

UPLC 快速检测连花清瘟胶囊水提液中多成分的含量

张永锋, 刘敏彦, 李正杰, 许红辉, 柏艳柳(石家庄以岭药业股份有限公司, 石家庄 050035)

摘要: 目的 建立连花清瘟胶囊水提工艺中间体快速含量测定方法。方法 采用 UPLC 测定新绿原酸、绿原酸、甘草苷、3,4-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、甘草酸的含量。色谱柱为 ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相为甲醇-乙腈-0.1%磷酸; 检测波长: 237 nm。结果 新绿原酸在 4.32~21.6 ng 内线性良好($r=0.999\ 8$)、绿原酸在 6.82~34.08 ng 内线性良好($r=0.999\ 8$)、甘草苷在 2.49~9.33 ng 内线性良好($r=0.999\ 8$)、3,4-二咖啡酰奎宁酸在 16.35~81.76 ng 内线性良好($r=0.999\ 7$)、4,5-二咖啡酰奎宁酸在 14.42~72.08 ng 内线性良好($r=0.999\ 7$)、甘草酸在 4.19~20.96 ng 内线性良好($r=0.999\ 6$), 平均回收率($n=6$)分别为 97.10%, 96.66%, 97.34%, 98.98%, 98.97%, 97.80%, RSD 分别为 0.82%, 1.30%, 1.31%, 1.17%, 1.63%, 1.73%。结论 本方法简便、快速、准确, 可有效地控制连花清瘟胶囊水提液的质量。

关键词: 连花清瘟胶囊; 质量标准; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)01-0078-03

Rapid Determination of Ingredients in Water Extract of Lianhua Qingwen Capsule by UPLC

ZHANG Yongfeng, LIU Minyan, LI Zhengjie, XU Honghui, BAI Yanliu(Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a fast determination method for Lianhua Qingwen capsule water extraction process intermediates. **METHODS** UPLC method was used to determine the content of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, liquiritin, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid, glycyrrhizic acid. The chromatographic conditions were the ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); the mobile phase was methanol-acetonitrile-0.1% phosphoric acid; the detection wavelength was set at 237 nm. **RESULTS** Neochlorogenic acid in 4.32–21.6 ng($r=0.999\ 8$), chlorogenic acid in 6.82–34.08 ng($r=0.999\ 8$), liquiritin in 2.49–9.33 ng($r=0.999\ 8$), 3,4-dicaffeoylquinic acid in 16.35–81.76 ng($r=0.999\ 7$), 4,5-dicaffeoylquinic acid in 14.42–72.08 ng ($r=0.999\ 7$), glycyrrhizic acid in 4.19–20.96 ng ($r=0.999\ 6$) had good linearity. The average recoveries were 97.10%, 96.66%, 97.34%, 98.98%, 98.97%, 97.80%, RSD were 0.82%, 1.30%, 1.31%, 1.17%, 1.63%, 1.73%($n=6$), respectively. **CONCLUSION** The quantitative method is simple, rapid, accurate. This method can effectively control the quality of Lianhua Qingwen capsule water extract.

KEY WORDS: Lianhua Qingwen capsule; quality standard; HPLC

连花清瘟胶囊是石家庄以岭药业股份有限公司研发的六类中药新药, 具有清瘟解毒、宣肺泄热的功效^[1], 适用于流行性感的治疗, 已列入国家医保乙类目录, 被卫生部《人禽流感诊疗方案》列入治疗人禽流感推荐用药^[2]。为了能够有效的控制产品质量, 保证公众的用药安全, 必须对生产工艺的中间环节进行质量控制, 而采用 HPLC 检验周期长^[3], 无法满足连续生产的需要, UPLC 具有高效、快速的优点, 克服了 HPLC 的缺点。本实验采用 UPLC 建立了快速检测连花清瘟胶囊水提液中多成分的含量方法, 可以有效控制产品质量, 并满足连续生产的要求。

1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC H-class-PDA 高效液相色谱

仪(美国 Waters); AT201 十万分之一分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO)。Empower 3 Build 3471 工作站; 色谱柱: ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); Milli-Q Advantage A10 超纯水系统(Millipore)。

连花清瘟胶囊(石家庄以岭药业股份有限公司, 批号: 121201, 121202, 121203, 规格: 0.35 g·粒⁻¹); 绿原酸、(R,S)-告依春、甘草苷、甘草酸铵对照品(中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110753-200413, 111753-201103, 111610-201005, 110731-200614, 纯度均≥98%); 新绿原酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸对照品(成都曼斯特生物科技有限公司, 批号分别为 MUST-11112202、MUST-11083102、MUST-11081803,

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项(2011ZX09201-201-27)

