

HPLC-UV-ELSD法同时测定痰热清注射液中主成分含量^{*}

王珏, 瞿海斌, 邵青^{**}

(浙江大学药物信息学研究所, 杭州 310058)

摘要 目的: 建立同时测定痰热清注射液中绿原酸、黄芩苷、熊去氧胆酸含量和鹅去氧胆酸限量的高效液相色谱法。方法: 色谱条件: Agilent Zorbax SB-C₁₈柱; 流动相为 0.15% 醋酸溶液-0.15% 醋酸乙腈, 线性梯度洗脱, 流速为 0.8 mL·min⁻¹; 柱温为 30℃; 紫外检测波长: 绿原酸 326 nm, 黄芩苷 276 nm; 蒸发光散射检测器漂移管温度为 100℃, 雾化气流速为 1.5 L·min⁻¹。结果: 绿原酸、黄芩苷、熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸分别在 0.221~4.42, 20.3~406, 19.8~396, 17.9~179 mg·L⁻¹ 质量浓度范围内呈良好的线性关系, *r* 均大于 0.9995; 平均加样回收率分别为 101%, 98.4%, 99.4%, 102%; 4 种化合物含量重复性试验 RSD 小于 1.8%。结论: 该方法简便、准确, 重复性好, 在对痰热清注射液中主要有效成分绿原酸、黄芩苷、熊去氧胆酸进行定量的同时, 实现对鹅去氧胆酸限量的测定。

关键词: 痰热清注射液; HPLC-UV-ELSD; 绿原酸; 黄芩苷; 熊去氧胆酸; 鹅去氧胆酸

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)11-1804-04

HPLC-UV-ELSD simultaneous determination of major component contents in Tanreqing injection^{*}

WANG Jue, QU Hai-bin, SHAO Qing^{**}

(Pharmaceutical Informatics Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Objective To establish an HPLC-UV-ELSD method for the simultaneous determination of chlorogenic acid, baicalin, ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid in Tanreqing injection. **Methods** The chromatographic separation was performed on an Agilent Zorbax SB-C₁₈ column. The mobile phase was mixtures of 0.15% acetic acid-water and 0.15% acetic acid-acetonitrile with linear gradient elution at the flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The column temperature was maintained at 30℃. The UV detection wavelength of chlorogenic acid and baicalin were 326 nm and 276 nm, respectively. The drift tube temperature of ELSD was set at 100℃ and the nitrogen flow rate at 1.5 L·min⁻¹. **Results** The calibration curves in the range of 0.221-4.42 mg·L⁻¹ for chlorogenic acid, 20.3-406 mg·L⁻¹ for baicalin, 19.8-396 mg·L⁻¹ for ursodeoxycholic acid and 17.9-179 mg·L⁻¹ for chenodeoxycholic acid were good linear, respectively. The values of correlation coefficient were higher than 0.9995 for all analytes. The average recoveries of chlorogenic acid, baicalin, ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid were 101%, 98.4%, 99.4%, 102%, respectively. Repeatability experiments showed that relative standard deviation (RSD) values of their contents were less than 1.8%. **Conclusion** The method is simple, accurate and repeatable. It can be used to determine the content of chlorogenic acid, baicalin and ursodeoxycholic acid which are the major effective components in Tanreqing injection, and monitor the limit content of chenodeoxycholic acid at the same time.

Key words Tanreqing injection; HPLC-UV-ELSD; chlorogenic acid; baicalin; ursodeoxycholic acid; chenodeoxycholic acid

痰热清注射液属国家新药中药二类, 方中以黄芩为君药, 熊胆粉、山羊角为臣药, 金银花为佐药, 连

翘为使药^[1], 具有清热、解毒、化痰等功效。黄芩苷、熊去氧胆酸、绿原酸是其主要成分^[2], 鹅去氧胆

* 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2005CB523402); 新世纪优秀人才支持计划资助 (NCET-06-0515)

** 通讯作者 Tel: (0571) 88208426; E-mail: shaor@zju.edu.cn

酸是熊去氧胆酸 7 β 差向异构体,具有溶解胆固醇型胆结石的药理作用,但同时具有一定的毒性^[3],必须对其进行限量控制。痰热清注射液中绿原酸、黄芩苷的含量测定方法已有文献报道^[4,5],但对痰热清注射液中主要成分绿原酸、黄芩苷、熊去氧胆酸含量进行测定并同时实现对限量成分鹅去氧胆酸进行定量分析的方法尚未见报道。本实验采用紫外-蒸发光散射检测器(UV/ELSD)联用方法建立了1次色谱条件联合测定痰热清注射液中3种主要成分含量和鹅去氧胆酸限量的高效液相色谱法,为该制剂的质量控制提供了依据。

