

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.10.08

HPLC 法同时测定双葛止泻口服液中 绿原酸和葛根素的含量

周冰, 李焕娟, 陈帅韬, 安卓睿, 程婵婵, 姚路路, 张聪*

(国家兽药药品工程技术研究中心/洛阳惠中兽药有限公司, 河南洛阳 471000)

[收稿日期] 2021-12-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 10-0041-07 [中图分类号] S859.79

[摘要] 建立了同时测定双葛止泻口服液中绿原酸和葛根素含量的测定方法。采用高效液相色谱(HPLC)法,使用 Waters XBridge C18(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱,流动相为乙腈-0.4%磷酸溶液梯度洗脱;检测波长为 315 nm;流速为 1.0 mL/min;柱温为 30 ℃。结果表明,绿原酸浓度在 0.008242~0.1030 mg/mL 的范围内,与峰面积线性关系良好($r=1.0000$),平均回收率为 99.1% ($n=6$), RSD 为 1.8%;葛根素浓度在 0.02296~0.2871 mg/mL 的范围内,与峰面积线性关系良好($r=1.0000$),平均回收率为 98.7% ($n=6$), RSD 为 1.6%。该方法简单、准确、专属性强,可用于双葛止泻口服液中绿原酸和葛根素的质量控制。

[关键词] 绿原酸;葛根素;双葛止泻口服液;高效液相色谱法

Determination of Chlorogenic Acid and Puerarin in Shuangge Zhixie Oral Liquid by HPLC

ZHOU Bing, LI Huan-juan, CHEN Shuai-tao, AN Zhuo-ru, CHENG Chan-chan, YAO Lu-lu, ZHANG Cong*

(National Research Center for Veterinary Medicine/Luoyang Huizhong Veterinary Medicine Co., Ltd, Luoyang 471000, China)

Corresponding author: ZHANG Cong, E-mail: zhangcong301@163.com

Abstract: The method for determination of the content of chlorogenic acid and puerarin in Shuangge Zhixie Oral Liquid was developed. The analysis was performed on an Waters XBridge C18 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm). The gradient mobile phase was consisted of acetonitrile-0.4% phosphoric acid solution, and the detection wavelength was 315 nm. The flow rate was 1.0 mL/min and the column temperature was 30 ℃. The linear range of the calibration curves for chlorogenic acid was 0.008242~0.1030 mg/mL ($r=1.0000$), and the average recovery was 99.1% ($n=6$) with RSD of 1.8%. The linear range of the calibration curves for puerarin

基金项目: 2019 年度洛阳市科技重大专项项目(1901024A)。

作者简介: 周冰, 硕士, 从事新兽药质量标准研究工作。

通讯作者: 张聪。E-mail: zhangcong301@163.com

was 0.02296 ~ 0.2871 mg/mL ($r = 1.0000$), and the average recovery was 98.7% ($n = 6$) with RSD of 1.6%. The method is simple and accurate with high specificity, which can be used to determine the content of chlorogenic acid and puerarin in Shuangge Zhixie Oral Liquid.

Key words: chlorogenic acid; puerarin; Shuangge Zhixie Oral Liquid; HPLC

双葛止泻口服液是由金银花、葛根、黄芩、黄连等 6 味中药采用提取、纯化等工艺制成的复方口服液体剂,并获得国家三类新兽药证书(农业农村部公告第 186 号)^[1]。该产品具有清热燥湿,解毒止泻的功能,临床上主要用于仔猪湿热泄泻,证见黄色糊状或稀粥样粪便、或挟有粘液,鼻盘微干等。方中金银花清热解毒,散热疏风^[2],同时具有较强抗菌活性^[3],葛根解肌退热,升阳止泻,二者共为君药,绿原酸和葛根素则分别为两者的特征性有效成分^[4-6]。现有质量标准及文献报道^[7-8]中绿原酸和葛根素分别采用单独的液相条件进行检测,检测时间较长。为进一步提升检验效率,并减少有机试剂的用量,本文建立了同时测定双葛止泻口服液中绿原酸和葛根素含量的方法,并对该方法进行了方法学验证。结果表明,该方法快速、准确、专属性强,可用于双葛止泻口服液的质量控制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器 U3000 型高效液相色谱仪,配 VWD - 3400RS 型紫外检测器, Thermo 公司; XSR205 型电子分析天平,瑞士梅特勒托利多公司。

