

# 高效液相色谱法测定清瘟解毒口服液中 梔子苷的含量研究

杨 森, 李攀登, 李灵娟, 王 彬, 杨振豪

(河南牧翔动物药业有限公司, 河南 郑州 451162)

**摘要:**目的 为评价梔子苷(Geniposide)的定量检测方法, 规范清瘟解毒口服液中梔子的质量控制标准, 特进行了本含量测定方法研究。方法 药液前处理以 70% 甲醇百倍稀释药液, 超声提取后过微孔滤膜, 精密进样 20  $\mu\text{L}$ , 通过 ODS 填料色谱柱, 以 11% 乙腈洗脱, 在波长 238 nm 下采集紫外吸收色谱进行计算。结果 进样梔子苷浓度在 10.44~156.65  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  内时, 与色谱峰面积值线性相关度佳。其中梔子苷加样回收率平均达 97.3%, (RSD=0.69%, n=6)。结论 得知该方法转移率高、重复性好, 可作为清瘟解毒口服液中梔子苷含量质控标准。

**关键词:**液相色谱法; 梔子苷; 清瘟解毒口服液; 质量标准

当前禽类养殖业正朝着规模型、集约型趋向快速发展, 致使疾病尤其是病毒性疾病群发风险被放大, 科学养殖和疾病诊治重要性不言而喻。当今国家大力推动“减抗、替抗、无抗”的大环境下<sup>[1]</sup>, 中药以特有的多靶点、广谱抗菌作用、无药残绿色安全等优势, 在病毒病防治中优势日益凸显。

同时, 中药制剂也以其化合物种类复杂、成分未可尽知的特点, 常在药典或质量规范中面临操作繁杂而导致有效部位转移率低、定量定性存在干扰等窘境。甚至相当数量中药制剂无含量测定项, 导致不同生产厂家经现有检测标准判为合格的样品, 有效成分含量差异较大的情况, 影响了产品质量的稳定性。故探索稳定及可靠的质控方法也是中兽药发展进程的难点课题之一。

清瘟解毒口服液是一种以禽类为靶动物的中兽药复方制剂, 主治鸡外感发热<sup>[2]</sup>。该制剂含 6 种药味: 梔子 250g、黄芩 225g、连翘 200g、板蓝根 200g、地黄 150g、玄参 150g。《兽药质量标准》对该方黄芩苷、连翘对照药材和梔子苷规范了鉴别要求, 无含量测定项。目前有文献刊登了该制剂中的黄芩苷<sup>[3]</sup>、连翘苷的定量分析方法, 但对于方中用量最大的梔子未见科学系统的定量方法研究文献。该试验拟对清瘟解毒口服液中梔子苷含量进行分析方法确定, 并在方法学上进行适当评价, 致力对本制剂的质量控制贡献思路。

## 1 仪器材料

### 1.1 仪器

Shimadzu LC-20AT(UVD) 高效液相色谱仪; Sartorius SQP 型电子分析天平; Thermo Genesys 10s 型紫外可见分光光度计; 超声波清洗仪(江苏昆山); 津腾真空抽滤泵(0.45  $\mu\text{m}$  滤膜); 和泰纯水仪。

### 1.2 试药与试剂

梔子苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 110749-201718, 含量 97.6%), 色谱级甲醇、乙腈(天津四友), 其它试剂为分析纯。

清瘟解毒口服液, 由河南牧翔动物药业有限公司(以下简称牧翔药业)生产; 阴性对照样品由牧翔药业根据国家兽药典处方中药味及投料量, 生产出的缺梔子阴性样品。

## 2 方法与结果

### 2.1 高效液相色谱条件的选择

2.1.1 紫外可见光吸收波长选取 依实验室处理经验, 对于糖苷类化合物多用甲醇-水系统作提取溶媒<sup>[4]</sup>, 此处以 50% 甲醇溶解适量梔子苷对照品, 供 190~800 nm 下紫外-可见光吸收度波谱扫描用, 运行结果如图 1。预测梔子苷浓度将在优势波峰 238 nm 处呈现良好紫外吸收度线性相关, 选择此宽度作梔子苷 HPLC 检测波长, 进

收稿日期: 2020-01-04 修回日期: 2020-02-20

第一作者简介: 杨 森(1995-), 男, 河南南阳人, 从事中药制剂分析工作。

行系统适用性试验。

2.1.2 系统适用性试验色谱条件 色谱柱:Agilent Zorbax SB-C18(4.6mm×250mm,5 μm);

