

高效液相色谱波长切换法同时测定银花感冒颗粒中绿原酸、甘草苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量

张鑫,任莹,王云霞,牛宇东

(西安市食品药品检验所中药室,陕西 西安 710054)

摘要:目的 建立同时测定银花感冒颗粒中绿原酸、甘草苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量的方法。方法 色谱柱, Welch-C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 流动相: 乙腈(A)-0.4% 磷酸(B), 梯度洗脱 0~5 min(5%~13% A); 5~18 min(13%~14% A); 18~22 min(14%~20% A); 22~38 min(20%~32% A); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 327 nm, 230 nm。**结果** 银花感冒颗粒中绿原酸在 54.05~540.50 ng($r=0.9999$), 甘草苷在 35.58~355.80 ng($r=0.9993$), 5-O-甲基维斯阿米醇苷在 30.59~305.90 ng($r=0.9999$) 范围内线性良好, 平均回收率分别为 99.58% (RSD 为 0.92%), 99.28% (RSD 为 2.31%), 98.91% (RSD 为 2.16%)。**结论** 高效液相色谱波长切换法同时测定银花感冒颗粒中绿原酸、甘草苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量具有操作简单, 专属性强, 准确度高的优点, 可以更全面的控制银花感冒颗粒的质量。

关键词: 色谱法, 高压液相; 金银花; 绿原酸; 甘草酸; 分光光度法; 5-O-甲基维斯阿米醇苷

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.07.009

Simultaneous determination the contents of chlorogenic acid, Lquoritin and 5-O-methylvisammiosode in Yinhua Ganmao granules by HPLC with wavelength switching method

ZHANG Xin, REN Ying, WANG Yunxia, NIU Yudong

(Department of Traditional Chinese Medicine, Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi 710054, China)

Abstract: Objective A method was developed for simultaneous determination the contents of chlorogenic acid, Lquoritin and 5-O-methylvisammiosode in Yinhua Ganmao Granules by HPLC with wavelength switching method. **Methods** The chromatography separation was performed on the column of Agilent Welch-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m), with acetonitrile(A)-0.4% phosphoric acid (B) as the mobile phase in the gradient elution mode (0-5 min (5%-13% A); 5-18 min (13%-14% A); 18-22 min (14%-20% A); 22-38 min (20%-32% A); at flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 327 nm and 230 nm respectively, temperature of column was set at 30 $^{\circ}$ C. **Results** The sample concentration of chlorogenic acid, Lquoritin and 5-O-methylvisammiosode had a good linearity with the value of peak areas at 54.05-540.50 ng ($r=0.9999$), 35.58-355.80 ng ($r=0.9993$), 30.59-305.90 ng ($r=0.9999$), respectively. The average recoveries were 99.58% (RSD=0.92%), 99.28% (RSD=2.31%) and 98.91% (RSD=2.16%), respectively. **Conclusions** The method of simultaneous determination the contents of chlorogenic acid, Lquoritin and 5-O-methylvisammiosode in Yinhua Ganmao Granules by HPLC with wavelength switching method which has a good advantage of simple operation, high accuracy stability and can be used for the quality control of Yinhua Ganmao Granules effectively.

Key words: Chromatography, high pressure liquid; Flos Ionicerae; Chlorogenic acid; Glycyrrhizic acid; Spectrophotometry; 5-O-methylvisammiosode

银花感冒颗粒是由金银花、连翘、防风、桔梗和甘草等五味药材加辅料制成的颗粒剂。具有清热解表, 利咽润喉的功效, 目前临床主要用于感冒发热、头痛、咽喉肿痛等症状^[1]。方中的金银花具有疏风散热、清热解毒、抗病毒作用, 主要用于治外感风热引起的风热感冒, 咽喉肿痛^[2-3] 等症状, 为君药; 防

风具有祛风解表, 止痛, 用于治疗感冒头痛, 风湿痹痛等症状^[4-5] 为臣药; 甘草具有补益脾气, 调和诸药, 缓急止痛等^[6] 作用为方中佐药。目前银花感冒颗粒制剂收载于国家药品监督管理局标准中, 未有对方中主药进行含量测定的项目, 只有简单的检查项目, 不能更好的控制其质量和疗效, 因此对银花感冒颗粒中主要成分含量的测定是有必要的, 有文献报道^[7-9] 对银花感冒颗粒中绿原酸和防风中升麻苷与 5-O-甲基维斯阿米醇苷含量的测定以及对药中

