

## · 研究报告 ·

## 用高效液相色谱法测定银翘散配方颗粒中连翘酯苷 A 的含量

王 婵<sup>1</sup>, 韦 刃<sup>2</sup>, 黄晓玉<sup>2</sup>, 林 广<sup>3</sup>, 黄志权<sup>3</sup>, 周永强<sup>3</sup> (培力药业有限公司, 广西 南宁 530007)

**[摘要]** 目的 建立了银翘散配方颗粒中连翘酯苷 A 的含量测定方法。方法 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Welch Ultimate XB-C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.2% 冰醋酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 330 nm, 柱温 20 ℃。结果 连翘酯苷 A 进样量在 0.080 3~3.211 μg 范围内线性关系良好 ( $r=1.000$ )。加样回收率为 103.78%, RSD 为 0.82%。结论 该方法简便、准确, 专一性和重复性较好, 可用于银翘散配方颗粒的质量控制。

**[关键词]** 高效液相色谱法; 银翘散配方颗粒; 连翘酯苷 A

**[中图分类号]** R917

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2015)02-0156-03

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.02.017

## Content determination of Forsythoside A in Yinqiaosan granules by HPLC

WANG Chan<sup>1</sup>, WEI Ren<sup>2</sup>, HUANG Xiaoyu<sup>2</sup>, LIN Guang<sup>3</sup>, HUANG Zhiquan<sup>3</sup>, ZHOU Yongqiang<sup>3</sup> (PuraPharm Corporation, Nanning 530007, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a method for determination of the content of Forsythoside A in Yinqiaosan granules. **Methods** HPLC method was adopted to carry on the determination. Welch Ultimate XB-C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with the mobile phase of methanol-0.2% Glacial acetic acid solution by gradient elution. The flow rate was 1.0 ml/min, the detection wavelength was 330 nm, and the column temperature was 20 ℃. **Results** Forsythoside A showed a good linear relationship at the range from 0.080 3~3.211 μg ( $r=1.000$ ). The average recovery rates were 103.78%, and RSD=0.82%. **Conclusion** The method was convenient and accurate. Meanwhile, it also has good specificity and reproducibility. It can be used effectively for the quality control of Yinqiaosan granules.

**[Key words]** HPLC; Yinqiaosan granules; Forsythoside A

银翘散配方颗粒(Yinqiaosan granules)由金银花、连翘、荆芥、桔梗等十味中药组成, 具有疏散风热、清热解毒的功效, 主治温病初起, 邪在卫分, 症见发热无汗, 或汗出不畅, 微恶风寒, 头痛口渴, 咳嗽咽痛, 舌尖红, 苔薄白或薄黄, 脉浮数。方中重用金银花、连翘为君, 既有辛凉透表、清热解毒的作用, 又具芳香辟秽的功效<sup>[1]</sup>。有研究表明, 连翘中发挥抗菌作用的主要是连翘酯苷, 其具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抑制弹性蛋白酶活力以及松弛血管等药理作用<sup>[2]</sup>。连翘中连翘酯苷包括连翘酯苷(Forsythoside)A、B、C、D、E等, 尤以连翘酯苷A含量最高<sup>[3]</sup>。《中华人民共和国药典》(2010版)新增了连翘酯苷A作为连翘药材的质量控制指标。本实验采用高效液相色谱法对银翘散配方颗粒中连翘酯苷A做含量

测定。结果表明, 本法操作简便, 稳定性、重现性好, 测定结果准确, 可作为银翘散配方颗粒的质量控制。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), GR-202 分析天平(日本), 昆山 KQ-500DE 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。连翘酯苷 A 对照品(批号: 111810-201103, 含量以 92.9% 计, 中国食品药品检定研究院), 银翘散配方颗粒[批号: A1300010, 培力(南宁)药业有限公司]; 甲醇(欧普森)为色谱纯, 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** 色谱柱: Welch Ultimate XB-C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 以甲醇为流动相 A, 0.2% 冰醋酸为流动相 B, 按表 1 进行梯度洗脱; 流速 1.0 ml/min; 进样量: 对照品溶液 10 μl, 供试品溶液 20 μl; 柱温 20 ℃; 检测波长 330 nm, 理论塔板数按连翘酯苷 A 峰计算应不低于 3 000。

