

# 高效液相色谱法测定痔炎消颗粒中绿原酸和芦丁含量

莫文电

(广西壮族自治区河池食品药品检验所, 广西 河池 547000)

**摘要:**目的 建立同时测定痔炎消颗粒中绿原酸和芦丁含量的高效液相色谱法。方法 采用 Diamonsil C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.5%磷酸(20:80)为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 344 nm。结果 绿原酸进样量线性范围是 0.019 2~0.48 μg, 平均加样回收率为 99.47%, RSD=0.33% (n=6); 芦丁进样量线性范围是 0.096~2.406 μg, 平均加样回收率为 99.59%, RSD=0.51% (n=6)。结论 该方法操作简便、重现性好, 可用作该药品的质量控制。

**关键词:** 痔炎消颗粒; 绿原酸; 芦丁; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号 R284.1 R286.0

文献标识码 A

文章编号 1006-4931(2008)24-0021-02

## Determination of Chlorogenic Acid and Rutin in Zhiyanxiao Granules by HPLC

Mo Wendian

(Hechi Institute for Food and Drug Control, Hechi, Guangxi, China 547000)

**Abstract: Objective** To establish a HPLC method for the determination of chlorogenic acid and rutin in Zhiyanxiao Granules. **Methods** The Diamonsil C<sub>18</sub> column was used. The mobile phase was acetonitrile-0.5% phosphoric acid(20:80) with the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 344 nm. **Results** The linearity of chlorogenic acid was good within the range of 0.019 2~0.48 μg. The average recovery rate was 99.47%, RSD=0.33% (n=6). The linearity of rutin was good within the range of 0.096~2.406 μg. The average recovery rate was 99.59%, RSD=0.51% (n=6). **Conclusion** This method is rapid, simple and accurate, which can be used for the standard quality control of Zhiyanxiao Granules.

**Key words:** Zhiyanxiao Granules; chlorogenic acid; rutin; HPLC; content determination

痔炎消颗粒是由火麻仁、紫珠叶、槐花、金银花、地榆、白芍、三七、茅根、茵陈、枳壳 10 味药材组方, 具有清热解毒、润肠通便、止血、

著抑制二甲苯致小鼠耳肿胀。

对角叉菜胶致小鼠足肿胀的影响:取体重为 20~22 g 的雄性小鼠 40 只, 分组及给药方法同上。给药后 30 min 在动物右后足部皮下注射 1% 角叉菜胶生理盐水 0.3 mL/只, 致炎后 4 h 处死动物, 在其长短毛交界处取下左右后足称重, 以左右后足质量差为其肿胀度。结果见表 1。可见, 高剂量湿疹消可显著抑制角叉菜胶致小鼠足肿胀。

表 1 湿疹消抗炎作用试验结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	给药剂量 (g/kg)	耳肿胀试验		足肿胀试验		皮肤毛细血管通透性试验	
		动物数	肿胀度(mg)	动物数	肿胀度(mg)	动物数	A 值
A	2	10	14.4 ± 3.5	10	23.3 ± 3.3	11	0.271 ± 0.118
B <sub>1</sub>	1	10	12.2 ± 1.6	10	23.4 ± 5.4	13	0.220 ± 0.049
B <sub>2</sub>	2	10	10.2 ± 1.4 <sup>△</sup>	10	18.5 ± 2.9 <sup>△</sup>	10	0.186 ± 0.046 <sup>△</sup>
C	2	10	9.8 ± 2.0 <sup>△</sup>	10	15.9 ± 2.9 <sup>△</sup>	11	0.154 ± 0.054 <sup>△</sup>

注: 与 A 组比较, t 检验, <sup>△</sup>P < 0.05, <sup>▲</sup>P < 0.01。

对皮肤毛细血管通透性增高的影响:取体重为 18~20 g 的雄性小鼠 45 只, 腹部脱毛后 24 h (脱毛面积约为 2.5 cm × 3.0 cm) 将其随机分为 4 组, 分别在腹部脱毛区给药, 方法同上。给药后 60 min 拭去药物, 并在脱毛区滴二甲苯 0.3 mL/只, 同时按每 10 g 体重 0.1 mL 剂量尾静脉注射 1% 伊文思蓝溶液, 注射后 20 min 处死动物, 取下腹部蓝染区皮肤, 剪碎后放入盛有 5.0 mL 的丙酮-生理盐水(7:3)溶液的带塞磨口试管中, 浸泡 48 h 后取出浸泡液并离心, 取上清液在比色计上比色, 波长为 610 nm, 以吸光度(A)值直接进行 t 检验(见表 1)。可见, 高剂量湿疹消可显著抑制二甲苯致小鼠皮肤通透性增高的作用。

