doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.04.05

UPLC-TUV 同时测定双黄连口服液中 3 种有效成分

陈　静[1,2],张　娜[1,2],张培训[1,2],李雅男[1,2],郭　莉[1,2]

(1.保定冀中药业有限公司,河北保定 071000; 2.河北省中兽药工程技术研究中心,河北保定 071500)

[收稿日期] 2018-11-14　[文献标识码]A　[文章编号]1002-1280 (2019) 04-0033-06　[中图分类号]S853.7

[摘　要]　建立一种超高效液相色谱法同时测定双黄连口服液中黄芩苷、绿原酸、连翘苷的含量的方法。采用 Acquity UPLC H-Class 超高效液相系统,Acquity UPLC TUV 紫外检测器,BEH C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),柱温 25 ℃,流动相乙腈-0.1%甲酸梯度洗脱,流速 0.3 mL/min,进样体积 4 uL,检测波长 278 nm。结果表明,所检测的 3 种成分在测定的质量浓度范围内线性关系良好,*r* 值均大于 0.999,加样回收率在 97%~103%之间,*RSD* 均小于 2.5%。试验精密度、重复性、准确性和稳定性良好。该方法简单、高效,灵敏度好,可用于双黄连口服液中 3 种成分的含量测定。

[关键词]　超高效液相色谱;双黄连口服液;黄芩苷;绿原酸;连翘苷

Simultaneous Determination of 3 Major Components of Shuanghuanglian Oral Liquid by UPLC-TUV

CHEN Jing[1,2], ZHANG Na[1,2], ZHANG Pei-xun[1,2], Li Ya-nan[1,2], Guo Li[1,2]

(1. *Baoding Jizhong Pharmaceutical co. LTD. Baoding*, *Hebei* 071000, *China*;2. *The Engineer Technology Research Center of Chinese Traditional Drug for Animal in Hebei Province*,*Baoding*, *Hebei* 071500, *China*)

Abstract: A detection method of baicalin and chlorogenicacid and forsythin in Shuanghuanglian Oral Liquid. The analysis was performed on a Waters BEH C18 column (2.1 mm×100 mm, 1.7μm) using acetonitrile-0.1% formic acid as mobile phase, with a gradient elution at the flow rate of 0.30 mL/min. The column temperature was maintained at 25 ℃, and the detection wavelength was 278 nm by Acquity UPLC detector includes. The calibration curves were linear in certain ranges for three compounds (r>0.999) respectively. The average recovery was 97%~103% and *RSD* were both less than 2.5%. This method was accurate and simultaneous analysis, which can be provided a reliable way for the quality control of Shuanghuanglian Oral Liquid.

Key words: UPLC-TUV; Shuanghuanglian Oral Liquid; baicalin; chlorogenicacid; forsythin

双黄连口服液临床用药广泛,是目前抗病毒、治疗呼吸道感染性疾病的首选药之一。《中华人民共和国兽药典》2015 版采用 2 种流动相分别检测黄芩苷、绿原酸、连翘苷的含量,过程复杂、耗时较长[1]。贺国彬等[2-4]建立了 HPLC 同时检测双黄连制剂中多种成分的方法,大大缩短了更换流动相需

基金项目: 国家重点研发计划课题:调节畜禽免疫功能的现代中兽药产品创新(2017YFD0501505)

作者简介: 陈　静,硕士研究生,从事新兽药研发工作。E-mail:cj20100301@ 163.com

要的配制及平衡时间,但是由于 HPLC 系统自身的特点,单针样品的分析周期仍在 60 min 以上。近年来,顾媛媛[5-7]等人采用 UPLC-MS 或 UPLC-MS-MS 的方法对双黄连制剂中 3 种或多种有效成分进行了含量测定方法的摸索,极大提高了灵敏度和工作效率,可由于质谱仪高昂的价格及检测费用使这些方法仅停留在研究阶段,难以推广应用。本试验在前期研究的基础上,建立了 UPLC-TUV 同时测定双黄连口服液黄芩苷、绿原酸、连翘苷的含量的分析方法,该方法准确、快速、灵敏度高,为双黄连口服液多成分的快速分析奠定了基础。

1　材料与方法

1.1　仪器和试药　Acquity UPLC H-Class 超高效液相系统,Acquity UPLC TUV 紫外检测器,BEH C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),Masslynx 色谱工作站(美国 Waters 公司)、CPA225D 电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。黄芩苷对照品(批号:Z0271705,纯度为 96.8%),绿原酸对照品(批号:Z0261702),连翘苷对照品(批号:110821-201615,纯度为 94.9%)均购自中国兽医药品监察所。双黄连口服液(保定冀中药业有限公司,规格:100 mL/瓶,批号:201810008),乙腈(Merck 公司,色谱纯),甲酸(Fisher Scientific,色谱纯,批号:106055A)

