

# 双波长HPLC法同时测定板柴口服液中(*R,S*)-告依春和绿原酸的含量<sup>Δ</sup>

华之卉<sup>1\*</sup>, 刘 栋<sup>2#</sup>, 李明春<sup>3</sup>(1.郑州人民医院药学部临床药学科, 郑州 450003; 2.解放军第153中心医院制剂室, 郑州 450042; 3.解放军第401医院药剂科, 山东青岛 266071)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)27-3853-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.27.30

**摘要** 目的:建立同时测定板柴口服液中(*R,S*)-告依春和绿原酸含量的方法。方法:采用双波长高效液相色谱法。色谱柱为Wondasil C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(11:89, *V/V*),流速为1.0 mL/min,检测波长为245 nm[(*R,S*)-告依春],327 nm(绿原酸),柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:(*R,S*)-告依春和绿原酸检测质量浓度线性范围分别为4.05~40.51 μg/mL( $r=0.999\ 9$ )、29.41~294.05 μg/mL( $r=0.999\ 9$ );定量限分别为3.32、2.45 ng,检测限分别为1.00、0.74 ng;精密性、稳定性、重复性试验的RSD均<1.0%;加样回收率分别为98.46%~101.06%(RSD=0.98%,  $n=9$ )、98.18%~100.78%(RSD=0.86%,  $n=9$ )。结论:该方法操作简便,结果准确、灵敏度高、重复性好,可用于板柴口服液中(*R,S*)-告依春和绿原酸含量的同时测定。

**关键词** 板柴口服液;(*R,S*)-告依春;绿原酸;含量测定;双波长高效液相色谱法

## Simultaneous Determination of (*R,S*)-goitrin and Chlorogenic Acid in Banchai Oral Liquid by Dual-wavelength HPLC

HUA Zhihui<sup>1</sup>, LIU Dong<sup>2</sup>, LI Mingchun<sup>3</sup>(1.Dept. of Clinical Pharmacy, Clinical pharmacy Section, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450003, China; 2. Drug Manufacturing Room, No. 153 Central Hospital of PLA, Zhengzhou 450042, China; 3. Dept. of Pharmacy, No. 401 Hospital of PLA, Shandong Qingdao 266071, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of (*R,S*)-goitrin and chlorogenic acid in Banchai oral liquid. METHODS: The dual-wavelength HPLC method was adopted. The determination was performed on Wondasil C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (11:89, *V/V*) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were 245 nm for (*R,S*)-goitrin and 327 nm for chlorogenic acid. The column temperature was 30 ℃, and injection volume was 10 μL. RESULTS: The linear ranges were 4.05-40.51 μg/mL for (*R,S*)-goitrin ( $r=0.999\ 9$ ), 29.41-294.05 μg/mL for chlorogenic acid ( $r=0.999\ 9$ ). The limits of quantification were 3.32, 2.45 ng, limits of detection were 1.00, 0.74 ng. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 1.0%; the recoveries were 98.46%-101.06% (RSD=0.98%,  $n=9$ ) and 98.18%-100.78% (RSD=0.86%,  $n=9$ ). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, sensitive and reproducible, and can be used for simultaneous determination of (*R,S*)-goitrin and chlorogenic acid in Banchai oral liquid.

**KEYWORDS** Banchai oral liquid; (*R,S*)-goitrin; Chlorogenic acid; Content determination; Dual-wavelength HPLC

板柴口服液[批准文号:总制字(2016)F403001,曾用名:复方板柴口服液]是解放军第153中心医院自主开发的中药复方制剂,由板蓝根、金银花、柴胡、鱼腥草、大青叶等5味中药材加工制成,具有清热解毒、疏散风寒、利咽消肿之功效,适用于感冒、发热、咽喉痛等症的治疗<sup>[1]</sup>,临床疗效确切,口碑较好,现已收录于2015年版《中国人民解放军医疗机构制剂规范》(第一册)。该制剂现行质量标准的含量测定项只检测了君药板蓝根中的(*R,S*)-告依春<sup>[2]</sup>,但单一指标成分测定难以反映制剂质量的整体特征。金银花和鱼腥草为方中臣药,二者的

