

HPLC 测定复方菊陈颗粒 中绿原酸的含量

黄 娟¹ 刘喜华^{2*}

【摘要】目的 运用 HPLC 建立复方菊陈颗粒中绿原酸的含量测定方法。方法 色谱柱 Ultimate XB-C18 (4.6×250mm,5μm), 乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱, 流速 1ml/min, 检测波长 328nm, 柱温 30℃。结果 绿原酸在 0.066μg ~ 1.652μg 范围内呈良好的线性关系 (r=0.9998), 平均回收率为 98.80%, RSD 为 1.88% (n=6)。结论 该方法简便、准确、专属性强, 可作为检测复方菊陈颗粒中绿原酸的方法。

【关键词】 复方菊陈颗粒; 绿原酸; HPLC

Determination of Chlorogenic acid in Compound Ju Chen Granules by HPLC HUANG Mei, LIU Xihua

【Abstract】 Objective To establish a method for determination of the content of chlorogenic acid in Compound Ju Chen granules by HPLC. Methods A HPLC method was used with Ultimate XB-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5μm). The mobile phase was consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid. The UV detector wavelength was at 328 nm. The flow rate was 1 mL·min⁻¹. The temperature of the column was at 30 ℃. Results The calibration curve of chlorogenic acid was linear range of 0.066μg-1.652μg (r=0.9998). The average recovery was 98.80%, RSD=1.88% (n=6). Conclusion The method is simple, convenient and reliable. It is appropriate for the content determination of the preparation.

【Key words】 Compound Ju Chen Granules; Chlorogenic acid; HPLC

复方菊陈颗粒是由菊花等多味中药组成的复 于风热感冒、厌食口腻等症状, 临床上还将其用
方制剂, 具有散风清热、燥湿健脾等功效, 可用 于解酒、醒酒等方面。本实验以菊花中的绿原酸

1 黄娟 (1979.8—), 女, 助理工程师, 主要从事制剂开发和检验工作, 广西梧州制药集团 (股份) 有限公司 广西梧州 543002

2 广西卫生职业技术学院 广西南宁 543002

* 通讯作者: 刘喜华 (1983—), 男, 硕士研究生, 从事中药教学及中药质量与成分分析研究

为控制指标,采用高效液相色谱法(HPLC)对成品进行质量控制。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

Agilent1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);Ultimate XB-C18(月旭材料科技(上海)有限公司,4.6×250mm,5μm);BS224S 电子天平(北京赛多利斯);LG-16WA 台式高速离心机(北京京立离心机有限公司);SB5200DT 超声波清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试剂

绿原酸对照品,供含量测定用,购于中国药品生物制品检定所,批号为:110753-200413;甲醇、乙腈(美国fisher公司,色谱醇);娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);其它试剂为分析纯;复方菊陈颗粒三批(本公司自行研制,批号:110901、110902、110903)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

结合预试验结果,按以下条件和方法进行。色谱柱:Ultimate C18柱(4.6×250mm,5μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸梯度洗脱(详见表1);流速:1.0mL·min⁻¹;检测波长:328nm;柱温:30℃;进样量:10μL;理论塔板数计算应不少于7500^[1-3]。分别取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液按照上述色谱条件进行测定。结果表明:供试品溶液中绿原酸能与相邻组分峰分离,分离度R>1.5,阴性对照品溶液无干扰,色谱图见图1-3。

表1 绿原酸含测梯度洗脱程序
(后运行时间:10min)

时间(分钟)	乙腈(%)	0.1%磷酸(%)
0	10	90
12	10	90
12.5	28	72
17.5	28	72
20	10	90

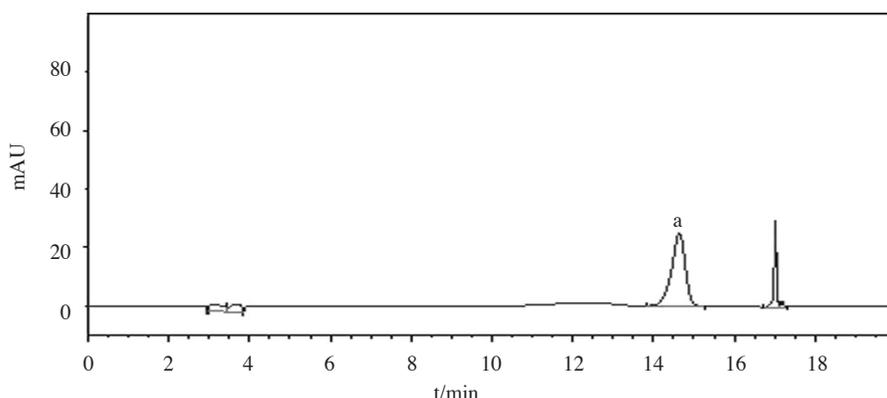


图1 绿原酸对照品色谱图(a为绿原酸)

