

· 药物分析 ·

## HPLC 法测定清热消肿口服液中绿原酸的含量

孙学雄<sup>1</sup>, 罗晨曲<sup>2</sup>(1. 娄底市中心医院药剂科, 湖南 娄底 417000; 2. 娄底市药品检验所, 湖南 娄底 417000)

**[摘要]** 目的 建立 HPLC 法测定清热消肿口服液中绿原酸的含量。方法 采用 phenomenex Luna-C<sub>18</sub> 柱(200 mm×4.60 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-1% 冰醋酸(20:80), 流速为 1.00 ml/min, 检测波长 326 nm, 柱温为 30 ℃。结果 绿原酸进样量在 0.163 1~1.087 2 μg 范围内与峰面积线性关系良好,  $r=1.000(n=5)$ , 平均回收率为 100.40%, RSD 为 1.20% ( $n=9$ )。结论 该方法简便、准确、可靠、重现性好, 可用于该制剂的质量控制。

**[关键词]** 清热消肿口服液; 绿原酸; HPLC; 含量测定

**[中图分类号]** R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2011)04-0278-03

## Determination of Chlorogenic acid in Qingrexiaozhong oral liquid by HPLC

SUN Xue-xiong<sup>1</sup>, LUO Chen-qu<sup>2</sup>(1. Department of Pharmacy, Loudi Center Hospital, Loudi 417000, China; 2. Loudi Institute for Drug control, Loudi 417000 China)

**[Abstract]** **Objective** To develop a HPLC method for determining the content of Chlorogenic acid in QingRexiaozhong Oral Liquid. **Methods** The phenomenex Luna-C<sub>18</sub>(200 mm×4.60 mm, 5 μm) was used; the mobile phase consisted of water-1% Acetic acid (20:80), the flow rate of 1.00 ml/min, and the detecting wavelength was 326 nm. The column temperature was at 30 ℃. **Results** There was a good linearity for Chlorogenic Acid in the range of 0.163 1~1.087 2 μg,  $r=1.000(n=5)$ , and the average recovery rate was 100.40%, RSD=1.20% ( $n=9$ ). **Conclusions** The method was simple, accurate, reliable and reproducible, which could be available for the quality control of QingRexiaozhong Oral Liquid

**[Key words]** Qingrexiaozhong oral liquid; Chlorogenic acid; HPLC; Content determination

清热消肿口服液由金银花、野菊花、板蓝根、连翘、甘草等九味药组成, 具有清热解毒, 凉血消肿等功效, 用于风热感冒, 上呼吸道感染, 流感, 腮腺炎, 流行性出血性结膜炎等。绿原酸是金银花、野菊花中有效成分之一, 具有抗菌、消炎抗病毒等作用<sup>[1]</sup>。本品为岳阳市第二人民医院制剂, 现标准中尚无含量测定项目, 为有效控制清热消肿口服液内在质量, 笔者选用绿原酸作为含量测定指标并加以控制, 建立清热消肿口服液中绿原酸 HPLC 含量测定方法, 结果表明该方法准确, 可靠, 重复性好, 可用于本品的质量控制。

### 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** 岛津 LC-20AT 系列高效液相色谱仪(日本岛津), METTLER XS-105 电子天平。

**1.2 试剂** 绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所, 含量测定用, 批号 110753-200413); 清热消肿口服液(岳阳市第二人民医院提供, 批号 20090708、20091008、20091108); 甲醇为色谱纯, 自制纯化水,

其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱: phenomenex Luna-C<sub>18</sub> 柱(200 mm×4.60 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-1% 冰醋酸(20:80); 流速 1.00 ml/min; 检测波长: 326 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10.00 μl。

**2.2 对照品溶液制备** 称取绿原酸对照品 18.12 mg, 置 50 ml 棕色量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得储备液(362.4 μg/ml)。精密量取储备液 15 ml, 置 100 ml 棕色量瓶中加水稀释至刻度, 即得(每 1 ml 含绿原酸 54.36 μg)。

