

银翘蓝芩口服液中绿原酸含量测定方法的建立

许春燕^{1,2}, 刘希望², 杨亚军², 孔晓军², 李世宏², 秦哲², 杨孝朴¹, 李剑勇^{2*}

(1. 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 中国农业科学院 兰州畜牧与兽药研究所/农业部
兽用药物创制重点实验室/甘肃省新兽药工程重点实验室, 甘肃 兰州 730050)

摘要: 为建立银翘蓝芩口服液中绿原酸含量的高效液相色谱测定方法, 选用 Scienhome Kromasil ODS - 1 C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇 - 0.1% 磷酸水 (体积比为 20:80), 检测波长 324 nm, 柱温 30 °C, 流速为 1 mL/min 进行测定。结果显示, 绿原酸在该色谱条件下, 系统适应性良好, 在质量浓度为 19.32 ~ 96.60 μg/mL 时线性关系良好, 回归方程为 $Y = 29.059X - 117.695$, $R^2 = 0.999$; 加样平均回收率为 94.57%, RSD 为 1.93%; 对 3 批样品的绿原酸含量进行测定, RSD 为 1.76%。表明建立的方法可用于银翘蓝芩口服液中绿原酸含量的测定。

关键词: 银翘蓝芩口服液; 绿原酸; 高效液相色谱法

中图分类号: S859.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004 - 3268(2016)11 - 0126 - 04

Establishment of Determination Method of Chlorogenic Acid Content in Yinqiaolanqin Oral Liquid by High Performance Liquid Chromatography

XU Chunyan^{1,2}, LIU Xiwang², YANG Yajun², KONG Xiaojun²,
LI Shihong², QIN Zhe², YANG Xiaopu¹, LI Jianyong^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences of CAAS/Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutical Development, Ministry of Agriculture/Key Laboratory of New Animal Drug Project of Gansu Province, Lanzhou 730050, China)

Abstract: In order to establish the determination method of chlorogenic acid content in Yinqiaolanqin oral liquid by high performance liquid chromatography (HPLC), Scienhome Kromasil ODS-1 C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. The HPLC system used a mobile phase composed of Methanol-0.1% phosphoric acid water (20:80, V/V) at a flow rate of 1 mL/min, the ultraviolet detector was set at 324 nm with column temperature of 30 °C. The HPLC system suitability of chlorogenic acid was good. A good linear calibration of chlorogenic acid was observed within the concentration rang of 19.32—96.60 μg/mL ($R^2 = 0.999$), and the average recovery rate was 94.57% with relative standard deviation (RSD) of 1.93%, the regression equation was $Y = 29.059X - 117.695$. The RSD of chlorogenic acid content in three lots of Yinqiaolanqin oral liquid was 1.76% indicating the method could be employed to determine the content of chlorogenic acid in Yinqiaolanqin oral liquid.

Key words: Yinqiaolanqin oral liquid; chlorogenic acid; high performance liquid chromatography (HPLC)

银翘蓝芩口服液由金银花、连翘、板蓝根、黄芩等中药材组成, 是从中兽医整体观出发辩证加减并通过临床疗效试验筛选后研制成的新型中兽药产

品。该口服液以传统中医学理论为基础, 运用现代药物制剂技术, 经过将金银花、黄芩、连翘、板蓝根等中药材与水共煎煮醇沉等工艺, 富集其有效成分制

收稿日期: 2016-05-26

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303040-12); 兰州市科技计划项目(2012-2-73)

作者简介: 许春燕(1988-), 女, 河南驻马店人, 在读硕士研究生, 研究方向: 基础兽医学。E-mail: zmdchunyan@163.com

* 通讯作者: 李剑勇(1971-), 男, 甘肃秦安人, 研究员, 博士, 主要从事新兽药开发研究。E-mail: lijy1971@163.com

备而成。药效学表明,银翘蓝芩口服液清热解毒、解表平喘,具有抑菌、促进免疫等药学作用^[1-2]。金银花是忍冬科植物忍冬(*Lonicera japonica* Thunb.)的干燥花蕾,或初开的花。夏初花开放前采收,干燥^[3]。金银花具有清热解毒、抗病原微生物、抗炎、免疫调节、清除自由基等作用,且对常见的呼吸道病毒有较强的抑制作用^[4],其有效成分为绿原酸,是植物体内在有氧呼吸过程中经莽草酸途径形成的一种苯丙素类物质^[5],药理活性显著,故将绿原酸作为银翘蓝芩口服液质量控制的指标之一^[6]。目前,关于绿原酸含量测定的方法多种多样,如分光光度法^[7]、毛细管电泳法^[8]、气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术^[9]、液相色谱-质谱(LC-MS)联用技术^[10]等,但这些方法操作均较复杂。为此,依据《中华人民共和国兽药典(二部)》^[11]和《兽药研究技术指导原则汇编(2006—2011)》^[12]中的质量控制分析方法验证指导原则,研究绿原酸含量的测定方法,以建立简便、快速、重现性好、准确可靠的绿原酸含量测定方法,为该口服液的进一步深入研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试药品 绿原酸对照品(96.6%,批号110753-201413)购自中国食品药品检定研究院;银翘蓝芩口服液(批号:20141201、20141207、20150105)由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所研制;不含金银花对照口服液(批号:20141220)由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所研制;甲醇、乙腈为色谱纯,购自 Fisher Scientific 公司。

