

HPLC 测定疏风散热胶囊中 5 个化合物的含量

覃子龙

(柳州市食品药品检验所,柳州 545001)

摘要 目的: 建立高效液相色谱法测定疏风散热胶囊中栀子苷、马钱苷、甘草苷、连翘苷和牛蒡苷的含量。**方法:** 采用 Agilent Zorbax SB-Aq C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.2% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速为 1 mL · min⁻¹, 柱温 40 °C, 检测波长为 237、228 nm, 同时测定疏风散热胶囊中 5 个化合物的含量。**结果:** 栀子苷、马钱苷、甘草苷、连翘苷和牛蒡苷的线性范围分别为 5.500~220.0 μg · mL⁻¹ (*r*=0.999 9)、1.382~55.30 μg · mL⁻¹ (*r*=0.999 7)、1.400~56.00 μg · mL⁻¹ (*r*=0.999 9)、1.377~55.08 μg · mL⁻¹ (*r*=0.999 8)、20.92~837.0 μg · mL⁻¹ (*r*=0.999 9); 平均回收率 (*n*=9) 分别为 97.8%、99.4%、98.1%、101.6%、100.0%。10 批疏风散热胶囊中每粒胶囊含上述 5 个成分的量分别为 0.35~1.09、0.03~0.41、0.02~0.13、0.07~0.14、2.38~3.64。**结论:** 建立的方法重复性好, 快速, 易操作, 适用于疏风散热胶囊的质量控制。

关键词: 疏风散热胶囊; 栀子苷; 马钱苷; 甘草苷; 连翘苷; 牛蒡苷; 高效液相色谱

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)12-2188-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.12.19

Simultaneous determination of 5 compounds in Shufeng Sanre capsules by HPLC

QIN Zi-long

(Liuzhou Institute of Food and Drug Control, Liuzhou 545001, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for the simultaneous determination of geniposide, loganin, liquiritin, forsythin and arctiin in Shufengsanre capsules. **Methods:** Agilent Zorbax SB-Aq C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used with acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution as mobile phase in gradient elution at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, the column temperature was 40 °C, and the detection wavelengths were 237 and 228 nm. **Results:** The linear ranges of geniposide, loganin, liquiritin, forsythin and arctiin were 5.500-220.0 μg · mL⁻¹ (*r*=0.999 9), 1.382-55.30 μg · mL⁻¹ (*r*=0.999 7), 1.400-56.00 μg · mL⁻¹ (*r*=0.999 9), 1.377-55.08 μg · mL⁻¹ (*r*=0.999 8) and 20.92-837.0 μg · mL⁻¹ (*r*=0.999 9), respectively; The average recoveries (*n*=9) were 97.8%, 99.4%, 98.1%, 101.6% and 100.0%, respectively. The contents for one capsule of geniposide, loganin, liquiritin, forsythin and arctiin in 10 batches of Shufengsanre capsules were 0.35-1.09, 0.03-0.41, 0.02-0.13, 0.07-0.14 and 2.38-3.64, respectively. **Conclusion:** The method developed is repeatable, fast and easy and can be used for the quality control of Shufengsanre capsules.

Keywords: shufengsanre capsules; geniposide; loganin; liquiritin; forsythin; arctiin; HPLC

作者 Tel:(0772)2825417; E-mail: 125490357@qq.com

疏风散热胶囊是在银翘散的基础上加工制成的中药胶囊^[1],现行标准收载于《中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂》第十二册,具有清热解毒,疏风散热的功效,临床上用于风热感冒,发热头痛,咳嗽口干,咽喉疼痛。本研究以提高疏风散热胶囊质量评价标准为目的,以获得有效控制疏风散热胶囊质量的方法,为风热感冒病人提供更安全、有效的药物。