1 仪器和试剂

Agilent 1100型高效液相色谱仪(德国 Agilent 公司); Alltech 2000型蒸发光散射检测器(美国奥泰公司); KQ-250B型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); METTLER AE240电子天平(梅特勒-托利多上海有限公司); Milli-Q超纯水机(美国 Millipore公司); Minispin离心机(德国 Eppendorf 公司)。

对照品:绿原酸(批号:110753-200413);黄芩苷(批号:110715-200815);熊去氧胆酸(批号:110755-9003);鹅去氧胆酸(批号:110806-200303)购自中国药品生物制品检定所。乙腈为色谱纯,购自 Merck公司;冰醋酸为色谱纯,购自 Tedia 公司;水为 Milli-Q超纯水。痰热清注射液:某药业有限公司(批号:070525,070718,070706,070708规格10 mL每支)。

2 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m), 汉邦 C₁₈ 预柱; 流动相: 0.15% 醋酸溶液(A)-0.15% 醋酸乙腈(B), 线性梯度洗脱[0~10 min B相 10% → 15%; 10~20 min B相 15% → 25%; 20~30 min B相 25% → 35%; 30~35 min B相 35% → 90%; 35~45 min B相 90%], 流速: 0.8 mL · min⁻¹; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μ L; 检测波长: 0 min 326 nm, 18 min 276 nm, ELSD漂移管温度: 100 °C; 雾化气流速: 1.5 L · min⁻¹。

3 溶液制备

3.1 混合对照品溶液 分别精密称取绿原酸、黄芩苷、熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸对照品适量于量瓶中,用甲醇溶解并定容,制成对照品储备液。精密量取各对照品储备液适量于量瓶中,用50%甲醇稀释至刻度,制成绿原酸、黄芩苷、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸的质量浓度分别为4.42、406、396、179 mg · L⁻¹的

混合对照品溶液。

3.2 供试品溶液 精密量取痰热清注射液0.2 mL于5 mL量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,10000 r · min⁻¹离心10 min,取上清液作为供试品溶液。

3.3 阴性样品溶液 取按痰热清注射液工艺方法制备的缺金银花、缺黄芩和缺熊胆粉痰热清注射液适量,分别照“3.2”项下方法操作,即得。

4 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,置1 mL量瓶中,用50%甲醇稀释至刻度,按“2”项下色谱条件进样分析。绿原酸和黄芩苷以对照品质量浓度 X (mg · L⁻¹)对峰面积 Y 进行线性回归,熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸以对照品质量浓度的对数值 $\lg X$ (mg · L⁻¹)对峰面积的对数值 $\lg Y$ 进行线性回归,得绿原酸、黄芩苷、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸回归方程分别为:

$$Y = 30.7X - 1.10 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 40.9X + 19.2 \quad r = 1.000$$

$$\lg Y = 1.56 \lg X + 0.0197 \quad r = 0.9996$$

$$\lg Y = 1.66 \lg X + 0.0250 \quad r = 0.9997$$

线性范围分别为0.221~4.42、20.3~406、19.8~396、17.9~179 mg · L⁻¹。

5 专属性试验

精密吸取“3”项下的混合对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液各10 μ L,按“2”项下色谱条件进样分析,结果见图1。阴性样品溶液在绿原酸、黄芩苷、熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸相对应的位置上未见色谱峰,表明痰热清注射液中其他成分对绿原酸、黄芩苷、熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸的测定无干扰。

6 精密度试验

6.1 仪器精密度 取混合对照品溶液,在“2”项色谱条件下,连续进样6次,分别测定绿原酸、黄芩苷、熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸的峰面积,其RSD分别为0.86%、0.06%、1.1%、1.7%,表明仪器精密度良好。

6.2 日间精密度 取批号为070718的痰热清注射液,按“3.2”项下方法连续3 d制备供试品溶液,按“2”项下色谱条件进样分析并计算4种成分含量,计算日间精密度($n=3$)。绿原酸、黄芩苷、熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸平均含量分别为30.1、5270、5940、740 mg · L⁻¹; RSD分别为1.2%、1.0%、0.77%、1.3%。

