

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.05.08

芪板青颗粒质量控制研究

林仙军, 王 彬, 陈晓林, 蔡文金

(浙江省兽药饲料监察所, 杭州 311101)

[收稿日期] 2019-02-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 05-0062-05 [中图分类号] S853.7

[摘要] 为建立芪板青颗粒中绿原酸、咖啡酸和黄芪甲苷含量测定的方法。测定绿原酸和咖啡酸采用 Agilent Eclipse XDB-C18 250 mm×4.6 mm 5 μm 色谱柱, 流动相为 0.05% 磷酸溶液-乙腈 (92 : 8, V : V), 进样量 10 μL, 柱温 30 ℃, 流速为 1.0 mL/min, 在 190 nm~400 nm 范围进行扫描, 记录 327 nm 色谱图; 测定黄芪甲苷采用 Waters symmetry C18 5 μm 4.6 mm×250 mm 色谱柱, 进样量 10 μL, 漂移管温度 35 ℃, 雾化器温度 35 ℃, 气流速度 1.2 L/min, 流动相为水-乙腈 (65 : 35, V : V), 柱温 30 ℃, 流速 1.0 mL/min。绿原酸在 3.611~72.23 μg/mL 范围内线性关系良好, r 为 0.99999, 平均加样回收率 97.1%; 咖啡酸在 3.060~61.20 μg/mL 范围内线性关系良好, r 为 0.99999, 平均加样回收率 96.2%; 黄芪甲苷在 1.0~10 μg 范围线性关系良好, r 为 0.9997, 平均加样回收率为 98.0%。该方法定性、定量准确, 适用于芪板青颗粒含量测定。

[关键词] 芪板青颗粒; 绿原酸; 咖啡酸; 黄芪甲苷; 高效液相色谱法; 二极管阵列检测器; 蒸发光散射检测器

Study on Quality Control of Qibanqing Granules

LIN Xian-jun, WANG Bin, CHEN Xiao-lin, CAI Wen-jin

(Zhejiang Province Supervisory Institute of Veterinary Drug and Feed, Hangzhou 311101)

Abstract: To establish a method for the determination of chlorogenic acid, caffeic acid and astragaloside in Qibanqing granules. Agilent Eclipse XDB-C18 250 mm×4.6 mm 5 μm column was used for the determination of chlorogenic acid and caffeic acid. The mobile phase was 0.05% phosphoric acid solution-acetonitrile (92 : 8, V : V), the injection volume was 10 μL, the column temperature was 30 ℃, and the flow rate was 1.0 mL/min. The chromatograms were scanned in the range of 190 nm to 400 nm and recorded at 327 nm. Waters symmetry C18 4.6 mm×250 mm 5 μm column was used for the determination of astragaloside. The mobile phase was water-acetonitrile (65 : 35, V : V). The column temperature was 30 ℃ and the flow rate was 1.0 mL/min, the injection volume was 10 μL. The drift tube temperature of ELSD was 35 ℃, the atomizer temperature was 35 ℃ and the gas flow rate was 1.2 L/min. The result indicated that chlorogenic acid was in linear over the range of 3.611 to 72.23 μg/mL, r was 0.99999, the average recovery was 97.1%; caffeic acid was in linear over the range of 3.060 μg/mL to 61.20 μg/mL, r was 0.99999, the average recovery was 96.2%; astragaloside was in linear

over the range of 1.0 to 10 μg , r was 0.9997, the average recovery was 98.0%. The method was accurate in qualitative and quantitative analysis, and suitable for the determination of Qibanqing granules.

Key words: Qibanqing granules; chlorogenic acid; caffeic acid; astragaloside; high performance liquid chromatography; diode array detector; evaporative light scattering detector

芪板青颗粒由黄芪、板蓝根、金银花、蒲公英、大青叶和甘草通过水煎煮、过滤、浓缩、加辅料、干燥制得,具有清热解毒的功能,畜禽养殖中主要用于鸡传染性法氏囊病的辅助治疗。该产品的质量收载于《兽药质量标准(2017年版)》中药卷^[1]中,标准仅采用薄层色谱法对绿原酸、咖啡酸和黄芪甲苷进行定性,未测定其含量。这三种成分为芪板青颗粒的主要活性成分之一^[2],含量的高低对药物的疗效有很大影响^[3]。高效液相色谱法具有快捷、准确、灵敏度高的特点^[4-5]。高效液相色谱-二极管阵列检测器法(HPLC-DAD)结合了光谱扫描和数据库功能^[6-7],定性定量更准确^[8];高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)为通用性检测器^[9],可直接检测无紫外吸收的物质^[10-11]。目前,没有查询到芪板青颗粒含量测定的有关文献。因此,为了完善该产品的质量控制方法,研究并建立高效液相色谱法测定有效成分具有现实意义。

