

HPLC 法测定金苓芍注射液中绿原酸·黄芩苷和芍药苷的含量

刘发全, 宋亚伟, 吴昊, 张莉, 丁在亮 (安徽省兽药饲料监察所, 安徽合肥 230091)

摘要 [目的]建立高效液相色谱法(HPLC)同时测定金苓芍注射液中绿原酸、黄芩苷和芍药苷的含量。[方法]色谱柱为 Waters 公司 Symmetry C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相 A 为乙腈, B 为 0.025 mol/L 磷酸溶液, 采用梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 测定波长为 230 nm, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL。[结果]绿原酸、芍药苷和黄芩苷分离度良好, 分别在 2.52~126.05、1.47~73.78、4.81~250.55 μg/mL 有良好的线性关系。[结论]该方法精密度高、重复性好、操作简便, 适用于金苓芍注射液中绿原酸、芍药苷和黄芩苷的含量测定。

关键词 金苓芍注射液; 绿原酸; 黄芩苷; 芍药苷; HPLC
中图分类号 R 284.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)24-0160-02

Determination of Chlorogenic Acid, Baicalin and Paeoniflorin in Jinqingshao Injection by High Performance Liquid Chromatography
LIU Fa-quan, SONG Ya-wei, WU Hao et al (Anhui Province Veterinary Drug and Feed Information Net, Hefei, Anhui 230091)
Abstract [Objective] The research aimed to establish the high performance liquid chromatography method, and determine the contents of chlorogenic acid, baicalin and paeoniflorin of Jinqingshao injection at the same time. [Method] The samples were separated by waters company symmetry C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), using acetonitrile and 0.025 mol/L phosphoric acid solution as mobile phases with flow rate 1.0 mL/min by gradient elution, detected by 230 nm, taken 10 μL at column temperature 30 ℃. [Result] There was good separation of chlorogenic acid, baicalin and paeoniflorin. The linear ranges were 2.52–126.05, 1.47–73.78 and 4.81–250.55 μg/mL, respectively. In this ranges, the peak areas had a good correlation. [Conclusion] The method has high precision, high repeatability and simple operation, and is suitable for the determination of chlorogenic acid, baicalin and baicalin in Jinqingshao injection.
Key words Jinqingshao injection; Chlorogenic acid; Baicalin; Paeoniflorin; High performance liquid chromatography

金苓芍注射液收载于《兽药质量标准》2017 年版(中药卷)^[1], 主要有金银花、黄芩、白芍 3 味中药材。金银花性寒, 味甘, 入肺、心、胃经, 具有清热解毒、疏散风热、凉血止痢、降血降火、消咽利膈之功效, 所含有绿原酸为主要药理活性成分^[2], 主治畜禽风热感冒、热毒血痢、痢疾疔毒, 对多种致病细菌、病毒有抑制作用, 具有增强免疫力、护肝、消炎、解热、止血, 用于预防和治疗呼吸道感染、肺炎、痢疾、肿溃疡、丹毒等症。黄芩性寒, 味苦, 入心、肺、胆、大肠经, 具有清热燥湿、凉血安胎、解毒的功效, 所含有黄芩苷为主要药理活性成分^[3], 主治畜禽温热病, 具有抗菌、解热、镇静、利胆、抗炎抗变态反应, 用于上呼吸道感染、肺热咳嗽、湿热黄胆、肺炎、痢疾、咳血、目赤、胎动不安、痈肿疔疮等症。芍药性微寒, 味微苦, 入心、肺、肝经, 具有养血滋阴、止痛护肝的功效, 所含有芍药苷为主要药理活性成分^[4], 用于促进畜禽新陈代谢, 提高肌体免疫力, 具有显著的镇痛、镇静、抗惊厥作用。金苓芍注射液是将 15 份金银花、7 份黄芩、6 份白芍中药经蒸馏、水煎、醇沉制成纯中药兽用制剂, 其具有疏散风热、清热解毒、抗菌保肝、解热退烧的功能, 主要用于治疗动物外感风热、温病初起^[5], 其质量标准主要规定检测活性成分绿原酸的含量, 而黄芩、白芍主要活性成分黄芩苷和芍药苷也起很大作用, 但标准未规定其含量检测方法。笔者利用高效液相色谱仪(HPLC), 采用梯度洗脱法, 同时测定了组方中金银花、黄芩、白芍中的活性成分绿原酸、黄芩苷、芍药苷含量, 为完善该制剂的质量标准提供參考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器。美国 Agilent 公司高效液相色谱仪, 型号