### 2.3 体外抑菌试验

将试验菌按营养需求接种于普通琼脂培养基平板或血平板, 37℃ 培养 18 h, 刮取少量菌苔乳化于肉汤, 比浊校正其浓度, 再作

10 万倍稀释, 使其终浓度相当于 1 × 10<sup>4</sup> CFU/mL 的肉汤(肺炎双球菌用血清肉汤), 以试管法测定最小抑菌浓度(MIC):将药物经灭菌后用无菌肉汤(肺炎双球菌用血清肉汤)作对倍稀释, 使质量浓度分别为 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.57 mg/mL, 同时设空白对照, 以无菌生长的最小质量浓度为 MIC。以平皿法测定最小杀菌浓度(MBC):取无菌生长的试管接种于平皿中进行培养, 以不生长细菌的质量浓度为 MBC。结果见表 2。

### 3 讨论

西医认为湿疹与过敏反应有关, 常伴有细菌感染, 故全身治疗常采用抗过敏疗法, 而局部治疗常采用激素加抗生素治疗, 但激素的毒副作用会给患者带来一定的危害。中医认为, 湿疹多系风湿热毒侵袭、湿热留滞等所致, 多采用杀虫驱湿等方法, 疗好较好。湿疹消主要由蛇床子、苦参等中药组成, 苦参具有抗病原微生物、抗炎及免疫抑制作用<sup>[4]</sup>, 而蛇床子醇提取物具有抗过敏、抗瘙痒作用<sup>[5]</sup>。湿疹消临床应用时显示出较好的杀虫、止痒、消肿等作用, 本试验结果亦初步证实其有止痒、抗炎、抑菌等作用。

### 参考文献:

- [1] 汪晨. 慢性湿疹的治疗[J]. 中国全科医学, 2004, 7(12): 855-856.
- [2] 王永辉, 张荣, 冯玛莉, 等. 蛇床子超临界萃取物止痒作用的实验研究[J]. 山西中医学院学报, 2005, 6(2): 17-18.
- [3] 雷玉兰, 谭正怀, 张白嘉, 等. 一贴止痛膏的药效学研究[J]. 中成药, 1997, 19(5): 33-34.
- [4] 沈映君. 中药药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 226-230.
- [5] 曲爱娜, 龚海英, 李灵芝. 蛇床子素药理作用及研究进展[J]. 武警医学, 2004, 15(5): 383-384.

(收稿日期 2008-09-23)

止痛、消肿的功效,用于治疗痔疮的炎、肿痛等症<sup>[1]</sup>。方中金银花功能清热解毒、凉散风热,茵陈功能清湿热、退黄疸,槐花功能凉血止血、清肝泻火<sup>[2]</sup>。本试验用同一流动相系统对金银花、茵陈中的绿原酸和槐花中的芦丁同时进行测定,报道如下。

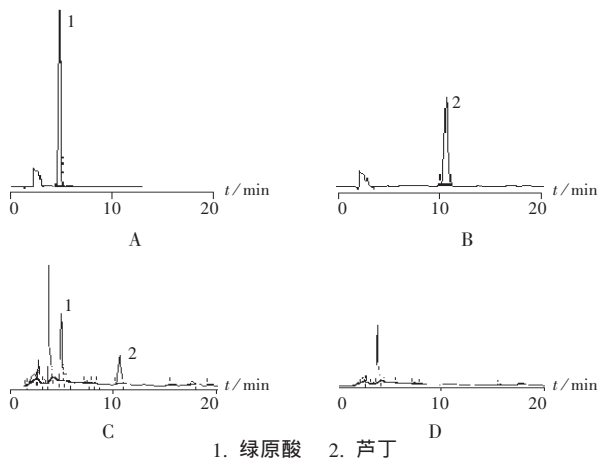
1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10ATVP 泵,SPD-10AVP 紫外检测仪;深圳威玛通用多媒体数据工作站,SB2200 型超声清洗器。绿原酸对照品(供含量测定用,批号为 200212),芦丁对照品(供含量测定用,批号为 200206),均由中国药品生物制品检定所提供;痔疮消颗粒(广西济民制药厂,规格为 10 g×9 袋/盒,批号为 061001,061002,061005);乙腈、磷酸为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 流动相: 乙腈-0.5% 磷酸(20:80) 流速: 1.0 mL/min 检测波长: 344 nm 进样量: 20 μL 柱温: 室温。在此色谱条件下,色谱图见图 1。



1. 绿原酸 2. 芦丁  
A~B. 对照品溶液 C. 供试品溶液 D. 阴性对照品溶液  
图 1 高效液相色谱图

2.2 溶液制备

精密称取绿原酸对照品 4.8 mg, 置 20 mL 棕色瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 5 mL, 置 50 mL 棕色瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得 0.024 mg/mL 的绿原酸对照品溶液。精密称取芦丁对照品 12.03 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 10 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得 0.1203 mg/mL 的芦丁对照品溶液。精密量取绿原酸对照品和芦丁对照品各 5 mL, 置同一棕色瓶中, 摇匀, 即得混合对照品溶液。取样品 5 袋内容物, 混匀, 研细, 取 0.5 g, 精密称定, 置 50 mL 棕色量瓶中, 加甲醇-水(3:7) 的溶液 40 mL, 超声 30 min 使溶解, 放冷, 加至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。据处方比例, 按标准制备法<sup>[1]</sup>制备不含金银花、茵陈和槐花的痔疮消颗粒, 并按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

