

## HPLC – DAD 法同时测定清开灵注射液中 7 个酚酸类成分\*

张倩 张加余 高凤阳 高晓燕 乔延江 卢建秋\*\*

(北京中医药大学科研实验中心 北京 100029)

**摘要** 目的: 建立同时测定清开灵注射液中 7 个酚酸类成分(新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸)含量的方法。方法: 采用 Agilent Zorbax SB – C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A) – 乙腈(B) 梯度洗脱, 流速为 0.5 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长 327 nm, 柱温 30 °C。结果: 80 min 内 7 个待测组分分离良好, 在各自的检测范围内与峰面积呈良好的线性, 其相关系数均大于 0.9998, 加样回收率为 96.1% ~ 103.9%。应用所建立的方法同时测定了清开灵注射液中 7 个成分的含量, 并对 5 个不同批次的注射液进行了含量测定, 其结果有一定的差异。结论: 本法可为清开灵注射液中酚酸类成分的质量控制提供参考。

**关键词:** 高效液相色谱 – 二极管阵列法; 清开灵注射液; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 咖啡酸; 3,4-二咖啡酰奎宁酸; 3,5-二咖啡酰奎宁酸; 4,5-二咖啡酰奎宁酸; 中药复方制剂质量控制

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 – 1793(2013)01 – 0073 – 05

## Simultaneous determination of 7 phenolic acids in Qingkailing injection by HPLC – DAD\*

ZHANG Qian ZHANG Jia – yu GAO Feng – yang GAO Xiao – yan QIAO Yan – jiang LU Jian – qiu\*\*

(Center of Scientific Experiment, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**Abstract Objective:** To establish an HPLC – DAD method for simultaneous determination of 7 phenolic acids (neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid and 4,5-dicaffeoylquinic acid) in Qingkailing injection. **Methods:** The separation was achieved on an Agilent Zorbax SB – C<sub>18</sub> analytical column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a gradient elution of 0.1% formic acid (A) and acetonitrile (B) at a flow rate of 0.5 mL · min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was 327 nm and the column temperature was 30 °C. **Results:** Perfect chromatogram with good separation was obtained within 80 min. All the seven calibration curves showed good linearity between concentration of each compound and peak area. And the value of *r* was higher than 0.9998 for all the analytes. The recoveries were 96.1% – 103.9%. The developed method was successfully applied for the simultaneous determination of the 7 components (neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid and 3,5-dicaffeoylquinic acid) in Qingkailing injection of five different batches which had great variation on the determination results. **Conclusion:** The developed method can provide reference for quality control of phenolic acids in Qingkailing injection.

**Key words:** HPLC – DAD; Qingkailing injection; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; caffeic acid; 3,4-dicaffeoylquinic acid; 3,5-dicaffeoylquinic acid; 4,5-dicaffeoylquinic acid; quality control of TCM compound preparation

清开灵注射液处方由胆酸、猪去氧胆酸、水牛角、黄芩苷、珍珠母、栀子、板蓝根、金银花共 8 味药组成<sup>[1]</sup>, 其中绿原酸作为金银花药材的主要有效成分, 具有抑菌、抗病毒、解热消炎等作用。2010 年版

\* 国家“重大新药创制”科技重大专项(2010ZX09502 – 002); 北京中医药大学自主选题项目资助(2011 – JYBZZ – XS104)

\*\* 通讯作者 Tel: (010) 64286203; E – mail: lujq@vip.sina.com

中国药典和清开灵注射液质量标准草案中主要对黄芩苷、栀子苷和胆酸进行了质控研究,并未将绿原酸纳入其中。目前有关清开灵注射液中酚酸类成分的含量测定最常见的是针对绿原酸和咖啡酸<sup>[2-4]</sup>。研究表明,金银花中含有以绿原酸为主的多种酚酸类成分<sup>[5-6]</sup>,且绿原酸在生产过程中易发生水解<sup>[7-8]</sup>,有多种酚酸类异构体的存在。作者在前期的研究工作中发现不同批次的清开灵注射液中绿原酸和咖啡酸含量差别较大,同时采用电喷雾离子阱质谱进行分析,发现清开灵注射液中含有新绿原酸、隐绿原酸等多种酚酸类成分。为了更好地控制产品质量,本研究采用 HPLC-DAD 法建立了同时测定清开灵注射液中 7 个酚酸类成分含量的方法。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪,包括在线脱气机、高压二元梯度泵、恒温自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、1100 色谱工作站(美国 Agilent 公司);KQ-250DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Millipore Synergy UV 型超纯水机(美国 Millipore 公司);R200D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。