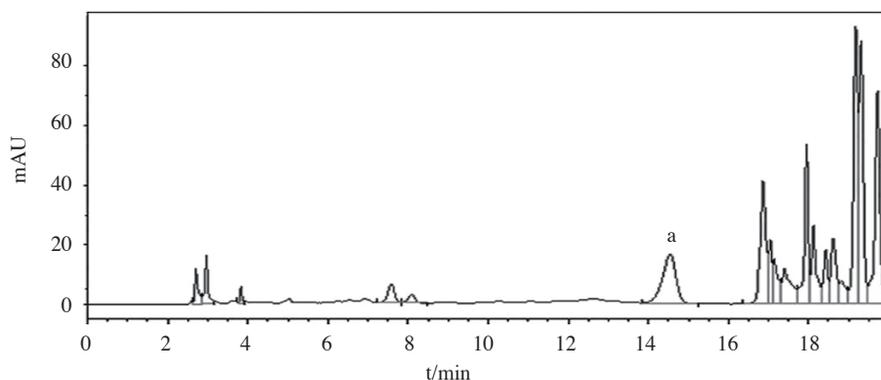


图 2 供试品色谱图 (a 为绿原酸)

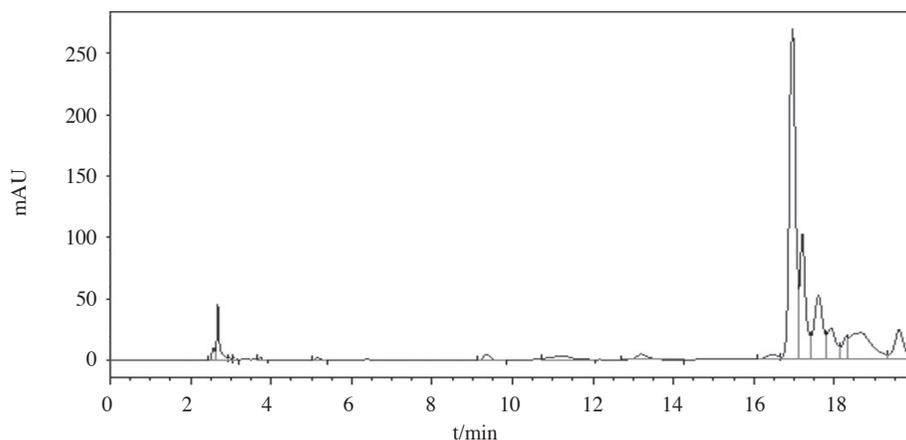


图 3 阴性样品色谱图

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

精密称取低温真空干燥至恒重的绿原酸对照品适量，加甲醇至溶解制成每 1ml 中含 33.04 μ g 绿原酸对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备

取样品研细 1g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加入甲醇 20ml，称定重量，超声提取 60min，放冷至室温，再称定重量，用甲醇补足减失重量，摇匀，滤过，取续滤液，过 0.45 μ m 微孔滤膜即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备

按处方比例配制成不含菊花的阴性样品，并

按 2.2.2 项下方法制成阴性样品溶液。

2.3 线性关系考察

精密称取绿原酸对照品 4.13mg 置于 25ml 容量瓶中，加甲醇溶解，并定容至刻度，制成浓度为 165.2 μ g/ml 的绿原酸对照品溶液，然后分别稀释成 82.6、33.04、16.52、6.608 μ g/ml。按上述色谱条件，分别吸取这 5 个对照品溶液 10 μ l 进样，测定峰面积。以峰面积为纵坐标，对照品溶液浓度为横坐标绘制标准曲线，并计算得回归方程为 $Y=23.818X-63.398$ ， $r=0.9998$ 。结果表明，绿原酸在进样量为 0.066 μ g ~ 1.652 μ g 线性良好。

2.4 精密度试验

精密吸取浓度为 33.04 μ g/ml 的绿原酸对照品

溶液 10 μ l, 按上述色谱条件重复进样 6 次, 测定绿原酸峰面积, RSD 值仅为 0.39%, 表明仪器的精密度良好。

2.5 稳定性试验

取同一供试品溶液, 分别在制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12h 精密吸取 10 μ l 进样, 记录每次进样绿原酸峰面积, RSD 值为 2.06%, 表明供试品溶液在 12h 内稳定。

