

HPLC 法测定利湿口服液中绿原酸和橙皮苷的含量

储忠英, 吴丽红, 徐红艳 (上海市松江食品药品检验所, 上海 201600)

[摘要] 目的 建立同时测定利湿口服液(车前草、地肤子、金银花、陈皮、苦参、茯苓皮、麦饭石)中绿原酸及橙皮苷含量的检测方法。方法 高效液相色谱法, 色谱柱为 C_{18} 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μ m), 以乙腈为流动相 A, 0.1% 磷酸为流动相 B, 梯度洗脱, 检测波长为 290 nm; 流速为 1.0 ml/min。结果 绿原酸对照品在 4.040 ~ 80.80 μ g/ml 范围内相关系数 $r = 1.000 0$; 橙皮苷对照品在 3.618 ~ 72.35 μ g/ml 范围内相关系数 $r = 1.000 0$, 绿原酸平均加样回收率为 100.2%, RSD 为 0.83%; 橙皮苷平均加样回收率为 99.95%, RSD 为 0.61%。结论 本方法简单准确、重现性好, 专属性强, 适用于利湿口服液中上述成分含量的检测。

[关键词] 利湿口服液; 绿原酸; 橙皮苷; HPLC

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)04-0300-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.04.017

Determination of chlorogenic acid and hesperidin in Lishi Oral Liquid by HPLC

CHU Zhong-ying, WU Li-hong, XU Hong-yan (Shanghai Songjiang Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201600, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for determining chlorogenic acid and hesheridin in Lishi Oral Liquid (Plantaginis Herba, Kochiate Frouctus, Lonicerae Japonicae Flos, Sophorpe Flavescentis Radix, Citri Reticulatae Pericarpium, Poriae Cutis, Maifahi-tum) by HPLC. **Methods** The HPLC with a C_{18} column was used. The mobile phases was a mixture of acetonitrile for current phase A, 1% Phosphoric acid solution for current phase B; the form prescribed in the gradient elution. The detection wavelength was 290 nm, flow velocity was 1.0 ml/min. **Results** The linear range was 4.040 ~ 80.80 μ g/ml for chlorogenic acid and 3.618 ~ 72.35 μ g/ml for hesperidin. The average recovery of chlorogenic acid was 100.2% (RSD was 0.83%). The average recovery of hesperidin was 99.95% (RSD was 0.61%). **Conclusions** The method was simple, accurate, and reproducible with exclusive property which could be used for quality control of Lishi Oral Liquid.

[Key words] Lishi Oral Liquid; HPLC; chlorogenic acid; hesperidin

利湿口服液是医院自制制剂^[1], 由车前草、地肤子、金银花、陈皮、苦参、茯苓皮、麦饭石七味药材组成, 具有清热利湿、消肿止痒之功效, 其中金银花和陈皮中主要成分绿原酸和橙皮苷对清热利湿起到了重要的治疗作用^[2,3]。笔者采用 HPLC 法, 通过梯度洗脱单波长同时检测绿原酸和橙皮苷, 方法简单易行, 可行性强, 为制定该制剂含量测定标准提供了依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent HP1100 高效液相色谱仪(DAD 检测器); METTLER AG135 型电子分析(精度为十万分之一)。

1.2 试剂 乙腈(色谱纯, 德国默克), 水为自制超纯水; 其余试剂均为分析纯。

1.3 对照品 绿原酸对照品(110715-200514)、橙皮苷对照品(110721-201014), 中国药品生物制品检

定所, 均为国家标准物质, 供定量测定用。

1.4 样品 利湿口服液(上海某医院生产, 规格为 10 ml/支, 批号 12011205、11120403、11112305、11091603、11070701)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱^[4]: ZORBAX Eclipse XDB- C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相^[4]: 乙腈为流动相 A, 以 1% 磷酸溶液为流动相 B, 按表 1 中的比例进行梯度洗脱^[6]; 检测波长为 290 nm^[5-7], 流速为 1.00 ml/min; 进样量为 10 μ l, 柱温为 30 $^{\circ}$ C。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品和橙皮苷对照品适量, 绿原酸用 50% 甲醇溶解, 橙皮苷用甲醇溶解, 再加 50% 甲醇制成每 1 ml 绿原酸 0.404 0 mg、橙皮苷 0.361 8 mg 的混合溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密吸取本品 2 ml, 置 50 ml 容量瓶中, 加 50% 甲醇适量, 振摇 10 min, 加

[作者简介] 储忠英(1972-), 女, 主管药师。Tel: (021) 57810790, 18917168230, E-mail: shsjczy@126.com。

溶剂稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

表1 梯度洗脱色谱条件

时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0~7	9	91
7~12	7	93
12~13	7→20	93→80
13~23	20→23	80→77
23~25	23→9	77→91