主要药味的薄层鉴别,未有同时测定其处方中多组分含量的报道,由于该处方中药味较多,单独测定一种药物的成分含量不能准确的控制药品的质量,因此本实验参考相关文献和中国药典^[10-12],建立高效液相色谱法同时测定银花感冒颗粒中金银花、防风、甘草中的绿原酸、甘草苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量来全面控制其质量,比目前报道的文献更能有效的反映其质量。

1 仪器与试剂

Agilent1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);G1311B 四元泵,G1314F 紫外检测器,UV-vis 分光光度计,型号 UV-2700(日本 Shinadzu 仪器公司);BT-124S 型百万分之一分析电子天平(德国 Sartorius 公司);双频数控超声波清洗器,型号 KQ-300DE(苏州昆山超声仪器有限公司);银花感冒颗粒(湖北御金丹药业有限公司生产,规格:每袋重 10 g,批号 161001,161203,160906)。对照品:绿原酸(批号 110753-201415,质量分数 96.2%),甘草苷(批号 111610-201106,质量分数 93.7%),5-O-甲基维斯阿米醇苷(批号 111523-201509,质量分数 95.8%),供含量测定使用,且都购于中国食品药品检定研究院,乙腈为色谱纯(美国 Fisher 试剂公司),水为纯净水(杭州娃哈哈公司),磷酸等其它试剂均为分析纯。本研究起止时间为 2016 年 12 月至 2017 年 2 月。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Welch-C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm,SN 211304320),流动相:乙腈(A)-0.4% 磷酸(B),梯度洗脱 0~5 min(5%~13% A);5~18 min(13%~14% A);18~22 min(14%~20% A);22~38 min(20%~32% A);流速 1.0 mL·min⁻¹;柱

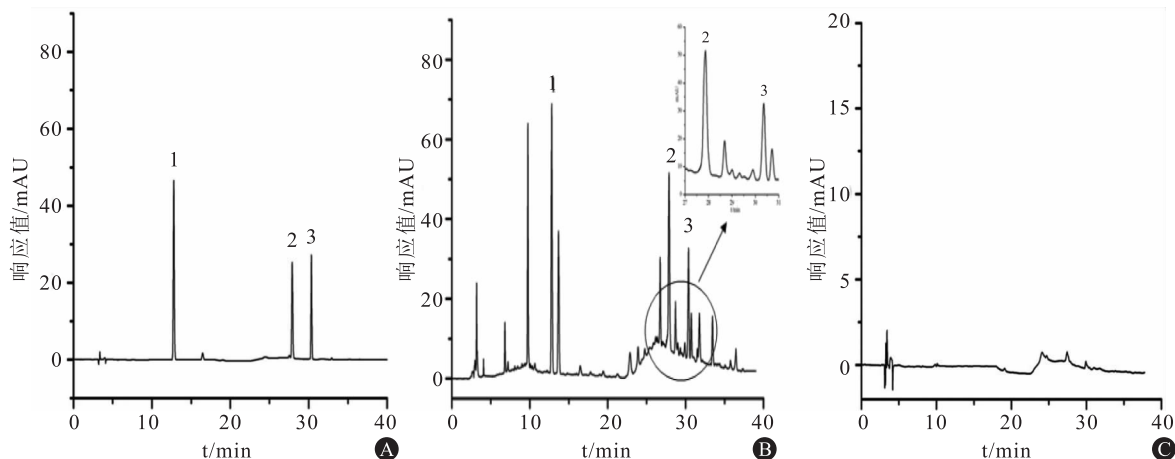
温 30℃,进样量:10 μL,波长 0~18 min(327 nm);18~38 min(230 nm),在此色谱条件下测定对照品、供试品溶液以及阴性样品溶液。理论塔板数以绿原酸峰计算不低于 4 000,分离度>1.5,色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品 5.63 mg、甘草苷 5.56 mg、5-O-甲基维斯阿米醇苷 4.78 mg 分别置三个 25 mL 容量瓶中,分别加甲醇稀释至刻度,作为对照品储备溶液。分别精密吸取上述绿原酸储备液 3 mL,甘草苷储备液 2 mL 和 5-O-甲基维斯阿米醇苷储备液 2 mL,置相同的一个 25 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,作为对照品溶液(每 1 mL 含绿原酸 27.024 μg,甘草苷 17.792 μg,5-O-甲基维斯阿米醇苷 15.296 μg)。

