

HPLC 法监测金英黄归汤制备过程中绿原酸和连翘酯苷 A 含量

周送桂^{1,2}, 何 璐¹, 肖 序³, 李 欣³, 张小艺³, 王 鲁¹(1. 贵州大学 贵州省生化工程中心, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州大学动物科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: **目的** 采用高效液相色谱(HPLC)法建立绿原酸和连翘酯苷 A 的含量测定方法, 并对制备过程中绿原酸和连翘酯苷 A 含量进行监测, 为金英黄归汤制备工艺改进提供质控标准。**方法** 采用 Hypersil C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 绿原酸和连翘酯苷 A 的流动相分别为乙腈-0.2 %磷酸(11 : 89)与乙腈-0.4 %冰醋酸(17 : 83); 检测波长分别为 327 nm 和 330 nm; 柱温分别为 35 ℃和 30 ℃; 流速分别为 0.8 mL·min⁻¹ 和 1.0 mL·min⁻¹。**结果** 绿原酸和连翘酯苷 A 的线性范围分别为: 13.56~217.00 μg·mL⁻¹ ($r^2=0.9997$), 0.0536~0.2680 mg·mL⁻¹ ($r^2=0.9996$); 稳定性试验 RSD 分别为 0.14 %和 0.47 %; 中间精密密度试验 RSD 分别为 0.63 %和 0.56 %; 重复性试验 RSD 分别为 0.68 %和 1.00 %; 平均回收率分别为绿原酸 99.23 %, RSD 为 0.61 %; 连翘酯苷 A 100.24 %, RSD 为 1.15 %。**结论** 建立的绿原酸和连翘酯苷 A 含量检测方法, 可为金英黄归汤制备过程提供质控数据。

关键词: 金英黄归汤; 绿原酸; 连翘酯苷 A; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2015)01-0109-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.027

Monitoring of Chlorogenic Acid and Forsythoside A Contents During Process of *Jinying Huanggui* Decoction by HPLC

ZHOU Songgui^{1,2}, HE Jun¹, XIAO Xu³, LI Xin³, ZHANG Xiaoyi³, WANG Lu¹(1. Biochemistry Engineering Center of Guizhou Province, Guizhou University, Guiyang 550025 Guizhou, China; 2. College of Pharmacy, Guizhou University, Guiyang 550025 Guizhou, China; 3. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025 Guizhou, China)

Abstract: **Objective** To establish the determination method for chlorogenic acid and forsythoside A in *Jinying Huanggui* decoction by HPLC, thus to provide the quality control standard for the improved product technology of *Jinying Huanggui* decoction. **Methods** Hypersil C₁₈ column(150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase of chlorogenic acid was acetonitrile-0.2% phosphonic acid solution(11 : 89) and that of forsythoside A was acetonitrile -0.4 % glacial acetic acid(17 : 83). The detection wavelength for chlorogenic acid and forsythoside A was set at 327 nm and 330 nm, the column temperature was 35 ℃ and 30 ℃, and the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹ and 1.0 mL·min⁻¹, respectively. **Results** The linear range of chlorogenic acid and forsythoside A in the established method was 13.56 ~ 217.00 μg·mL⁻¹ ($r^2=0.9997$) and 0.0536 ~ 0.2680 mg·mL⁻¹ ($r^2=0.9996$), RSD of stability test was 0.14% and 0.47%, RSD of intermedial precision test was 0.63% and 0.56%, and RSD of the repeatability test was 0.68% and 1.00%, respectively. The average recovery of chlorogenic acid was 99.23%, RSD being 0.61%, and that of forsythoside A was 100.24%, RSD being 1.15%. **Conclusion** The determination method for chlorogenic acid and forsythoside A has been established, and the method will provide evidence for the quality control of *Jinying Huanggui* decoction preparation process.