1.1.2 试验仪器 Waters 2695 型高效液相色谱仪、Waters 2489 紫外检测器购自 Waters 公司,ME235S 赛多利斯微量天平、Sartorius BS110S 电子天平购自北京赛多利斯天平有限公司,溶剂过滤器购自 phenomen 公司,KQ-600DE 型数控超声波清洗器购自昆山市超声仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 Scienhome Kromasil ODS-1 C18 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)(北京迪马欧泰科技发展中心),流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(体积比为 20:80),检测波长为 324 nm,柱温 30 ℃,流速 1.0 mL/min;进样量 10 μL。

1.2.2 供试品溶液的配制 精密吸取 1 mL 银翘蓝芩口服液于 50 mL 棕色容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀;进样前用 0.22 μm 的尼龙滤膜过滤。

1.2.3 系统适应性试验 精密称取绿原酸对照品 0.01 g 于 10 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度线,摇匀,用 0.22 μm 的尼龙滤膜过滤,进样量为 10 μL,记录色谱图。分析绿原酸色谱峰的理论塔板数^[11]。

1.2.4 杂质干扰试验 按照 1.2.2 的方法分别配制银翘蓝芩口服液的样品溶液和不含金银花的对照口服液的样品溶液,进样 10 μL,分析不含金银花对照口服液对绿原酸是否有干扰。

1.2.5 标准曲线绘制 精密称取绿原酸对照品 0.01 g 于 10 mL 容量瓶中,用水溶解并稀释至刻度,摇匀,即为 966 μg/mL 的绿原酸储备液。分别吸取不同体积的储备液,用水稀释为 9.66、19.32、28.98、38.64、57.96、77.28、96.6 μg/mL。进样前用 0.22 μm 的尼龙滤膜过滤,进样量为 10 μL,不同质量浓度的绿原酸标准溶液分别进样 3 次,记录色谱图。以平均峰面积(Y)为纵坐标,以质量浓度(X, μg/mL)为横坐标,进行线性回归得回归方程^[11-12]。

1.2.6 精密度试验 取同一批次银翘蓝芩口服液,按供试品溶液的配制,制得 6 个平行样品,分别进样测定,记录峰面积,求得日内精密度。取同一批次银翘蓝芩口服液样品,按上述处理方法及色谱条件,分别于第 0、1、2、3 天处理进样,记录峰面积,求得日间精密度^[11-12]。

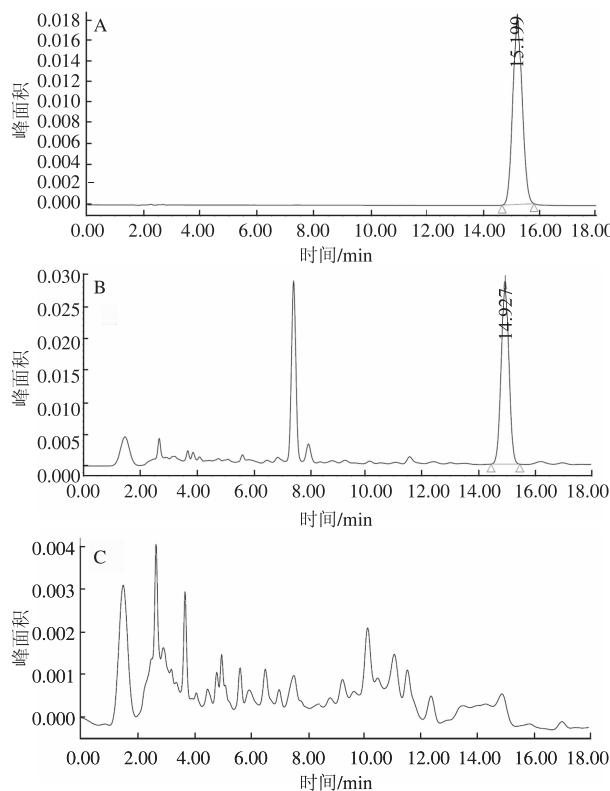
1.2.7 加样回收率试验 分别精密吸取银翘蓝芩口服液 1 mL 于 50 mL 容量瓶中,分别精密加入 966 μg/mL 绿原酸标准溶液 1.5、2.0、2.5 mL,摇匀,加水定容至刻度,即为加样回收率的低、中、高质量浓度样品,质量浓度分别为 28.98、38.64、48.30 μg/mL。按供试品溶液制备方法,制备样品,按上述色谱条件,每份样品溶液吸取 10 μL,进样、测定,记录峰面积并计算加样回收率^[13]。