2.3 供试品溶液的制备 取银花感冒颗粒(批号 161001)样品 5 袋,研细,精密称取 5.0 g,置 150 mL 具塞锥形瓶中,然后精密加入 50% 甲醇(v/v) 50 mL,摇匀,密塞,称定重量,超声处理(频率 270 W,功率 40 kHz)30 分钟,放冷,再称定重量,用 50% 甲醇补足减失的重量,摇匀,用 φ 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.4 阴性样品的制备 按照银花感冒颗粒的处方工艺和处方量,取连翘和桔梗,缺金银花、甘草和防风的药材作为阴性样品,依据供试品溶液的制备方法,同法制成阴性样品溶液。按照“2.1”项下的色谱条件分别吸取“2.2”项下对照品和“2.3”项下供试品溶液及阴性样品溶液各 10 μL,记录色谱图,在供试品溶液出峰的位置阴性样品没有出现保留时间一致的色谱峰,结果表明阴性样品对绿原酸、甘草苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的测定无干扰。

2.5 线性关系的考察 按照“2.1”项下的液相色谱条件,分别精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液



注:1 为绿原酸;2 为甘草苷;3 为 5-O-甲基维斯阿米醇苷

图1 银花感冒颗粒 HPLC 图:A 示对照品,B 示供试品,C 示阴性供试品

2、5、10、15、20 μL 注入液相色谱仪,进行测定不同进样量下对照品溶液的峰面积,以不同进样量对照品的质量(ng)为横坐标,相对应的峰面积为纵坐标进行线性回归,结果见表 1。

表 1 3 种成分的线性方程,相关系数及线性范围			
对照品	线性方程	相关系数(<i>r</i>)	线性范围/ng
绿原酸	$Y = 3.082X + 6.064$	0.999 9	54.05 ~ 540.50
甘草苷	$Y = 2.592X + 3.137$	0.999 3	35.58 ~ 355.80
5-O-甲基维斯阿米醇苷	$Y = 2.531X + 6.767$	0.999 9	30.59 ~ 305.90

2.6 精密度试验 取“2.2”项下的混合对照品溶液,依照“2.1”项下的色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积,结果表明绿原酸峰面积的 RSD 为 0.17%,甘草苷峰面积的 RSD 为 1.08%,5-O-甲基维斯阿米醇苷峰面积的 RSD 为 0.53%,RSD < 2,说明该仪器的精密度良好。

2.7 稳定性试验 取“2.3”项下供试品溶液,分别在 0,1,2,4,8,12,24 h 测定,进样量为 10 μL,连续考察 24 h,记录色谱峰面积,结果绿原酸、甘草苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷峰面积的 RSD 分别为 1.04%、1.04% 和 2.25%,RSD < 3,结果说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验 取银花感冒颗粒(批号 161001)样品,按照“2.3”项下的方法制备供试品溶液,平行制备样品 6 份,按照“2.1”项下的色谱条件分别注入液相色谱仪进行测定,结果每袋含绿原酸含量的

RSD 为 0.22%,甘草苷含量的 RSD 为 1.10%,5-O-甲基维斯阿米醇苷含量的 RSD 为 1.19%,结果说明本方法的重复性良好。

2.9 加样回收率试验 精密称取已知含量的银花感冒颗粒(批号 161001)样品 2.5 g 共 6 份,另分别精密称取绿原酸对照品 4.76 mg 置 10 mL 容量瓶中(每 1 mL 含绿原酸 0.476 0 mg),甘草苷对照品 4.520 0 mg 置 10 mL 容量瓶中(每 1 mL 含甘草苷 0.452 0 mg),5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品 12.35 mg 置 50 mL 容量瓶中(每 1 mL 含 5-O-甲基维斯阿米醇苷 0.247 0 mg),分别精密加入上述对照品溶液各 1 mL 于上述 6 份供试品溶液中,依照“2.3”项下供试品溶液的制备方法制备,依照“2.1”项下色谱条件进行测定,分别计算绿原酸、甘草苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷的平均回收率,测定结果见表 2。