1 仪器与材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪,Agilent 1260,配 Agilent 1260 Infinity G4212A 型二极管阵列检测器;高效液相色谱仪,Agilent 1260,配 Agilent 1260 G4260B ELSD 检测器;AG-285 电子天平(Mettler 公司);DELTA320 pH 计(Mettler 公司);KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与材料 甲醇和乙腈为色谱纯,磷酸、氨水、正丁醇、乙醇、乙酸乙酯、三氯甲烷、甲酸、乙酸丁酯、硫酸和丙酮均为分析纯;实验用水为 milli-Q 超纯水。咖啡酸为中国食品药品检定研究院产品,批号 110885-201703,含量 100.0%;绿原酸为中国兽医药品监察所产品,批号 Z0261702,含量 98.3%;黄芪甲苷为中国兽医药品监察所产品,批号

Z0371312,含量 94.4%。芪板青颗粒,为浙江金大康动物保健品有限公司产品,批号为 20180822、20180823 和 20180824。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

2.1.1 对照品储备液和对照品溶液配制 称取绿原酸对照品 18.37 mg 和咖啡酸对照品 15.30 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇定容,摇匀,为绿原酸和咖啡酸对照品储备液;取 5.00 mL,加 50% 甲醇溶液稀释并定容至 50 mL,为绿原酸和咖啡酸对照品溶液。

称取黄芪甲苷对照品 25.00 mg,置 50 mL 棕色容量瓶中,用甲醇溶解定容,摇匀,为黄芪甲苷对照品溶液。

2.1.2 绿原酸和咖啡酸供试品溶液配制 精密称取供试品约 2 g,加乙醇 30 mL,加热回流 30 min,滤过,滤液蒸干,加甲醇溶解,并转移至 25 mL 量瓶中,定容,摇匀,为供试品溶液。

2.1.3 黄芪甲苷供试品溶液配制 取本品 15 g,精密称定,加甲醇 30 mL,超声 30 min,滤过,再加甲醇 30 mL 重复提取 2 次,滤液合并,蒸干,残渣加水 10 mL 微热使溶解,转移至分液漏斗中,用水饱和的正丁醇溶液提取 3 次,每次 30 mL,合并正丁醇液,用 3% 氨试液洗涤 2 次,每次 30 mL,弃去氨试液,收集正丁醇液,置蒸发皿中蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,定容,摇匀,过 0.45 μm 滤膜,滤液作为供试品溶液,为供试品溶液。

2.2 色谱条件

2.2.1 绿原酸和咖啡酸测定色谱条件及系统适用性试验 采用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(Agilent Eclipse XDB-C18 250 mm \times 4.6 mm 5 μm),流动相为 0.05% 磷酸溶液-乙腈(92:8, V:V);进样量 10 μL ,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,流速为 1.0 mL/min,在 190 nm~

400 nm 范围进行扫描,记录 327 nm 色谱图。绿原酸和咖啡酸对照品溶液色谱图(图 1)、绿原酸光谱图(图 2)、咖啡酸光谱图(图 3)和绿原酸和咖啡酸供试品溶液色谱图(图 4)。绿原酸、咖啡酸和其他峰分离度符合要求。

2.2.2 黄芪甲苷测定色谱条件及系统适用性试验
采用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(Waters symmetry C18, 5 μm, 4.6 mm×250 mm),进样量 10 μL,漂移管温度 35 ℃,雾化器温度 35℃,通气气流流速 1.2 L/min,流动相为水-乙腈(65 : 35, V : V),柱温 30 ℃,流速 1.0 mL/min。得到黄芪甲苷对照品色谱图(图 5)和黄芪甲苷供试品溶液色谱图(图 6)。

2.3 线性关系考察 精密量取绿原酸和咖啡酸对照品储备适量,制成相应浓度的系列标准品溶液,以浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线。绿原酸在 3.611~72.23 μg/mL 范围内线性良好,线性回归方程为 $Y=30.54781X-3.22028$,线性相关系数为 0.99999;咖啡酸在 3.060~61.20 μg/mL 范围内线性良好,线性回归方程为 $Y=52.27768X-4.49668$,线性相关系数为 0.99999。