**2.3 供试品溶液制备** 精密量取本品 2 ml, 置 50 ml 棕色量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.4 阴性对照溶液制备** 按处方配比(缺金银花, 野菊花药材)照工艺制备成模拟口服液, 按“2.3”项下的方法制成阴性对照溶液。

**2.5 干扰试验** 照上述色谱条件, 将对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各 10.00 μl, 分别注入液相色谱仪, 色谱图见图 1。供试品色谱图中, 在与对照品色谱图相应的保留时间处, 有相同的色谱峰, 而

**[作者简介]** 孙学雄(1964-), 男, 副主任药师。Tel: (0738) 8527325, E-mail: SunXueXiong@163.com.

阴性对照溶液无干扰峰。

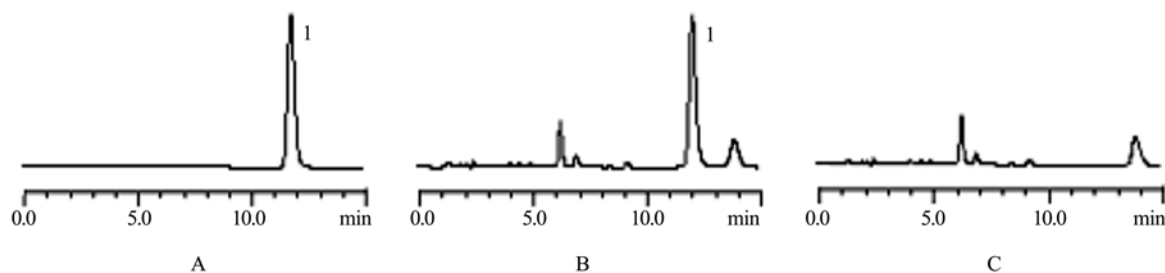


图1 清热消肿口服液中绿原酸 HPLC 图

A 对照品; B-供试品; C-阴性对照; 1-绿原酸

**2.6 线性关系考察** 将上述绿原酸对照品溶液 (54.36  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 分别进样 3.00、5.00、10.00、15.00、20.00  $\mu\text{l}$ , 按上述色谱条件测定, 以平均峰面积为纵坐标, 以进样量为横坐标, 进行线性回归, 得方程:  $Y=2.54 \times 10^4 X - 3.54 \times 10^3$ ,  $r=1.000$ , 线性范围为 0.163 1 ~ 1.087 2  $\mu\text{g}$ 。

**2.7 精密度试验** 取对照品溶液 (54.36  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 连续进样 6 次, 每次 10.00  $\mu\text{l}$ , 记录峰面积,  $RSD$  为 0.16%, 表明精密度良好。

**2.8 稳定性试验** 取供试品溶液 (批号 20090708), 分别于 0、4、8、12、16、24 h 进样 10.00  $\mu\text{l}$ , 测得样品中绿原酸峰面积的  $RSD$  为 1.40%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.9 重复性试验** 精密取同一批号样品 (批号为 20090708) 6 份, 按“2.3”项下的方法制备供试品溶液, 依法测定, 结果绿原酸含量的  $RSD$  为 1.17%, 表明本法重复性较好。

**2.10 加样回收率试验** 量取已知绿原酸含量为 1.567 0  $\text{mg}/\text{ml}$  的样品 9 份 (批号为 20090708), 每份 1.00 ml, 3 份一组, 每组分别按对照品溶液浓度的 80%、100%、120% 的量加入对照品, 按“2.3”项下的方法制备供试品溶液, 计算回收率, 结果见表 1。

表1 清热消肿口服液中绿原酸的回收率试验结果 ( $n=9$ )