Keywords: *Jinying Huanggui* decoction; Chlorogenic acid; Forsythoside A; High performance liquid chromatography (HPLC); Content determination

收稿日期: 2014-07-18

作者简介: 周送桂, 女, 硕士研究生, 研究方向: 药物化学。Email: 565345638@qq.com。通讯作者: 王鲁, 教授, 博士, 研究方向: 中兽医学及中药药理学研究。Email: wanglu7007@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060347)。

金英黄归汤是我们在前期研究中筛选获得具有良好抗炎和免疫增强作用的组方^[1],由金银花、蒲公英、大黄、当归等8味中药按一定比例组成。在该配方中金银花、蒲公英、瓜蒌为主药,金银花主要有效成分绿原酸是一种重要的生理活性物质,具有抗菌、抗病毒、升高白细胞、保肝利胆、抗肿瘤、降血压、降血脂、清除自由基等作用^[2]。绿原酸也能减弱系统性高迁移族蛋白B1(HMGB1)在体内的积累,预防由内毒素血症和多种微生物的脓毒症引起的死亡率^[3]。此外,连翘酯苷A作为一种酚性成分,一直以来都被视为连翘的主要有效成分,但其结构较为复杂,遇酸、碱或高温等不稳定,易引起分解,所以对其含量进行检测,更加显得重要^[4]。本实验采用高效液相色谱(HPLC)法对金英黄归汤中绿原酸和连翘酯苷A含量进行测定,建立了金英黄归汤中绿原酸和连翘酯苷A的含量测定方法;并对金英黄归汤的制备过程中绿原酸和连翘酯苷A的含量进行监测,以期为该制剂的质量控制提供一定的参考依据,也为后期对金英黄归汤的制备工艺的优化奠定基础。

1 材料

1.1 药物及试剂 金银花、蒲公英、当归、大黄等8味中药,2013年购于贵阳市同济堂药店;芙蓉花,2013年10月采自贵阳花溪湿地公园;绿原酸对照品,中国食品药品检定研究院,批号:119753-201314,纯度>96.65;甲醇,为色谱纯,天津市科密化学试剂有限公司;乙腈、磷酸等有机化学试剂,均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器 Agilent Technologies 1260 Infinity 液相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;旋转蒸发器(RE-5298),上海亚荣生化仪器厂;超声波清洗机,上海冠特超声仪器有限公司。

2 方法与结果

2.1 金英黄归汤制备^[5] 将8味中药按比例混合,称取150 g,加入50%乙醇1500 mL浸泡30 min,回流提取2 h,多层纱布过滤。药渣再加1200 mL的50%乙醇,回流提取1.5 h,多层纱布过滤,合并滤液,旋转蒸发至无醇味后定容至1.0 g·mL⁻¹(为供试品溶液1)。加入石油醚萃取,水相浓缩至1.0 g·mL⁻¹(为供试品溶液2)。加乙醇于溶液中连续进行3次醇沉,溶液中乙醇的浓度依次为70%、75%及80%,于4℃进行醇沉24 h,取80%乙醇醇沉后的上清进行52℃旋转蒸发,回收乙醇,将无醇的浓缩液加入注射用水,制备成1.0 g·mL⁻¹的溶液,为澄明透亮的

淡黄色液体状(为供试品溶液3)。加0.5%活性炭,煮沸,搅拌15 min,过滤到热源处理后的量筒中,制备成1 g·mL⁻¹的注射成品,调pH值为7.2,然后过0.22 μm滤膜除菌,即得金英黄归汤注射剂(为供试品溶液4)。

2.2 HPLC 建立绿原酸和连翘酯苷 A 的含量测定方法^[6-11]

2.2.1 标准品溶液制备 分别精密称定2.17 mg绿原酸对照品和2.68 mg的连翘酯苷A对照品,置10 mL的具塞棕色量瓶中,分别加甲醇定容至刻度,即得到浓度分别为0.217 mg·mL⁻¹和0.268 mg·mL⁻¹的绿原酸对照品溶液和连翘酯苷A对照品溶液(10℃以下保存)。

2.2.2 供试品溶液制备 分别精密量取金英黄归汤0.05 mL,置于25 mL的具塞锥形瓶中,分别精密加入绿原酸流动相和连翘酯苷A流动相各4.95 mL,称定质量,超声处理(功率100 W,频率59 kHz)至完全溶解,放冷,再称定质量,分别用绿原酸流动相和连翘酯苷A流动相补足减失的质量,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,摇匀,即得浓度均为10 mg·mL⁻¹的绿原酸供试品溶液和连翘酯苷A供试品溶液。

2.2.3 色谱条件及系统适应性试验 色谱柱均为Hypersil C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm),绿原酸以乙腈-0.2%磷酸(11:89)为流动相,检测波长:327 nm,柱温:35℃,流速:0.8 mL·min⁻¹,进样量:20 μL;连翘酯苷A以乙腈-0.4%冰醋酸(17:83)为流动相,检测波长:330 nm,柱温:30℃,流速:1.0 mL·min⁻¹,进样量:20 μL。依上述色谱条件,分别精密吸取绿原酸对照品溶液及供试品溶液、连翘酯苷A对照品溶液及供试品溶液各20 μL,分别进样。结果见图1。