1.2.8 样品含量测定 将银翘蓝芩口服液按照 1.2.2 的配制方法配制供试样品溶液,进样量为 10 μL。记录色谱峰面积,代入标准曲线,计算样品溶液质量浓度。

2 结果与分析

2.1 系统适应性和杂质干扰试验

从图 1 可知,将绿原酸对照品、银翘蓝芩口服液、对照口服液分别进样 10 μL,绿原酸的保留时间在 15 min 左右,绿原酸的理论塔板数 12 396,满足《中华人民共和国兽药典(二部)》^[14]中理论塔板数按绿原酸峰计算不低于 1 000 的要求,不含金银花的对照口服液对绿原酸的 HPLC 测定无干扰。



A:绿原酸对照品；B:银翘蓝芩口服液；C:对照口服液

图 1 样品色谱图

2.2 绿原酸的标准曲线

表 1 为测定绿原酸标准品的质量浓度和平均峰面积,以平均峰面积(Y)为纵坐标,以质量浓度(X , $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $Y = 29.059X - 117.695$, $R^2 = 0.999$ (图 2)。可见,绿原酸在质量浓度为 $19.32 \sim 96.60 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,线性关系良好。

表 1 绿原酸标准品的质量浓度和峰面积

| 质量浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 峰面积平均值 |
|----------------------------------|-----------|
| 19.32 | 420 233 |
| 28.98 | 728 112 |
| 38.64 | 1 029 136 |
| 77.28 | 2 136 991 |
| 96.60 | 2 676 139 |

表 4 银翘蓝芩口服液的加样回收率试验结果

| 项目 | 总测定值/($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 加入量/($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 测定加入量/($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|-------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-------|------------------|-------|
| 样品 | 33.37 | 0 | | | | |
| 低质量浓度 | 59.35 | 28.98 | 27.20 | 95.52 | | |
| 中质量浓度 | 66.90 | 38.64 | 36.26 | 92.47 | 94.57 ± 1.82 | 1.93 |
| 高质量浓度 | 76.76 | 48.30 | 45.33 | 95.72 | | |

2.5 样品中绿原酸含量测定

对 3 批银翘蓝芩口服液进行绿原酸含量测定(表 5),绿原酸的含量在 $1.68 \sim 1.74 \text{ mg/mL}$, RSD 为 1.76% 。

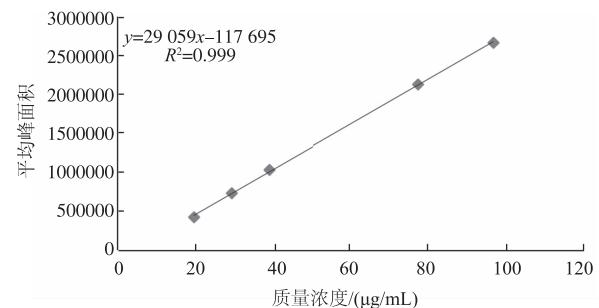


图 2 绿原酸的标准曲线

2.3 精密度试验结果

从表 2、表 3 可以看出,绿原酸的日内精密度、日间精密度的 RSD 值分别为 0.52% 、 0.44% ,均小于 5% ,符合方法验证对精密度的要求。

表 2 绿原酸的日内精密度

| 样品编号 | 含量/($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 平均值/($\mu\text{g}/\text{mL}$) | $RSD/\%$ |
|------|--------------------------------|---------------------------------|----------|
| 1 | 31.91 | | |
| 2 | 31.65 | | |
| 3 | 32.13 | 31.84 ± 0.17 | |
| 4 | 31.76 | | |
| 5 | 31.77 | | |
| 6 | 31.81 | | |

表 3 绿原酸的日间精密度

| 时间/d | 含量/($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 平均值/($\mu\text{g}/\text{mL}$) | $RSD/\%$ |
|------|--------------------------------|---------------------------------|----------|
| 0 | 31.84 | | |
| 1 | 32.05 | 32.01 ± 0.14 | |
| 2 | 31.97 | | |
| 3 | 32.18 | | |