精密吸取黄芪甲苷对照品溶液 10、20 μL,注入液相色谱仪,测定,以峰面积 Y 的对数值对浓度 X 的对数值作图,得工作曲线。黄芪甲苷在 1~10 μg 范围内线性良好,线性回归方程为 $Y=1.4191X+1.7344$,线性相关系数为 0.9997。

2.4 精密度和稳定性试验 精密度试验取批号为 20180822 芪板青颗粒供试品溶液,重复进样 6 次,计算绿原酸、咖啡酸和黄芪甲苷的含量,其含量 RSD 分别为 0.6%、1.2% 和 1.5%;稳定性试验取上述溶液,分别于 0、2、4、6、12 和 24 h 进行测定,计算绿原酸、咖啡酸和黄芪甲苷的含量,其含量 RSD 分别为 0.7%、1.4% 和 1.6%。

2.5 加样回收率试验 取绿原酸、咖啡酸和黄芪甲苷对照品适量,加甲醇配制成约 1 mg 每毫升的加样回收率试验溶液。添加到批号为 20180822 的芪板青颗粒样品中,添加的浓度与样品中原有的量相当,6 个重复,按照上述方法制备供试品溶液,进

行检测,结果扣除芪板青颗粒样品原有相应组分的量,计算加样回收率和 RSD。绿原酸平均加样回收率为 97.1%,RSD 为 1.3%,咖啡酸平均加样回收率 96.2%,RSD 为 1.4%。黄芪甲苷平均加样回收率为 98.0%,RSD 为 2.4%。

2.6 实际样品的测定 取批号为 20180822、20180823 和 20180824 的芪板青颗粒每一批做 3 个平行,依法测定,结果绿原酸的含量分别为 0.83、0.82 和 0.83 mg/g;咖啡酸的含量分别为 0.74、0.76 和 0.77 mg/g;黄芪甲苷含量分别为 0.0814、0.0825 和 0.0835 mg/g。

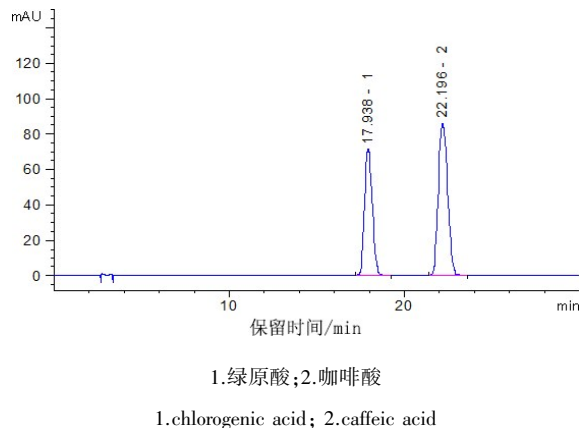


图 1 绿原酸和咖啡酸对照品溶液色谱图
Fig 1 Chromatogram of chlorogenic acid and caffeic acid reference solution