2.2.4 线性关系考察 用上述配置的绿原酸对照品采用二倍稀释法配制成为5个梯度的对照品,即浓度依次为217.00, 108.50, 54.25, 27.13, 13.56 μg·mL⁻¹。用上述配置的连翘酯苷A对照品配制成为5个梯度的对照品,即浓度依次为0.2680, 0.1340, 0.0893, 0.0670, 0.0536 mL·min⁻¹。依次分别精密量取各20 μL,按上述各自的色谱条件依次测定,记录峰面积,分别以绿原酸对照品浓度、连翘酯苷A对照品浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线。得到绿原酸回归方程为:Y=61663X+237.61, r²=0.9997,连翘酯苷A回归方程为:Y=24742X+126.18, r²=0.9996,表明绿原酸、连翘酯

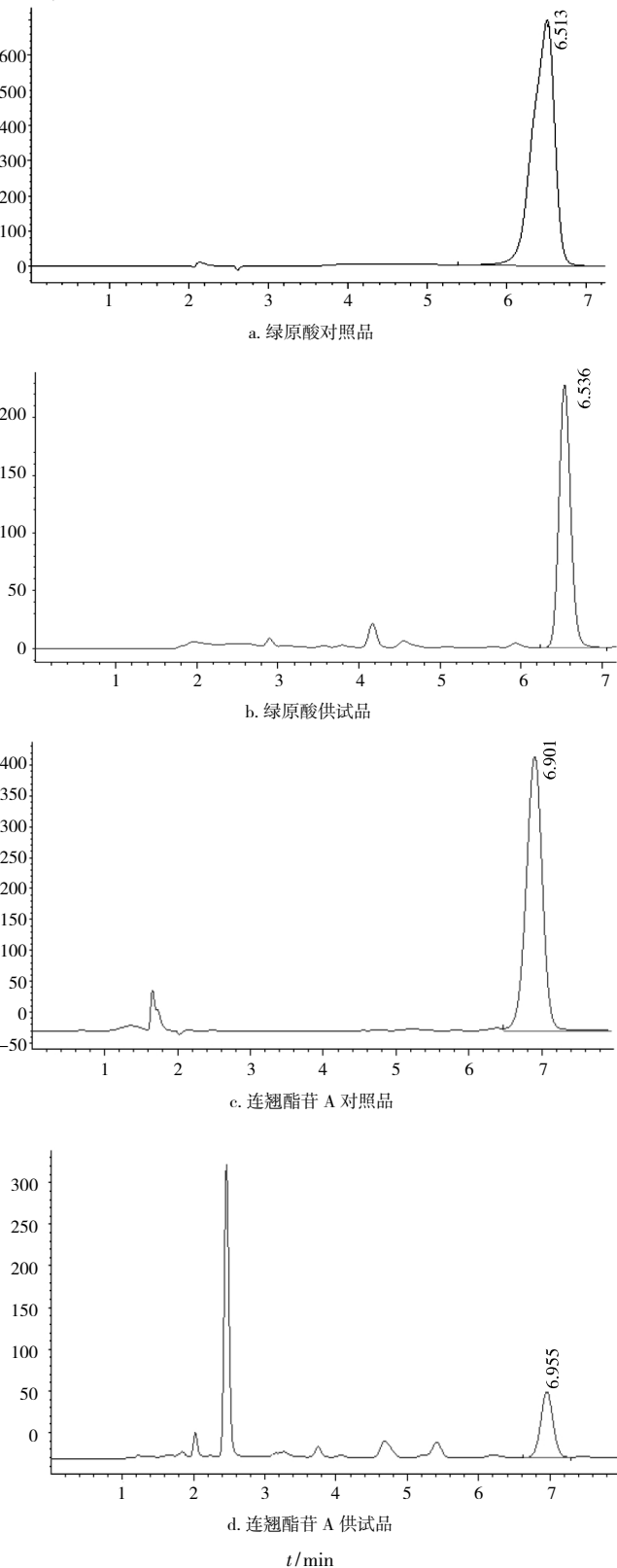


图 1 金英黄归汤各成分 HPLC 色谱图

Figure 1 The HPLC chromatogram of Jinying Huanggui decoction

苷 A 分别在 13.56 ~ 217.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内及 0.0536 ~ 0.2680 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好。