2.2.3 阴性空白样品溶液的制备 按处方组成,制备不含金银花和陈皮的阴性模拟制剂,照上述供试品溶液的制备方法制成空白溶液。

2.3 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下的对照品混合溶液,稀释配制含绿原酸质量浓度分别为4.040、8.080、16.16、32.32、48.48、64.64、80.80 μg/ml和橙皮苷质量浓度为3.618、7.236、14.47、28.94、43.41、57.88、72.35 μg/ml的系列混合对照品溶液,在上述色谱条件下测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。其结果:绿原酸的回归方程: $Y=22.5321X-2.3374$, $r=1.0000$,橙皮苷的回归方程: $Y=16.4281X-1.8883$, $r=1.0000$,表明绿原酸在4.040~80.80 μg/ml范围内线性关系良好,橙皮苷在3.618~72.35 μg/ml范围内线性关系良好。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 在上述拟定色谱条件下,通过梯度洗脱后,绿原酸和橙皮苷与其他杂峰均能达到基线分离,理论板数均大于4000,且供试品和对照品在220~400 nm峰型匹配度好,纯度高,阴性对照溶液均无干扰峰。对照品、供试品及阴性样品色谱峰见图1。

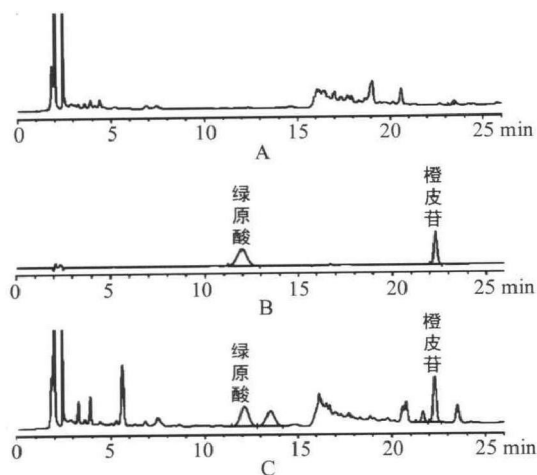


图1 绿原酸和橙皮苷色谱图

A-阴性对照品;B-对照品;C-供试品

2.4.2 精密度试验 取供试品溶液,连续重复进样6次,结果绿原酸峰面积相对标准偏差RSD为0.37% ($n=6$);橙皮苷峰面积相对标准偏差RSD为0.22% ($n=6$)。

2.4.3 重复性试验 取同一批供试品,分别按照“2.3”项下的方法平行制备6份供试品溶液,进行测定,绿原酸峰面积相对标准偏差RSD为0.51% ($n=6$),橙皮苷峰面积相对标准偏差RSD为0.79% ($n=6$)说明方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一供试品溶液,于0、2、4、6、8、10、24 h分别测定,结果绿原酸相对标准偏差RSD为0.95%;橙皮苷相对标准偏差RSD为0.80%。表明样品在24 h内稳定。

2.4.5 回收率试验 精密吸取已知含量的样品(批号12011205)1.0 ml,精密加入“2.2”项下的对照品混合溶液0.5、1.0、2.0 ml,每份平行2份,按“2.2”项下方法制成加样供试品溶液。依法测定,计算回收率,结果绿原酸平均回收率为100.2%,RSD为0.83%;橙皮苷平均回收率为99.94%,RSD为0.61%,表明本方法回收率良好。具体见表2。

表2 加样回收率试验结果($n=6$)

成分	样品量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
绿原酸	0.4147	0.2020	0.6232	101.05	100.2	0.83
	0.4147	0.2020	0.6244	101.25		
	0.4147	0.4040	0.8216	100.35		
	0.4147	0.4040	0.8178	99.89		
	0.4147	0.6060	1.2194	99.73		
	0.4147	0.6060	1.2112	99.06		
橙皮苷	0.4922	0.1809	0.6695	99.47	99.94	0.61
	0.4922	0.1809	0.6690	99.39		
	0.4922	0.3618	0.8510	99.65		
	0.4922	0.3618	0.8518	99.74		
	0.4922	0.7236	1.2218	100.49		
	0.4922	0.7236	1.2268	100.90		

2.5 样品测定 按“2.2.2”项下的方法制备成供试品溶液,每批样品制备3份平行样,带入标准曲线,按照标准曲线法计算绿原酸和橙皮苷量,即得,结果见表3。

表3 样品测试结果($n=3$)

批号	绿原酸量(mg/ml)	RSD(%)	橙皮苷量(mg/ml)	RSD(%)
12011205	0.4146	0.53	0.4925	0.76
11120403	0.4854	0.41	0.6055	0.76
11212305	0.2408	0.57	0.3614	0.56
11091603	0.2368	0.61	0.3358	0.46
11070701	0.1620	0.52	0.4204	0.49