疏风散热胶囊由金银花、连翘、忍冬藤、桔梗、薄荷、牛蒡子、地黄、淡竹叶、荆芥、栀子、淡豆豉和甘草共12味中药组成^[2],金银花、连翘、忍冬藤为君药,薄荷、牛蒡子、荆芥穗、淡豆豉为臣药,淡竹叶、栀子、地黄、桔梗为佐药,甘草是属佐使之用^[3]。通过分析组方中各味药材的化学成分^[4-15],笔者以高效液相色谱法,在同一色谱条件下测定疏风散热胶囊中栀子苷、马钱苷、甘草苷、连翘苷和牛蒡苷的含量,为该制剂的质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪;Mettler AE200 万分之一电子分析天平;Mettler XP26 百万分之一电子分析天平;AS7240BT 超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);元素 1810A 超纯水器(上海摩勒科技有限公司)。

对照品栀子苷(批号 110749-201617,含量:98.4%)、马钱苷(批号 111640-200604,含量:100%)、甘草苷(批号 111610-201005,含量:94.9%)、连翘苷(批号 110821-200711,含量:98.9%)和牛蒡苷(批号 110819-201611,含量:95.9%),均来自中国食品药品检定研究院;疏风散热胶囊(批号 150302、150303、150304、150305、160801、160802、160401、160404、160406,规格:0.25 g,黑龙江省济仁药业有限公司;批号:20150601,规格:0.25 g,贵州民族药业股份有限公司);乙腈(色谱纯,J&K Scientific Ltd.公司);水(纯水),其他试剂(分析纯,成都市科龙化工试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Zorbax SB-Aq C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,Agilent 公司);以乙腈(A)-0.2% 磷酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~15 min, 10%A; 15~20 min, 10%A → 20%A; 20~25 min, 20%A; 25~30 min,

20%A → 25%A; 30~35 min, 25%A; 35~40 min, 25%A → 10%A);流速:1.0 mL · min⁻¹;检测波长:0~32 min 为 237 nm, 32~50 min 为 228 nm;进样量:20 μL,柱温:40 °C。

2.2 溶液制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取对照品栀子苷 11.18 mg、马钱苷 11.06 mg、甘草苷 11.80 mg、连翘苷 11.14 mg 和牛蒡苷 10.91 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成各对照品储备液。精密吸取各储备液,栀子苷 1 mL、马钱苷 0.25 mL、甘草苷 0.25 mL、连翘苷 0.25 mL、牛蒡苷 4 mL,置同一 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得含栀子苷 100.0 μg · mL⁻¹、马钱苷 27.65 μg · mL⁻¹、甘草苷 28.00 μg · mL⁻¹、连翘苷 27.54 μg · mL⁻¹、牛蒡苷 418.5 μg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