1.1.2 试药与试剂 绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110753 - 202018,含量:96.1%)、葛根素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110752 - 201816,含量:95.4%)、双葛止泻口服液(洛阳惠中兽药有限公司,批号:20200905,20201002,20210301);乙腈, Thermo Fisher Scientific 公司, HPLC 级;磷酸,天津市科密欧化学试剂有限公司, HPLC 级;水为实验室自制超纯水。

1.2 试验方法

1.2.1 色谱条件与系统适用性 色谱柱: Waters XBridge C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 梯度洗脱, 流动相: 乙腈 - 0.4% 磷酸溶液 (0 ~ 14 min, 乙腈

11%; 14 ~ 15 min, 乙腈由 11% 上升到 70%; 15 ~ 20 min, 乙腈 70%; 20 ~ 21 min, 乙腈由 70% 下降到 11%; 21 ~ 25 min, 乙腈 11%), 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 315 nm; 进样量: 10 μL。理论板数按绿原酸峰计算应不低于 10000; 按葛根素峰计算应不低于 10000。

1.2.2 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸、葛根素对照品适量,加 30% 乙醇制成每 1 mL 约含绿原酸 40 μg、葛根素 120 μg 的溶液,即得。

1.2.3 供试品溶液的制备 精密量取本品 2 mL,置 50 mL 量瓶中,加 30% 乙醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

1.2.4 阴性对照溶液的制备 按处方制备缺金银花的阴性样品和缺葛根的阴性样品,分别按照“1.2.3”项下方法制成阴性对照溶液,即得。

1.3 方法学考察

1.3.1 专属性试验 分别取上述对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,考察主峰位置是否有干扰。

1.3.2 线性试验 精密称取绿原酸对照品 10.72 mg,置 25 mL 量瓶中,作为绿原酸线性贮备液;精密称取葛根素对照品 30.09 mg,置 50 mL 量瓶中,作为葛根素线性贮备液。分别精密量取上述贮备液按照一定比例稀释成一系列梯度浓度的混合标准工作液,绿原酸浓度分别为 0.008242 mg/mL、0.02060 mg/mL、0.04121 mg/mL、0.08242 mg/mL、0.1030 mg/mL,葛根素浓度分别为 0.02296 mg/mL、0.05741 mg/mL、0.1148 mg/mL、0.2296 mg/mL、0.2871 mg/mL。依次吸取上述线性溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,记录峰面积。以峰面积 (Y) 为纵坐标,浓度为 (X , mg/mL) 为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程及相关系数。

1.3.3 精密度试验 取“1.2.2”项下对照品溶液,

按上述色谱条件,连续进样 6 针,记录色谱图,测定峰面积并计算 *RSD*。

1.3.4 溶液稳定性试验 精密量取本品 2 mL(批号:20200905),按照“1.2.3”项制备供试品溶液,取对照品溶液和供试品溶液分别于第 0、2、4、8、12 小时进样,测定峰面积并计算 *RSD*。

1.3.5 重复性试验 取同一批样品(批号:20200905),按照“1.2.3”项下制备 6 份供试品溶液,依法测定,记录峰面积,计算含量及 *RSD*。

1.3.6 中间精密度 取同一批样品(批号:20200905),由两名人员在不同日期、使用不同的高效液相色谱仪,依法测定,每人平行测定 6 份。计算两人 12 个含量结果的 *RSD*。

1.3.7 加样回收率 精密量取本品 1 mL,共 9 份,分别置于 50 mL 量瓶中。分别精密加入相当于测定量 50% 水平(0.1126 mg/mL, 5 mL)、100% 水平(0.1126 mg/mL, 10 mL)、150% 水平(0.1126 mg/mL, 15 mL)的绿原酸对照品溶液和相当于测定量 50% 水平(0.3462 mg/mL, 5 mL)、100% 水平(0.3462 mg/mL, 10 mL)、150% 水平(0.3462 mg/mL, 15 mL)的葛根素对照品溶液,分别加 10% 乙醇定容至刻度,摇匀,滤过,作为回收率供试品溶液,每个水平制备 3 份。精密吸取对照品溶液、回收率供试品溶液各 10 μ L,依法测定,计算回收率及 *RSD*。