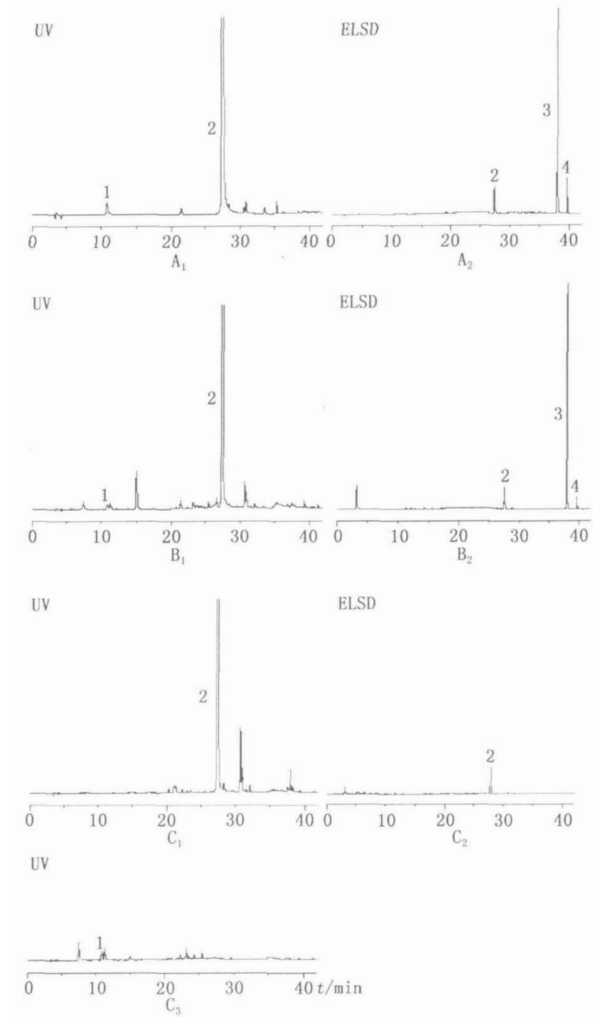


图 1 HPLC-UV-ELSD 色谱图
Fig 1 HPLC-UV-ELSD chromatograms
A₁, A₂ 对照品 (chemical reference substances) B₁, B₂ 痰热清注射液样品 (Tanreqing injection samples) C₁. 缺金银花阴性样品 (negative sample without Flos Loniceræ Japonicæ) C₂. 缺熊胆粉阴性样品 (negative sample without bear bile powder) C₃. 缺黄芩阴性样品 (negative sample without Radix Scutellariæ)
1 绿原酸 (chlorogenic acid) 2 黄芩苷 (baicalin) 3 熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid) 4 鹅去氧胆酸 (chenodeoxycholic acid)

7 重复性试验

按“3.2”项下供试品溶液制备方法, 平行制备 6 份同一批号 (070718) 样品的供试品溶液, 按“2”项下色谱条件进样分析, 按外标法计算 4 种成分含量。结果绿原酸、黄芩苷、熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸平均含量分别为 30.1, 5220, 5740, 717 mg•L⁻¹; RSD 分别为 0.77%, 0.78%, 1.8%, 1.7%。

8 溶液稳定性试验

取同一供试品溶液 (070718), 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样分析, 绿原酸、黄芩苷、熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸峰面积的 RSD 分别为 1.1%, 2.3%,

1.3%, 2.2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

9 加样回收率试验

精密吸取已知含量的痰热清注射液 (070718) 9 份, 每份 0.1 mL, 分别加入相当于原含量 80%, 100%, 120% 量的绿原酸、黄芩苷、熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸对照品溶液, 按“3.2”项下方法制备所需溶液。按“2”项下色谱条件进样分析, 测定含量, 计算 4 种成分的加样回收率。结果绿原酸、黄芩苷、熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸的平均加样回收率分别为 101%, 98.4%, 99.4%, 102%; RSD 分别为 2.4%, 1.6%, 2.9%, 2.3%。

10 定量限和检测限

按信噪比为 10:1, 测得绿原酸、黄芩苷、熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸的定量限分别为 1.11, 1.31, 198, 125 ng, 其 RSD 分别为 1.8%, 1.6%, 2.3%, 2.5% (n=6)。按信噪比为 3:1 测得上述组分的检测限分别为 0.332, 0.522, 98.9, 62.5 ng。

11 样品含量测定

取各批次痰热清注射液, 按“3.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2”项下色谱条件进样分析, 按外标法计算痰热清注射液中绿原酸、黄芩苷、熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸的含量, 结果见表 1。

表 1 痰热清注射液中 4 种成分含量测定 (mg•L⁻¹, n=3)

Tab 1 Results of four components determination in Tanreqing injection

批号 (Lot No.)	绿原酸 (chlorogenic acid)		黄芩苷 (baicalin)		熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid)		鹅去氧胆酸 (chenodeoxycholic acid)	
	含量 (content) /mg•L ⁻¹	RSD (%)	含量 (content) /mg•L ⁻¹	RSD (%)	含量 (content) /mg•L ⁻¹	RSD (%)	含量 (content) /mg•L ⁻¹	RSD (%)
070525	24.3	1.20	5.42×10 ³	0.87	5.76×10 ³	2.30	8.85×10 ²	1.5
070718	30.0	0.69	5.19×10 ³	0.49	5.80×10 ³	1.9	7.27×10 ²	0.92
070706	36.1	0.26	5.07×10 ³	0.88	5.70×10 ³	0.87	8.49×10 ²	0.96
070708	23.3	0.70	5.11×10 ³	0.51	5.79×10 ³	0.72	8.94×10 ²	0.69