对照品绿原酸(批号:110753-200413)、咖啡酸(批号:110885-200102)购于中国食品药品检定研究院;新绿原酸、隐绿原酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸(纯度分别为 99.3%、99.8%、99.3%、98.9%、99.2%)均购于成都普瑞科技有限公司;市售清开灵注射液,批号:010705A、011606A、011601A、011401A、011403A;板蓝根提取液、珍珠母水牛角水解液、黄芩苷、胆酸、猪胆酸(纯度大于 95%)由生产厂家提供。

甲酸为分析纯,乙腈为色谱纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液制备

**2.1.1 对照品溶液** 分别称取绿原酸、咖啡酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、新绿原酸、隐绿原酸的对照品适量,精密称定,加甲醇制成浓度分别为 108.0、141.6、100.4、90.8、102.4、110.0、126.8  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品储备液。分别精密吸取各对照品储备液 0.5 mL,加甲醇定容于 5 mL 量瓶中,即得混合对照品溶液,于 4 °C 冰箱中储存。

**2.1.2 供试品溶液** 取清开灵注射液,用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

**2.1.3 阴性对照溶液** 按照配制清开灵注射液生产过程,将板蓝根提取液和珍珠母水牛角水解液混合后,加到胆酸、猪去氧胆酸 75% 乙醇溶液中,混

匀,加乙醇使含醇量达 75%,调 pH 至 7 后滤过回收乙醇,加水备用。黄芩苷用注射用水溶解,调 pH 为 7.5,加入备用液,混匀即可。

**2.2 色谱条件** 色谱柱:Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );柱温:30 °C;流动相:0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~15 min,0% B → 10% B;15~22 min,10% B → 12% B;22~45 min,12% B → 18% B;45~55 min,18% B → 23% B);流速:0.5 mL · min<sup>-1</sup>;检测波长:327 nm;进样量:10  $\mu\text{L}$ 。

**2.3 系统适用性试验** 按上述色谱条件,对照品和清开灵注射液中 7 个酚酸类成分 HPLC 图见图 1,所建立的方法对该 7 个成分分离良好,分离度均在 1.8 以上,拖尾因子均在 0.95~1.05 之间,理论塔板数均大于 11000。

**2.4 线性关系的考察** 精密吸取各对照品储备液,分别用甲醇稀释成 6 个不同浓度的混合对照品溶液,摇匀,每个浓度进样 2 次,记录各峰面积,以其峰面积均值为纵坐标,浓度为横坐标,进行回归分析,并分别以信噪比 3:1 和 10:1 为标准测定各成分的最低检测限和定量限,所得结果见表 1。

**2.5 精密度的试验** 精密吸取对照品储备液,按“2.2”项下色谱条件,每种溶液分别连续进样 6 次,记录峰面积,计算绿原酸、咖啡酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、新绿原酸、隐绿原酸峰面积的 RSD ( $n=6$ ) 分别为 1.7%、1.4%、1.7%、0.7%、0.3%、0.5%、0.7%,表明仪器的精密度良好。

**2.6 重复性试验** 取同一批次(批号 010705A)清开灵注射液,按“2.1.2”项下方法制备 6 份供试品溶液,按照“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,代入对应的线性方程计算,绿原酸、咖啡酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、新绿原酸、隐绿原酸含量平均值 ( $n=6$ ) 分别为 8.83、6.70、5.90、3.20、1.30、11.89、8.68  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,其 RSD 分别为 1.0%、2.5%、2.6%、0.9%、2.7%、1.6%、2.0%。

**2.7 稳定性试验** 取同一批次(批号 010705A)清开灵注射液的供试品溶液,室温下放置,分别在不同时间点(0、2、4、6、8、10 h)进样,测定峰面积,代入对应的线性方程计算,绿原酸、咖啡酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、新绿原酸、隐绿原酸含量的 RSD 分别为 0.5%、2.8%、1.9%、2.5%、2.2%、3.1%、0.6%。说明供试品溶液在室温下放置 10 h 稳定性良好。