作者简介 刘发全(1979—), 男, 安徽六安人, 兽医师, 硕士, 从事兽药、饲料、畜产品安全检测工作。

收稿日期 2018-04-09

HP 1100, 配四联梯度泵、在线脱气机、二极管阵列紫外检测器(DAD)、自动进样器和柱温箱; 十万分之一天平, 德国赛多利斯, 感量 0.01 mg, 型号 BS21S。

1.1.2 主要试剂。绿原酸对照品(批号 Z0261407, 含量 97.3%)、芍药苷对照品(批号 Z0261706, 含量 96.3%)、黄芩苷对照品(批号 Z0271705, 含量 96.8%), 均购自中国兽医药品监察所; 金苓芍注射液(合肥爱瑞特生物制药有限公司提供, 批号 20171001、20171002、20171003); 乙腈、甲醇均为色谱纯, 美国 FISHER Chemical 公司; 磷酸, 分析纯, 上海试剂公司; 色谱用水为一级水, 符合 GB/T 6682 中用水规定。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液的制备。精密称取绿原酸 25.91 mg、芍药苷 25.35 mg、黄芩苷 24.85 mg 对照品于 100 mL 容量瓶, 加 50% 甲醇溶解, 制成储备液, 分别精密量取绿原酸、芍药苷、黄芩苷储备液 5 mL 于 50 mL 容量瓶混合, 加 50% 甲醇定溶, 制成工作液。

1.2.2 供试品溶液的制备。精密量取金苓芍注射液 1 mL 置 50 mL 容量瓶, 分别加水、乙腈各 10 mL 混合, 凉至室温, 加水定容至刻度, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

1.2.3 色谱分析条件。色谱柱: Waters 公司 Symmetry C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 以乙腈为流动相 A, 以 0.025 mol/L 磷酸溶液为流动相 B, 四元梯度泵在线配制, 按表 1 规定进行梯度洗脱; 流速 1.0 mL/min; 测定波长 230 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL。

1.2.4 方法学考察。

1.2.4.1 系统适用性试验。分别吸取对照品溶液及供试品溶液各 10 μL, 在“1.2.3”色谱条件下, 注入液相色谱仪进行测定, 记录色谱图, 考察系统适用性。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution procedures

时间 Time//min	流动相 A Mobile phase A//%	流动相 B Mobile phase B//%
0~12	16	84
12~16	16→32	84→68
16~23	32	68
23~27	32→16	68→84
27~30	16	84

1.2.4.2 线性关系的考察。HPLC 自动进样器吸取工作液 2、5、10、10、20、40 μL 注入 HPLC 仪,记录色谱图,以进样浓度 X (μg/mL)为横坐标、峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线,计算线性回归方程。

1.2.4.3 精密度试验。取对照品工作液,按“1.2.3”色谱条件连续进样 6 次,测定对照品工作液中绿原酸、芍药苷、黄芩苷的峰面积的 RSD 值。

1.2.4.4 稳定性试验。取供试品溶液,在室温下放置 1、6、12、24、48 h 后,按“1.2.3”色谱条件,注入液相色谱仪进行测定,进样量 10 μL,测定峰面积积分值,计算 RSD。

1.2.4.5 重复性试验。取同一批号的样品按“1.2.2”方法制备供试品溶液 6 份,按“1.2.3”色谱分析条件,进样量为 10 μL,测定峰面积,计算平均含量和 RSD。

1.2.4.6 加样回收试验。取同一批号样品 6 份,精密加入分别与样品中绿原酸、芍药苷、黄芩苷含量相等的对照品,按“1.2.2”方法制备供试品溶液,再按“1.2.3”色谱条件测定,进样量为 10 μL,测定峰面积,计算平均回收率和 RSD。

1.2.5 样品测定。取金苓芍注射液,每批按“1.2.2”方法制备 3 份平行样,按“1.2.3”色谱条件注入 HPLC,测定样品中绿原酸、芍药苷、黄芩苷的峰面积,通过标准曲线计算样品含量。

2 结果与分析

2.1 方法学考察

2.1.1 系统适用性试验。图 1、2 表明,按“1.2.3”此条件下,绿原酸、芍药苷、黄芩苷的保留时间分别为 5、10、20 min 左右,对照品溶液色谱主峰保留时间与供试品保留时间一致,分离度大于 1.5,理论塔板数大于 5 000。