12 讨论

12.1 供试品溶液制备方法选择 已有文献报道^[5]痰热清注射液中绿原酸、黄芩苷含量测定时, 供试品溶液制备选择 50% 甲醇溶液为稀释用溶剂, 考虑到熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸在纯甲醇中具良好溶解性能, 首先选择甲醇为供试品溶液制备用溶剂。但实验中发现以甲醇为溶剂时, 由于溶剂效应, 绿原酸色谱峰出现前沿峰现象, 当按文献报道选择 50% 甲醇为稀释用溶剂时, 绿原酸色谱峰峰形对称, 且黄

芩苷、熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸均溶于该稀释溶剂, 最终选择 50% 甲醇为供试品溶液制备用溶剂。

12.2 检测波长选择 将绿原酸、黄芩苷的对照品溶液于 200~ 400 nm 波长处进行扫描, 结果显示, 绿原酸在 326 nm 波长处有最大吸收, 黄芩苷在 276 nm 波长处有最大吸收, 而熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸文献报道仅在紫外末端有微弱吸收^[3], 为了保证各成分都有最佳的检测灵敏度, 绿原酸、黄芩苷检测采用紫外变波长方式, 选择其最大吸收波长为检测波长, 而熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸选择串联蒸发光散射检测器进行检测。

12.3 色谱条件优化 实验考察了甲醇-水溶液、乙腈-水溶液、乙腈-醋酸水溶液 3 种流动相系统梯度洗脱的分离效果, 结果表明以乙腈-醋酸水溶液为流动相, 进行梯度洗脱, 可得到峰形对称、分离度好、分析时间适宜的各组分色谱图。考察了 20, 30, 40 °C 柱温对分离的影响, 结果表明柱温 30 °C 时样品中的绿原酸和黄芩苷与邻近色谱峰分离最佳, 因此确定柱温为 30 °C。

12.4 ELSD 参数优化 考察了 95, 100, 105 °C 漂移管温度及 1, 1.5, 2 L·m⁻¹ 雾化气流速, 漂移管温度为 100 °C, 雾化气流速为 1.5 L·m⁻¹ 时, ELSD 响应较好, 且基线噪音相对较小, 信噪比最

高。所以选择漂移管温度为 100 °C, 雾化气流速为 1.5 L·m⁻¹。

参考文献

- 1 GAO Yi-m in(高益民), WANG Zhong-shan(王忠山). The preliminary evaluation of Tanreqing injection in clinical pharmacy(对痰热清注射液临床药理学初步评价). *Cap Med*(首都医药), 2004 12 44
- 2 WANG Chun-quan(王春全). The prescription and effectiveness of Tanreqing injection(痰热清注射液的方解及功效). *Mod Med Health*(现代医药卫生), 2006 22(5): 720
- 3 ZHENG Xing(郑兴). Comparative studies on ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid(熊去氧胆酸与鹅去氧胆酸的对比研究). *Inner Mongolia Sci Technol Econ*(内蒙古科技与经济), 2008 156(2): 28
- 4 XUE Dong-sheng(薛东升), CAO Yan-bin(曹宴彬). Determination of chlorogenic acid in Tongmai oral liquid by HPLC (HPLC 测定痰热清注射液中绿原酸的含量). *Henan J Tradit Chin Med Pharm*(河南中医药学刊), 2002 17(3): 18
- 5 WU Wei-ming(吴伟明), CHEN Li-jia(陈丽佳), ZHU Le-kai(诸乐恺). Determination of baicalin and chlorogenic acid in Tanreqing injection with high performance liquid chromatography(高效液相色谱法测定痰热清注射液中黄芩苷和绿原酸的含量). *J Pediatric Pharm*(儿科药理学杂志), 2006 12(4): 38

(本文于 2009 年 7 月 17 日修改回)

《药物分析杂志》稿件在线管理系统已开通

本刊于 2008 年 10 月 23 日开通稿件在线管理系统。从即日起, 凡投稿本刊, 请登录 <http://www.ywfxzz.cn> 进行网上投稿。

该系统采用 E-mail 作为用户名进行注册。

网上投稿的同时需寄单位介绍信及稿件处理费 50 元。

作者在线投稿后, 可在线了解稿件情况: 编辑-送审-专家已审-待编辑处理稿件-退修-编辑加工完成-已刊出等。

20080580 号以前的作者可与编辑部联系修改用户名后, 登录此系统。

读者可在线查看本刊目录, 了解本刊编委及其他信息, 并可在线订阅本刊。

投稿过程中如遇技术问题, 请与技术支持联系: 010- 69296712。

谢谢合作!

《药物分析杂志》编辑部