**[基金项目]** 南宁市本级科学研究与技术开发计划项目(20141060, 20133163); 广西创新计划专项经费项目(2014CXJHA02)

**[作者简介]** 王 婵, 助理工程师, 研究方向: 中药配方颗粒质量标准研究. E-mail: cwang@purapharm.com.cn

## 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液** 取连翘酯苷 A 对照品适量,精密称定,加含 0.5% 冰醋酸的 50% 甲醇溶液制成 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的对照品溶液,即得。

表 1 梯度洗脱程序

时间( $t/\text{min}$ )	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0~10	25→34	75→66
10~17	34→35	66→65
17~35	35	65
35~45	35→75	65→25
45~50	75→25	25→75

**2.2.2 供试品溶液** 取本品适量,研细,取约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入 50% 甲醇 50 ml,称重,超声处理(功率 400 W,频率 40 kHz)

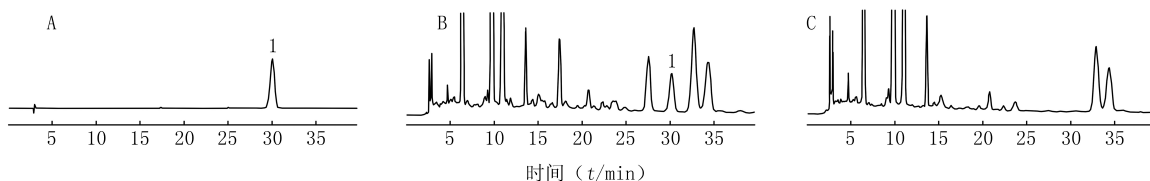


图 1 连翘酯苷 A 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 连翘酯苷 A

**2.4 线性关系考察** 分别精密量取浓度为 0.321 1  $\text{mg}/\text{ml}$  的对照品溶液 0.25、0.50、1.0、2.0、5.0 ml,置 10 ml 量瓶中,加含 0.5% 冰醋酸的 50% 甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,得线 1 至线 5,并取 0.321 1  $\text{mg}/\text{ml}$  的对照品溶液作为线 6。精密吸取线 1 至线 6 对照品溶液各 10  $\mu\text{l}$ ,进行测定。以进样量( $\mu\text{g}$ )为横坐标,峰面积积分为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为  $Y=1\ 668.805\ 5X-12.496\ 2$  ( $r=1.000$ )。结果表明,连翘酯苷 A 在 0.080 3~3.211  $\mu\text{g}$  范围内线性关系良好。

**2.5 精密度实验** 精密吸取连翘酯苷 A 对照品溶液(浓度为 32.11  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )10  $\mu\text{l}$ ,重复进样 6 次,测定峰面积。结果表明,连翘酯苷 A 峰面积的  $\text{RSD}=2.43\%$ ,说明仪器精密度良好。

**2.6 稳定性实验** 取同一供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、13 h 进样,依法测定,结果连翘酯苷 A 峰面积的  $\text{RSD}=0.75\%$ ,说明供试品溶液在 13 h 内稳定。

**2.7 重复性实验** 取同一批样品,研细,取 6 份,每份约 1.0 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制得供试品溶液,精密吸取供试品溶液各 20  $\mu\text{l}$  进样,测峰面积并计算连翘酯苷 A 的含量。结果连翘酯苷 A 的平均含量为 0.965  $\text{mg}/\text{g}$ ,含量的  $\text{RSD}$  为 0.56%,说

明本方法重复性较好。

**2.2.3 阴性样品溶液** 取缺连翘药材的银翘散配方颗粒阴性样品,研细,取约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 50 ml,称重,超声处理(功率 400 W,频率 40 kHz)45 min,取出,放冷,称定重量,用 50% 甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