有效成分均为绿原酸,其具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗肿瘤、增强免疫等作用<sup>[3-5]</sup>。鉴于此,本课题组采用双波长高效液相色谱法(HPLC)建立了同时测定板柴口服液中(*R,S*)-告依春和绿原酸的含量,以期完善该制剂质量标准提供参考。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

LC-10A型HPLC仪,包括SPD-10A型紫外检测器、手动进样器、LC-solutionLite色谱工作站(日本Shimadzu公司);BT125D型十万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司)。

#### 1.2 药品与试剂

板柴口服液(解放军第153中心医院自制,批号:161023、161209、170112,规格:10 mL/支);(*R,S*)-告依春对照品(批号:111753-201304,纯度:99.9%)、绿原酸

<sup>Δ</sup> 基金项目:军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题(No.14ZJZ02)

\* 主管药师,硕士。研究方向:医院药学。电话:0371-67079918。E-mail:zhihui19998@126.com

# 通信作者:主管药师,硕士。研究方向:医院制剂研发与质量控制。电话:0371-60653569。E-mail:liudong13673546650@163.com

对照品(批号:110753-201314,纯度:96.6%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,甲醇和磷酸为分析纯,水为自制重蒸水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Wondasil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(11:89, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:245 nm[(R,S)-告依春]、327 nm(绿原酸);柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取(R,S)-告依春、绿原酸对照品各适量,加50%甲醇溶液,制成(R,S)-告依春、绿原酸质量浓度分别为81.02、588.10 μg/mL的混合对照品贮备液。精密量取上述混合对照品贮备液2 mL,置于10 mL棕色量瓶中,加50%甲醇溶液定容,摇匀,即得(R,S)-告依春、绿原酸质量浓度分别为16.20、117.62 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取样品5 mL,置于25 mL棕色量瓶中,加50%甲醇溶液定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的配方比例和制备工艺,分别制备缺板蓝根、缺金银花和鱼腥草的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

### 2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以(R,S)-告依春峰和绿原酸峰计分别为13 387、10 876,保留时间分别为11.1、15.0 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

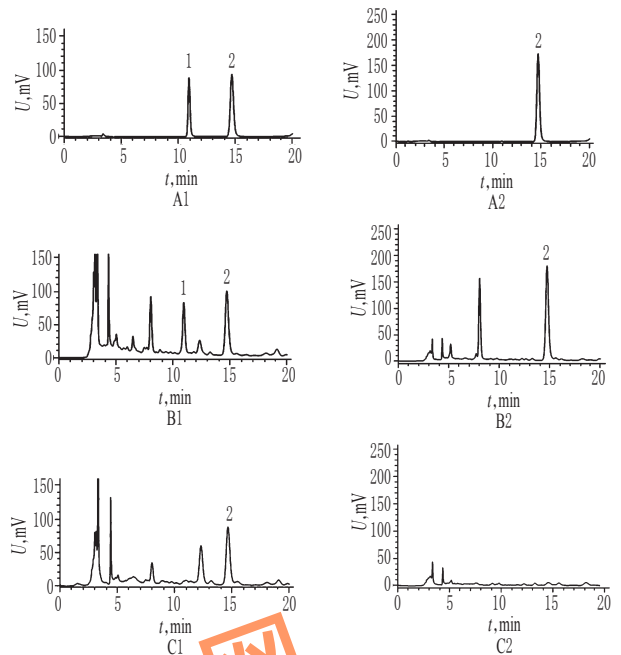
### 2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品贮备液0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,分别置于10 mL棕色量瓶中,加50%甲醇溶液定容,摇匀,制成系列混合对照品溶液。精密量取上述系列混合对照品溶液各10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以(R,S)-告依春和绿原酸质量浓度( $x$ , μg/mL)为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归,得(R,S)-告依春回归方程为 $y=67\ 928.30x-38\ 823.11$ ( $r=0.999\ 9$ ),绿原酸回归方程为 $y=29\ 509.83x-56\ 152.16$ ( $r=0.999\ 9$ )。结果表明,(R,S)-告依春和绿原酸检测质量浓度线性范围分别为4.05~40.51、29.41~294.05 μg/mL。