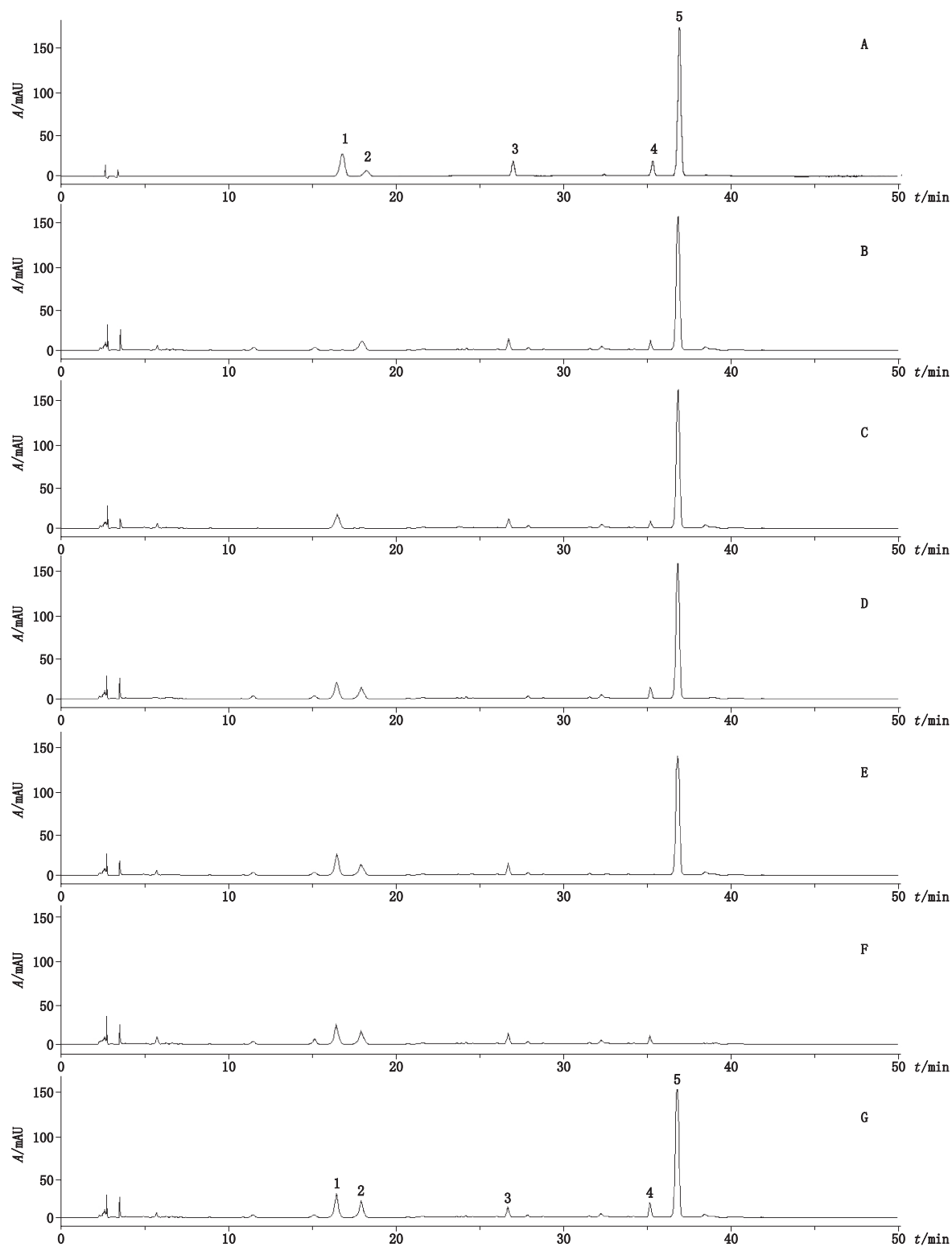
2.2.2 供试品溶液 将本品内容物混匀,取约 0.25 g,精密称定,置 100 mL 锥形瓶中,精密加入甲醇 20 mL,精密称定,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 30 min,取出放冷后,用甲醇补足减失的量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 10 mL,蒸至近干,加中性氧化铝 1 g 拌匀,加在中性氧化铝柱(100~200 目,3 g,内径为 1.5 cm)上,用 70% 乙醇水 80 mL 洗脱,收集洗脱液,浓缩至干,残渣用 50% 甲醇水溶解,转移至 10 mL 量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,以 0.45 μm 滤膜过滤,取续滤液,作为供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液 按疏风散热胶囊制备工艺分别制成缺栀子、缺忍冬藤、缺甘草、缺连翘和缺牛蒡子的 5 种阴性样品,按“2.2.2”项下方法分别制得各阴性样品溶液。

2.3 专属性试验

取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液各 20 μL,在上述色谱条件下进行测定,记录色谱图。结果阴性样品溶液在与混合对照品溶液相同的保留时间位置上无色谱峰出现,见图 1。

2.4 线性关系及定量下限 分别精密吸取混合对照品溶液 1、4、10、20、40 μL 进样,测定其峰面积。以进样量 X(μg)为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标进行线性回归,得疏风散热胶囊中 5 个化合物的标准曲线方程、相关系数及线性范围。取混合对照品溶液逐步稀释并分析,以 10 倍信噪比计算各指标成分的定量下限。结果见表 1。表明各化合物进样量和峰面积线性关系良好。



1. 栀子苷 (geniposide) 2. 马钱苷 (loganin) 3. 甘草苷 (liquiritin) 4. 连翘苷 (forsythin) 5. 牛蒡苷 (arctiin)