**2.3 专一性考察** 分别吸取对照品溶液 10  $\mu\text{l}$ 、供试品溶液和阴性样品溶液各 20  $\mu\text{l}$  进样。在“2.1 色谱条件”下,供试品中连翘酯苷 A 色谱峰与对照品色谱峰保留时间一致,并与其他共存成分最小分离度为 1.83,理论塔板数为 17 206,主峰与杂质峰达到基线分离,且阴性样品在相应的位置没有色谱峰干扰,说明本方法专一性良好(图 1)。

明本方法重复性较好。

**2.8 加样回收率实验** 称取同一批已知含量为 0.965  $\text{mg}/\text{g}$  的样品,研细,取 6 份,每份约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入浓度为 0.605  $\text{mg}/\text{ml}$  的连翘酯苷 A 对照品溶液 0.8 ml,蒸干,按“2.2.2”项下方法制得供试品溶液,进样测定,计算回收率,分别为 103.20%、103.12%、102.79%、104.38%、104.88% 和 104.34%,平均回收率为 103.78%, $\text{RSD}$  为 0.82%,说明本方法回收率良好。

**2.9 样品测定** 取本品 6 批,每批取 2 份,每份约 1.0 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制得供试品溶液,按“2.1 色谱条件”进样测定,结果见表 2。

表 2 6 批银翘散配方颗粒含量测定结果( $n=6$ , $\text{mg}/\text{g}$ )

批号	含量	平均含量
A101547-01	0.759	0.763
A110371-01	1.257	1.268
A110123-01	0.567	0.573
A1201513	1.774	1.757
A1300009	0.909	0.905
A1300010	0.951	0.979

### 3 讨论

**3.1 流动相的选择** 本实验曾参考《中华人民共和国药典(一部)》2010年版中[连翘]含量测定项,使用乙腈-0.4%冰醋酸(15:85)作为流动相进行测定,结果连翘酯苷A峰与相邻杂质峰分离不佳、峰形差;亦曾考察不同的流动相系统:乙腈-0.2%磷酸水溶液梯度洗脱、甲醇-磷酸水溶液梯度洗脱<sup>[4,5]</sup>、乙腈-0.4%冰醋酸水溶液等度及梯度洗脱<sup>[6,7]</sup>、甲醇-0.2%冰醋酸梯度洗脱,结果以甲醇-0.2%冰醋酸梯度洗脱分离效果最好,峰形最佳。

**3.2 供试品制备方法的考察** 考察提取溶剂种类时,对甲醇、70%甲醇、50%甲醇、乙醇、70%乙醇、50%乙醇等提取溶剂进行比较,发现使用50%甲醇作为提取溶剂时,测得含量较高且峰形最好,因此选择50%甲醇作为提取溶剂。另对提取方式(加热回流、超声处理、浸泡处理),提取时间(30、45、60 min),提取溶剂用量(25、50、100 ml)进行了优选。优选方案为:加溶剂50 ml,超声处理45 min。

**3.3 对照品配制用溶剂的选择** 连翘酯苷A含酚类结构,其结构较为复杂,在高湿、强光下不稳定<sup>[3]</sup>。本研究发现,当使用含有水的甲醇溶液配制时,对照品溶液放置几小时后就会分解(HPLC测定可发现

在主峰前有明显的分解峰,且主峰的峰面积有明显的下降);使用不含水的纯甲醇配制,对照品溶液放置几天后峰面积亦会降低。有研究报道称,酸性介质或抗氧化剂的加入有利于改善连翘酯苷A在水溶液中的稳定性<sup>[3]</sup>。因此,笔者尝试通过在50%甲醇中加入0.5%冰醋酸作为溶剂配制对照品溶液以提高其稳定性,测定结果表明,此法效果显著,对照品溶液放置20 d后峰面积亦无明显变化。