1.2　方法

1.2.1　色谱条件　以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;乙腈(A)-0.1%甲酸(B)梯度洗脱(0~0.3 min,5%~10%A;0.3~2.0 min,10%~10%A;2.0~4.0 min,10%~13%A;4.0~4.01 min,13%~15%A;4.01~9.0 min,15%~15%A;9.0~12.0 min,15%~20%A;12.0~15.0 min,20%~25%A;15.0~20.0 min,25%~80%A;20.0~20.01 min,80%~5%A;);检测波长为 278 nm,流速:0.3 mL/min,柱温:25 ℃。

1.2.2　对照品溶液的制备　取黄芩苷对照品、绿原酸对照品、连翘苷对照品适量,精密称定,加甲醇分别制成每 1 mL 含黄芩苷 150 μg、绿原酸 9 μg、连翘苷 6.0 μg 的储备液。再分别精密量取各个对照品储备液,加 30%甲醇制成每 1 mL 含黄芩苷 5 μg、绿原酸 0.3 μg、连翘苷 0.2 μg 的混合对照品溶液。

1.2.3　供试品溶液的制备　精密量取双黄连口服液 1 mL,置 50 mL 量瓶中,加 50%甲醇定容至刻度,摇匀,再精密量取 1 mL 加 50%甲醇稀释至 10 mL,摇匀,再精密量取 1 mL 加 30%甲醇稀释至 8 mL,摇匀,过滤,即得。

1.2.4　阴性双黄连口服液的制备　参照《中华人民共和国兽药典》2015 版二部分别制备缺黄芩、缺金银花和缺连翘的阴性双黄连口服液。

2　结果和分析

2.1　方法学考察

2.1.1　专属性　通过对比双黄连口服液样品和自行制备的各个阴性样品,记录色谱图,结果表明在与黄芩苷对照品(保留时间 13.15 min)、绿原酸对照品(保留时间 2.45 min)、连翘苷对照品(保留时间 14.05 min)保留时间一致处,双黄连口服液中均见相对应的色谱峰。同时各阴性样品在与 3 种对照品保留时间一致处无干扰(图 1),因此,该方法的专属性良好。

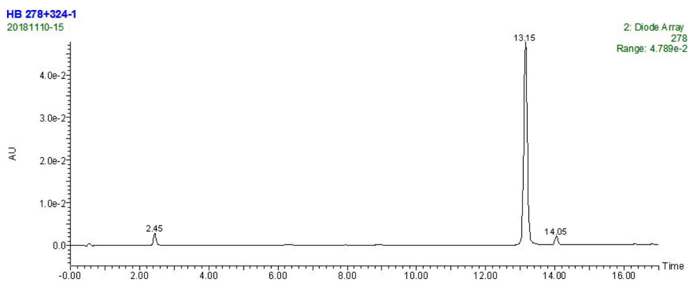


图 1　混合对照品超高效液相色谱图

Fig 1　UPLC chromatograms of mixed standards

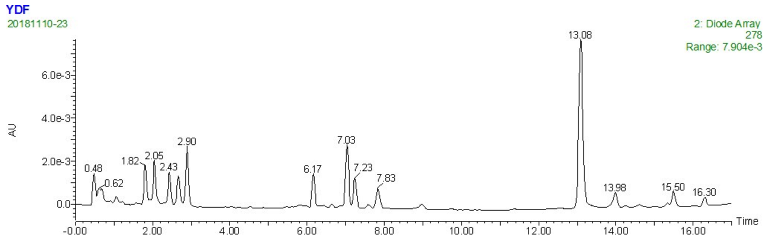
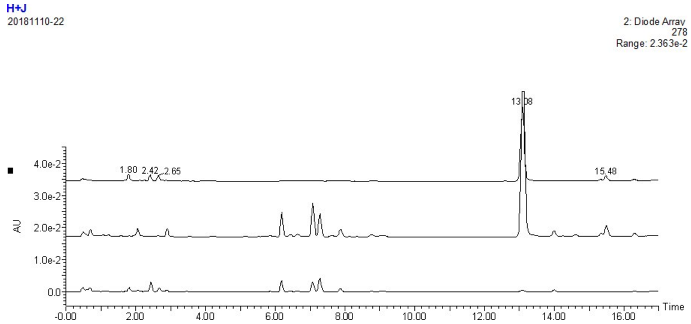


