

2.6 精密度实验 取每 1ml 含芍药苷 0.015mg 的对照品溶液与相应的供试品溶液,各进样 5 次,芍药苷对照品 5 次测定的峰面积平均值为 505098, RSD 为 0.63%; 供试品中芍药苷的平均值为 608772, RSD 为 0.88%; 说明仪器性能良好。

2.7 稳定性试验 取精密度试验项下的对照品溶液与供试品溶液,每隔一定时间进样 1 次,考察了 20 小时内的稳定性,对照品芍药苷的 RSD 为 0.55%; 供试品中芍药苷的 RSD 为 0.74%。说明对照品与供试品在 20 小时内稳定。

2.8 重复性试验 以高、中、低剂量,取同一批样品(批号: 040828) 9 份,按供试品制备及色谱条件,进行测定。结果芍药苷的 RSD 为 0.66%。说明方法重现性良好。

2.9 回收率试验 采用加样回收试验,取已知含量的同一批样品(批号: 040828) 9 份,按高、中、低剂量,取适量样品,加上一定量的对照品,按供试品制备及色谱条件,进行测定,计算回收率。芍药苷的平均回收率为 99.05% (n= 9), RSD 为 0.88%, 见表 1。

表 1 芍药苷的回收率试验结果

| 样品<br>取样量<br>(g) | 对照品<br>加入量<br>( $\mu\text{g}$ ) | 总测<br>得量<br>( $\mu\text{g}$ ) | 样品量<br>( $\mu\text{g}$ ) | 对照品<br>测得量<br>( $\mu\text{g}$ ) | 回收率<br>(%) | X<br>(%) | RSD<br>(%) |
|------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------------------|------------|----------|------------|
| 0.0653           | 70.0                            | 217.7                         | 147.7                    | 70.0                            | 100.00     |          |            |
| 0.0658           | 70.0                            | 218.3                         | 148.8                    | 69.5                            | 99.29      |          |            |
| 0.0650           | 70.0                            | 216.2                         | 147.0                    | 69.2                            | 98.86      |          |            |
| 0.0600           | 116.6                           | 251.7                         | 135.7                    | 116.0                           | 99.49      |          |            |
| 0.0607           | 116.6                           | 250.6                         | 137.3                    | 113.3                           | 97.17      | 99.05    | 0.88       |
| 0.0609           | 116.6                           | 254.1                         | 137.8                    | 116.3                           | 99.74      |          |            |
| 0.0631           | 186.6                           | 326.3                         | 142.7                    | 183.6                           | 98.39      |          |            |
| 0.0618           | 186.6                           | 324.4                         | 139.8                    | 184.6                           | 98.93      |          |            |
| 0.0615           | 186.6                           | 325.0                         | 139.1                    | 185.9                           | 99.62      |          |            |

2.10 样品测定 取供试品,按供试品制备及色谱条件项下,进行提取,制备,进样 20 $\mu\text{l}$ ,以外标一点法计算含量,结果见表 2。

表 2 脑心通片中芍药苷含量测定结果

| 样品批号   | 芍药苷含量(mg/片) |
|--------|-------------|
| 040828 | 1.13        |
| 040829 | 1.06        |
| 040808 | 1.30        |
| 040803 | 1.33        |
| 040801 | 1.32        |

### 三、讨论

1. 根据本制剂药味多、药量小、生药粉末投药的特点,为排除众多成分的相互干扰,选择了脂溶性成分,作为鉴别指标。采用低沸点的乙醚为提取溶剂,提高了样品前处理速度,得到的供试品溶液,点于薄层板上,以苯-醋酸乙酯(19:1.5)为展开剂,展开,同一薄层板上日光下可检视丹参的红色斑点,紫外光灯(365nm)下可检视桂枝的荧光斑点。点于另一块薄层板上,稍稍提高一下展开剂极性,又可在紫外光灯(254nm)下检视乳香特征性一个荧光熄灭斑点;紫外光灯(365nm)下检视当归、川芎的荧光斑点;喷香草醛硫酸溶液-乙醇(1:6)溶液后,检视没药的兰紫色斑点。各斑点清晰,无干扰。

2. 黄芪的鉴别前处理一直都是烦琐、复杂、费时的,本鉴别初次根据黄芪苷类的化学结构,直接采用碱水溶液溶解,正丁醇萃取,一步就能得到黄芪甲苷的清晰鉴别斑点,有效提高了检测速度。