2.2.5 稳定性试验 取上述制备的绿原酸供试品溶液及连翘酯苷 A 供试品溶液，分别在 0，2，4，6，10 h

进样 20 μL ，记录峰面积，计算绿原酸供试品溶液及连翘酯苷 A 供试品溶液的 RSD 值分别为 0.14 % 与 0.47 %，说明 10 h 内仪器稳定性好。

2.2.6 中间精密度试验 分别取上述制备的绿原酸供试品溶液及连翘酯苷 A 供试品溶液，进样 20 μL ，连续进样 5 次，记录峰面积积分值，计算绿原酸供试品溶液及连翘酯苷 A 供试品溶液的 RSD 值分别为 0.63 % 和 0.56 %，说明仪器精密度较好。

2.2.7 重复性试验 量取金英黄归汤 5 份，按照按 2.2.2 项下的方法制备供试品溶液。分别进样 20 μL 测定，记录峰面积积分值，计算绿原酸供试品溶液的 RSD 值为 0.68 %，连翘苷 A 供试品溶液的 RSD 值为 1.00 %，表明本方法重复性较好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取 2.2.2 项配置的绿原酸供试品溶液及连翘酯苷 A 供试品溶液各 6 份，每份为 1 mL，每两份分别精密加入含量为 1 mL 的供试品中绿原酸及连翘酯苷 A 含量的 80 %、100 %、120 % 的上述配置的绿原酸对照品与连翘酯苷 A 对照品。分别进样 20 μL 测定，计算得绿原酸的平均回收率为 99.23 %，RSD 为 0.61 %；连翘酯苷 A 的平均回收率为 100.24 %，RSD 为 1.15 %。见表 1 及表 2。

表 1 绿原酸加样回收率实验结果

Table 1 Results of recovery test of chlorogenic acid							
编号	供试品加入量/mL	供试品含绿原酸量/mg	加入绿原酸量/mg	测定绿原酸量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	1.00	0.0391	0.0313	0.0695	98.72	99.23	0.61
2	1.00	0.0391	0.0313	0.0704	100.00		
3	1.00	0.0391	0.0391	0.0773	98.85		
4	1.00	0.0391	0.0391	0.0774	98.98		
5	1.00	0.0391	0.0469	0.0860	100.00		
6	1.00	0.0391	0.0469	0.0850	98.84		

表 2 连翘酯苷 A 加样回收率实验结果

Table 2 Results of recovery test of forsythoside A							
编号	供试品的加入量/mL	供试品含连翘酯苷 A 量/mg	加入连翘酯苷 A 量/mg	测定连翘酯苷 A 量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	1.00	0.0369	0.0295	0.0672	101.20	100.24	1.15
2	1.00	0.0369	0.0295	0.0676	101.81		
3	1.00	0.0369	0.0369	0.0733	99.32		
4	1.00	0.0369	0.0369	0.0737	99.86		
5	1.00	0.0369	0.0443	0.0816	100.49		
6	1.00	0.0369	0.0443	0.0802	98.77		

2.3 金英黄归汤制备过程中绿原酸、连翘酯苷 A 的含量测定 对于金英黄归汤的整个制备流程(见 2.1 项)中各阶段所得的供试品溶液，分别按 2.2.2 下的方法制备成供试品溶液 1，2，3，4。分别按上述绿

原酸和连翘酯苷 A 的色谱条件进行 HPLC 分析, 每种供试品溶液分别连续进样 5 次, 测定各指标成分的峰面积并计算含量。见表 3 及表 4。

表 3 金英黄归汤制备过程中绿原酸含量测定结果($\bar{x} \pm s$)
Table 3 The assay results of chlorogenic acid content in the product process of *Jinying Huanggui* decoction

样品	n	绿原酸含量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%
供试品溶液 1	5	63.12 $\pm$ 0.60	0.94
供试品溶液 2	5	57.95 $\pm$ 0.51	0.87
供试品溶液 3	5	37.55 $\pm$ 0.07	0.18
供试品溶液 4	5	32.45 $\pm$ 0.20	0.62

表 4 金英黄归汤制备过程中连翘酯苷 A 含量测定结果($\bar{x} \pm s$)
Table 4 The assay results of forsythoside A content in the product process of *Jinying Huanggui* decoction

