

高效液相色谱法测定复方清开灵 注射液中栀子苷的含量

刘 锋¹, 黄显会¹, 付美琴², 唐国洋²

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 广州环球生物药品有限公司, 广东 广州 510430)

摘要:采用色谱柱 Kromasil-C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、流动相为乙腈-水(体积比 13:87)、检测波长为 239 nm、流速为 1.0 mL · min⁻¹、柱温为室温的检测条件建立了复方清开灵注射液中有有效成分栀子苷的含量测定方法。结果表明, 栀子苷进样量在 0.5 ~ 25.0 μg 范围内线性关系良好, 相关系数(r) = 0.999 9, 加样平均回收率为 100.3%, 相对标准偏差(RSD)为 0.73% ($n=6$)。

关键词:高效液相色谱法; 复方清开灵注射液; 栀子苷; 含量测定

中图分类号: S859.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)04-00104-04

Content Determination of Geniposide in Compound Qingkailing Injection by HPLC

LIU Feng¹, HUANG Xian-hui¹, FU Mei-qin², TANG Guo-yang²

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: This study aimed at establishing a method for content determination of geniposide in compound Qingkailing injection by HPLC. The samples were separated on an Kromasil-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column using the mobile phases of acetonitrile-water ($\varphi = 13:87$). Detection was performed under the room temperature, with the detection wavelength set at 239 nm and the flow rate at 1.0 mL/min. The results showed that optimum linear relationships were achieved when measuring Geniposide at 0.5 – 25.0 μg, with the correlation coefficient at 0.999 9. The average recovery of added samples was 100.3% with a RSD of 0.73% ($n=6$).

Key words: HPLC; compound Qingkailing injection; geniposide; determination

复方清开灵注射液是以古典方剂为基础研制的一种中药复方注射液, 由黄芩、生石膏、栀子、淡竹叶、甘草等九味药材组成, 具有较好的清热解毒、凉血功效, 用于热邪外浸所致的高热妄语、头痛如劈、全身疼痛等热实证。作为处方中的主要有效成分栀子为临床常用中药, 始载于《神农本草经》, 为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实。味苦, 性寒, 归心、肺、三焦经, 具泻火除烦、清热利尿、凉血解毒之功, 用于热病心烦, 黄疸尿赤, 血淋涩

痛, 血热吐衄, 目赤肿痛, 火毒疮疡, 外治扭伤痛^[1-2]。中成药中栀子苷含量的测定方法有紫外分光光度法^[3]、薄层光密度法^[4]、薄层扫描法^[5]、高效液相色谱法^[6-13]等。本试验建立了复方清开灵注射液中栀子苷含量的高效液相色谱测定方法, 并利用建立的方法测定了同一厂家 3 个不同批号的复方清开灵注射液中栀子苷含量。本法具有操作简单、准确、重现性好等优点, 同时也为中药复方注射液提供了更加简便、合理、可靠的质控方法。

收稿日期: 2009-11-20

作者简介: 刘 锋(1983—), 男, 硕士研究生; 通信作者: 黄显会, 男(1969—), 高级兽医师, E-mail: xhhuang@scau.edu.cn

基金项目: 十一五国家科技支撑计划(2006BAD31B06)

1 材料与方 法

1.1 仪器

美国 Waters 公司高效液相色谱仪(带有 Waters2695 液相泵, Waters2487 紫外检测器), 电子分析天平(FA2004N 型, 上海精密科学仪器有限公司), 台式高速离心机(Centrifuge5804, eppendorf 公司)。

1.2 试剂

对照品: 栀子苷(中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 批号: 110749-200714, 规格: 20 mg)。复方清开灵注射液(广州环球生物药品有限公司, 每 1 mL 相当于原生药 1.24 g, 批号: 0811001、0811002、0812002), 甲醇(德国 CNW TECHNOLOGIES GmbH, 批号: HX080945, 色谱纯), 乙腈(德国 MERCK kGaA, 批号: 1473430-908, 色谱纯), 甲醇、磷酸等其他试剂为国产分析纯, 水为双蒸水。

1.3 色谱和检测条件

色谱柱: Kromasil-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 水(体积比 13:87); 检测波长: 239 nm; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 室温; 进样体积: 20 μL。