3. 采用乙醚提取过的药渣,直接用甲醇超声,滤液就是检出赤芍的供试品溶液。与甲醇超声的赤芍对照药材,点样,展开,喷香草醛硫酸乙醇液显色,可观察到清晰的芍药苷蓝紫色斑点,简便、快捷。

4. 本文还对处方中川芎和当归所含的有效成分绿原酸进行了含量测定探讨,绿原酸和芍药苷用同一流动相可同时测定,芍药苷的色谱保留时间为 15 分钟左右,绿原酸的为 23 分钟左右;但由于供试品中各药材含量太少,每片中含川芎和当归各 0.027g,绿原酸的波峰太小,因此无法与芍药苷同时测定。

## HPLC 法同时测定双黄连口服液中绿原酸和黄芩苷的含量

曹红<sup>1</sup> 祝业<sup>2</sup> (1. 总后勤部卫生部药品仪器检验所,北京 100071; 2. 解放军医学图书馆,北京 100850)

摘要 目的: 建立测定双黄连口服液中绿原酸和黄芩苷含量的高效液相色谱法。方法: 采用高效液相色谱法。以 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(250mm × 4.6mm 5 $\mu\text{m}$ ) 为色谱柱; 流动相: 甲醇-0.05% 磷酸线性梯度洗脱; 检测波长: 328nm; 流速: 1.0ml/min。结果: 绿原酸和黄芩苷的加样平均回收率分别为 98.02%、RSD 为 1.98% (n= 6); 99.38%、RSD 为 1.25% (n= 6)。结论:

作者简介: 曹红,女,主任药师。学科及研究方向: 药学; 中药新药研发和质量评价。联系电话: 010-66949080。

试验结果表明,该方法准确、灵敏度高、重现性好,可以作为双黄连口服液的质量控制标准。

关键词: 双黄连口服液; 绿原酸和黄芩苷; 高效液相色谱法

中图分类号: 921.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-3656(2007)-2-43-4

## Content Determination of Chlorogenic Acid and Baicalin in Shuanghuanglian Oral Solution by HPLC

Cao Hong, Zhu Ye ( Institute for Drug and Instrument Control of PLA, Beijing 100071; Medicinal Library of PLA, Beijing 100850)

**Abstract Objective:** To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of Chlorogenic Acid and Baicalin in Shuanghuanglian Oral Solution. **Methods:** A gilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> (250mm × 4.6mm, 5 $\mu$ m) column was used as the stationary phase, methanol and 0.05% phosphoric acid were used as mobile phase, and the photodiode array detector was used at 328nm. the flow rate was 1.0ml/min. **Results:** The method had good linear relationship within the range of 5~100 $\mu$ g for chlorogenic acid and within the range of 2.7~54mg for baicalin, with the correlation coefficients ( $R$ ) 0.9998 and 0.9999, respectively. The results of the average recovery were 98.2% (RSD = 2.1% n = 6) and 100.8% (RSD = 1.8%, n = 6). **Conclusion:** In this condition, chlorogenic acid and baicalin could be well separated from the other components. The advantage of the method was convenient, rapid, accurate and reliable. The method can be applied to quality control of Shuanghuanglian Preparations.

**Key words:** Shuanghuanglian Oral Solution; Chlorogenic acid; Baicalin; HPLC

双黄连口服液是由金银花、黄芩、连翘三味药材组成的复方制剂。临床上用于感冒发热、咳嗽、咽喉疼痛等的治疗。绿原酸、黄芩苷作为处方中金银花、黄芩两味药材中的主要有效成分,具有清热解毒及明显的抗炎作用,故测定其含量具有实际意义,原标准中只对黄芩药材中的黄芩苷进行了含量测定<sup>[1]</sup>。而其他剂型如注射用双黄连<sup>[2]</sup>和双黄连注射液<sup>[3]</sup>,均采用不同的流动相体系,分别对绿原酸和黄芩苷进行含量测定。本文采用高效液相色谱梯度洗脱法,同时测定双黄连口服液中绿原酸和黄芩苷的含量,用以控制成药的质量,经方法学考察,方法灵敏,定量准确,专属强,快速。

### 一、仪器与试剂

仪器: HP-1050 高效液相色谱仪, HP-1050 四元梯度泵; HP-1050 DAD 检测器; HP-1100 自动进样器; HP-1100 在线脱气机。