### 2.5 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得LOQ;当信噪比为3:1时,得LOD。结果,(R,S)-告依春和绿原酸的LOQ分别为

3.32、2.45 ng;(R,S)-告依春和绿原酸的LOD分别为1.00、0.74 ng。



A1.混合对照品(245 nm);A2.混合对照品(327 nm);B1.供试品(245 nm);B2.供试品(327 nm);C1.缺板蓝根的阴性对照(245 nm);C2.缺金银花和鱼腥草的阴性对照(327 nm);1.(R,S)-告依春;2.绿原酸

A1.mixed control (245 nm);A2.mixed control (327 nm);B1.test sample (245 nm);B2.test sample (327 nm);C1.negative control without *Isatis indigotica* (245 nm);C2.negative control without *Lonicera japonica* and *Houttuynia cordata* (327 nm);1.(R,S)-goitrin;2.chlorogenic acid

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

### 2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,(R,S)-告依春和绿原酸峰面积的RSD分别为0.59%、0.46%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

### 2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:170112)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,(R,S)-告依春和绿原酸峰面积的RSD分别为0.71%、0.78%( $n=6$ ),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

### 2.8 重复性试验

取同一批样品(批号:170112)适量,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,(R,S)-告依春和绿原酸的含量平均值分别为0.080 6、0.604 2 mg/mL,RSD分别为0.96%、0.82%( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

### 2.9 加样回收率试验

精密量取已知含量的样品(批号:170112)2.5 mL,

共9份,分别置于25 mL棕色量瓶中,各加入低、中、高质量的(*R,S*)-告依春和绿原酸对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液。取上述供试品溶液10 μL,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(*n*=9)

Tab 1 Results of recovery tests(*n*=9)

待测成分	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
<i>(R,S)</i> -告依春	0.201 5	0.103 6	0.303 5	98.46	99.67	0.98
	0.201 5	0.103 6	0.304 1	99.03		
	0.201 5	0.103 6	0.305 5	100.39		
	0.201 5	0.207 2	0.405 6	98.50		
	0.201 5	0.207 2	0.409 9	100.58		
	0.201 5	0.207 2	0.410 9	101.06		
	0.201 5	0.310 8	0.510 2	99.32		
	0.201 5	0.310 8	0.509 6	99.13		
	0.201 5	0.310 8	0.513 9	100.51		
绿原酸	1.510 5	0.726 0	2.230 2	99.13	99.26	0.86
	1.510 5	0.726 0	2.223 9	98.26		
	1.510 5	0.726 0	2.227 9	98.82		
	1.510 5	1.452 0	2.973 8	100.78		
	1.510 5	1.452 0	2.950 8	99.19		
	1.510 5	1.452 0	2.936 1	98.18		
	1.510 5	2.178 0	3.681 2	99.66		
	1.510 5	2.178 0	3.693 6	100.23		
	1.510 5	2.178 0	3.667 5	99.04		

## 2.10 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(*n*=3,mg/mL)

Tab 2 Results of content determination of samples(*n*=3,mg/mL)

样品批号	<i>(R,S)</i> -告依春	绿原酸
161023	0.076 4	0.564 0
161209	0.081 9	0.588 0
170112	0.080 6	0.604 2