1.4 对照品溶液的制备

精密称取栀子苷对照品 2.5 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加体积分数为 50% 甲醇溶解并稀释定容至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 含 50 μg 的溶液, 即质量浓度为 0.050 mg/mL, 作为栀子苷对照品储备液。准确吸取储备液 0.1, 0.2, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0 mL, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 用体积分数为 50% 甲醇稀释定容至刻度, 所得对照品溶液的质量浓度分别为 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 25.0 μg/mL。

1.5 供试品溶液的制备

精密量取复方清开灵注射液 2 mL, 置 7 mL 具塞离心管中, 精密加入磷酸溶液 0.1 mL, 混匀, 置 2 ~ 10 °C 放置 1 h, 取出, 放至室温, 离心(3 000 r/min) 20 min, 精密量取上清液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加体积分数为 50% 甲醇稀释定容至刻度, 摇匀, 并通过 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

1.6 阴性样品溶液的制备

取处方中除栀子外的其他药味, 按处方比例制成不含栀子苷的阴性对照品, 依 1.5 供试品溶液制备方法配制阴性样品溶液。

2 结果

2.1 专属性检查

分别精密吸取对照品溶液(质量浓度为 20

μg/mL)、供试品溶液及阴性样品溶液(均稀释 10 倍)按 1.3 色谱条件进样测定, 色谱图见图 1。结果表明对照品与供试品溶液均分离至基线, 且阴性样品无干扰。