样品	n	连翘酯苷 A / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%
供试品溶液 1	5	61.14 $\pm$ 0.27	0.81
供试品溶液 2	5	66.88 $\pm$ 0.42	1.12
供试品溶液 3	5	41.72 $\pm$ 0.17	0.63
供试品溶液 4	5	37.50 $\pm$ 0.39	1.04

2.4 金英黄归汤中绿原酸、连翘酯苷 A 的含量测定
取本品 3 批, 每批进样 5 次, 分别按 2.2.2 项下的方法制备绿原酸供试品溶液与连翘酯苷 A 供试品溶液, 分别按上述各自的色谱条件下进行 HPLC 分析, 测定各指标成分的峰面积并计算含量。见表 5 及表 6。

表 5 金英黄归汤中绿原酸含量测定结果($\bar{x} \pm s$)
Table 5 The assay results of chlorogenic acid content of *Jinying Huanggui* decoction

批号	n	绿原酸 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%
20110830	5	38.44 $\pm$ 0.54	1.41
20140428	5	31.64 $\pm$ 0.40	1.25
20140519	5	32.45 $\pm$ 0.20	0.62

表 6 金英黄归汤中连翘酯苷 A 含量测定结果($\bar{x} \pm s$)
Table 6 The assay results of forsythoside A content on *Jinying Huanggui* decoction

批号	n	连翘酯苷 A / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%
20110830	5	36.03 $\pm$ 0.31	0.86
20140428	5	36.83 $\pm$ 0.17	0.45
20140606	5	37.50 $\pm$ 0.39	1.04

3 讨论

在金英黄归汤制剂的制备过程中, 醇沉的主要目

的是除去制剂中的蛋白质、糊化淀粉、黏液质等, 以提高制剂的澄清度和制剂的稳定性。制备过程中各步骤的绿原酸和连翘酯苷 A 的含量测定表明, 在用石油醚萃取之后, 绿原酸和连翘酯苷 A 的含量变化不大。而经过醇沉后, 虽然除去了大量的杂质, 但有效成分绿原酸和连翘酯苷 A 的含量也明显减少, 仅接近为粗提取物的一半。因此, 金英黄归汤的制备工艺还有待进一步优化。

本实验采用 HPLC 法建立金英黄归汤中绿原酸和连翘酯苷 A 的含量测定方法, 并对金英黄归汤制备过程中绿原酸和连翘酯苷 A 的含量进行测定。由于绿原酸极不稳定, 易受温度、光照的影响, 故绿原酸的供试液应放置于棕色瓶、冰箱(4 ℃)保存。研究结果表明, 本法样品处理方便、测定方法简单, 测定结果准确可靠, 可用于金英黄归汤制剂制备过程中的质量控制。

参考文献:

[1] 易琼, 何炳坤, 王鲁, 等. 中药复方对小鼠吞噬细胞吞噬功能的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010, (8): 140-142.

[2] 王莲, 袁艺. 不同产地鱼腥草中绿原酸、槲皮素含量测定[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(7): 1081.

[3] Lee CH, Yoon SJ, Lee SM. Chlorogenic acid attenuates high mobility group box 1 (HMGB1) and enhances host defense mechanisms in murine sepsis[J]. Molecular Medicine, 2012, 15(11): 1437.

[4] 陈日来, 李玉珍, 李衡梅, 等. 高效液相色谱法同时测定双黄连口服液液中连翘酯苷 A 和连翘苷[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 18(3): 420-421.

[5] 唐静静, 何润霞, 王鲁, 等. 金英黄归注射液制备、检测及其对奶牛乳房炎的疗效[J]. 中国兽医杂志, 2014, 50(9): 78-81.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 560.

[7] 刘明斌, 童巧珍, 谢振宇. HPLC 法测定金银花中绿原酸的含量[J]. 医学临床研究, 2006, (6): 759.

[8] 樊磊磊, 刘乃强, 王雪芹, 等. HPLC 测定双黄连注射液中木犀草苷[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, (10): 82-83.

[9] 王洪福, 于海彦. 双黄连泡腾片中绿原酸含量测定的方法学研究[J]. 黑龙江医药, 2014, 15(4): 241-242.

[10] 李建芳, 黄劲通. 高效液相色谱法测定银花感冒冲剂中绿原酸含量[J]. 中国药业, 2013, 20(7): 63-64.

[11] 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, (11): 114.

(编辑: 邓响潮)