图 2　双黄连口服液超高效液相色谱图

Fig 2　UPLC chromatograms of Shuanghuanglian Oral Liquid



1:缺连翘阴性; 2:缺金银花阴性; 3:缺黄芩阴性

图 3　缺味阴性样品超高效液相色谱图

Fig 3　UPLC chromatograms of negative samples

2.1.2　线性　精密量取 1.2.2 项下的各对照品的储备液各 1 mL,加 30%甲醇定容至 10 mL,即得到黄芩苷、绿原酸、连翘苷浓度分别为 15、0.9、0.6 μg/mL 的混合对照品溶液母液。精密量取上述溶液 0.5、1、2、3 mL 置 5 mL 量瓶中,加 30%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得黄芩苷浓度为 1.5、3、6、9、15 μg/mL,绿原酸浓度为 0.09、0.18、0.36、0.54、0.9 μg/mL,连翘苷浓度为 0.06、0.12、0.24、0.36、0.6 μg/mL 的标准曲线溶液。照 1.2.1 液相条件测定,并计算回归方程和相关系数,见表 1。

表 1　3 种对照品的线性关系考察

Tab 1　Liner range, regression equation and limit of 3 standards

化合物	线性方程	相关系数	线性范围
黄芩苷	$y=501.42x-221.13$	$R=0.999$	6～60 ng
绿原酸	$y=488.06x+7.8652$	$R=0.999$	0.36～3.6 ng
连翘苷	$y=174.28x+0.6486$	$R=0.999$	0.24～2.4 ng

2.1.3　精密度　取供试品溶液,连续进样 6 次测定。经计算黄芩苷、绿原酸、连翘苷的峰面积 *RSD* 分别为 0.16%、0.15%、0.06%,表明该方法精密度良好。

2.1.4　重复性　按 1.2.3 项下方法制备 6 份供试品溶液,测得该批产品中黄芩苷、绿原酸、连翘苷的平均含量分别为 15、0.9、0.7 mg/mL,*RSD* 分别为 0.62%、0.28%、0.69%,结果表明该方法的重复性良好。

2.1.5　稳定性　取 2.4 项下的同一份供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样测定,测得黄芩苷、绿原酸、连翘苷峰面积的 *RSD* 分别为 0.52%、0.65%、0.96%,结果显示黄芩苷、绿原酸、连翘苷在 12 h 内稳定。

2.1.6　准确度　精密量取已知含量的双黄连口服液样品,分别按约 80%,100%,120%比例加入 3 种质量浓度的对照品溶液,按 1.2.3 项下制备供试品溶液,按 1.2.1 项下色谱条件,分别注入色谱仪测定,每个浓度各分别制备 3 份供试品溶液进行测定,计算回收率和 *RSD*,结果见表 2。3 种物质的加样回收率均在 97%～103%之间,*RSD* 均小于 2.5%。

表 2　双黄连口服液 3 种成分加样回收率试验结果(n=9)

Tab 2　Recovery results of 3 compands in Shuanghuanglian Oral Liquid(n=9)

化合物	本底值/mg	加入值/mg	回收率/%	平均回收率/%	*RSD*/%
黄芩苷	7.55	6.00	97.83	99.4	1.2
			99.33		
			98.33		
		7.50	100.67		
			100.93		
			98.67		
		9.06	99.12		
			101.21		
			98.56		
绿原酸	0.75	0.60	96.67	98.8	1.9
			98.33		
			101.67		
		0.75	98.67		
			96.00		
			100.00		
		0.90	97.78		
			101.11		
			98.89		
连翘苷	0.46	0.36	102.78	99.5	2.4
			97.22		
			97.22		
		0.45	102.22		
			100.00		
			97.78		
		0.55	101.82		
			96.36		
			100.00		

2.2　含量测定　取 3 批双黄连口服液样品,按照上述所建立的色谱方法采用外标法测定。同时与采用《中华人民共和国兽药典》2015 版二部收载的含量测定方法比较,结果显示 2 种方法测定结果基本一致,相对偏差均小于 2%,见表 3。

3　讨论与结论

3.1　检测波长的选择　据文献报道,结合紫外可见全波段扫描发现,黄芩苷和绿原酸的最大吸收波长分别为 278 nm [8] 和 327 nm [9],连翘苷的最大吸收波长为 228 nm 和 277 nm [10],样品中连翘苷含量较低,且在 278 nm 处黄芩苷和绿原酸有较好的紫外吸收。因此,选择 278 nm 吸收波长作为检测波长,既满足了 3 种成分的检测灵敏度需要,又达到了简化检测方法的目的。

表 3　2 种方法含量测定结果比较

Tab 3　Determinnstion results of comparision of the two methods

批号	化合物	UPLC/(mg · mL^{-1})	HPLC/(mg · mL^{-1})	相对偏差/%
201810012	黄芩苷	15.82	15.72	0.32%
	绿原酸	1.65	1.70	1.5%
	连翘苷	0.96	0.94	1.05%
201810013	黄芩苷	15.40	15.26	0.46
	绿原酸	1.72	1.67	1.47
	连翘苷	0.82	0.79	1.86
201810014	黄芩苷	16.40	16.27	0.40
	绿原酸	1.55	1.49	1.97
	连翘苷	0.84	0.86	1.18