样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	$RSD$ (%)
0.783 5	0.622 4	1.416 1	101.64	100.40	1.20
0.783 5	0.622 4	1.406 0	100.02		
0.783 5	0.622 4	1.403 6	99.63		
0.783 5	0.780 5	1.553 8	98.69		
0.783 5	0.780 5	1.565 8	100.23		
0.783 5	0.780 5	1.556 7	99.06		
0.783 5	0.936 6	1.736 1	101.71		
0.783 5	0.936 6	1.739 6	102.08		
0.783 5	0.936 6	1.725 5	100.58		

**2.11 样品含量测定** 取 3 批样品, 按“2.3”项下的方法制备供试品溶液, 进样 10.00  $\mu\text{l}$ , 照外标法 (峰面积) 计算绿原酸的含量, 结果见表 2。

表2 样品含量测定结果 ( $n=3$ )

批号	绿原酸含量 ( $\text{mg}/\text{ml}$ )
20090708	1.567 0
20091008	1.512 8
20091108	1.498 7

### 3 讨论

**3.1** 取绿原酸对照品溶液, 在 200 ~ 400 nm 波长范围内扫描, 结果显示在 326 nm 处有最大吸收峰且不易受溶剂峰干扰, 故选择 326 nm 为测定吸收波长。

**3.2** 绿原酸为有机酸, 易产生电离而使色谱峰扩散, 因此采用离子抑制技术, 在流动相中加入少量酸抑制其色谱峰拖尾, 采用了 0.4% 磷酸, 0.1% 磷酸, 0.5% 冰醋酸及 1% 冰醋酸, 结果用 1% 冰醋酸色谱峰拖尾现象最小。另外再考察了乙腈-1% 冰醋酸, 甲醇-1% 冰醋酸<sup>[2,3]</sup> 等流动相, 最终确定甲醇-1% 冰醋酸 (20 : 80) 作为流动相, 流速为 1.00  $\text{ml}/\text{min}$ , 分离效果良好, 分析快速准确, 重复性好, 回收率高, 是测定清热消肿口服液中有效成分含量的理想方法。

**3.3** 绿原酸在放置过程中见光、受热后不稳定, 易分解<sup>[4]</sup>, 因而试验中绿原酸对照品和样品均采用棕色瓶低温保存。

**3.4** 本品为口服液, 在制成制剂中已经多次提取, 除去了较多的杂质, 所以样品用水稀释过滤后直接进入测定就能达到实验要求, 样品处理方便。

**3.5** 从线性, 回收率, 重复性, 溶液稳定性等实验结果可以看出, 用 HPLC 法测定清热消肿口服液中绿原酸的含量, 准确性高, 重现性好, 且操作简便快速。

### 【参考文献】

[1] 中国药典 2005 版. 一部[S]. 2005:405.

- [2] 王宏军, 吴国娟, 李焕荣, 等. 金银花中绿原酸提取方法的筛选及其抑菌作用[J]. 北京农学院学报, 2003, 18(4): 262.
- [3] 胡美芳, 宋秋华, 王波. 高效液相色谱法测定清肺止咳颗粒中绿原酸的含量[J]. 中国药业, 2009, 18(20): 34.
- [4] 邱华荣, 田吉, 冯文学, 等. 青银注射液中绿原酸与樟脑的含量测定[J]. 中成药, 2004, 26(8): 621.
- [收稿日期] 2010-07-09  
[修回日期] 2011-03-04

(上接第264页)

(Y), 绘制标准曲线, 计算回归方程。回归方程为  $Y = -19.85 + 37.17X$ ,  $r = 0.9999$  ( $n = 6$ )。结果表明: 盐酸小檗碱在 5.59 ~ 178.88  $\mu\text{g/ml}$  范围内有良好的线性关系。

**3.2.6 样品溶液稳定性试验** 精密称取供试品(批号 20090525) 0.5026 g, 照上述方法制备供试品溶液, 精密吸取 10  $\mu\text{l}$ , 分别于配制后 0、2、4、8、12、16 h 依法测定, 盐酸小檗碱峰面积的 RSD 为 0.57%。结果表明, 供试品溶液在 16 h 内较稳定。