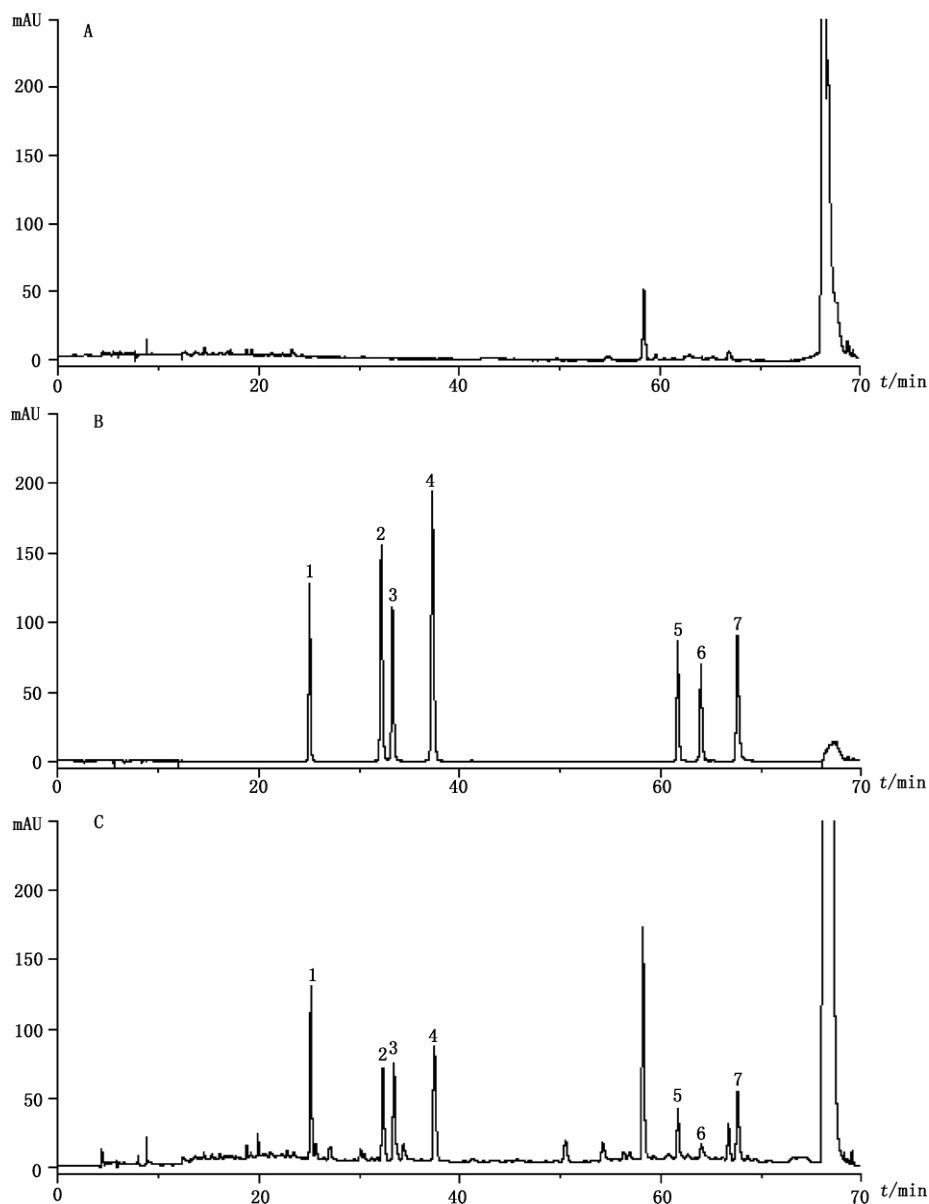


图1 阴性对照(A)、混合对照品(B)、清开灵注射液(C) HPLC图

Fig 1 HPLC chromatograms of negative control(A), reference substances(B) and Qingkailing injection(C)

1. 新绿原酸(neochlorogenic acid) 2. 绿原酸(chlorogenic acid) 3. 隐绿原酸(cryptochlorogenic acid) 4. 咖啡酸(caffeic acid) 5. 3,4-二咖啡酰奎宁酸(3,4-dicaffeoylquinic acid) 6. 3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicaffeoylquinic acid) 7. 4,5-二咖啡酰奎宁酸(4,5-dicaffeoylquinic acid)

表1 线性关系结果

Tab 1 Results of regression analysis on calibration curves and detection limits

化合物 (compound)	回归方程 (regression equation)	线性范围 (linear range) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$r$	LOD /ng	LOQ /ng
绿原酸(chlorogenic acid)	$Y = 61.99X - 56.78$	2.16 - 108.00	0.9998	0.247	0.822
咖啡酸(caffeic acid)	$Y = 110.0X - 38.10$	1.70 - 141.60	1.0000	0.077	0.256
新绿原酸(neochlorogenic acid)	$Y = 65.02X + 5.241$	1.10 - 44.00	0.9999	0.132	0.616
隐绿原酸(cryptochlorogenic acid)	$Y = 60.84X - 11.96$	0.51 - 38.04	0.9999	0.146	0.487
4,5-二咖啡酰奎宁酸(4,5-dicaffeoylquinic acid)	$Y = 81.31X - 106.4$	2.01 - 100.40	0.9999	2.008	6.275
3,4-二咖啡酰奎宁酸(3,4-dicaffeoylquinic acid)	$Y = 61.67X - 29.26$	1.82 - 90.80	0.9999	0.207	0.689
3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicaffeoylquinic acid)	$Y = 73.73X - 2.773$	0.41 - 20.48	0.9999	0.124	0.414