3.2　流动相的选择　对比甲醇-0.1%甲酸和乙腈-0.1%甲酸流动相的分离效果,发现乙腈-0.1%甲酸为流动相时绿原酸峰的拖尾得到明显改善,同时黄芩苷的峰形较理想,并通过优化梯度洗脱的程序使各目标峰的分离度、峰形均符合要求。

3.3　进样溶液的选择　试验发现,进样溶液的甲醇浓度对绿原酸色谱峰的峰形影响显著,以 30%甲醇为进样溶液时峰形尖锐、对称,分离度良好。最终确定 30%甲醇作为进样溶液。

3.4　供试品溶液稳定性考察　我们在进行供试品溶液稳定性考察时发现:黄芩苷的含量在 24 h 开始降低,同时在保留时间 18 min 处,有一新物质峰生成,且该新物质峰随着黄芩苷含量的降低峰面积逐渐增大,因此该供试品溶液在 12 h 内稳定。

3.5　结论　本方法建立了 UPLC-TUV 法检测双黄连口服液中 3 种有效成分的方法,前处理简单,快速、准确、重现性好,可用于双黄连口服液的质量控制,为快速有效地控制双黄连口服液提供新的方法。

参考文献:

[1]　中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版二部[S].
The Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. The Veterinary Pharmacopoeia of the People´s Republic of China, 2015[S].

[2]　贺国彬,李津明,赵金凤,等. HPLC 法同时测定双黄连口服液中的质控成分含量[J]. 黑龙江医药, 2014, 27(1) : 3-6.
He G B, Li J M, Zhao J F , *et al*. Simultaneous determination of the content of Shuanghuanglian oral QC ingredients by HPLC method[J]. Heilongjiang Medicine Journal, 2014,27(1):3-6.

[3]　Yang D Z, An Y Q, Jiang X L, *et al*. Development of anovel method combining HPLC fingerprint and multiingredients quantitative analysis for quality evaluation of traditional Chinese medicine preparation[J]. Talanta, 2011, 85(2) : 885.

[4]　宁科贤,黄燕萍. HPLC 同时测定双黄连颗粒中绿原酸、木犀草苷、连翘苷和黄芩苷的含量[J]. 中国药房, 2014, 24(40): 3819-3821.
Ning K X, Huang Y P. Content determination of chlorogenic Acid,Luteolin,Forsythin and Baicalin in Shuanghuanglian granules by HPLC[J]. China Pharmacy,2014,25(40):3819-3821.

[5]　顾媛媛,李殿明,徐红英, 等. 双黄连粉针剂 UPLC-MS 指纹图谱的建立及聚类分析[J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(6):91-94.
Gu Y Y, Li D M, Xu H Y, *et al*. Establishment and cluster analysis of UPLC-MS fingerprint of Shuanghuanglian powder-injection[J]. Chinese Journal of Information on TCM,2015,22(6): 91-94.

[6]　罗 玲,黄玉婵,黄 琴,等. UPLC-MS-MS 同时测定双黄连粉针中 7 种活性成分[J].中国实验方剂学杂志. 2014, 20(13): 80-84.
Luo L, Huang Y C, Huang Q, *et al*. Simultaneous determination of seven components in Shuanghuanglian injection powder by UPLC-MS-MS[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2014, 20(13):80-84.

[7]　刘 廷,狄留庆,彭琳秀,等. UPLC-MS/MS 同时测定双黄连口服液中 17 种有效成分[J]. 中草药, 2015, 46(22):3357-

3363.

Liu T, Di L Q, Peng L X, *et al*. Simultaneous determination of 17 Major components of Shuang－Huang－Lian Oral Liquid by UPLC－MS/MS [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2015, 46(22):3357-3363.

[8] 何自强,张惠玲,李传坤. 黄芩中黄芩苷提取的工艺研究[J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2016,40(3):73-79.

He Z Q, Zhang H L, Li C K. Research on extracting technology of baicalin from *Scutellaria baicalensis* Georgi[J]. Journal of Anhui University(Natural Science Edition), 2016,40(3):73-79.

[9] 肖文平,李 娟. 金银花中绿原酸的提取和含量测定[J]. 安徽农业科学,2011,39(35):21675-21676.

Xiao W P, Li J. Extraction and quantitative determination of chlorogenic acid from flos lonicerae japonicae [J]. Journal of Anhui Agri.Sci, 2011,39(35):21675-21676.

[10] 赵建斌,柴建新,张俊英,等. 银翘解毒胶囊中连翘苷和牛蒡苷含量的测定[J]. 山西中医, 2016,32(11):53-57.

Zhao J B, Chai J X, Zhang J Y, *et al*. Determination of contents of forsythin and arctiin in Yinqiao Jiedu capsules[J]. Shanxi of TCM, 2016,32(11):53-57.

(编 辑:陈 希)