**3.2.7 重复性试验** 取同一批号肠康颗粒样品(批号 20090525) 6 份, 按“供试品溶液”项下方法操作, 结果盐酸小檗碱的平均含量为 12.61 mg/袋; RSD = 0.52% ( $n = 6$ ); 表明此法重复性良好。

**3.2.8 加样回收率实验** 取已知含量的肠康颗粒样品 0.25 g (批号 20090525, 盐酸小檗碱含量为 1.261 mg/g), 按 1:1 的比例分别加入对照品适量, 按供试品溶液的制备方法制备供试液, 平行试验 6 份, 按上述色谱条件, 测定其含量, 结果其平均回收率为 103.32%, RSD 为 1.26%。回收率试验的测定结果见表 1。

表 1 肠康颗粒中黄连的加样回收率试验结果

称样量(g)	相当盐酸小檗碱的量(mg)	加入盐酸小檗碱的量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均值(%)	RSD(%)
0.2501	0.3154	0.3410	0.6665	102.96		
0.2564	0.3233	0.3410	0.6797	104.52		
0.2498	0.3150	0.3410	0.6686	103.70	103.32	1.26
0.2491	0.3141	0.3410	0.6583	100.94		
0.2575	0.3247	0.3410	0.6806	104.37		
0.2538	0.3200	0.3410	0.6727	103.43		

**3.2.9 样品测定** 取肠康颗粒各批次样品, 按上述方法测定, 计算盐酸小檗碱含量, 结果见表 2。

表 2 肠康颗粒中盐酸小檗碱含量测定结果 ( $n = 2$ )

批号	盐酸小檗碱含量(mg/袋)
20090525	12.61
20090526	11.34
20090527	12.29

由于测定样品的批次有限, 根据测定结果, 暂定本品每袋含黄连以盐酸小檗碱( $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClNO}_4$ )计, 不得少于 9.0 mg。

#### 4 讨论

**4.1 提取溶剂与提取方法考察** 在样品的前提取处理中<sup>[1]</sup>, 对稀乙醇、乙醇、甲醇、盐酸-甲醇(1:100)的考察结果表明, 盐酸-甲醇(1:100)作为提取溶剂提取率最高。对冷浸法、热回流提取法、超声处理法的考察结果表明, 超声处理法效果较理想。此外, 对超声处理的时间进行了考察, 结果超声处理 30 min, 即将有效成分基本提取完全。

**4.2 色谱条件的选择** 选择  $\text{C}_{18}$  色谱柱, 比较了不

同商品类型的色谱柱 Agilent ZORBAX SB- $\text{C}_{18}$  (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 分析柱、SHIMADZU VP-ODS (250 mm $\times$ 4.6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ) 分析柱、及 Agilent ZORBAX EXTEND- $\text{C}_{18}$  (250 mm $\times$ 4.6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ) 分析柱, 结果上述  $\text{C}_{18}$  分析柱对盐酸小檗碱的分离效果均较好<sup>[1-3]</sup>。以乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调节 pH 至 3) (30:70) 为流动相, 可同时分离多种小檗碱型生物碱类化合物, 达到了较满意的分离效果。

**4.3 检测波长的选择** 在实验中, 对盐酸小檗碱对照品<sup>[2]</sup>溶液, 在 200 ~ 400 nm 分别进行光谱扫描, 在 265 nm 处有最大吸收, 测定灵敏度最高, 故选择其为测定波长。

#### 【参考文献】

- [1] 中国药典 2010 版. 一部[S]. 2005: 54, 213.
- [2] 王宝琴. 中成药质量标准与标准物质研究[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994: 118.
- [3] 安登魁. 现代药物分析选论[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 781.

[收稿日期] 2010-09-26  
[修回日期] 2011-01-19