2.10 样品含量测定 取 3 个不同批号的银花感冒颗粒样品,依照“2.3”项下供试品溶液的方法制备,每批样品平行制备 2 份,依照“2.1”项下的色谱条件进行测定,以外标法分别计算 3 批样品中绿原酸、甘草苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量,测定结果见表 3。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的考察 本实验采用正交方法对供试品溶液的制备方法进行考察,包括不同时间(30 min,1.0 h,2.0 h),不同溶剂(甲醇、乙醇、50% 甲醇、70% 乙醇)作为溶剂进行提取,不同

表 2 加样回收率试验结果(<i>n</i> = 6)							
成分	取样/g	样品量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
绿原酸	2.510 7	0.483 3	0.476 0	0.952 0	98.47	99.58	0.92
	2.506 9	0.482 6	0.476 0	0.957 9	99.85		
	2.517 7	0.484 6	0.476 0	0.962 7	100.44		
	2.512 3	0.483 6	0.476 0	0.963 3	100.78		
	2.523 2	0.485 7	0.476 0	0.956 8	98.97		
	2.511 8	0.483 5	0.476 0	0.954 7	98.99		
甘草苷	2.510 7	0.423 8	0.452 0	0.864 3	97.45	98.28	2.31
	2.506 9	0.423 2	0.452 0	0.860 2	96.69		
	2.517 7	0.425 0	0.452 0	0.867 7	97.95		
	2.512 3	0.424 1	0.452 0	0.872 1	99.12		
	2.523 2	0.425 9	0.452 0	0.860 3	96.10		
	2.511 8	0.424 0	0.452 0	0.886 8	102.39		
5-O-甲基维斯阿米醇苷	2.510 7	0.233 2	0.247 0	0.485 5	102.13	98.91	2.16
	2.506 9	0.232 9	0.247 0	0.473 6	97.45		
	2.517 7	0.233 9	0.247 0	0.475 8	97.94		
	2.512 3	0.233 4	0.247 0	0.482 4	100.81		
	2.523 2	0.234 4	0.247 0	0.477 9	98.58		
	2.511 8	0.233 3	0.247 0	0.471 8	96.54		

表3 银花感冒颗粒样品含量测定结果(*n* = 3)

成分	批号	含量 (毫克/袋)	平均含量 (毫克/袋)	RSD/ %
绿原酸	161001	1.924 6	1.922 7	0.98
	161203	1.940 5		
	160906	1.902 9		
甘草苷	161001	1.688 0	1.677 6	1.29
	161203	1.652 8		
	160906	1.692 0		
5-O-甲基维斯阿米醇苷	161001	0.929 0	0.920 8	1.79
	161203	0.931 6		
	160906	0.901 8		

供试品的制备方法(包括回流提取与超声提取制备),结果发现两种提取方法制备的银花感冒颗粒中绿原酸、甘草苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量结果差异无统计学意义,采用50%甲醇作为提取溶剂,超声处理30 min时提取效果最优,鉴于超声提取制备方法具有操作简单,无需加热,实验方便的优点,因此本实验确定供试品溶液的最佳制备方法为,50%甲醇作为提取溶剂超声提取30 min作为供试品溶液的制备方法。

3.2 色谱条件的选择 本实验参考文献报道和2015版中国药典金银花,甘草、防风^[13]项下含量测定的条件,首先采用Agilent 5TC-C18色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm)进行分析,结果发现样品峰分离不好,峰形较差,然后采用Welch-C18色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),发现峰形较好,分离度符合要求,故采用Welch-C18色谱柱。最后比较了以甲醇-水,乙腈-水,甲醇-0.4%磷酸和乙腈-0.4%磷酸等为流动相,结果发现乙腈-0.4%磷酸作为流动相进行测定时,对照品和供试品溶液的色谱峰基线比较平稳,无干扰峰出现,绿原酸,甘草苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷的峰形良好,拖尾因子在0.95~1.05之间,分离效果好,理论塔板数高,结果满意,可以用于供试品溶液中三种成分的测定。