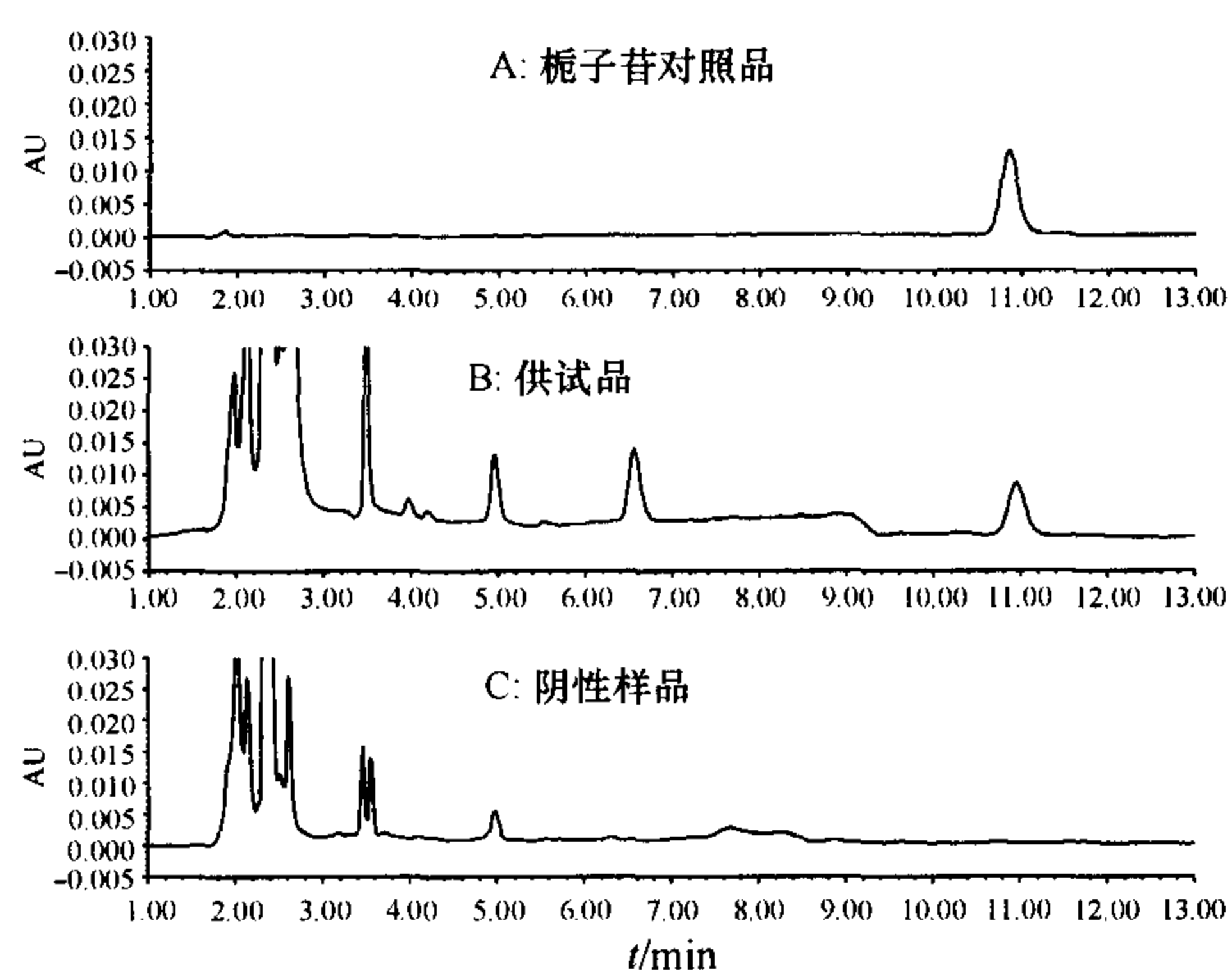


图 1 对照品和样品中栀子苷的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of geniposide in reference substance and sample

2.2 线性关系的考察

在 1.3 色谱条件下, 栀子苷分别在 6 个质量浓度点, 平行测定 3 次(均进样 20 μL), 记录峰面积。以峰面积为纵坐标, 对照品质量浓度(μg/mL)为横坐标, 绘制标准曲线, 回归方程为: $y = 8\,444.9x + 1\,296$, $r = 0.999\,9$; 结果表明在 0.5 ~ 25.0 μg/mL 范围内, 栀子苷峰面积与进样量呈良好的线性关系。

2.3 精密度试验

精密吸取栀子苷对照品溶液, 按 1.3 色谱条件连续进样 6 次, 每次进样 20 μL。测定峰面积, 计算其 RSD 为 0.68%。结果表明仪器精密度良好。

2.4 重现性试验

精密吸取复方清开灵注射液(0811001), 按 1.5 方法, 平行操作制备 6 份供试品溶液, 依 1.3 色谱条件进样 20 μL, 测定峰面积, 并计算质量浓度, 结果平均质量浓度为 0.125 8 mg/mL, RSD = 0.22%。表明本法重复性好。

2.5 (样品) 稳定性试验

精密吸取复方清开灵注射液(0811001), 按 1.5 方法, 制备 1 份供试品溶液, 按 1.3 色谱条件分别于 0、2、4、8、16、24 h 测定峰面积, 计算其 RSD = 0.65%。结果表明样品在 24 h 内稳定。

2.6 空白加标回收率试验

按照 1.4 方法制备 50 μg/mL 的储备液, 精密量取储备液 0.1、0.2、1.0、2.0、4.0、5.0 mL, 用体积分数为 50% 甲醇稀释配制成 6 个不同标准工作液, 按

1.3 色谱条件测定峰面积,得到标准曲线为 $y = 28\ 084x + 2\ 104.2$, $r = 0.999\ 8$. 然后再分别精密量取储备液 4.0、2.0、1.0 mL,用体积分数为 50% 甲醇稀释成 20、10、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3 种理论质量浓度的样品. 精密吸取不含栀子苷的阴性对照品 1 mL 和上面配好的 3 种理论质量浓度的样品 1 mL 混合,按 1.5 方法操作,分别平行制备 3 份供试液,共制得 9 份供试液,用 0.45 μm 微膜过滤后分别进样 20 μL ,计算栀子苷含量,求空白加标回收率,表 1 数据表明此色谱条件下测定空白加标回收率良好.