1.3.8 耐用性 分别考察柱温、流速、磷酸比例、流动相比比例及色谱柱批号变化对含量测定结果的影响。待系统稳定后,依次精密吸取对照品溶液、供试品溶液,依法进样测定。以含量及 *RSD* 为指标,考察色谱条件的耐用性。

1.4 样品测定 分别采用现有标准方法(农业农村部公告第 186 号)和新建立的方法对市售 3 批双葛止泻口服液进行含量测定,考察本文所建立方法与标准方法检测结果的差异。

2 结果与分析

2.1 方法学考察结果

2.1.1 专属性考察结果 专属性结果表明,在缺金银花的阴性对照和缺葛根的阴性对照色谱图中,绿原酸和葛根素主峰位置均没有干扰,表明本方法

专属性良好。见图 1。

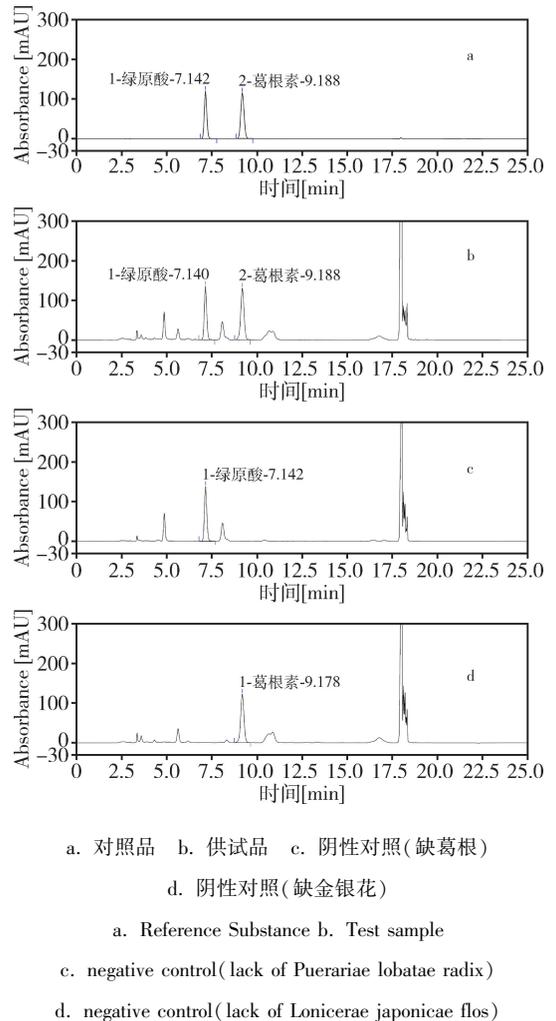


图 1 专属性考察色谱图

Fig 1 The chromatogram of specific inspection

2.1.2 线性试验 以峰面积(Y)为纵坐标,浓度为(X , mg/mL)为横坐标,绘制标准曲线。绿原酸回归方程为: $Y = 473.8194 X + 0.0536$ ($r = 1.0000$); 葛根素回归方程为: $Y = 214.6356 X + 0.1281$ ($r = 1.0000$)。表明绿原酸进样浓度在 0.008242 ~ 0.1030 mg/mL 范围内和葛根素进样浓度在 0.02296 ~ 0.2871 mg/mL 范围内,峰面积与进样浓度线性关系良好。

2.1.3 精密度试验 取“1.2.2”项下对照品溶液,连续进样 6 针,记录峰面积,结果绿原酸峰面积的 *RSD* 为 0.1% ($n = 6$),葛根素峰面积的 *RSD* 为 0.1% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

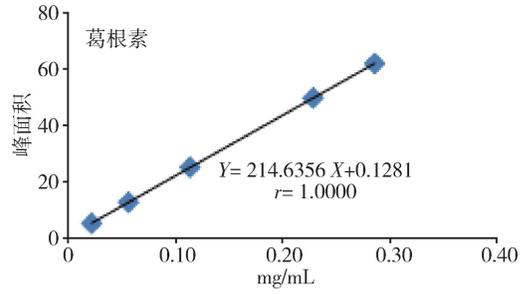
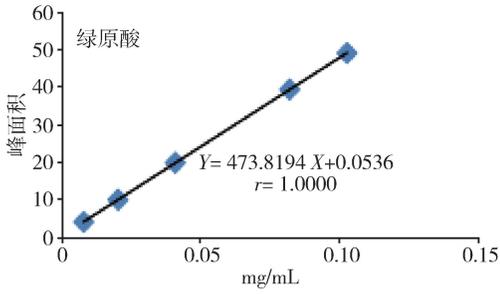