试剂: 甲醇为色谱纯, 磷酸等其它试剂均为分析纯。

对照品: 绿原酸对照品 chlorogenic acid CRS (供含量测定用)、黄芩苷对照品 baicalin CRS (供含量测定用) 均由中国药品生物制品检定所提供。

样品: 市场自购。

### 二、方法与结果

#### 1. 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> (250mm × 4.6mm 5 $\mu$ m) 分析柱; 流动相: 甲醇-0.05% 磷酸水溶液线性梯度, 运行时间为 45min; 流速: 1.0mL · min<sup>-1</sup>; 柱温 40 $^{\circ}$ C; 检测波长 328nm。

流动相线性梯度洗脱程序如表 1。

表 1 梯度洗脱程序

| 梯度时间(分钟) | 流动相   |       |
|----------|-------|-------|
|          | A (%) | B (%) |
| 0        | 15    | 85    |
| 40       | 60    | 40    |

注: A: 甲醇 B: 0.05% 磷酸

#### 2. 溶液的制备

**对照品溶液的制备** 取绿原酸和黄芩苷对照品适量, 精密称定, 分别以甲醇制成每 1mL 中约含 20 $\mu$ g 的绿原酸溶液, 和每 1mL 中约含 1.08mg 的黄芩苷溶液, 作为对照品溶液。

**供试品溶液的制备** 精密量取本品 1.0ml, 置 10ml 量瓶中, 加甲醇定容, 用 0.45 $\mu$ m 微孔滤膜滤过, 滤液作为供试品溶液。

**空白对照溶液的制备** 按双黄连口服液样品制备方法, 自制不含黄芩药材和金银花药材的空白对照溶液, 按样品溶液的制备方法配制空白对照溶液。

双黄连口服液、绿原酸对照品、黄芩苷对照品及阴性对照的 HPLC 色谱图分别见图 1、2、3、4。

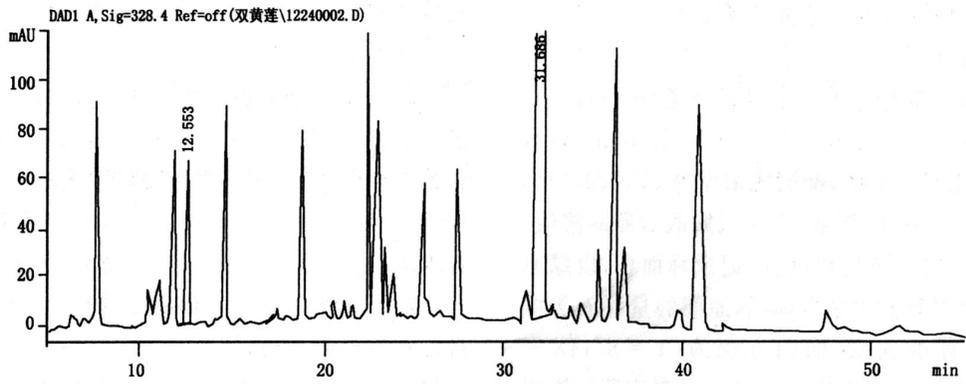


图 1 双黄连口服液 HPLC 色谱图

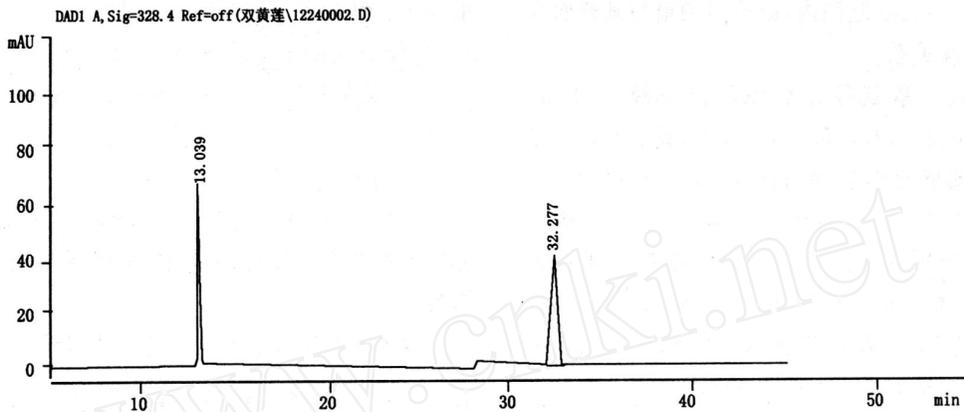