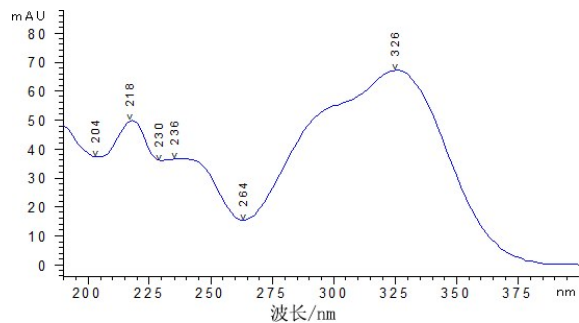


图 2 绿原酸对照品溶液光谱图
Fig 2 Spectrogram of chlorogenic acid reference solution

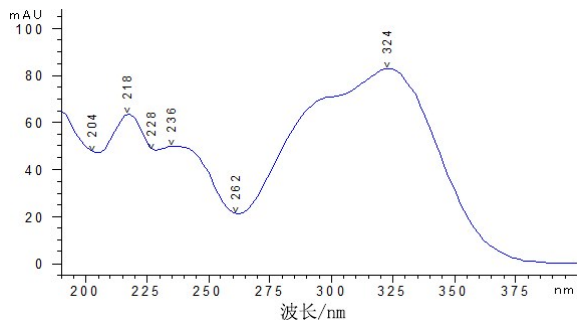


图3 咖啡酸对照品溶液光谱图

Fig 3 Spectrogram of caffeic acid reference solution

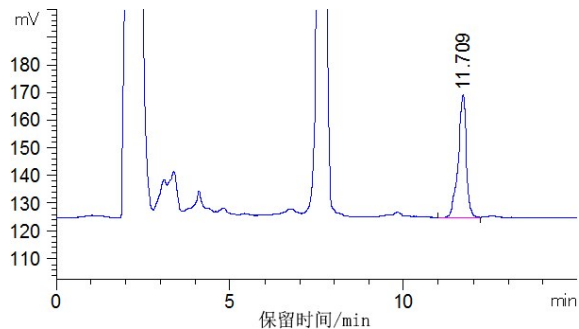
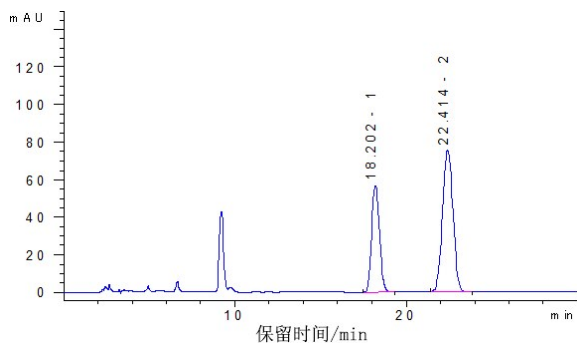


图6 黄芪甲苷供试品溶液色谱图

Fig 6 Solution chromatogram of astragaloside IV



1.绿原酸;2.咖啡酸

1.chlorogenic acid; 2.caffeic acid

图4 供试品溶液色谱图

Fig 4 Solution chromatogram of the sample

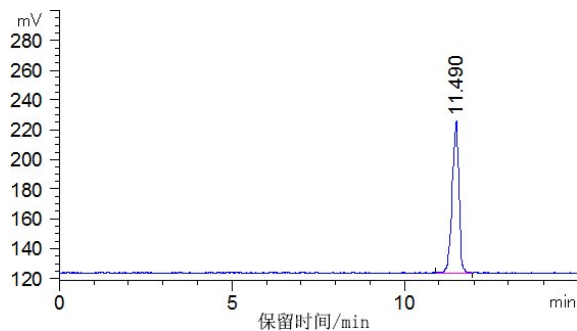


图5 黄芪甲苷对照品溶液色谱图

Fig 5 Solution chromatogram of astragaloside reference substance

3 讨论与结论

3.1 提取溶剂的选择 绿原酸和咖啡酸检测中,选择了水、乙醇、甲醇和50%甲醇溶液超声和水浴回流等不同方式提取,结果表明,绿原酸在甲醇中提取效率稍低,其他几种方式均较好;咖啡酸在水

超声和水回流中的提取效率比较低,其余几种方式均较好。因此,综合考虑,选择乙醇回流作为芪板青颗粒供试品的提取溶剂和提取方式。在这基础上,做了提取时间的确认,试验分别超声15、20、30和60 min,结果15 min的结果稍低,30 min以后无显著差异,因此,超声时间定为30 min。

3.2 检测波长的选择 本试验采用DAD检测器对绿原酸和咖啡酸进行全波长扫描,结果发现,绿原酸在326 nm波长有最大吸收,咖啡酸在324 nm处有最大吸收,参考《中国兽药典》2015年版二部绿原酸的测定方法,综合考虑每个药物的响应值及杂质干扰因素,选择327 nm作为检测波长。

3.3 流动相的选择 选择绿原酸和咖啡酸的流动相时,考察了乙腈与不同浓度磷酸溶液作为流动相,各流动相保留时间和峰形一致,而0.4%磷酸溶液pH值为1.5,0.2%磷酸溶液pH值为1.7,pH值小于2.0对色谱柱损害较大;而0.05%磷酸溶液pH值为2.3左右。因此,选择0.05%磷酸溶液-乙腈作为流动相,调节流动相比例,两种药物分离较好,保留时间比较合适。黄芪甲苷流动相参考《中国兽药典》2015年版二部黄芪甲苷相关内容进行检测。