流动相:乙腈-水(11:89);波长:238 nm;柱温:30℃;流速:1.0ml·min<sup>-1</sup>;进样量:20 μl。

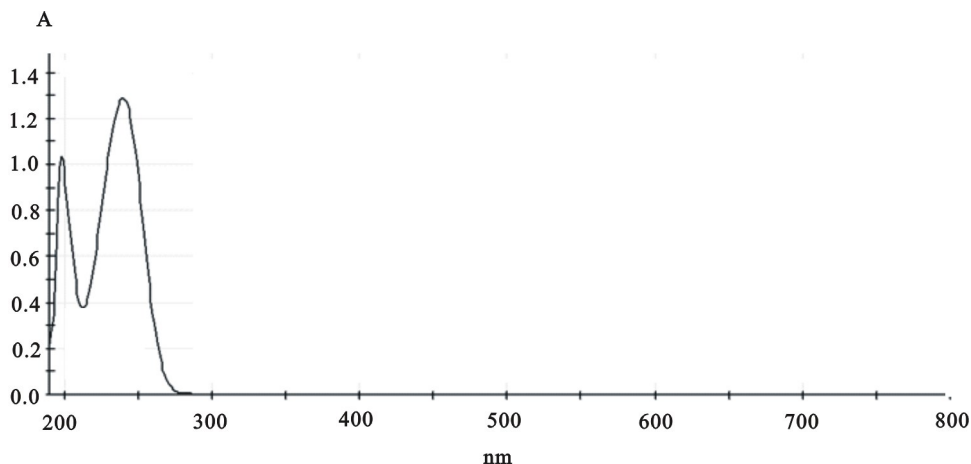


图 1 栀子苷的 50% 甲醇溶液全波长扫描谱图

2.2 对照品溶剂的选择及制备

精密称取栀子苷对照品 26.75mg (含量 97.6%)置 100ml 量瓶中,以 50% 甲醇溶解,定容,摇匀,作为标准储备液。精密量取上述标准储备液各 5 mL 分别以纯甲醇、50% 甲醇溶解至两组 25 mL 量瓶中,定容,摇匀,即得栀子苷含量为 52.22 μg·mL<sup>-1</sup> 的不同溶媒工作标准品

溶液。

过微孔滤膜,注于液相色谱仪,计算谱图指标。其中 50% 甲醇溶解的对照品溶液对应谱图的色谱峰型、柱效均优于纯甲醇配制的对照品溶液对应谱图指标。故选定 50% 甲醇作为配置对照品溶剂,结果如图 2。

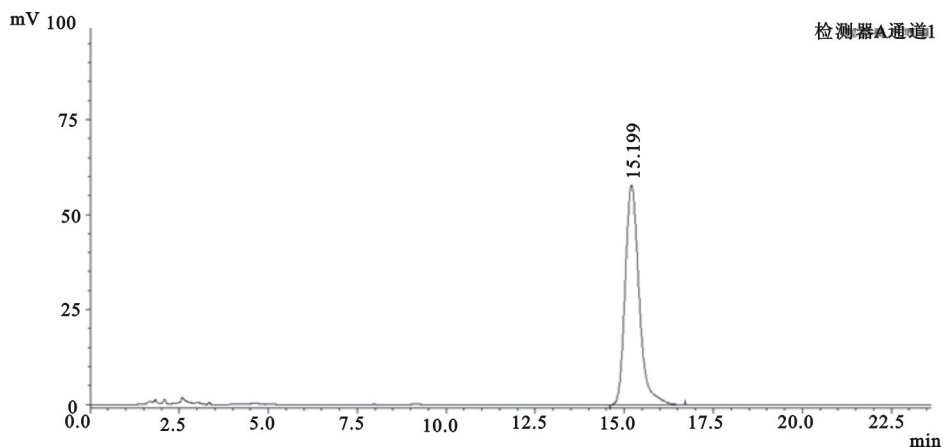


图 2 栀子苷对照品色谱图

2.3 供试品提取溶剂的选择及制备

精密量取本品各 1ml,分别置三组 100 mL 量瓶中,各以 50% 甲醇、70% 甲醇、纯甲醇适量溶解,超声提取 20 min 后,冷却至室温,定容,摇匀,

即得不同溶媒制备的供试品溶液。

过微孔滤膜,注于液相色谱仪,计算谱图指标。结果如表 1:

表 1 不同提取溶剂的供试品色谱指标

Solvent	Result/(mg·mL <sup>-1</sup> )	n/(Geniposide)	Tf
50%MeOH	7.642	7 539	1.321
70%MeOH	8.023	6 161	1.231
ABS MeOH	6.974	3 853	0.761

其中,50%甲醇提取的供试品溶液对应谱图虽柱效较高,但是分离度、峰形、以及定量表现均逊于以70%甲醇所制备者(如图3)。故选70%甲醇作供试品提取溶剂。

#### 2.4 空白溶液制备和专属性试验

精密量取阴性对照样品1 ml,置100 ml量瓶

中,以适量的70%甲醇溶解,超声提取20 min后,冷却至室温,定容,摇匀,即得空白样品溶液。

过微孔滤膜,注于液相色谱仪,采集色谱图(如图4)。可见在本方法色谱条件下,清瘟解毒口服液中栀子苷目标峰无干扰。

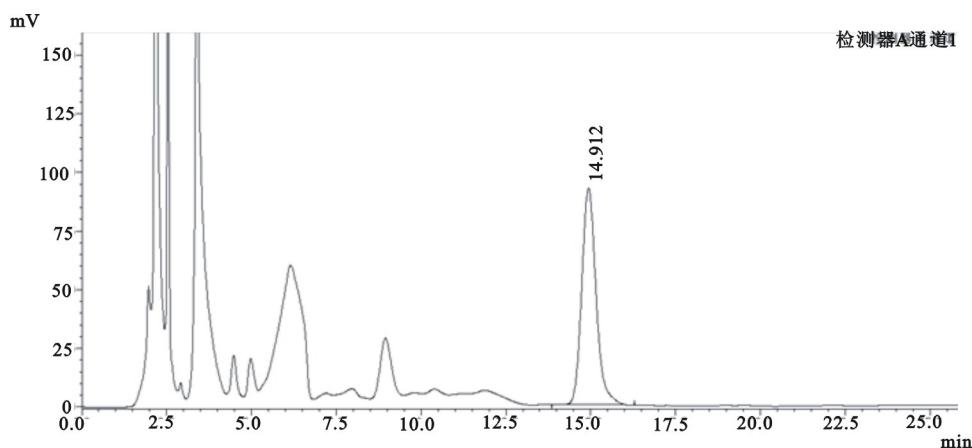


图3 清瘟解毒口服液供试品色谱图

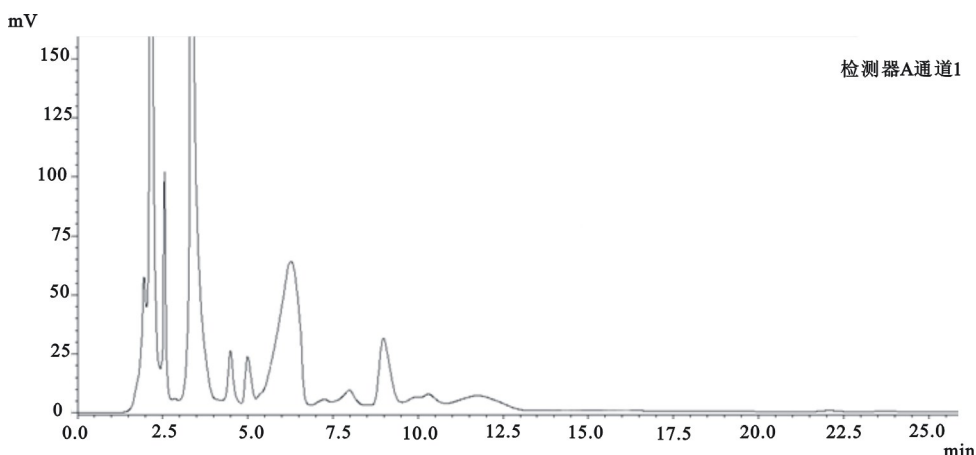


图4 空白样品色谱图

#### 2.5 线性范围考察

精密量取栀子苷储备液各1 mL、2 mL、3 mL、5 mL、10 mL、15 mL分别置不同25 mL量瓶中,以50%甲醇定容,摇匀,过微孔滤膜,注于液相色谱仪,计算目标峰面积积分结果。以峰面积值A为因变量,浓度值C为自变量进行线性回归解析,得: $A = 3 \times 10^7 \times C - 3370.3$ , ( $R = 1.0000$ )。表明栀子苷在进样浓度为10.44~156.65  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内时,与对应峰面积值所拟合的回归方程线性相关度高。