图 2 线性关系图

Fig 2 The chromatogram of linear relationship results

2.1.4 溶液稳定性试验 取对照品溶液和供试品溶液,分别于第 0、2、4、8、12 小时进样测定,结果对照品溶液中绿原酸峰面积的 RSD 为 0.3%,葛根素峰面积的 RSD 为 0.1%;供试品溶液中绿原酸峰面积的 RSD 为 0.4%,葛根素峰面积的 RSD 为 0.2%,表明对照品溶液和供试品溶液在 12 小时内稳定。

2.1.5 重复性试验 同一批样品,制备 6 份供试品溶液,依法测定,绿原酸平均含量为 1.2 mg/mL ($n = 6$), RSD 为 1.7%,葛根素平均含量为 3.3 mg/mL ($n = 6$), RSD 为 1.9%,表明本方法重复性良好。

表 1 重复性试验结果 ($n = 6$)Tab 1 The results of repeatable test results ($n = 6$)

成分	含量/(mg · mL ⁻¹)						平均值	RSD /%
	1	2	3	4	5	6		
绿原酸	1.15	1.16	1.14	1.13	1.14	1.18	1.2	1.7
葛根素	3.26	3.37	3.37	3.32	3.21	3.33	3.3	1.9

2.1.6 中间精密度 两名人员在不同日期、使用不同仪器测得绿原酸的平均含量为 1.2 mg/mL ($n = 12$), RSD 为 1.4%,葛根素平均含量为 3.3 mg/mL ($n = 12$), RSD 为 1.5%,表明本方法的中间精密度良好。

表 2 中间精密度试验结果

Tab 2 The results of intermediate precision test

成分	人员	日期	设备	含量/(mg · mL ⁻¹)						平均值	RSD /%
				1	2	3	4	5	6		
绿原酸	A	2021.12.06	A	1.15	1.16	1.14	1.13	1.14	1.18	1.2	1.4
	B	2021.12.07	B	1.17	1.14	1.16	1.16	1.14	1.17		
葛根素	A	2021.12.06	A	3.26	3.37	3.37	3.32	3.21	3.33	3.3	1.5
	B	2021.12.07	B	3.34	3.33	3.26	3.36	3.34	3.29		

2.1.7 加样回收率试验 通过设计 3 个加入水平,9 份回收率结果进行评价。结果绿原酸回收率在 96.35% ~ 101.24% 之间,平均值为 99.1%

($n = 9$), RSD 为 1.8%,葛根素回收率在 96.40% ~ 101.77% 之间,平均值为 98.7% ($n = 9$), RSD 为 1.6%,表明本方法准确度良好。

表 3 绿原酸回收率试验结果

Tab 3 The results of Chlorogenic Acid recovery test

编号	添加水平	取样量/mL	本底量 /mg	对照品加入量 /mg	测得总量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1		1	1.1512	0.5631	1.6978	97.07		
2	50%	1	1.1512	0.5631	1.7055	98.43		
3		1	1.1512	0.5631	1.7213	101.24		
4		1	1.1512	1.1263	2.2813	100.34		
5	100%	1	1.1512	1.1263	2.2805	100.27	99.1	1.8
6		1	1.1512	1.1263	2.2524	97.78		
7		1	1.1512	1.6894	2.8608	101.19		
8	150%	1	1.1512	1.6894	2.8211	98.85		
9		1	1.1512	1.6894	2.7790	96.35		

表 4 葛根素回收率试验结果

Tab 4 The results of Puerarin recovery test

编号	添加水平	取样量/mL	本底量 /mg	对照品加入量 /mg	测得总量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1		1	3.3088	1.7310	5.0252	99.16		
2	50%	1	3.3088	1.7310	4.9776	96.40		
3		1	3.3088	1.7310	5.0704	101.77		
4		1	3.3088	3.4621	6.7573	99.61		
5	100%	1	3.3088	3.4621	6.7442	99.23	98.7	1.6
6		1	3.3088	3.4621	6.7511	99.43		
7		1	3.3088	5.1931	8.3372	96.83		
8	150%	1	3.3088	5.1931	8.4230	98.48		
9		1	3.3088	5.1931	8.3884	97.82		