A. 对照品 (reference substances) B. 缺栀子阴性样品 (negative sample without Gardeniae Fructus) C. 缺忍冬藤阴性样品 (negative sample without Lonicerae Japonicae Caulis) D. 缺甘草阴性样品 (negative sample without Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma) E. 缺连翘阴性样品 (negative sample without Forsythiae Fructus) F. 缺牛蒡子阴性样品 (negative sample without Arctii Fructus) G. 样品 (sample)

图 1 疏风散热胶囊中 5 个化合物的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of 5 compounds in sufengsanre capsules

表 1 回归方程及线性范围

Tab. 1 Regression equations and linear ranges

化合物 (compound)	回归方程 (regression equation)	<i>r</i>	线性范围 (linear range)/ μg	定量下限 (limit of quantity)/ng
栀子苷 (geniposide)	$Y=1.450 \times 10^4 X+2.040 \times 10^4$	0.999 9	0.11~4.40	1.02
马钱苷 (loganin)	$Y=1.560 \times 10^4 X+6.670 \times 10^4$	0.999 7	0.03~1.11	1.11
甘草苷 (liquiritin)	$Y=2.010 \times 10^4 X+6.780 \times 10^2$	0.999 9	0.03~1.12	0.45
连翘苷 (forsythin)	$Y=2.000 \times 10^4 X+3.220 \times 10^3$	0.999 8	0.03~1.10	0.45
牛蒡苷 (arctiin)	$Y=1.650 \times 10^4 X+2.550 \times 10^4$	0.999 9	0.48~19.26	0.65

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 20 μL , 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测定各指标成分峰面积, 计算其精密度, 栀子苷、马钱苷、甘草苷、连翘苷和牛蒡苷峰面积的 RSD 分别为 0.21%、0.34%、0.32%、0.68% 和 0.13%, 结果表明该仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一份供试品溶液 (批号 160406), 分别于 0、2、4、6、8、12h 进样测定, 结果供试品中栀子苷、马钱苷、甘草苷、连翘苷和牛蒡苷峰面积的 RSD 分别为 0.29%、0.27%、0.53%、0.99% 和 0.40%, 表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.7 重复性试验

取同一批号疏风散热胶囊 (批号 160406) 内容物适量, 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液进行测定, 结果供试品中栀子苷、马钱苷、甘草苷、连翘苷和牛蒡苷的含量平均值 ($n=6$) 分别为 0.51、0.39、0.13、0.08、3.33 $\text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$, RSD 分别为 0.68%、0.77%、0.82%、0.56%、0.79%。结果表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品约 0.12 g, 共 9 份, 分别精密加入一定量的栀子苷、马钱苷、甘草苷、连翘苷和牛蒡苷对照品, 按“2.2.2”项下方法制备溶液, 每个浓度制备 3 份, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 结果见表 2。

表 2 回收率试验结果 ($n=3$)

Tab. 2 Results of recovery

化合物 (compound)	样品含量 (content)/ μg	加入量 (added)/ μg	测得量 (detected)/ μg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/%
栀子苷 (geniposide)	249.06	110.01	356.02	97.2	97.5	1.1
	249.87		358.85	99.0		
	247.44		353.56	96.4		
	235.51	220.02	450.13	97.6		
	232.28		451.27	99.5		
	234.91	330.03	451.67	98.5		
	233.69		558.74	98.5		
马钱苷 (loganin)	230.66	69.12	550.85	97.0	99.5	1.7
	210.85		529.59	96.6		
	194.13		262.38	98.7		
	194.76	138.25	262.72	98.3		
	192.87		260.88	98.4		
	183.57		324.36	101.8		
	181.05		321.20	101.4		
	183.10	207.38	323.66	101.7		
	182.16		385.47	98.0		
	179.79		383.91	98.4		
164.35		367.35	97.9			

表 2(续)