2.6 重复性试验

取同一批样品 (110901) 6 份, 按供试品溶

液的制备方法制备, 进样 10 μ l, 测定峰面积。计算绿原酸含量。绿原酸平均含量为 0.3820mg \cdot g⁻¹, RSD 值为 2.29%, 表明该方法的重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取已测得绿原酸含量的样品 (110901)6 份, 每份 1g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入一定量的绿原酸对照品, 按 2.2.2 项下的方法制备供试品, 在上述色谱条件下依法测定, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 绿原酸加样回收试验结果

编号	样品重 (g)	样品中绿原酸含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均值回收率 (%)	RSD (%)
1	1.0956	0.4185	0.3990	0.8213	100.94	98.80	1.88%
2	1.0084	0.3852	0.3990	0.7813	99.26		
3	1.0879	0.4156	0.3990	0.8001	96.37		
4	1.0964	0.4188	0.3990	0.8062	97.07		
5	1.0932	0.4176	0.3990	0.8106	98.48		
6	1.0106	0.3861	0.3990	0.7878	100.68		

2.8 样品测定

取三批样品研细, 取 1g, 精密称定, 按 2.2.2 项下的方法制备供试品溶液。分别精密吸取

对照品溶液和样品溶液各 10 μ l, 注入液相色谱仪, 测定绿原酸峰面积, 外标法计算绿原酸的含量, 结果见表 3。表中 RSD 值为 0.04%, 表明三批样品绿原酸含量稳定。

表 3 样品绿原酸含量测定

批号	绿原酸含量 (mg/g)	均值 (mg/g)	RSD%
110901	0.3820	0.3821	0.04%
110902	0.3823		
110903	0.3821		

3 讨论

3.1 预实验曾对绿原酸采用了高效液相的等度洗脱,但在连续注入数个样品之后,后期色谱图基线出现了极大的波动,可能为低极性物质保留时间过长导致,于是将绿原酸的测定改为梯度洗脱,使低极性物质不影响绿原酸的测定,同时节省分析时间。

3.2 供试品中的绿原酸进行 DAD 扫描,结果发现在 328nm 处有最大吸收,故确定其作为检测波长。同时对供试品制备方法进行了提取溶剂、提取方法、提取时间的考察,结果表明:甲醇提取的绿原酸比水及乙醇提取的更充分;超声提取

比回流提取及索氏提取的更完全;30min、60min、90min 提取以 60min 提取的含量最高,故供试品制备方法按上述最佳条件进行。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010:292.
- [2] 陈秋虹, 徐慧, 蒋艳芳. 高效液相色谱法测定桑叶中的绿原酸和芦丁的含量[J]. 中华中医药杂志, 2009,(5):663-665.
- [3] 吴怀恩, 劳深, 王雯慧, 等. HPLC 测定石韦配方颗粒中绿原酸、咖啡酸及芒果苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(16):54-61.

(上接第 19 页)

PMPRB 的建立, 价格管制审评过程以及对过高药品控价的政策都值得我国借鉴。我国采用成本定价法, 多数药品政府定价只规定最高零售价格, 这与加拿大制定出厂价格有很大的不同, 这样的定价方式使得购买双方对于出厂价格有很大的自主权, 医院在不超过最高零售价格的前提下低价购药, 很高利润和中间加价环节下的销售价格实际已经无法给市场价格调查提供真实的数据, 不利于价格的监管。另外我国的药品价格控制缺少分类比价政策, 监管部门没有国内某一药品价格同国内同一类药品价格比较, 而加拿大将同一类治疗水平的药品价格规定在某一范围内。虽然我国的《政府定价办法》中有这样的规定, 但是没有具体到比较对象包括哪些国家以及这些国家的遴选标准等。很难落实到位, 因此, 我国在改善药价过高的局面, 要找出问题的根源, 对症下药才能解决问题。

参考文献

- [1] Wayne D. Critchley. Drug patents and drug prices: The Role of the PMPRB. Toronto: PMPRB Publications, 2002,3-4.
- [2] Brien G. Benoit. Canada's Patented Medicine Prices Review Board - Moving Forward (A).[EB/OL]http://www.pmprb-cepmb.gc.ca/english/view.asp?x=122.2011-03-23.
- [3] Ronald J. Corvari. Trends in Patented Drug Prices (M). Ottawa, Ontario: PMPRB Publications, 1998,1.
- [4] PMPRB. Compendium of policies and guidelines and procedures.[EB/OL]http://www.pmprb-cepmb.gc.ca/english/view.asp?x=1034.2011-04-26.
- [5] 刘宝. 加拿大药品费用及药品价格管理介绍[J]. 中国药房, 2009,20(4):244-247.
- [6] Valérie Paris, Elizabeth Doctor. Pharmaceutical Pricing and Reimbursement Policies in Canada (A). OECD Health Working Papers 24(C). OECD Publishing. 2006,12-13.