2.1.8 耐用性试验 当流动相比例、柱温、流速、磷酸含量及色谱柱批号发生变化时,各因素下含量测

定结果的 RSD 均 ≤ 2.0%。色谱条件的微小变化对含量测定结果无显著影响,表明本方法耐用性良好。

表 5 耐用性试验结果

Tab 5 The results of durability test

变化项目	变化情况	绿原酸含量/(mg · mL ⁻¹)	RSD/%	葛根素含量/(mg · mL ⁻¹)	RSD/%
流动相比例	乙腈 -0.4% 磷酸溶液(10:90)	1.19		3.25	
	乙腈 -0.4% 磷酸溶液(11:89)	1.17	1.7	3.32	1.7
	乙腈 -0.4% 磷酸溶液(12:88)	1.15		3.21	
柱温	25 °C	1.17		3.34	
	30 °C	1.17	0.5	3.32	0.5
	35 °C	1.16		3.31	
流速	0.9 mL/min	1.17		3.31	
	1.0 mL/min	1.17	0.0	3.32	0.2
	1.1 mL/min	1.17		3.31	
磷酸含量	0.3%	1.17		3.31	
	0.4%	1.17	0.5	3.32	0.3
	0.5%	1.16		3.30	
色谱柱	柱 1(SN:01763608213827)	1.16		3.36	
	柱 2(SN:01823635612482)	1.17	0.9	3.32	0.7
	柱 3(SN:01863719143815)	1.18		3.32	

2.2 样品含量测定 取双葛止泻口服液样品(批号:20200905,20201002,20210301),分别采用现有标准方法及新建的方法测定绿原酸和葛根素的含量,两种方法检测结果无明显差异,结果见表 6。

表 6 样品含量测定结果

Tab 6 The results of sample content determination

批号	绿原酸含量/(mg · mL ⁻¹)		葛根素含量/(mg · mL ⁻¹)	
	现有标准	新建方法	现有标准	新建方法
20200905	1.2	1.2	3.3	3.3
20201002	1.3	1.3	3.5	3.5
20210301	1.2	1.2	3.7	3.7

3 讨论与结论

3.1 检测波长的选择 采用紫外全波长扫描,绿原酸在 327 nm 处有最大吸收,葛根素在 250 nm 处有最大吸收,见图 3。考虑到本品中葛根素含量高于绿原酸含量,为了使色谱图中绿原酸和葛根素峰面积大小一致,综合考虑,选择 315 nm 作为检测波长。

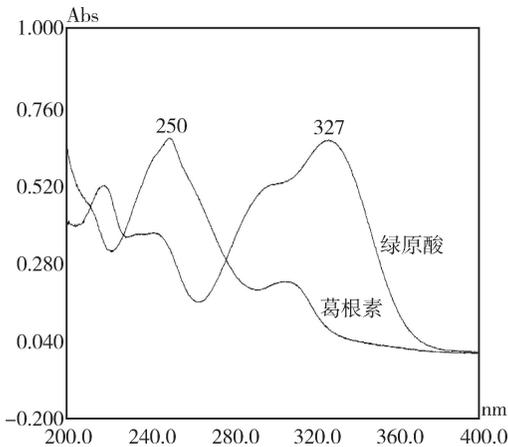


图 3 绿原酸和葛根素光谱图

Fig 3 The spectrogram of Chlorogenic Acid and Puerarin

3.2 流动相的考察 参考相关文献方法^[9],以乙腈 - 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (pH 3.0) 为流动相梯度洗脱,通过调整流动相洗脱条件,葛根素主峰位置始终有阴性干扰。参考相关文献^[10],改变流动相为乙腈 - 0.4% 磷酸溶液,采用等度洗脱