2.7 加样回收率试验

精密吸取栀子苷对照品 0.1 mg,置于 10 mL 容量瓶中,加体积分数为 50% 甲醇溶解并稀释定容至刻度,摇匀备用. 精密吸取复方清开灵注射液 (0811001) 1 mL 和上面配好的对照品溶液 1 mL 混合,按 1.5 方法操作,制得 6 份供试液. 过滤膜后分别

表 1 栀子苷空白加标回收率试验结果

Tab.1 Results of blank and standard recovery test

试验号	$\rho(\text{栀子苷})/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$		回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
	理论	实测			
1	10.00	10.06	100.60	99.93	0.76
2	10.00	9.91	99.10		
3	10.00	10.01	100.10		
4	5.00	5.01	100.20	99.47	0.65
5	5.00	4.96	99.20		
6	5.00	4.95	99.00		
7	2.50	2.45	98.00	99.07	1.23
8	2.50	2.47	98.80		
9	2.50	2.51	100.40		

进样 20 μL ,计算含量,求加样回收率,结果见表 2. 表 2 数据表明此色谱条件下测定栀子苷加样回收率良好.

表 2 栀子苷加样回收率试验结果

Tab.2 Results of recovery test

$n = 6$

试验号	样品质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	加入对照品质量 浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	实测质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	6.48	5.00	11.45	99.40	100.30	0.73
2	6.48	5.00	11.55	101.40		
3	6.48	5.00	11.51	100.60		
4	6.48	5.00	11.49	100.20		
5	6.48	5.00	11.46	99.60		
6	6.48	5.00	11.51	100.60		

2.8 样品中栀子苷含量测定

将样品溶液按 1.5 方法处理后,经 0.45 μm 滤膜过滤,进样 20 μL ,分别定量测定栀子苷的含量. 结果见表 3.

表 3 注射液中栀子苷质量浓度测定结果

Tab.3 Content determination of geniposide

批号	$\rho(\text{栀子苷})/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$				RSD/%
	重复 1	重复 2	重复 3	平均值	
0811001	0.125 1	0.126 1	0.125 1	0.125 4	0.46
0811002	0.125 5	0.125 3	0.125 4	0.125 4	0.08
0812002	0.126 7	0.127 1	0.127 0	0.127 0	0.21

3 讨论

在配制栀子苷标样的过程中,曾经尝试用不同的溶剂来溶解栀子苷,分别为体积分数 70% 乙醇、纯甲醇和体积分数 50% 甲醇,经过比较,得出由体积分数 50% 甲醇溶解的效果较好,因此选择体积分数 50% 甲醇来溶解栀子苷.

检测波长的确定:试验中,在 200 ~ 800 nm 波长范围内对某一质量浓度的栀子苷进行紫外扫描,图谱显示栀子苷在 239 nm 波长处有最大吸收,与文献 [1] 栀子含量测定项下栀子苷含量测定波长 238 nm 基本一致,故采用 239 nm 作为检测波长.

流动相的选择:以乙腈 - 水以体积比 10:90、15:85 和 13:87 不同比例进行了试验对比,得出乙腈 - 水 (13:87) 为流动相时,能使栀子苷的分离效果得到满意分离,保留时间也较合适.

色谱柱的选择:本试验曾经尝试了 2 个不同厂家的色谱柱, Hypersil BDS- C_{18} 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 和 Kromasil- C_{18} 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 其中 Hypersil BDS- C_{18} 柱的栀子苷峰分离效果虽好,但其柱效较低,而 Kromasil- C_{18} 柱不仅分离效果好,而且其柱效较高. 综合考虑,故选用 Kromasil- C_{18} 柱作为本试验的色谱柱.

栀子为复方清开灵注射液的主要有效成分,所含栀子苷有解热、抗炎、抗菌和利胆等作用^[14-15]. 本

试验利用高效液相色谱法测定复方清开灵注射液中栀子苷的含量,通过线性关系的考察、精密度、重现性、稳定性、空白加标回收率及加样回收率等一系列试验,建立了清开灵注射液中栀子苷的高效液相色谱法含量测定方法,证明了该法在测定复方清开灵注射液中栀子苷的含量中具有快速、准确、分离效果好等优点,为中药复方注射液提供了更加快速、准确的质量控制方法。