图 2 绿原酸和黄芩苷对照品 HPLC 色谱图

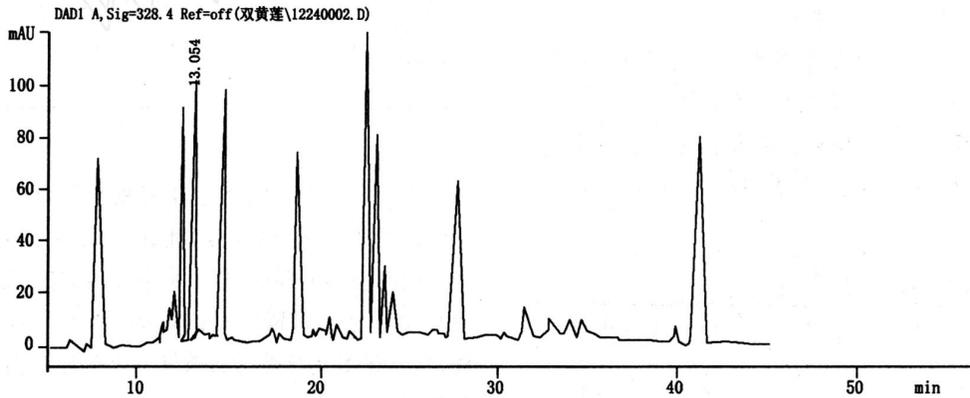


图 3 缺黄芩药材空白对照溶液 HPLC 图谱

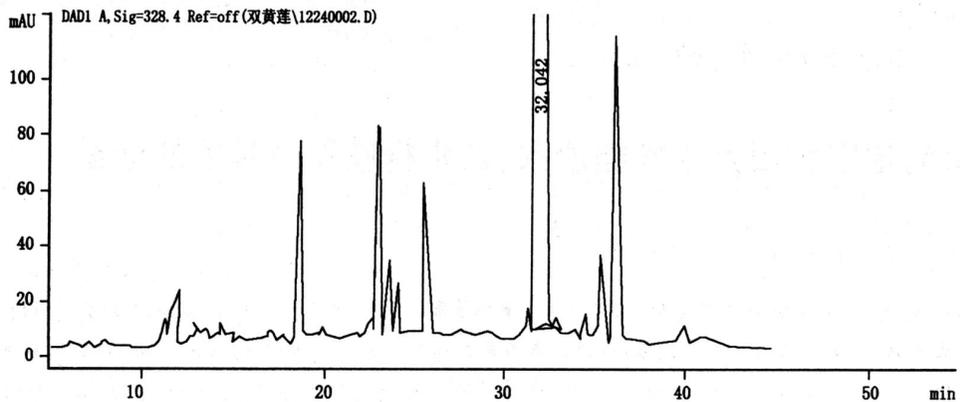


图 4 空白对照溶液 HPLC 图谱

### 3. 专属性试验

按样品测定方法测定空白对照溶液, HPLC 色

谱结果表明均空白不干扰测定结果。

#### 4. 线性关系

**绿原酸** 取绿原酸对照品储备液(0.2mg/mL) 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0、5.0mL, 置 10mL 量瓶中, 以甲醇稀释至刻度, 配制成浓度为 5、10、20、30、40、80、100 $\mu$ g/mL 的溶液, 作为绿原酸对照品溶液, 分别取 10 $\mu$ l 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 以绿原酸峰面积的积分值为纵坐标, 绿原酸的量( $\mu$ g)为横坐标, 绘制标准曲线, 回归方程为:  $Y = 8.14X + 3.68$ , 相关系数  $r = 0.9998$  ( $n = 7$ )。结果表明绿原酸对照品在 5~100 $\mu$ g 范围内, 绿原酸的量与其峰面积呈良好的线性关系。

**黄芩苷** 取黄芩苷对照品储备液(5.4mg/mL) 0.5、1.0、2.0、4.0、5.0、10.0mL, 置 10mL 量瓶中, 以甲醇稀释至刻度, 配制成浓度为 0.27、0.54、1.08、2.16、2.7、5.4mg/mL 的溶液, 作为黄芩苷对照品溶液, 分别取 10 $\mu$ l 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 以黄芩苷峰面积的积分值为纵坐标, 黄芩苷的量(mg)为横坐标, 绘制标准曲线, 回归方程为:  $Y = 1.29X + 3.70$  相关系数  $r = 0.9999$  ( $n = 6$ )。结果表明黄芩苷对照品在 2.7~54mg 范围内, 黄芩苷的量与其峰面积呈良好的线性关系。