40 min 后仍有色谱峰,为缩短运行时间,最终采用梯度洗脱方法。该方法可提高检测效率,减少溶剂用量。

3.3 前处理方法的考察与优化 对照品溶液采用甲醇为稀释溶剂,经重复性验证,绿原酸的主峰良好,但葛根素主峰前始终有一色谱峰干扰。参考《中国兽药典》2020 版二部葛根项下,以 30% 乙醇为稀释溶剂,该条件下基线平稳,绿原酸和葛根素主峰无干扰。曾分别采用 10% 乙醇、30% 乙醇、50% 甲醇、甲醇为提取溶剂制备供试品溶液,结果 50% 甲醇和甲醇提取的样品容量瓶底部产生较多絮状沉淀,影响体积的准确性,10% 乙醇和 30% 乙醇提取的样品比较澄清,综合考虑,选择和对照品溶液一致,以 30% 乙醇为提取溶剂。进而比较了直接摇匀提取和超声提取法,结果二者含量无明显差异,因此选择更为简便的直接摇匀提取。

本文建立了一个同时测定双葛止泻口服液中绿原酸和葛根素含量的方法,该方法简单、准确、专属性强,可用于双葛止泻口服液的质量控制。

参考文献:

- [1] 桑卡娜,李焕娟,杨绒娟,等. 双葛止泻口服液微生物限度检查方法学验证[J]. 中国兽药杂志, 2021, 55(2): 19 - 25. Sang K N, Li H J, Yang R J, et al. Methodological Validation of Microbial Limit Test of Shuangge Anti - diarrhea Oral Liquid[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2021, 55(2): 19 - 25.
- [2] 中国兽药典委员会. 《中华人民共和国兽药典》2020 年版二部[S]. China Veterinary Pharmacopoeia Committee. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia volume II 2020 edition[S].
- [3] 孙茂永. 金银花等 5 种中药对猪源大肠杆菌抗菌活性的影响[J]. 中国兽药杂志, 2020, 54(6): 66 - 70. Sun M Y. Effect of 5 kinds of Chinese traditional medicine such as honeysuckle on antibacterial activity of pig - derived E. coli [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2020, 54(6): 66 - 70.
- [4] 吴娇,王聪,于海川. 金银花中的化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(4): 225 - 234. Wu J, Wang C, Yu H C. Chemical Constituents and Pharmacological Effect of *Lonicerae Japonicae Flos*[J]. Chinese Journal of

- Experimental Traditional Medical Formulae, 2019, 25 (4): 225 - 234.
- [5] 陈艳, 文佳玉, 谢晓芳, 等. 葛根的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药与临床, 2021, 12(1): 53 - 60.
Chen Y, Wen J Y, Xie X F, *et al.* Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of Gegen[J]. Pharmacy and Clinics of Chinese Materia Medica, 2021, 12(1): 53 - 60.
- [6] 曹盼, 张樱山, 魏学明, 等. 葛根素药理作用研究新进展[J]. 中成药, 2021, 43(8): 2130 - 2134.
Cao P, Zhang Y S, Wei X M, *et al.* Research progress on Pharmacological Effect of Puerarin[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2021, 43(8): 2130 - 2134.
- [7] 周冰, 李焕娟, 杨会鲜, 等. 高效液相色谱法测定双葛止泻口服液中绿原酸的含量[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(10): 167 - 169.
Zhou B, Li H J, Yang H X, *et al.* Determination of Chlorogenic Acid in Shuangge Anti - diarrhea Oral Liquid by HPLC[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2019, 47 (10): 167 - 169.
- [8] 朱华伟, 周冰, 李焕娟, 等. 高效液相色谱法测定双葛止泻口服液中葛根素的含量[J]. 中国动物保健, 2021, 23(12): 121 - 122, 124.
Sang K N, Li H J, Yang R J, *et al.* Determination of Puerarin in Shuangge Anti - diarrhea Oral Liquid by HPLC[J]. China Animal Health, 2021, 55(2): 19 - 25.
- [9] 相婷, 霍晓奎, 丛海建, 等. HPLC 法同时测定双花百合片中绿原酸、表小檗碱、巴马汀、小檗碱的含量[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4): 1775 - 1778.
Xiang T, Huo X K, Cong H J, *et al.* Simultaneous determination of chlorogenic acid, epiberberine, palmatine, berberine in Shuanghua Baihe Tablet by HPLC[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2017, 32 (4): 1775 - 1778.
- [10] 陈锡龙, 钱莘莘, 孙真峥, 等. 白英质量标准初步研究[J]. 中国兽药杂志, 2020, 54(11): 30 - 38.
Chen X L, Qian X X, Sun Z Z, *et al.* Preliminary Study on the Quality Standard of Solanum lyratum Thunb[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2020, 54(11): 30 - 38.

(编辑:陈希)