### 【参考文献】

- [1] 段富津.方剂学[M].上海科学技术出版社,1995:28.
- [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] 王曙宾,郑亚杰.连翘提取物和连翘酯苷A原料中连翘酯苷A的稳定性研究[J].中草药,2010,41(6):909-911.
- [4] 鲍涵,张忠义,张军,等.HPLC法同时测定热毒清颗粒中绿原酸和连翘酯苷A的含量[J].中国药房,2012,23(24):2284-2286.
- [5] 蔡颖.HPLC法测定小儿肺热咳喘口服液中含连翘苷和连翘酯苷A的含量[J].齐鲁药事,2012,31(6):333.
- [6] 刘鹏,宋迎权.HPLC法测定双黄连颗粒中含连翘酯苷A的含量[J].中国中医药现代远程教育,2011,9(19):158.
- [7] 赵昱玮,于森,南敏伦,等.高效液相色谱法测定银翘解毒片中连翘酯苷A的含量[J].中国医药科学,2011,1(22):114.

【收稿日期】2013-08-10 【修回日期】2014-02-20

【本文编辑】李睿晔

(上接第146页)

浆样品中筛选出主要代谢物7-OH MTX,并获得液质联用的相关特征信息。经比较,色谱峰10.4 min处的物质在液质联用中的色谱与质谱行为与筛选所得7-OH MTX均相符,故确证其为MTX在人体内的代谢物7-OH MTX。

### 【参考文献】

- [1] Green MR, Chowdhary S, Lombardi KM, et al. Clinical utility and pharmacology of high-dose MTX in the treatment of primary CNS lymphoma[J]. Expert Rev Neurother, 2006, 6(5): 635-652.
- [2] Lennard L. Therapeutic drug monitoring of antimetabolic cytotoxic drugs[J]. Br J Clin Pharmacol, 1999, 47: 131-143.
- [3] 彭波. 高效液相色谱法测定甲氨蝶呤的血药浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(11): 951-952.
- [4] 张春燕, 顾健. 反相高效液相色谱法同时测定人血浆中亚叶酸、5-甲基四氢叶酸及甲氨蝶呤的浓度及临床应用[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(7): 543-547.
- [5] 许耘川, 袁向亮, 沈立松. HPLC法测定血清甲氨蝶呤浓度的方法建立及其与荧光偏振法的比较[J]. 检验医学, 2010, 25(9): 701-704.
- [6] 谢军平, 冯玲玲, 匡霞. HPLC测定大剂量甲氨蝶呤患者血药浓度[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11): 69-72.

- [7] 霍晶, 袁盛华, 方芸, 等. 反相高效液相色谱法测定人血浆中甲氨蝶呤的浓度[J]. 药学与临床研究, 2007, 15(5): 390-392.
- [8] Turci R, Micoli G, Minoia C. Determination of methotrexate in environmental samples by solid phase extraction and high performance liquid chromatography: ultraviolet or tandem mass spectrometry detection? [J]. Rapid Commun Mass Spectr, 2000, 14: 685-691.
- [9] 周卿, 潘雪君. 固相萃取-高效液相色谱法测定人乳中甲氨蝶呤的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(12): 2305-2307.
- [10] 吴雪梅, 丘宏强, 方令平, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定甲氨蝶呤的血药浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(18): 1617-1619.
- [11] 张华年, 文玲莉, 张少文, 等. 固相萃取高效液相色谱法检测生物样本中甲氨蝶呤[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(6): 401-404.
- [12] 曹一辰, 孟祥乐, 朱金辉, 等. LC-MS/MS法测定人血清中甲氨蝶呤及其代谢产物7-羟基甲氨蝶呤的浓度[J]. 中国药师, 2012, 15(2): 191-194.
- [13] Guo PI, Wang XM, Liu LS, et al. Determination of methotrexate and its major metabolite 7-hydroxymethotrexate in mouse plasma and brain tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43: 1789-1795.

【收稿日期】2014-04-03 【修回日期】2014-06-26

【本文编辑】李睿晔