作者简介: 张永锋, 男, 工程师 Tel: (0311)85901768-8831 E-mail: a8775@126.com

纯度均 $\geq 98\%$);乙腈、甲醇为色谱纯,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: ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m);检测波长: 237 nm;流动相: 5%甲醇(A)-乙腈(B)-0.1%磷酸(C)溶液梯度洗脱(0~3 min, 5%B, 90%C; 3~8 min, 5%B \rightarrow 40%B, 90%C \rightarrow 55%C; 8~11 min, 40%B \rightarrow 85%B, 55%C \rightarrow 10%C; 11~11.5 min, 85%B \rightarrow 5%B, 10%C \rightarrow 90%C; 11.5~13 min, 5%B, 90%C);流速: 0.4 mL \cdot min⁻¹;理论板数以绿原酸峰计不低于 5 000。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取绿原酸、(R,S)-告依春、甘草苷、甘草酸铵、新绿原酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸对照品适量,加 70%甲醇制成每 1 mL 分别含 17, 5, 6, 10, 11, 41, 36 μ g 的溶液,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液的制备

量取莲花清瘟胶囊按制备工艺提取的水提液 5 mL 至 10 mL 量瓶中,加水 4 mL 摇匀,超声处理 10 min,水稀释至刻度,0.2 μ m 滤膜过滤,即得。

2.4 检测波长的选择

对各对照品溶液进行光谱检测,从光谱图上可见,在 237 nm 处均有较大吸收,并且考虑到样品中这几种成分的含量,所以选择 237 nm 作为检测波长。

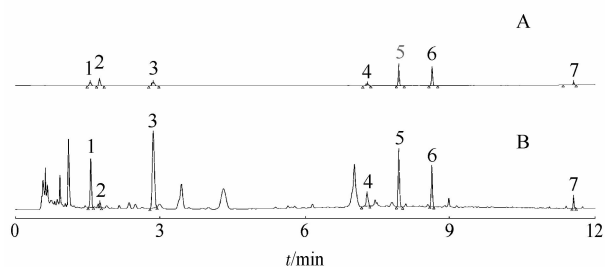


图 1 HPLC 色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液; 1-新绿原酸; 2-告依春; 3-绿原酸; 4-甘草苷; 5-3,4-二咖啡酰奎宁酸; 6-4,5-二咖啡酰奎宁酸; 7-甘草酸铵

Fig 1 HPLC chromatograms

A-standard solution; B-sample solution; 1-neochlorogenic acid; 2-epigallocatechin gallate; 3-chlorogenic acid; 4-liquiritin; 5-3,4-dicaffeoylquinic acid; 6-4,5-dicaffeoylquinic acid; 7-glycyrrhizic acid

2.5 标准曲线

分别精密吸取 10.8 μ g \cdot mL⁻¹ 新绿原酸、

17.04 μ g \cdot mL⁻¹ 绿原酸、6.22 μ g \cdot mL⁻¹ 甘草苷、40.88 μ g \cdot mL⁻¹ 3,4-二咖啡酰奎宁酸、36.04 μ g \cdot mL⁻¹ 4,5-二咖啡酰奎宁酸、10.48 μ g \cdot mL⁻¹ 甘草酸铵对照品溶液 0.4, 0.8, 1, 1.5, 2 μ L 注入高效液相色谱仪,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程,结果见表 1。

表 1 标准曲线

Tab 1 Standard curve

检测成分	标准曲线	线性范围/ ng	r
新绿原酸	$Y=4\ 833.888\ 2X-15.831\ 2$	4.32~21.6	0.999 8
绿原酸	$Y=4\ 068.808\ 7X+138.750\ 0$	6.82~34.08	0.999 8
甘草苷	$Y=4\ 899.275\ 3X+58.418\ 8$	2.49~9.33	0.999 8
3,4-二咖啡酰奎宁酸	$Y=4\ 079.060\ 3X-44.662\ 4$	16.35~81.76	0.999 7
4,5-二咖啡酰奎宁酸	$Y=4\ 017.029\ 7X+233.125\ 0$	14.42~72.08	0.999 7
甘草酸铵	$Y=1\ 499.704\ 9X+23.525\ 8$	4.19~20.96	0.999 6

2.6 仪器精密度试验

吸取对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样 5 次,测定峰面积,结果新绿原酸、绿原酸、甘草苷、3,4-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、甘草酸铵对照品峰面积的 RSD 分别为 0.50%, 0.55%, 0.94%, 0.90%, 0.61%, 1.06%,说明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

吸取供试品溶液,于 0, 2, 6, 12, 24 h 进样,测定峰面积,结果供试品中新绿原酸、绿原酸、甘草苷、3,4-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、甘草酸铵对照品峰面积的 RSD 分别为 0.28%, 0.43%, 0.80%, 0.55%, 0.79%, 0.92%,说明供试品溶液 24 h 内稳定。

2.8 重复性试验

取同一批样品,按“2.3”项下方法处理 6 份,测定样品中新绿原酸、绿原酸、甘草苷、3,4-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、甘草酸铵的含量,含量平均值分别为 0.301 4, 0.143 4, 0.188 8, 0.323 7, 0.181 1, 0.219 0 mg \cdot mL⁻¹,RSD 分别为 1.39%, 1.49%, 1.06%, 0.82%, 1.08%, 0.65%,说明方法重复性良好。