## 3 讨论

### 3.1 色谱条件的选择

3.1.1 流动相的选择 笔者考察了甲醇-磷酸溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液作为流动相时的色谱情况<sup>[6-8]</sup>。结果,当乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相进行等度洗脱时, (*R,S*)-告依春和绿原酸的色谱峰峰形均较好。又进一步考察了等度洗脱下流动相的比例(7:93、11:89、13:87、*V/V*)。结果,当以乙腈-0.1%磷酸溶液(11:89, *V/V*)为流动相进行等度洗脱时<sup>[9]</sup>, (*R,S*)-告依春和绿原酸与相邻峰的分度度较好,且分析时间恰当(20 min内),因此选择上述溶液为本试验的流动相。

3.1.2 检测波长的选择 通过扫描(*R,S*)-告依春和绿原酸的紫外吸收波谱,并参考2015年版《中国药典》(一部)<sup>[6]</sup>可知, (*R,S*)-告依春和绿原酸的最大吸收波长分别为245、327 nm,但绿原酸在245 nm波长处也有一定的

吸收度。本研究在预试验中考察了HPLC波长转换法,但转换波长时易出现基线瞬间上扬的现象。同时考虑到最大吸收波长处测定含量灵敏度和准确度最高,因此笔者选择分别在两种成分各自的最大吸收波长处进行含量测定,即选择检测波长为245 nm[ (*R,S*)-告依春]、327 nm (绿原酸)。

### 3.2 溶剂的选择

笔者分别考察了水、不同体积分数的甲醇(20%、50%、80%)和乙醇(20%、50%、80%)为溶剂。结果,以水为溶剂时,杂质峰较多;用不同体积分数的乙醇溶液为溶剂时, (*R,S*)-告依春和绿原酸的峰形较差且基线不稳;而采用50%甲醇溶液为溶剂时,上述两种成分的响应均较好,分离度高。因此,选择50%甲醇溶液为本试验的溶剂。

### 3.3 绿原酸阴性对照的确定

处方中的金银花和鱼腥草均含有绿原酸<sup>[3-5]</sup>,以金银花中含量较高<sup>[10]</sup>,故试验过程中制备了缺金银花和鱼腥草的双阴性样品<sup>[11]</sup>。

综上所述,本方法操作简便,结果准确、灵敏度高、重复性好,可用于板柴口服液中(*R,S*)-告依春和绿原酸含量的同时测定。

### 参考文献

- [1] 巩伟,赵庆华,张琨,等.HPLC法测定复方板柴口服液中表-告依春的含量[J].实用医药杂志,2014,31(2):155-156.
- [2] 中央军委后勤保障部卫生局.中国人民解放军医疗机构制剂规范:第一册[S].2015.
- [3] 王莲,袁艺.不同产地鱼腥草中绿原酸、槲皮素含量测定[J].药物分析杂志,2008,28(7):1081-1083.
- [4] 胡生俊,徐岳鑫,董赛文,等.高效液相色谱法测定复方金银花颗粒中绿原酸含量[J].中国药业,2011,20(3):23.
- [5] 何兵,刘艳,李春红,等.一测多评法同时测定鱼腥草不同部位中6种活性成分的量[J].中草药,2013,43(15):2160-2164.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社:205、221.
- [7] 王宇宁,张君,杨洪武,等.CTS天然(中药)澄清剂应用于复方抗感片提取液的除杂工艺研究[J].辽宁中医药大学学报,2011,13(3):182-184.
- [8] 郑娟,茅纯.HPLC波长转换法同时测定小儿咳喘灵颗粒中的(*R,S*)-告依春、绿原酸和甘草苷的含量[J].中国现代应用药学,2015,32(6):727-731.
- [9] 许舒瑜,彭军,陈小玲,等.金牡感冒片的质量标准研究[J].中国药房,2014,25(39):3682-3684.
- [10] 肖引,兰怡,陈江,等.鱼金清解口服液质量标准研究[J].解放军药科学学报,2012,28(6):523-526.
- [11] 夏林丽,王协和,盛蓉.波长切换高效液相色谱法同时测定青翘抗毒颗粒中7个成分的含量[J].中国医院药学杂志,2016,36(23):2065-2070.

(收稿日期:2017-05-02 修回日期:2017-06-13)

(编辑:刘柳)