**2.8 回收率试验** 取已知含量的同一批(批号 010705A)清开灵注射液 2.5 mL,共 9 份,平均分成 3 组,每组分别精密加入高、中、低 3 个浓度的绿原酸对

照品溶液 2.5 mL,摇匀,用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,按照“2.2”项下色谱条件进样 10  $\mu\text{L}$ ,计算绿原酸的回收率;依法获得其他成分的回收率,结果见表 2。

表 2 回收率试验结果( $n=3$ )

Tab 2 Results of the recoveries of the compounds

化合物 (compound)	供试品含量 (content of sample) / $\mu\text{g}$	加入量 (amount added) / $\mu\text{g}$	测得量 (amount found) / $\mu\text{g}$	回收率 (recovery) /%	RSD /%
绿原酸 (chlorogenic acid)	24.89	19.00	44.02	100.7	0.4
		23.24	48.61	102.1	0.4
		35.00	60.02	100.4	0.1
咖啡酸 (caffeic acid)	38.71	36.82	75.34	99.5	2.0
		22.66	61.79	101.9	2.0
		50.98	88.63	97.9	1.5
新绿原酸 (neochlorogenic acid)	53.26	44.00	97.93	101.5	3.2
		55.00	110.41	103.9	1.3
		66.00	118.82	99.3	3.2
隐绿原酸 (cryptochlorogenic acid)	45.80	25.00	71.37	102.3	0.8
		38.00	83.50	99.2	2.0
		76.00	121.03	99.0	0.5
4,5-二咖啡酰奎宁酸 (4,5-dicaffeoylquinic acid)	17.62	7.03	24.71	100.9	0.7
		10.04	27.62	99.6	0.6
		30.12	46.56	96.1	1.6
3,4-二咖啡酰奎宁酸 (3,4-dicaffeoylquinic acid)	8.90	7.00	15.95	100.7	1.4
		9.00	17.83	99.2	0.6
		27.00	35.92	100.1	0.3
3,5-二咖啡酰奎宁酸 (3,5-dicaffeoylquinic acid)	3.06	2.46	5.60	103.3	2.0
		3.07	6.22	102.9	3.3
		3.69	6.70	98.6	1.4

**2.9 样品测定** 取 5 个批号的清开灵注射液,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进

样,测定各成分的峰面积,代入各自的线性方程,计算 7 个成分的含量,每个批次的注射液测定 3 份,结果见表 3。

表 3 5 个批次清开灵注射液含量测定结果( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

Tab 3 Contents of the seven compounds in Qingkailing injection of 5 batches

化合物(compound)	Lot No. 010705A	Lot No. 011606A	Lot No. 011601A	Lot No. 011401A	Lot No. 011403A
新绿原酸(neochlorogenic acid)	11.87	29.06	30.08	34.36	43.91
绿原酸(chlorogenic acid)	8.80	21.27	22.91	26.94	33.53
隐绿原酸(cryptochlorogenic acid)	8.50	21.57	23.27	27.63	34.85
咖啡酸(caffeic acid)	6.43	14.61	15.99	16.31	20.24
4,5-二咖啡酰奎宁酸(4,5-dicaffeoylquinic acid)	5.87	14.94	16.35	19.64	24.15
3,4-二咖啡酰奎宁酸(3,4-dicaffeoylquinic acid)	3.22	9.46	10.43	12.95	15.31
3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-dicaffeoylquinic acid)	1.21	3.08	3.42	4.08	4.59

### 3 讨论

2010 年版中国药典规定金银花中绿原酸含量测

定检测波长为 327 nm,同时根据各对照品溶液的紫外全波长扫描结果,确定采用 327 nm 作为各成分的最

大吸收波长。试验过程中分别考察了0.1%甲酸水-乙腈、0.1%乙酸水-乙腈、0.1%甲酸水-0.1%甲酸乙腈、0.1%乙酸水-0.1%乙酸乙腈,在前期摸索液相色谱条件过程中发现清开灵注射液在打开4 h后,3,5-二咖啡酰奎宁酸附近产生1个新的色谱峰,相同洗脱梯度下流动相中加入甲酸分离度更好,有机相中加入甲酸与否对分离效果影响不大,考虑制备流动相的简便性,最终采用0.1%甲酸水-乙腈为流动相。同时对流速(0.5、0.6、0.8 mL·min<sup>-1</sup>)和柱温(25、30、35℃)进行了考察,最终确定“2.2”项下液相色谱分析条件。