2.9 回收率试验

采用加样回收试验,量取提取液 6 份,每份 2.5 mL,分别加入对照品溶液 2.5 mL,按“2.2.3”

项下方法处理后, 依法测定, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 回收率试验结果($n=6$)

Tab 2 Results of recovery tests($n=6$)

组分	已知量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
新绿原酸	0.753 5	0.748 0	1.472 1	96.07	97.10	0.82
	0.753 5	0.748 0	1.481 6	97.34		
	0.753 5	0.748 0	1.488 5	98.26		
	0.753 5	0.748 0	1.476 9	96.71		
	0.753 5	0.748 0	1.476 2	96.62		
绿原酸	0.753 5	0.748 0	1.483 7	97.62	96.66	1.30
	0.358 5	0.369 5	0.713 4	96.05		
	0.358 5	0.369 5	0.717 6	97.19		
	0.358 5	0.369 5	0.723 5	98.78		
	0.358 5	0.369 5	0.710 3	95.21		
甘草苷	0.3585	0.369 5	0.712 8	95.89	97.34	1.31
	0.358 5	0.369 5	0.716 2	96.81		
	0.472 0	0.478 0	0.935 7	97.01		
	0.472 0	0.478 0	0.929 1	95.63		
	0.472 0	0.478 0	0.942 5	98.43		
3,4-二咖啡酰奎宁酸	0.472 0	0.478 0	0.944 4	98.83	98.98	1.17
	0.472 0	0.478 0	0.931 8	96.19		
	0.472 0	0.478 0	0.940 1	97.93		
	0.809 2	0.808 5	1.596 2	97.34		
	0.809 2	0.808 5	1.620 4	100.33		
4,5-二咖啡酰奎宁酸	0.809 2	0.808 5	1.618 5	100.10	98.97	1.63
	0.809 2	0.808 5	1.602 2	98.08		
	0.809 2	0.808 5	1.611 4	99.22		
	0.809 2	0.808 5	1.608 3	98.84		
	0.452 8	0.461 0	0.905 7	98.24		
甘草酸铵	0.452 8	0.461 0	0.913 3	99.89	97.80	1.73
	0.452 8	0.461 0	0.920 1	101.37		
	0.452 8	0.461 0	0.904 2	97.92		
	0.452 8	0.461 0	0.899 4	96.88		
	0.452 8	0.461 0	0.911 6	99.52		
甘草酸铵	0.547 5	0.551 5	1.081 4	96.81	97.80	1.73
	0.547 5	0.551 5	1.092 1	98.75		
	0.547 5	0.551 5	1.098 4	99.89		
	0.547 5	0.551 5	1.093 6	99.02		
	0.547 5	0.551 5	1.082 3	96.97		
	0.547 5	0.551 5	1.073 5	95.38		

2.10 样品测定

按“2.1”项下色谱条件, 依法测定 3 批样品中新绿原酸、绿原酸、甘草苷、3,4-二咖啡酰奎宁

酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、甘草酸铵的含量, 结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果

Tab 3 Results of content determination of samples

组分	含量/mg·mL ⁻¹		
	121201	121202	121203
新绿原酸	0.054	0.060	0.072
绿原酸	0.121	0.120	0.130
甘草苷	0.018	0.018	0.024
3,4-二咖啡酰奎宁酸	0.038	0.042	0.049
4,5-二咖啡酰奎宁酸	0.037	0.038	0.044
甘草酸铵	0.034	0.037	0.040

3 讨论

为了全面保证药品质量, 需要对药品中的多种成分进行监测, 而莲花清瘟胶囊中成分比较多, 如果采用 HPLC 进行中间体检验, 检验周期长, 无法满足连续生产的需要, 因此制订了 UPLC 多成分含量测定的方法。本方法可同时对甘草、金银花、板蓝根中的多种成分进行定量、定性控制, 用较短的分析时间就能够比较全面的监控产品质量。方法简便, 灵敏度较高, 并且减少了有机试剂的使用。

对新绿原酸、绿原酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、甘草苷、甘草酸的光谱进行了分析, 综合考虑各成分的灵敏度、供试品中杂质峰的多少以及分离度等情况, 选择 237 nm 作为检测波长。

在供试品溶液中, 检测到了(R,S)-告依春, 但由于未达到良好的基线分离, 故此未列入含量测定中, 作为一个定性指标进行控制。

REFERENCES

- [1] ZHAO S H, XU H H, LI X Y. TLC and quantitative determination by HPLC for Lianhua Qingwen capsule [J]. Drug Stand China(中国药品标准), 2007, 8(1): 55-59.
- [2] LI H B, XIONG S Y, LI H G. Determination of ephedrine hydrochloride in Lianhua Qingwen capsules by RP-HPLC [J]. China Pharm(中国药业), 2010, 19(11): 11-12.
- [3] XIE B X, LI Z M, CHEN S C. Determination of phillyrin and ephedrine hydrochloride in Lianhua Qingwen capsules by HPLC [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2010, 41(9): 690-691, 713.

收稿日期: 2013-04-06