3.3 波长的选择 实验采用紫外可见分光光度计在200~380 nm之间分别对绿原酸、甘草苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品溶液进行全波长扫描,并分别对各对照品溶液的最大吸收色谱峰进行比较,然后参考相关文献^[14-16]中绿原酸、甘草苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量测定条件,结果发现绿原酸在波长327 nm下具有最大吸收峰且峰形尖锐,干扰较小,甘草苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷分别在237 nm和254 nm下的具有最大吸收值峰型相对尖锐,

干扰较小,但是实验发现在237 nm和254 nm下同时测定这两个成分,结果发现峰形拖尾干扰严重,不能分离,最后发现在230 nm下峰形较好,可以满足分离要求,故实验采用切换波长把绿原酸检测波长设为327 nm,甘草苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷检测波长为230 nm。

银花感冒颗粒中未有同时测定绿原酸、甘草苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷四种成分含量的报道,本实验通过建立同时测定银花感冒颗粒中三种药材金银花、甘草、防风的主要活性成分,即绿原酸、甘草苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量来控制该药品的质量,比目前文献报道中的通过测定单一成分更有效,更全面,该方法具有操作简单、结果准确,专属性强的优点,可以用于全面评价银花感冒颗粒的质量。

参考文献

[1] 瞿彩丽,谈小飞. 银花感冒颗粒制备与质量标准研究[J]. 医药卫生:全文版, 2016, 2(9):00135-00135.

[2] ZHANG Z, GUO S, FU S, et al. Research progress of active ingredients and pharmacological action of honeysuckle[J]. Animal Husbandry & Feed Science, 2014, 6(1):22-24.

[3] 孟晓丹. 分析中药金银花的药用成分与药理作用[J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(13):276-277.

[4] 李文,李丽,是元艳,等. 防风有效部位的药理作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(6):29-31.

[5] 窦红霞,高玉兰. 防风的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2009, 26(2):15-17.

[6] 王惠敏. 甘草药理作用及其临床应用[J]. 天津中医药学院学报, 2004, 23(4):184-185.

[7] 唐德智. HPLC测定银花感冒颗粒中绿原酸含量[J]. 中医药导报, 2009, 15(8):73-74.

[8] 黎小伟. HPLC测定银花感冒颗粒中升麻苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷含量[J]. 中成药, 2006, 28(1):37-38.

[9] 汤云莉,江启睿,徐正明. 银花感冒颗粒中主要药味的薄层色谱鉴别[J]. 中国药业, 2004, 13(11):41-41.

[10] 郑芳,李鹏,李志浩,等. HPLC-DAD法测定“武当三号金银花”藤中4种有效成分含量[J]. 安徽医药, 2014, 18(11):2062-2065.

[11] 张婷. 高效液相色谱法同时测定小儿咳喘灵口服液中绿原酸与甘草苷的含量[J]. 安徽医药, 2016, 20(11):2052-2054.

[12] SHIBANO M, OZAKI K, WATANABE H, et al. Determination of flavonoids in licorice using acid hydrolysis and reversed-phase HPLC and evaluation of the chemical quality of cultivated licorice[J]. Planta Med, 2010, 76(7):729-733.

[13] 国家药典委员会. 中国药典:2015年版 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 149,221.

[14] 张鑫,王云霞. HPLC法测定百合固金颗粒中芍药苷和甘草苷含量[J]. 化学分析计量, 2017, 26(1):88-91.

[15] 刘亚萍,曹雨诞. HPLC法测定炙甘草中主要化学成分含量的研究[J]. 安徽医药, 2015, 19(7):1272-1273.

[16] 任莹,范姣姣,张鑫. HPLC法测定复方双花片中绿原酸、咖啡酸、连翘苷、穿心莲内酯和木犀草素[J]. 现代药物与临床, 2017, 32(7):1192-1195.

(收稿日期:2017-03-06,修回日期:2018-04-22)