应用所建立的方法对5个批次的清开灵注射液中酚酸类成分进行了含量测定,结果显示不同批次间各组分含量差异比较大。

绿原酸分子结构中存在酯键、不饱和双键和多元酚3个不稳定部分,日光<sup>[9]</sup>、温度<sup>[9]</sup>、pH<sup>[10]</sup>等是其不稳定的因素,同时在从植物提取过程中,往往通过水解和分子内酯基迁移而发生异构化<sup>[11]</sup>;储存环境的影响也容易使异构体之间发生相互转化<sup>[8]</sup>。本研究所测新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和4,5-二咖啡酰奎宁酸均是由咖啡酸与奎宁酸缩合而成,互为异构体,为避免试验过程中由于外界因素干扰造成异构体转化而影响定量结果,故采用单一对照品溶液进行试验。

清开灵注射液中金银花、栀子以提取液形式入药,在其生产过程中加热、醇沉、pH调节等都会造成异构体含量的变化,本研究所测成分之间究竟有何转化关系有待进一步研究。与此同时,为保证清开灵注射液的质量,应对其生产工艺进行严格的控制,加强对原料、中间体、成品的监测。

#### 参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2010. Vol I(一部): 1110
- 2 CAO Jin(曹进), XU Yan(徐燕), WANG Yi-ming(王义明), *et al.* Determination of 3 components in Qingkailing injection by HPLC under different UV-vis waves(多波长高效液相色谱法测定清开灵注射液中3种有效成分). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2004, 24(1): 8
- 3 GAO Xiao-yan(高晓燕), LI Na(李娜), FAN Qiang(范强), *et al.* Study on the method of rapid quality control of aqueous solution of Flos Lonicerae Japonicae extraction in the preparation of Qingkailing injection(清开灵注射液生产过程中金银花提取液的在线质量控制方法研究). *Spectrosc Spect Anal*(光谱学与光谱分析), 2006, 26(5): 904
- 4 WU Yan-shu(武彦舒), JIN Cheng(金城), ZHANG Qian(张倩), *et al.* Simultaneous determination of ten active components in Qingkailing injection and relationship with quality control(清开灵注射液中10种有效成分的同时测定及其质量相关性研究). *Spectrosc Spect Anal*(光谱学与光谱分析), 2009, 29(11): 3112
- 5 XING Li-hong(邢丽红), LI Wen-long(李文龙), QU Hai-bin(瞿海斌). Rapid determination of 5 kinds of organic acid in Flos Lonicerae extracts by UV spectroscopy(金银花提取物中5种有机酸含量测定的紫外光谱法). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2011, 31(3): 547
- 6 NIU Xiao-xue(牛晓雪), CUI Xu-sheng(崔旭盛), SU He(苏贺), *et al.* Simultaneous determination of seven compounds in *Lonicera japonica* by high performance liquid chromatography(高效液相色谱法同时测定忍冬中7种成分). *Chin J Chromatogr*(色谱), 2012, 30(2): 211
- 7 LUO Qi-zhi(罗奇志), WANG You-zhi(王有志), LUO Jia-bo(罗佳波). HPLC-ESI/MS analysis of chlorogenic acid and its hydrolysate(绿原酸水解产物的高效液相色谱-电喷雾串联质谱分析). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2011, 31(7): 1345
- 8 Ma Yuan-chun, Wang Xiao-qian, Hou Fei-fei, *et al.* Rapid resolution liquid chromatography(RRLC) analysis and studies on the stability of Shuang-Huang-Lian preparations. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 54(2): 265
- 9 GU Li-hong(顾丽红), ZHU Pin-ye(朱品业). Influence of light and temperature on the stability of the solution of chlorogenic acid(日光和温度对绿原酸供试液稳定性的影响). *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 1999, 21(11): 568
- 10 CHEN Gang(陈钢), HOU Shi-xiang(侯世祥), HU Ping(胡平), *et al.* Studies on stability of chlorogenic acid in extract of Flos Lonicerae(金银花提取物中绿原酸的稳定性研究). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2003, 28(3): 223
- 11 LIU Yi(刘意), ZENG Gui-xian(曾桂先), SONG Feng-lan(宋凤兰), *et al.* Study on stability of chlorogenic acid(绿原酸稳定性研究). *Chem Intermediates*(化工中间体), 2009, 5(2): 25

(本文于2012年1月5日收到)