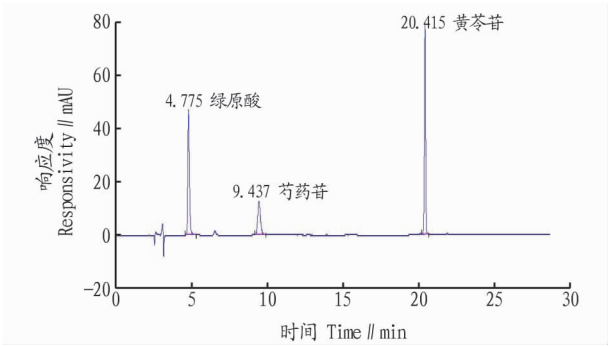


图 1 对照品色谱图

Fig.1 Chromatogram of reference substance

2.1.2 线性关系的考察。按“1.2.4.2”方法操作,计算线性回归方程,见表 2。结果表明,绿原酸在 2.52~126.05 μg/mL、芍

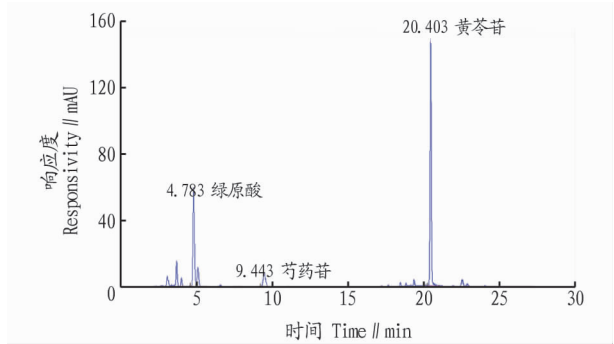


图 2 样品色谱图

Fig.2 Chromatogram of sample

药苷在 1.47~73.78 μg/mL、黄芩苷在 4.81~250.55 μg/mL 呈良好的线性关系。

表 2 回归方程和线性范围

Table 2 Regression equation and linear range

组分 Component	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient (r)	线性范围 Linear range μg/mL
绿原酸 Chlorogenic acid	$Y=16.09X-34.35$	0.999 8	2.52~126.05
芍药苷 Paeoniflorin	$Y=11.05X-1.65$	0.999 9	1.47~73.78
黄芩苷 Baicalin	$Y=9.35X+7.57$	0.999 9	4.81~250.55

2.1.3 精密度试验。按“1.2.4.3”方法操作,计算得出绿原酸、芍药苷、黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 0.34%、0.46%、0.53% ($n=6$),保留时间的 RSD 均小于 1%,表明在此试验条件下精密度良好。

2.1.4 稳定性试验。按“1.2.4.4”方法操作,计算得出绿原酸、芍药苷、黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 0.44%、0.68%、0.86% ($n=5$),表明试样在 48 h 内稳定。

2.1.5 重复性试验。按“1.2.4.5”方法操作,计算得出样品中绿原酸、芍药苷、黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 0.31%、0.42%、0.50% ($n=6$),保留时间的 RSD 均小于 2%,表明该方法重复性良好。

2.1.6 加样回收试验。按“1.2.4.6”方法操作,平均回收率为 98.0%~102.8%,RSD 为 1.00%~1.15%,表明该方法准确、可靠,可用于金苓芍注射液中绿原酸、芍药苷、黄芩苷含量测定。

2.2 样品含量测定 由表 3 可知,金苓芍注射液中绿原酸、芍药苷、黄芩苷含量分别为 3.51、2.45、3.74 mg/mL。

表 3 样品含量测定结果 ($n=3$)

Table 3 Sample content determination results mg/mL

批号 Batch number	绿原酸 Chlorogenic acid	芍药苷 Paeoniflorin	黄芩苷 Baicalin
20171001	3.51	2.45	3.73
20171002	3.52	2.44	3.75
20171003	3.51	2.45	3.74

资源丰富,因地制宜,大力培育雷竹林,建立雷竹生产基地;构建以板栗生产为主的特色农产品基地,打造新丰板栗品牌;开发蚕桑产业,建立蚕桑养殖基地。



图 6 镇区道路系统规划
Fig.6 Township road system planning chart

(2)因地制宜。将工业迁离中心镇区,优化镇区环境,在乡域内形成“一心两区”的空间布局模式。由于山区可供成片开发的建设用地较少,且镇区周围都是山体,属于窝风地带,不适合布置工业企业,因此在镇区外围地形较为开敞地区选址 A、B 2 个工业区。工业项目结合产业特点分类布置在 2 个工业区内,节约市政基础设施投入。

(3)在 GIS 知识的支撑下,利用 ArcGIS 对各项地形地貌因子进行综合分析评价。结合新丰乡地处皖南山区的特点,利用 ArcGIS 软件对新丰乡的地形地貌进行模拟分析,对高程、坡度等各类因子进行综合评价,为乡域地面径流和地

质灾害等规划内容提供更加有效的技术支撑。

(4)充分挖掘新丰乡旅游资源潜力,策划特色旅游产品,打造黄山区北部旅游乡镇。深入分析新丰乡旅游资源特点、挖掘文化底蕴,围绕旅游市场发展需求和趋势,策划具有地域特色的旅游产品,规划设计百年板栗园等具体旅游项目,以旅游开发来推动全乡经济发展。

