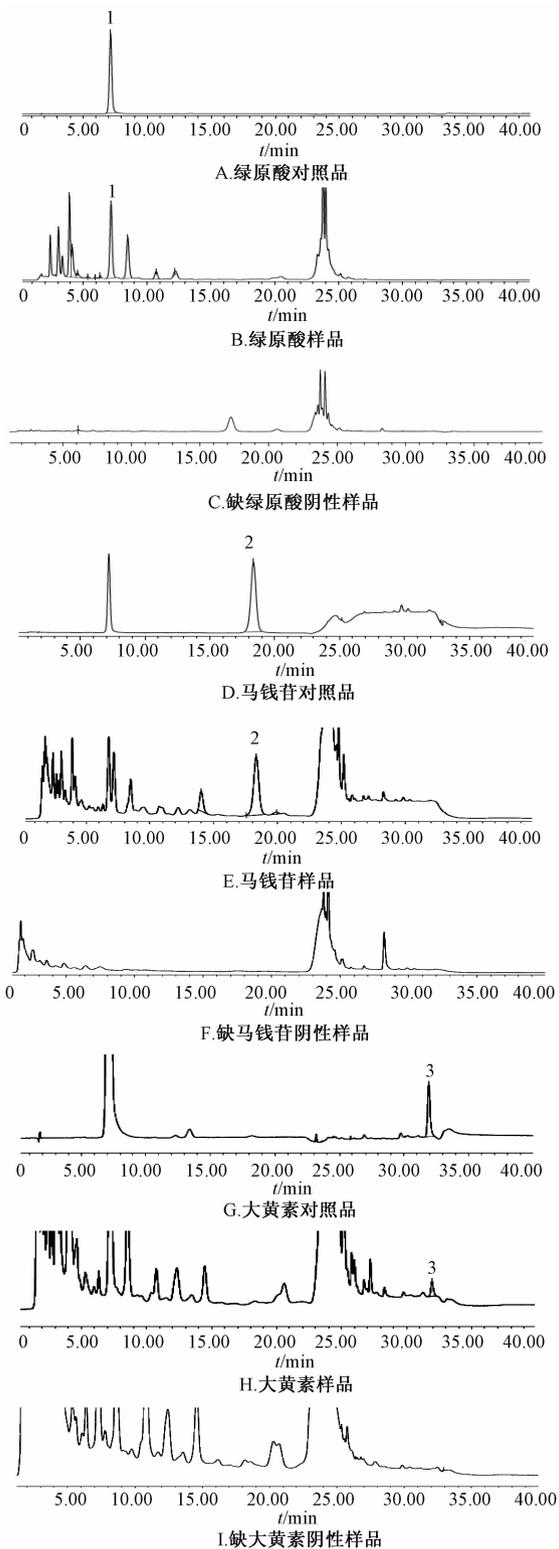
成分	线性范围/ng	回归方程	r
绿原酸	43.33~866.60	$Y=3.00 \times 10^3 X - 1.58 \times 10^4$	0.999 9
马钱苷	84.00~1 680.00	$Y=1.58 \times 10^3 X - 2.38 \times 10^4$	0.999 9
大黄素	0.725~14.50	$Y=4.18 \times 10^3 X - 1.47 \times 10^3$	0.999 9

2.3.3 精密度试验 取同一混合对照品溶液,连续进样 6 次,测得绿原酸、马钱苷、大黄素的峰面积 RSD 分别为 1.00%、0.84%、3.86%,表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下于 0、3、5、8、10、12 h 进样 5 μL,测得绿原酸、马钱苷、大黄素的峰面积 RSD 分别为 1.37%、1.42%、2.29%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.5 重复性试验 取同一批号(150111)样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份,进样测定,测得绿原酸、马钱苷、大黄素的平均含有量分别为 458.00、1 014.00、4.78 μg/mL, RSD 分别为 1.24%、1.84%、2.62%,表明该方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 精密量取含有量已知的



1. 绿原酸 2. 马钱苷 3. 大黄素
1. chlorogenic acid 2. loganin 3. emodin

图1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

923.00、7.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 混合对照品溶液 0.3、0.5、0.8 mL, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 使三者含有量均约为已知样品的 80%、100%、120%, 每个水平 3 份, 吸取 5 μL 进样测定, 计算回收率。结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果 ($n=9$)

Tab. 2 Results of recovery tests ($n=9$)

成分	加入量/ ng	原有量/ ng	测得量/ ng	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
绿原酸	68.70	114.53	183.58	100.50	97.19	1.9
	68.70	114.53	182.49	98.92		
	68.70	114.53	182.77	99.33		
	114.50	114.53	223.46	95.14		
	114.50	114.53	224.61	96.14		
	114.50	114.53	224.78	96.29		
	160.30	114.53	268.25	95.90		
	160.30	114.53	268.57	96.10		
	160.30	114.53	269.01	96.37		
马钱苷	138.45	253.48	393.74	101.30	98.75	1.29
	138.45	253.48	390.66	99.08		
	138.45	253.48	389.92	98.55		
	230.75	253.48	477.51	97.09		
	230.75	253.48	477.39	97.04		
	230.75	253.48	480.57	98.41		
	323.05	253.48	574.36	99.33		
	323.05	253.48	573.37	99.02		
	323.05	253.48	573.19	98.97		
大黄素	1.06	1.19	2.25	100.00	100.18	1.94
	1.06	1.19	2.25	100.00		
	1.06	1.19	2.22	97.17		
	1.77	1.19	2.98	101.13		
	1.77	1.19	2.98	101.13		
	1.77	1.19	2.92	97.74		
	2.48	1.19	3.66	99.60		
	2.48	1.19	3.76	103.62		
	2.48	1.19	3.70	101.21		