2.4 加样回收率试验结果

加样回收率试验结果见表 4,在银翘蓝芩口服液的低、中、高加样回收率中,绿原酸的回收率在 $92.47\% \sim 95.72\%$,总平均回收率为 94.57% , RSD 为 1.93% ,符合回收率在 $90\% \sim 110\%$ 的要求^[15]。说明绿原酸含量测定方法准确度高。

表 5 样品中绿原酸含量测定结果

| 批号 | 含量/(mg/mL) | 平均含量/(mg/mL) | $RSD/\%$ |
|----------|------------------------------|--------------------------------|----------|
| 20141201 | 1.69 | | |
| 20141207 | 1.74 | 1.70 ± 0.03 | |
| 20150105 | 1.68 | | |

3 结论与讨论

本试验的色谱条件参照《中华人民共和国兽药典(二部)》中双黄连口服液制剂中规定的色谱条件,并依据银翘蓝芩口服液本身的特点和试验条件进行优化,《中华人民共和国兽药典(二部)》规定测定绿原酸的流动相为甲醇-水-冰醋酸(20:80:1),在该试验的色谱条件下,绿原酸峰前有杂质,且基线不稳。当用0.1%磷酸水代替冰醋酸水即甲醇-0.1%磷酸水(体积比为20:80)时,色谱图较好,理论塔板数高。

本研究的测定方法中,绿原酸的理论塔板数远大于《中华人民共和国兽药典(二部)》的规定,说明绿原酸的峰型好;不含金银花的对照口服液无干扰;绿原酸质量浓度在19.32~96.60 μg/mL时,线性关系良好;日内精密度和日间精密度的RSD均小于5%,说明测定结果在日内和日间偏差较小,准确度高,重现性好;加样回收率试验的RSD值为1.93%,说明试验结果与真实值偏差小,准确度高;3批口服液绿原酸含量测定结果的RSD值为1.76%,说明该测定方法的重复性好,结果准确。本试验中用于溶解样品的溶液为水,试验所需的试剂为实验室常用的色谱级试剂,操作简便,价格便宜,符合方法学验证的要求。

本研究建立的银翘蓝芩口服液中绿原酸含量的测定方法符合检测要求,该方法简便、快速、重现性好,且结果准确可靠,可用于银翘蓝芩口服液中绿原酸含量的测定,为银翘蓝芩口服液的质量评价和质量标准的制定奠定基础,并为其进一步研究和开发提供依据。

参考文献:

- [1] 陈佳娟,李剑勇,杨亚军,等.基于体外抑菌作用筛选的中药注射剂“炎毒热清”[J].湖北农业科学,2010,49(3):635-637.

- [2] 陈佳娟.中兽药“炎毒热清”注射液的筛选与毒理药效学研究[D].兰州:甘肃农业大学,2010.
- [3] 中国兽药典委员会.中华人民共和国兽药典(二部)[M].北京:中国农业出版社,2010:294.
- [4] 王林青,崔保安,张红英.金银花药理作用研究进展[J].中国畜牧兽医,2007,34(11):91-95.
- [5] 刘军海,裘爱泳.绿原酸的提取分离及含量测定[J].中国油脂,2005,30(3):54-56.
- [6] 尉芹,马希汉.绿原酸及其提取分离方法评述[J].中成药,2001,23(2):135-138.
- [7] 邢俊波,李会军,李萍,等.中药金银花质量标准研究——总黄酮的含量测定[J].中国现代应用药学,2002,19(3):169-170.
- [8] Chen J,Li S L,Li P,et al. Qualitative and quantitative analysis of active flavonoids in *Flos Lonicerae* by capillary zone electrophoresis coupled with solid-phase extraction [J]. J Sep Sci,2005,28(4):365-372.
- [9] 吉力,潘炳光.忍冬花挥发油的GC-MS分析[J].中国中药杂志,1990(11):40-42.
- [10] Ren M T,Chen J,Song Y,et al. Identification and quantification of 32 bioactive compounds in *Lonicera* species by high performance liquid chromatography coupled with time of flight mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal,2008,48(5):1351
- [11] 中国兽药典委员会.中华人民共和国兽药典(二部)[M].北京:中国农业出版社,2010:173-175.
- [12] 农业部兽药评审中心.兽药研究技术指导原则汇编(2006—2011)[M].北京:化学工业出版社,2012:32-37.
- [13] 程培培,杨亚军,刘希望,等.新型复方氟苯尼考注射液中氟尼辛葡甲胺含量测定方法研究[J].河南农业科学,2014,43(3):142-146.
- [14] 中国兽药典委员会.中华人民共和国兽药典(二部)[M].北京:中国农业出版社,2010:295.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.实验室质量控制规范食品理化检测:GB/T 27404—2008[S].北京:中国标准出版社,2008:31.