(5)结合山区地形条件,道路线形顺应地形走势,合理规划集镇路网形态。根据规划范围内地形高低起伏状况合理规划镇区道路,道路线形依山就势,减少了道路建设的土方工程量,节省了基础设施投资,同时道路线形更加符合山区乡镇路网特点,整个集镇路网形态更加合理美观。

参考文献

- [1] 胡志华,李婷.乡镇总体规划修编工作的实践与思考:以宿迁市为例[J].江苏城市规划,2010(8):33-34.
- [2] 闫瑾.欠发达地区乡镇总体规划编制思考:以新疆吉木乃县托斯特乡为例[J].安徽建筑,2014,21(6):45-46.
- [3] 李肇娥,赵海春,李铜英.城乡空间统筹在县城总体规划中的实践:以米脂县城总体规划为例[J].城市规划,2009,33(7):74-77.
- [4] 莫滨.城乡统筹视野下的小城镇总体规划编制:以南宁市那陈镇总体规划为例[J].广西城镇建设,2010(7):18-21.
- [5] 朱宝杨.基于城乡统筹背景下的“1+X”小城镇总体规划探讨[J].小城镇建设,2012(7):28-33.
- [6] 郭健.城乡统筹背景下小城镇总体规划编制方法探析:以河北省唐山市丰南区黄各庄镇为例[J].城市规划,2011,35(9):92-96.
- [7] 陈志诚,侯雷,兰贵盛.“城乡统筹发展”与小城镇总体规划的应对[J].规划师,2006,22(2):69-72.
- [8] 李肇娥,赵海春,李铜英.城乡空间统筹在县城总体规划中的实践:以米脂县城总体规划为例[J].城市规划,2009,33(7):74-77.

(上接第 161 页)

3 结论与讨论

(1)有文献报道用甲醇、磷酸溶液作为流动相^[6-8],经试验发现,绿原酸、芍药苷、黄芩苷 3 种成分分离度达不到要求,杂质有干扰。以乙腈、0.025 mol/L 磷酸溶液进行梯度洗脱能够缩短分析周期,增加灵敏度,提高分离度同时使峰型得到改善,减少拖尾和杂质干扰。

(2)经二极管阵列紫外检测器(DAD)全波长扫描,绿原酸、黄芩苷分别在 327、278 nm 有最大的吸收,《兽药质量标准》2017 年版(中药卷)规定采用 327 nm 测定金苓芍注射液 中绿原酸含量,芍药苷在此波长处几乎没有吸收,芍药苷在 230 nm 处有最大吸收,黄芩苷、绿原酸在 230 nm 处有次吸收,根据处方金银花和黄芩投料比例较高,所以选择 230 nm 为测定波长。

(3)该研究建立了 HPLC 同时测定金苓芍注射液中绿原

酸、芍药苷和黄芩苷的含量方法,通过试验发现,该方法精密度高、重复性好、操作简便,适用于金苓芍注射液的质量控制,为标准的提高提供依据。

参考文献

- [1] 中国兽药典委员会.兽药质量标准:中药卷[S].北京:中国农业出版社,2017.
- [2] 李平,赵成.金银花水提物及醇提物体外抗菌实验[J].中国当代医药,2010,17(17):48,50.
- [3] 周锡钦,梁鸿,路新华,等.中药黄芩主要黄酮类成分及其生物活性研究[J].北京大学学报(医学版),2009,41(5):578-584.
- [4] 戴亦晖,王小虹,戴晓东.白芍总苷的药理作用及其应用[J].中华临床医学卫生杂志,2006(5):27-28.
- [5] 张璐,龚旭昊,范强.金苓芍注射液含量测定的不确定度分析[J].中国兽药杂志,2018,52(1):56-62.
- [6] 桂蜀华,陈军,王林,等.HPLC 法同时测定银翘柴桂颗粒中绿原酸、芍药苷和黄芩苷[J].中成药,2011,33(7):1175-1178.
- [7] 何建雄,赖小平,魏刚,等.HPLC 测定银翘柴桂汤中绿原酸、芍药苷、黄芩苷[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(6):48-50.
- [8] 郝洋,张照洁,刘晓红.HPLC 法同时测定连翘败毒丸中 5 种成分的含量[J].中国药房,2016,27(6):815-818.

科技论文写作规范——文内标题

文章内标题力求简短,一般不超过 20 字,标题内尽量不用标点符号。标题顶格书写,文内标题层次不宜过多,一般不超过 4 级,分别以 1;1.1;1.1.1;1.1.1.1 方式表示。