2.4 样品含有量测定 取 3 个批号样品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 每批平行 3 份, 计算含有量, 结果见表 3。

表 3 含有量测定结果 ($n=3$)

Tab. 3 Results of content determination ($n=3$)

批号	绿原酸/ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	马钱苷/ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	大黄素/ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
141211	0.550	1.057	0.005 93
150111	0.461	1.003	0.004 64
150311	0.361	0.857	0.006 26

考虑到中药材受季节和产地的影响较大, 故制定清热利胆合剂含有量限度时规定, 每 1 mL 制剂中绿原酸含有量不得低于 0.323 mg, 马钱苷不得低于 0.765 mg, 大黄素不得低于 0.005 62 mg。

样品 9 份, 每份 0.5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 分别加入绿原酸、马钱苷、大黄素 (458.00、

3 讨论

3.1 流动相及梯度条件选择 流动相中加入磷酸后,绿原酸和大黄素的峰形变好,没有拖尾;加入量分别为0.1%与0.2%时,峰形没有明显变化。由于中药制剂中组分众多,而且极性相差较大,故流动相比例在梯度中的变化较大。兼顾提高分离度和缩短分析时间,本实验选择“2.1”项下流动相及梯度条件。

3.2 测定波长的选择 将各对照品溶液进行紫外扫描,发现绿原酸、马钱苷及大黄素最大吸收波长分别为327、236和287 nm。同样条件下,阴性样品溶液无杂质峰干扰。综合考虑灵敏度和专属性,确定最佳检测波长分别为327 nm(绿原酸)、236 nm(马钱苷)、287 nm(大黄素)。

3.3 结果分析 根据文献[5-10],首先选取6,7-二甲氧基香豆素、绿原酸、马钱苷、槲皮素、山柰素、大黄素作为处方的有效成分。但由于采收季节不同,6,7-二甲氧基香豆素在茵陈中含有量不同^[11],本实验检测不到6,7-二甲氧基香豆素;可能受制于提取工艺,金钱草中有效成分槲皮素和山柰素含有量很低,无法进行定量研究。因此,最终选择绿原酸、马钱苷、大黄素作为有效成分。

含有量测定时发现,发现不同批号合剂之间存在差异,这可能与药材来源、采收时间以及制备工艺有关。由于样本量略小,故对制定的含有量限度标准应继续考察,等到有更多的样本纳入时可进行适当修正。

目前,清热利胆合剂的质量标准仅有薄层鉴别,故建立HPLC法进行多组分定量测定可以更好控制该制剂的质量。由于合剂中3种组分的最大吸

收波长不一致,给同时测带来一定困难,故本实验利用二极管阵列紫外检测器的特点,在同一色谱条件下可同时提取不同波长图谱,实现不同组分同时定量测定,既可为清热利胆合剂提供质量控制方法,还能为类似多组分含有量同时测定提供借鉴。

参考文献:

- [1] 张保国,刘庆芳.茵陈蒿汤近年临床应用[J].中成药,2011,33(3):502-505.
- [2] 孙远南,冯健.茵陈蒿的化学成分与药理作用研究进展[J].中国现代医生,2011,49(21):12-14.
- [3] 鲁思爱.忍冬藤的化学成分及其药理应用研究进展[J].临沂大学学报,2012,34(3):132-134.
- [4] 戴洁.大黄药理研究与临床应用[J].天津药学,2011,23(4):67-70.
- [5] 王志伟,高钧,谭晓杰.双波长RP-HPLC法同时测定茵陈蒿中绿原酸、咖啡酸和对羟基苯乙酮的含量[J].药物分析杂志,2009,29(6):919-922.
- [6] 李莉,孙艳涛,王冰.RP-HPLC同时测定茵陈中3种有效成分含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(5):136-138.
- [7] 李克,吴龙琴,汤误.RP-HPLC法同时测定忍冬藤中绿原酸和咖啡酸含量[J].现代中药研究与实践,2013,27(1):17-19.
- [8] 陈军,马双成.HPLC法测定忍冬藤中当药苷和马钱苷的含量[J].药物分析杂志,2005,25(12):1451-1452.
- [9] 阎婷,金宪涵,王盈.HPLC法测定金钱草中槲皮素和山柰素含量[J].中华中医药学刊,2009,27(3):653-654.
- [10] 王瑞芬,郭海丽.HPLC同时测定喘舒片中5种蒽醌类成分的含量[J].中成药,2011,33(3):446-449.
- [11] 韩晋,金城,刘太华.不同采收期和不同部位茵陈药材滨蒿内酯的含量测定与资源利用建议[J].解放军药学报,2005,21(2):155-156.