#### 2.6 精密度试验

2.6.1 仪器精密度试验 取2.2项下工作标准品溶液,过微孔滤膜,注于液相色谱仪( $n=6$ ),同样以2.1.2项的色谱条件洗脱,计算目标峰面积积分结果。得结果间 $RSD=0.19\%$ ,故所用仪器精密度高。

2.6.2 方法重复性试验 取同一批样品,按照2.3项下所确定的处理方法制备供试品溶液( $n=6$ ),过微孔滤膜,注于液相色谱仪,以2.1.2项的色谱条件洗脱,并计算目标峰面积积分结果。以外标法计得栀子苷含量分别为:8.38、8.19、8.24、

8.23、8.22、8.25 mg · mL<sup>-1</sup>, RSD=0.79%。

### 2.7 准确度试验

取 2.6.2 重复性试验项下所取的样品 1 mL, 在 2.3 项下"置 100 mL 量瓶中"前精密加入梔子

苷储备液 5ml, 其后处理步骤与 2.3 项下所确定的处理方法一致, 过微孔滤膜, 注于液相色谱仪, 以 2.1.2 项的色谱条件洗脱, 并计算目标峰面积积分结果、测得值及回收率。结果如表 2:

表 2 准确度试验结果

Primary Conc. /(mg · mL <sup>-1</sup> )	Spike /mg	Result /(mg · mL <sup>-1</sup> )	Recovery /%	Average Recovery /%	RSD /%
8.38	1.3054	9.65	97.65	97.34	0.69
8.19	1.3054	9.46	96.91		
8.24	1.3054	9.50	96.24		
8.23	1.3054	9.50	97.34		
8.22	1.3054	9.50	98.02		
8.25	1.3054	9.53	97.90		

### 2.8 样品含量测定

测量样品取用了牧翔药业生产的六批清瘟解毒口服液样品, 各按 2.3 项下所选定的样品制备方法制取供试品溶液, 过微孔滤膜, 注于液相色谱仪, 以 2.1.2 项的色谱条件洗脱, 计算梔子苷含量, 结果如表 3:

由以上六批生产样品检测结果可见, 牧翔药业所生产的清瘟解毒口服液样品含量精密度良好, 批次间质量稳定, 工艺可靠。

表 3 样品含量测定结果

Batch #	Result /(mg · mL <sup>-1</sup> )	RSD
20191001	7.60	3.49%
20191002	8.22	
20191003	8.09	
20191101	8.37	
20191102	8.36	
20191103	8.09	

## 3 小结与讨论

清瘟解毒口服液方中含多味中药, 制剂企业在制备过程中为保持其性状及药学稳定性也不可避免加入特定辅料, 成分复杂。通过系统适用性试验发现, 流动相采用国家标准中测定梔子药材及饮片所含梔子苷的方法流动相乙腈-水(15:85)时<sup>[5]</sup>, 目标峰过早地与杂质同被洗出、分离不

佳, 峰形对称性稍差, 以致不能满足对于以药典标准所生产的该口服液样品的成药制剂质量标准中的定量性能需求。通过色谱条件调整, 使其中杂峰更早地集中流出, 缩短了实际分析周期, 峰形优异, 分离度良好, 可以达到质控的要求。

考察了常用提取溶剂的分析效果, 并通过液相色谱方法进行结果评估。最终通过条件筛选确定了 70% 甲醇超声提取的前处理方法, 简便有效的同时兼备优异定量性能。

综上, 本试验所确定含量测定方法能满足中兽药制剂清瘟解毒口服液中梔子苷的定量分析要求, 为生产该制剂的企业质量控制提供了规范、为行业标准优化扩展贡献参考依据。

### 参 考 文 献:

- [1] 国家卫生计生委员会等. 遏制细菌耐药国家行动计划(2016—2020 年)[Z]. 2016. 第 43 号
- [2] 中国兽药典委员会. 兽药质量标准(2017 年版)中药卷[S]. 北京: 中国农业出版社, 2017. 272-273.
- [3] 刘素梅. 清瘟解毒口服液中黄芩苷含量测定的研究[C]. 中国畜牧兽医学动物药品学分会. 中国畜牧兽医学动物药品学分会第五届全国会员代表大会暨 2016 年学术年会论文集. 中国畜牧兽医学动物药品学分会: 中国畜牧兽医学, 2016: 125-130.
- [4] 匡海学. 中药化学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003. 1: 62-63.
- [5] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[S]. 北京: 中国农业出版社, 2016: 363-364.