并利用建立的方法对同一厂家3个不同批号复方清开灵注射液中栀子苷含量进行了测定,分别为0.1254、0.1254、0.1270 mg/mL,因此,初步确定本注射液中含栀子苷不得少于0.1 mg/mL。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:1部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:173.
- [2] 沈爱宗,刘圣,汤源泉. 栀子药理作用及临床应用进展[J]. 基层中药杂志,1997,11(2):49-52.
- [3] 袁翠美,马自超. 紫外分光光度法测定栀子黄色素中栀子酚和栀子苷的含量[J]. 中国野生植物资源,1993(4):9-11.
- [4] 葛建华,刘捷. 薄层光密度法测定栀子金花丸中栀子苷的含量[J]. 中国药科大学学报,1990,21(3):185-186.
- [5] 朱玉,刘红霞,魏爱卿. 薄层扫描法测定清肝利胆粉剂中栀子苷的含量[J]. 药物分析杂志,1998,S1:47-48.
- [6] 胡晓丹,张德权,田许,等. 高效液相色谱法测定栀子苷的含量[J]. 核农学报,2008,22(5):669-673.
- [7] 胡震,王义明,罗国安,等. 栀子药材中三种有效成分HPLC定量分析结果不确定度的评定[J]. 中药材,2005;28(11):991-994.
- [8] 黄晓丹,傅英,陈禧翎,等. HPLC法测定清开灵胶囊中栀子苷的含量[J]. 中国中医药信息杂志,2009,16(6):52-53.
- [9] 刘天柱,莫结丽. HPLC测定龙胆泻肝片中栀子苷的含量[J]. 中国医药导报,2008,5(10):34-35.
- [10] 王坤,谢强胜. HPLC法测定小儿退热颗粒中栀子苷的含量[J]. 中国医药导报,2009,6(25):48-49.
- [11] 刘瑞新. HPLC同时测定龙胆泻肝丸中龙胆苦苷和栀子苷的含量[J]. 中成药,2007,29(8):1170-1171.
- [12] 段启,庄义修,陈华师. HPLC法测定不同产地栀子中栀子苷含量[J]. 亚太传统医药,2009,5(6):20-21.
- [13] GUAN Ye, ZHU Hai-yan, ZHAO Hao-long, et al. HPLC method for the determination and pharmacokinetic studies on geniposide in rat serum after oral administration of traditional Chinese medicinal preparation Yin-Zhi-Ku decoction[J]. Biomedical Chromatography,2006;20:743-747.
- [14] 田智勇,于培明,许启泰. 中药栀子的研究进展[J]. 时珍国医国药,2004(11):57-59.
- [15] 傅春升,委红祥,张学顺. 栀子的化学成分与药理作用[J]. 国外医药:植物药分册,2004,19(4):152-156.

【责任编辑 柴 焰】

(上接第103页)

参考文献:

- [1] 崔步云. 中国布鲁氏菌病疫情监测与控制[J]. 疾病监测,2007,22(10):649-651.
- [2] 王海艳,刘中学,石新花,等. 牛结核病的现状与未来研究方向[J]. 检验检疫科学,2007,17(3):63-66.
- [3] 田文霞,邢全福. 对奶牛场“布鲁氏菌和结核杆菌病”防控工作的思考[J]. 中国动物检疫,2005,22(12):19-20.
- [4] COLE S T. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex [J]. Microbiology, 2002,148(10):2919-2928.
- [5] SREEVATSAN S, BOOKOUT J B, RINGPIS F, et al. A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle[J]. Clin Microbiol,2000,38(7):2602-2610.
- [6] 闫广谋,王兴龙,任林柱,等. 布鲁氏菌分子标记、毒力缺失疫苗株△S1922的构建[J]. 中国兽医学报,2007,27(5):690-694.
- [7] 杜振昆,郭军庆,张妙仙,等. 牛奶样品布氏杆菌套式PCR检测方法的建立[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2008,34(2):169-174.
- [8] 刘艳环,苗利光. 结核分枝杆菌DNA的快速提取试验[J]. 特产研究,2004,3:16-17.
- [9] CLOECKAERT A, VERGER J M, GRAYON M, et al. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella* [J]. Microbiology,1995,141:2111-2121.
- [10] 谢芝勋,谢志勤,刘加波,等. 多重PCR快速检测鉴别牛布鲁氏菌和牛分枝杆菌的研究与应用[J]. 中国人兽共患病学报,2007,23(7):714-737.
- [11] RIJPE NS N P, JANNES G, VAN ASBROECK M, et al. Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes[J]. Appl Environ Microbiol,1996,62(5):1683-1688.

【责任编辑 柴 焰】