化合物 (compound)	样品含量 (content)/ μg	加入量 (added)/ μg	测得量 (detected)/ μg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/%	
甘草苷 (liquiritin)	62.87	28.00	90.12	97.3	97.5	0.84	
	63.08		90.54	98.1			
	62.47		89.67	97.1			
	59.46	55.99	114.91	99.0	98.5		
	58.64		113.73	98.4			
	59.30		114.22	98.1			
	59.00	83.98	140.54	97.1	98.3		
	58.23		140.96	98.5			
	53.23		136.68	99.4			
	38.77		13.77	52.98			103.2
38.90	53.07	102.9					
连翘苷 (forsythin)	38.52	27.54	52.79	103.6	102.3		
	36.66		64.80	102.2			
	36.16		64.47	102.8			
	36.57	41.31	64.61	101.8	99.4		
	36.38		77.07	98.5			
	35.91		76.65	98.6			
	32.82		74.57	101.1			
	牛蒡苷 (arctiin)	1 640.94	662.19	2 308.15	100.8	100.8	0.79
		1 646.26		2 314.67	100.9		
		1 630.28		2 296.11	100.6		
1 551.70		1 324.38	2 879.71	100.3	99.7		
1 530.39			2 848.25	99.5			
1 547.70			2 861.12	99.2			
1 539.71			1 986.57	3 509.99		99.2	
1 519.73		3 487.03		99.0			
1 389.20	3 390.47	100.7					

2.9 样品测定

按“2.2.2”项下方法制备 10 批样品的供试品溶液各 2 份。精密吸取各供试品溶液 20 μL , 按“2.1”

项下色谱条件进样测定, 将峰面积代入线性回归方程进行计算, 结果见表 3。

表 3 样品中 5 个化合物的含量 ($n=2, \text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$)Tab. 3 Contents of 5 compounds ($n=2, \text{mg per capsule}$)

批号 (lot No.)	栀子苷 (geniposide)	马钱苷 (loganin)	甘草苷 (liquiritin)	连翘苷 (forsythin)	牛蒡苷 (arctiin)
150302	0.35	0.03	0.02	0.07	3.64
150303	0.61	0.13	0.09	0.12	3.30
150304	0.62	0.13	0.08	0.11	3.41
150305	0.51	0.12	0.08	0.11	3.47
160401	0.47	0.35	0.12	0.08	3.38
160404	0.48	0.34	0.12	0.08	3.34
160406	0.51	0.39	0.13	0.08	3.32
160801	0.69	0.41	0.12	0.08	3.38
160802	0.69	0.41	0.11	0.08	3.43
20150601	1.09	0.04	0.07	0.14	2.38

3 讨论

3.1 成分选择

实验考察的 5 个化合物,连翘苷、马钱苷、牛蒡苷、栀子苷、甘草苷分别为连翘、忍冬藤、牛蒡子、栀子、甘草的指标性成分^[16],基本覆盖了疏风散热胶囊组方中的君臣佐使,能较为全面地反映疏风散热胶囊的质量。

3.2 提取方法的选择

疏风散热胶囊组方包含了 12 味药材,成分相对复杂,简单的甲醇提取所含成分较多,无法用液相色谱完全分离。笔者尝试了甲醇提取后蒸干,用水溶解,再用水饱和正丁醇萃取和甲醇提取后过中性氧化铝柱,用 70% 乙醇水洗脱 2 种纯化方法,结果后者更为有效且相对简便,重现性也更好。

3.3 检测波长的选择

考察了 5 个化合物的紫外吸收光谱,结合《中华人民共和国药典》2015 年版一部中对应各成分的检测波长和相应成分在本实验洗脱程序上的保留时间,最终确定 0~32 min 选择 237 nm 作为检测波长,32~50 min 选择 228 nm 作为检测波长。仅做 1 次波长转变,就能使 5 种目标化合物基本都在最大吸收处检测。

3.4 提取方法的优化

供试品提取方法中有提取溶剂用量、超声时间和洗脱液用量 3 个因素明显影响目标成分的提取效果,故以正交试验的方法,比较了以上 3 个因素在 3 个水平下对目标成分的提取效果。结果表明,以甲醇 20 mL,超声 30 min,过柱,用 70% 乙醇水洗脱收集 80 mL 即可基本完全提取目标成分。