线性关系考察: 分别精密量取对照品溶液 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 进样测定。以峰面积积分为纵坐标, 进样量(μg)为横坐标绘制标准曲线, 绿原酸回归方程  $Y = 308\ 248.9X + 402.2$ ,  $r = 0.9999$ , 线性范围为 0.0192~0.48 μg; 芦丁回归方程  $Y = 461\ 350.8X - 4\ 078.5$ ,

$r = 0.9998$  线性范围为 0.096~2.406 μg。

精密度试验: 取对照品溶液, 连续进样 6 次, 依法测定。结果绿原酸、芦丁峰面积的 RSD 分别为 0.78%, 1.03% ( $n = 6$ )。

稳定性试验: 取供试品溶液, 在室温下放置 0, 2, 4, 6, 8, 12 h, 分别进样, 测定峰面积, 结果绿原酸、芦丁峰面积的 RSD 分别为 1.42%, 1.83% ( $n = 6$ )。

重现性试验: 取同一批次样品 5 份, 依法测定。结果绿原酸的平均含量为 2.06 mg/g, RSD 为 0.70%, 芦丁的平均含量为 1.06 mg/g, RSD = 0.81%, 表明该法重现性好。

加样回收试验: 精密称取已知含量的样品 6 份, 分别精密加入绿原酸、芦丁对照品适量, 按上述方法配制供试品溶液, 依法测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 样品中绿原酸加样回收结果

样品含量(μg)		加入量(μg)		测得量(μg)		回收率(%)		$\bar{X}$		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.0826	0.0425	0.0480	0.0962	0.1305	0.1390	99.79	100.31				
0.0834	0.0429	0.0480	0.0962	0.1312	0.1390	99.58	99.90				
0.0849	0.0437	0.0960	0.2406	0.1801	0.2815	99.17	98.84	99.47	99.59	0.33	0.51
0.0827	0.0426	0.0960	0.2406	0.1777	0.2824	98.95	99.67				
0.0833	0.0428	0.2400	0.4812	0.3224	0.5204	99.62	99.25				
0.0842	0.0433	0.2400	0.4812	0.3235	0.5225	99.71	99.58				

注: A 为绿原酸, B 为芦丁。

2.4 样品含量测定

取 3 批样品, 依法测定。结果批号为 061001, 061002, 061005 的样品中绿原酸含量分别为 2.06, 1.81, 1.92 mg/g ( $n = 5$ ), 芦丁含量分别为 1.06, 0.94, 0.93 mg/g ( $n = 5$ )。

3 讨论

经紫外吸收光谱测定, 两对照品在 344 nm 波长处均有较大的吸光度, 因而选择 344 nm 作为测定波长。曾以甲醇-水(1:1)、甲醇-水(7:3)、甲醇-水(3:7)、60% 乙醇、70% 乙醇 6 种不同溶剂分别进行超声和加热回流提取, 结果以甲醇-水(3:7) 超声处理为佳。通过对超声时间考察, 提取 30 min 与提取 40 min 和 60 min 时结果无明显差别, 故选用超声提取 30 min。试验中曾使用甲醇-1% 冰醋酸(15:85)<sup>[3]</sup>、乙腈-0.4% 磷酸(10:90)<sup>[4]</sup> 作流动相, 但供试品中绿原酸未能有效分离。经对乙腈-0.4% 磷酸(10:90) 流动相进行配比, 特别是增加乙腈的浓度, 选用乙腈-0.5% 磷酸(20:80) 作为流动相时, 主峰与其他峰分离良好, 峰形对称。

试验中发现, 绿原酸有光分解现象, 即储存在无色容量瓶中的绿原酸对照品溶液在实验室光照条件下放置一定时间后, 色谱中除绿原酸主峰外, 其后会出现 1 个杂质峰, 峰面积与光照时间成正比。但改用棕色瓶后, 同样条件下放置未发现此现象, 因此试验中应注意避光操作。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第十二册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 172.  
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 152, 166, 246.  
[3] 李运景, 王乾蕾, 陈钧茂, 等. 高效液相色谱法测定菌毒清颗粒中绿原酸含量[J]. 中国药业, 2007, 16(21): 15.  
[4] 国家药品监督管理局. 国家中成药标准汇编·中成药地方标准上升国家标准部分(外科妇科分册)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 262.

(收稿日期 2008-05-16, 修回日期 2008-06-27)