(下转第317页)

短期容易实现的指标如文章等;高级职称者相对在药剂岗位上工作年限更长,已经通过了职务评审,更看重的是一些需要长期积累和努力实现的指标,如教学奖励、开展新业务情况、差错率等,这也符合咨询专家本身的身份。

总之,只有正确的对待中高级职称人员的不同意见,全面掌握人员的思想动态,客观的加以分析,建立科学的、让专业人员信服的高级技术职务任职标准,使评审工作由重学历、重资历向重能力、重业绩方向转变,才能使军队卫生领域职称评审工作在政策、工作方式、服务质量上更上一层楼,促进军队卫生事业的健康、可持续发展^[4]。

【参考文献】

- [1] 丁果. 浅谈湖北省卫生专业高级职称评审的现状[J]. 公共卫生与预防医学, 2008, 19(5): 100.
- [2] Frith L. Priority setting and evidence based purchasing[J]. Health care analysis, 1999, 7: 139.
- [3] 余璐璐, 彭彬, 姚锐. 卫生专业高级职称评审中实行量化标准的思考[J]. 咸宁学院学报, 2009, 10: 164.
- [4] 罗琳, 梁旭. 卫生专业技术职务评聘指标及机制研究[J]. 中国循证医学杂志, 2010, 10(5): 631.

[收稿日期] 2012-07-09

[修回日期] 2012-11-14

(上接第301页)

3 讨论

3.1 检测组分的确定 本处方药味虽不多,但成分复杂。由于本制剂为传统水煎剂,能在同系统同波长条件下同时检测的已知成分不多,笔者根据实际情况选择绿原酸和橙皮苷两种成分,通过试验证明用本方法检测上述有效成分简单可行。

3.2 检测波长的确定 选择290 nm波长,虽不是两者的最大吸收波长,但笔者分别在该波长和两成分的最大吸收波长进行线性比较,均达到了满意的结果,且在各波长处考察主峰与相邻杂峰均能达到有效分离,故选定290 nm为本品检测波长。

3.3 供试品制备方法的考察 本制剂为水煎液,待检成分已经处于溶解状态,故笔者分别用水、50%、60%、80%、100%不同浓度的甲醇,并用振摇(0、10、30 min),超声(10、20、30 min)进行试验,结果用水做溶剂未知成分与有效成分较难达到基线分离,结果重现性差,用50%甲醇和100%甲醇均能达到满意分离,且结果一致,而不振摇、振摇、超声的结果也几乎无差异,考虑到环保、结果的稳定性等因素选择50%甲醇作为溶剂,以振摇10 min作为提取方法。

3.4 流动相比比例考察 笔者考察过甲醇-水的梯度和乙腈-水的梯度,发现乙腈-水的梯度能使两组分和其他未知峰更有效分离,并对磷酸浓度0.1%和0.4%进行考察,发现磷酸浓度的变化对结果无明显影响。通过大量的试验确定前述梯

度,既可保证两者和杂峰的有效分离,峰的纯度高,理论塔板数在4 000以上(橙皮苷的理论塔板数达到10 000以上)。

本制剂虽是医院制剂,但对其质量控制也是非常重要的。通过大量试验证明本方法分离度好,精密度高,重复性好,无干扰,制备简单,且能同时检测绿原酸和橙皮苷,可行性强,可用于本制剂中上述成分的含量检测。通过对5批样品的检测,发现两成分含量各不相同,且差异较大。造成此现象的原因有多种,主要可能是由于各原药材质量,因此,更有必要用本法对该制剂的有效成分进行检测,达到质量控制的目的。

【参考文献】

- [1] 上海市食品药品监督管理局医疗机构制剂质量标准[S], SYZ-ZF-003-2004.
- [2] 黄丽瑛, 吕植楨, 李继彪, 等. 中药金银花化学成分的研究[J]. 中草药, 1996, 15(11): 645.
- [3] 张志海, 王彩云, 杨天鸣, 等. 陈皮的化学成分及药理作用研究进展[J]. 西北药学杂志, 2005, 20(1): 49.
- [4] 中国药典2010年版[S]. 2010: 205, 176, 1089, 1077, 1139.
- [5] 邢丽红, 李文龙, 瞿海斌. 金银花提取物中5种有机酸含量测定的紫外光谱法[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(3): 133.
- [6] 杨蓓蓓, 刘超, 王素娟, 等. 高效液相色谱法测定金银花药材中3种成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(2): 34.
- [7] 林林, 林子夏, 莫云燕, 等. 不同年份新会陈皮总黄酮及橙皮苷含量动态分析[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(6): 150.

[收稿日期] 2012-07-18

[修回日期] 2012-12-10