3.5 样品结果分析

比较了 2 个厂家 10 个不同批次的样品后发现,上述 5 个化合物在不同批次中差异较大,分析原因认为最大可能是不同批次原料药的差异造成。

参考文献

- [1] 贵州省药品标准[S]. 1989: 98
Guizhou Drug Standards[S]. 1989: 98
- [2] 卫生部药品标准中药成方制剂第 12 册[S]. 1997: 161
Drug Specifications Promulgated by Ministry of Public Health, P. R. China. Prescription of Chinese Patent Medicine Vol 12[S]. 1997: 161
- [3] 邓中甲. 方剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 28
DENG ZJ. Pharmacology of Traditional Chinese Medical Formulae[M]. Beijing: Chinese Medicine Press, 2003: 28
- [4] 王亚丹, 杨建波, 戴忠, 等. 中药金银花的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(11): 1928.
WANG YD, YANG JB, DAI Z, et al. Research progress on Lonicerae Japonicae Flos[J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34(11): 1928
- [5] 胡静, 马琳, 常艳旭. 连翘的研究进展[J]. 中南药学, 2012, 10

- (10): 760
HU J, MA L, CHANG YX. Research progress on Forsythiae Fructus[J]. Cent South Pharm, 2012, 10(10): 760
- [6] 张聪, 殷志琦, 叶文才, 等. 忍冬藤的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2009, (12): 3051
ZHANG C, YIN ZQ, YE WC, et al. Study on chemical composition of Lonicerae Japonicae Caulis[J]. China J Chin Mat Med, 2009, (12): 3051
- [7] 郭丽, 张村, 李丽, 等. 中药桔梗的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2007, 52(3): 181
GUO L, ZHANG C, LI L, et al. Research progress on Chinese herb Platycodonis Radix[J]. China J Chin Mat Med, 2007, 52(3): 181
- [8] 李祥, 邢文峰. 薄荷的化学成分及临床应用研究进展[J]. 中南药学, 2011, 5(9): 362
LI X, XING WF. Research progress on chemical composition and clinical application of Menthae Haplocalycis Herba[J]. Cent South Pharm, 2011, 5(9): 362
- [9] 李卓恒, 于彩平, 管海燕, 等. 牛蒡子化学成分的分离与鉴定[J]. 中国药房, 2012, 23(39): 3696
LI ZH, YU CP, GUAN HY, et al. Separation and identification of chemical constituents of Arctium lappa[J]. China Pharm, 2012, 23(39): 3696
- [10] 李红伟, 孟祥乐. 地黄化学成分及其药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2015, 38(2): 218
LI HW, MENG XL. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of Rehmannia glutinosa[J]. Drug Eval Res, 2015, 38(2): 218
- [11] 陈焯. 淡竹叶化学成分与药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(13): 50
CHEN Y. Review on research of the chemical constituents and pharmacological activities of Lophatherum Gracile Brongn[J]. Asia-Pac Tradit Med, 2014, 10(13): 50
- [12] 赵立子, 魏建和. 中药荆芥最新研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, 29(4): 39
ZHAO LZ, WEI JH. Latest research and development of Schizonepeta tenuifolia Briq[J]. Chin Agr Sci Bull, 2013, 29(4): 39
- [13] 孟祥乐, 李红伟, 李颜, 等. 栀子化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(11): 959
MENG XL, LI HW, LI Y, et al. Advances in studies on chemical constituents and pharmacological activities of Gardenia jasminoides[J]. Chin J New Drugs, 2011, 20(11): 959
- [14] 张景, 冯亭亭, 张明柱. UPLC 同时测定淡豆豉中 6 种异黄酮的含量[J]. 中药材, 2016, 39(11): 2566
ZHANG J, FENG TT, ZHANG MZ. UPLC simultaneous determination of 6 kinds of isoflavone in Glycine max[J]. J Chin Med Mater, 2016, 39(11): 2566
- [15] 刘育辰, 陈有根, 王丹, 等. 甘草化学成分研究[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(7): 1251
LIU YC, CHEN YG, WANG D, et al. Studies on chemical constituents on roots of Glycyrrhiza Uralensis[J]. Chin J Pharm Anal, 2011, 31(7): 1251
- [16] 中华人民共和国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 72, 86, 170, 193, 248
ChP 2015. Vol I[S]. 2015: 72, 86, 170, 193, 248

(本文于 2018 年 9 月 11 日修改回)