3.4 ELSD条件的优化 黄芪甲苷属于在紫外区无特征吸收的化合物,而ELSD作为质量通用型检测器,不依赖样品的光学特征,不受官能团的影响。漂移管温度、雾化器温度和气流速度等是ELSD的重要参数,决定了流动相气化是否完全、响应值是否满足要求,因此实验考察了不同漂移管温度、雾化器温度和气流速度,最终得到理想的条件。

3.5 结论 采用 HPLC-DAD 法对芪板青颗粒中绿原酸和咖啡酸进行检测,采用 HPLC-ELSD 法对芪板青颗粒中黄芪甲苷进行检测,对提取溶剂、提取方式和色谱条件(检测波长、漂移管温度、雾化器温度和气流速度)等条件进行优化,方法定性定量准确,得到了满意的结果,为芪板青颗粒质量控制提供数据。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会.兽药质量标准 2017 年版(中药卷).[M].北京.中国农业出版社.
Commission of chinese veterinary pharmacopoeia.Veterinary drug quality standards(2017).[M].Beijing,China Agriculture Press.2017.
- [2] 杜红娜,陆安,刘炳炜,等.贞莲增免口服液质量标准研究[J].今日畜牧兽医,2018,34(10):12-15.
Du H N, Lu A, Liu B W, *et al.* Study on Quality Standard of Zhenlian Zengmian Oral Liquid[J].Hebei Xumu Shouyi,2018,34(10):12-15.
- [3] 杨洪早,王东升,苗小楼,等.藿芪灌注液质量标准研究[J].西南大学学报(自然科学版),2018,40(03):1-9.
Yang H Z, Wang D S, Miao X L, *et al.* Study on Quality Standard of Huoqi Perfusion Solution[J].Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2018,40(03): 1-9.
- [4] 朱红梅,刘翠,张倩,等.乳腺康注射液质量标准研究[J].中国畜牧兽医,2017,44(08):2465-2474.
Zhu H M, Liu C, Zhang Q, *et al.* Study on Quality Standard of Ruxiankang Injection [J].Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2017,44(08): 2465-2474.
- [5] 张丽先,魏悦,曹静亚,等. HPLC 法同时测定连花柴苓可溶性粉中 4 种有效成分含量[J].中国兽药杂志,2017,51(05):27-32.

- Zhang L X, Wei L, Cao J Y, *et al.* Simultaneous Determination of Four Active Components in Lian-hua-chai-qin Soluble Power by HPLC [J].Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(05):27-32.
- [6] 林仙军,张航俊,蔡文金,等.双黄连注射液质量控制研究[J].中兽医医药杂志,2016,35(05):35-38.
Lin X J, Zhang H J, Cai W J, *et al.* Quality Control of Shuang-huanglian Injection [J].Journal of Chinese Veterinary Medicine, 2016,35(05): 35-38.
- [7] 赵增成,林树乾,李桂明,等.清营口服液质量检测方法的研究[J].中国畜牧兽医,2016,43(06):1647-1653.
Zhao Z C, Lin S Q, Li G M, *et al.* Study on Quality Detection Method of Qingying Oral Liquid [J].Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2016,43(06):1647-1653.
- [8] Wang J, Zhao Y M, Zhang M L, *et al.* Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, Alantolactone and Isoalantolactone in Inula helenium by HPLC[J].Journal of Chromatographic Science.2015.53(4):526-530.
- [9] Wang J F, Zhang Q, Mu X. Determination of Astragaloside IV in Yupingfeng Oral Solution by HPLC-ELSD Method [J].Agricultural Science & Technology.2015.16(2):197-199.
- [10] 张聪,杨强,樊丽博,等. HPLC-ELSD 法测定五加芪粉中黄芪甲苷的含量[J].中国兽药杂志,2017,51(08):62-66.
Zhang C, Yang Q, Fan L B, *et al.* Determination of Astragaloside in Wujiqi Powder by HPLC-ELSD[J].Chinese Journal of Veterinary Drug,2017,51(08):62-66.
- [11] 侯美如,刘宇,王岩,等.不同提取工艺对黄芪总皂苷提取效果的研究[J].中国兽药杂志,2016,50(12):24-28.
Hou M R, Liu Y, Wang Y, *et al.* Effect of Different Extraction Processes on the Content of the Total Saponins of Astragalus [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug,2016,50(12):24-28.

(编辑:陈希)