**5. 重复性试验** 精密量取同一批双黄连口服液(批号 031113) 6 份, 按“供试品溶液制备”项下方法操作, 结果绿原酸和黄芩苷的平均含量分别为: 0.11mg/支和 84.1mg/支; RSD 分别为 1.7% 和 1.4%。

表 2 日间精密度试验结果(峰面积)

| 序号  | 1 天   | 2 天   | 3 天   | RSD (%) |
|-----|-------|-------|-------|---------|
| 绿原酸 | 812   | 833   | 815   | 1.4     |
| 黄芩苷 | 31735 | 31861 | 31632 | 0.4     |

分别取浓度为 30 $\mu$ g/mL、1.08 $\mu$ g/mL 的绿原酸和黄芩苷对照品溶液, 照上述色谱条件, 连续三天,

每天进样一次, 计算相对标准偏差, 考查日间精密度。结果见表 2。

**6. 样品溶液的稳定性** 将待测样品溶液, 在室温下贮存, 分别于 0、1、3、5、6、8、12 小时, 定期测定含量。结果样品中绿原酸和黄芩苷测定 7 次含量的 RSD 分别为 1.41% 和 0.96%, 结果表明样品溶液在本项试验的条件下, 至少可以稳定 12 小时。

**7. 加样回收试验** 精密量取已知含量的同一批双黄连口服液(批号 031113) 0.5mL, 分别精密加入绿原酸和黄芩苷对照品适量, 按文中供试品溶液的制备方法操作, 测定其含量, 并计算回收率, 测定结果: 绿原酸的平均回收率为 98.2%; RSD (%) 为 2.1%。黄芩苷的平均回收率为 100.8%; RSD (%) 为 1.8%。

#### 8. 样品测定方法

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 5 $\mu$ l, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法计算, 即得。以上述方法测定 3 批市售样品, 结果见表 3。

表 3 样品中绿原酸和黄芩苷含量测定结果( $n = 5$ )

| 批号     | 绿原酸(mg/支) | 黄芩苷(mg/支) | RSD (%) |
|--------|-----------|-----------|---------|
| 031113 | 0.11      | 84.1      | 1.42    |
| 040125 | 0.14      | 110.6     | 0.69    |
| 040304 | 0.13      | 97.5      | 1.25    |

### 三、讨论

由以上含量测定方法学考察结果可以看出, 本方法的线性关系、精密度、准确度、稳定性都符合要求。同时在不同时间、以不同色谱柱, 考察了对绿原酸和黄芩苷的保留时间的影响, 结果表明  $C_{18}$  色谱柱, 均可在本文所确定的条件下进行分离测定。

#### 参考文献

- [1] 国家药典委员会, 中华人民共和国药典[S]. 2005 年版 北京: 化学工业出版社, 2005 一部: 152; 211; 405

## HPLC 法测定宗胺因片中氯唑沙宗、乙水杨胺和咖啡因的含量

王震红 佟宝光(辽宁省药品检验所 沈阳 110023)

**摘要** 目的: 建立高效液相色谱法, 测定复方制剂宗胺因片中氯唑沙宗、乙水杨胺和咖啡因的含量。方法: 采用  $C_{18}$  柱, 以甲醇-水(48:52)为流动相, 检测波长: 280nm。结果: 线性范围为氯唑沙宗 0.0825~0.742 $\mu$ g ( $r = 0.9999$ ); 乙水杨胺 0.165~0.823 $\mu$ g ( $r = 1.0000$ ); 咖啡因 0.0263~0.131 $\mu$ g ( $r = 0.9999$ ), 平均回收率( $n = 9$ )为氯唑沙宗 100.1% (RSD% = 1.01%); 乙水杨胺 99.7% (RSD% = 0.74%); 咖啡因 99.3% (RSD% = 0.57%)。结论: 本方法简便、快速, 专属性强, 可有效的控制宗胺因片中氯

作者简介: 王震红, 女, 主管药师, 学科及研究方向: 药物分析, 联系电话: 13066662037。

