

HPLC法测定复方银连颗粒中绿原酸的含量

夏莲*(广西北海食品药品检验所,北海市 536000)

中图分类号 R283.625;R927.2 文献标识码 A 文章编号 1001-0408(2011)31-2943-02

摘要 目的:建立测定复方银连颗粒中绿原酸含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Welchrom C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸(10:90),检测波长为327 nm;流速为1.0 mL·min⁻¹,柱温为30 ℃。结果:绿原酸进样量在0.303 5~1.517 5 μg范围内与峰面积积分值呈良好线性关系($r=0.999 6$);平均回收率为101.6%,RSD=1.84%($n=6$)。结论:本方法操作简便、可靠,可用于复方银连颗粒的质量控制。

关键词 复方银连颗粒;高效液相色谱法;绿原酸;含量测定

Content Determination of Chlorogenic Acid in Compound Yinlian Granules by HPLC

XIA Lian(Beihai Institute for Food and Drug Control of Guangxi, Beihai 536000,China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determine of chlorogenic acid in Compound yinlian granules. METHODS: HPLC method was adopted. The Welchrom C₁₈ column(250 mm×4.6 mm,5 μm)was used with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid(10:90). The detection wavelength was set at 327 nm and flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 30 ℃. RESULTS: The calibration curve of baicalin was linear within the range of 0.303 5~1.517 5 μg($r=0.999 6$).The average recovery was 101.6%(RSD=1.84%, $n=6$). CONCLUSION: The method is simple, convenient and reliable. It is appropriate for the quality control of Compound yinlian granules.

KEY WORDS Compound yinlian granules;HPLC;Chlorogenic acid;Content determination

复方银连颗粒是由金银花、连翘等多味中药组成的临床经验方,具有清热、解毒、凉血的功效,临床用于治疗痤疮效果良好。原方以煎剂入药,笔者将其改成颗粒剂,既保持了煎剂吸收较快、作用迅速的优点,又克服了煎剂需临时煎煮、服用量大、携带储存不方便、久置易发霉变质等缺点。本试验采用高效液相色谱(HPLC)法,对复方银连颗粒君药金银花中有效成分绿原酸的含量进行了测定,以为该制剂的质量控制提供参考依据。

1 仪器与试剂

Agilent1100型HPLC仪,8453紫外分光光度计(美国安捷伦公司);LG16-W高速微量离心机(北京医用离心机厂);SHZ-DⅢ予华牌循环水真空泵(2 800 r·min⁻¹,巩义市英峪予华仪器厂);BS224S电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);SB5200DT超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司,工作频率:40 kHz,功率:200 W)。

绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110715-200815);乙腈(色谱纯,天津市四有科技发展有限公司);磷酸(分析纯,中国医药集团上海化学试剂公司);复方银连颗粒(批号:100901、100903、100906)及其阴性对照颗粒(笔者自制)。

2 方法与结果

2.1 检测波长的选择

参照2010年版《中国药典》(一部)“金银花”项下绿原酸的测定条件^[1],并通过绿原酸对照品的紫外扫描结果,选择327 nm为检测波长。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

*工程师。研究方向:药品、食品检验及药品不良反应监测。电话:0779-6803511。E-mail:l770@163.com

色谱柱:Welchrom C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸(10:90);检测波长:327 nm;流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:30 ℃。分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液与阴性对照溶液各10 μL,注入液相色谱仪进行测定。结果表明,绿原酸峰与其他峰分离良好,阴性对照无干扰;理论板数按绿原酸峰计算应不低于3 000。色谱见图1。

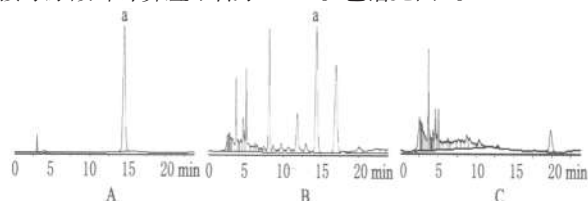


图1 高效液相色谱图

A.绿原酸对照品;B.供试品;C.阴性对照;a.绿原酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A. chlorogenic acid control; B. test sample; C. negative control; a. chlorogenic acid

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液 精密称取绿原酸对照品适量,置10 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成每1 mL含0.607 mg的对照品溶液。再精密量取0.5 mL,置2 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成每1 mL含151.75 μg的对照品溶液。再精密量取1 mL,置2 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成每1 mL含75.87 μg的对照品溶液,备用。

2.3.2 供试品溶液 取本品10 g,研细,取约1 g,精密称定,置25 mL量瓶中,加纯净水超声溶解,冷却至室温后定容,摇匀,即得。

2.3.3 阴性对照溶液 按处方量称取缺金银花的其他药材,制成缺绿原酸成分的阴性对照颗粒,并根据“2.3.2”项下方法

制成阴性对照溶液。

2.4 线性关系考察

分别精密量取浓度为 $151.75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液 2、4、6、8、10 μL ，注入液相色谱仪，记录色谱图。以峰面积积分值 (Y) 为纵坐标，进样量 ($X, \mu\text{g}$) 为横坐标，进行线性回归，得回归方程为 $Y=2\ 970.3X+61.42$ ($r=0.999\ 6, n=5$)。结果表明，绿原酸进样量在 $0.303\ 5\sim 1.517\ 5 \mu\text{g}$ 范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

精密量取浓度为 $75.87 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液 10 μL ，按上述色谱条件注入液相色谱仪，重复进样 5 次，记录峰面积。结果，平均峰面积为 2 369.9， $RSD=1.72\%$ ($n=5$)，表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取复方银连颗粒细粉 (批号: 100901) 适量，共 6 份，分别按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，按上述色谱条件测定。结果，样品中绿原酸的平均含量为 $1.520 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ， $RSD=2.37\%$ ($n=6$)，表明本方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液，分别于制备后 0、2、4、8、12 h 进样 10 μL ，按上述色谱条件测定。结果，绿原酸峰面积的 $RSD=1.15\%$ ($n=5$)，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的复方银连颗粒细粉 (批号: 100901) 6 份，每份约 0.5 g，精密称定，分别精密加入浓度为 $0.607 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的绿原酸对照品溶液 1.2 mL，按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，按上述色谱条件测定，计算加样回收率，结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果 ($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests ($n=6$)

| 序号 | 称样量 /g | 样品含量 /mg | 加入量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | \bar{x} /% | RSD /% |
|----|---------|----------|---------|---------|--------|--------------|--------|
| 1 | 0.506 2 | 0.769 1 | 0.728 4 | 1.499 9 | 100.3 | 101.6 | 1.84 |
| 2 | 0.509 5 | 0.774 1 | 0.728 4 | 1.517 5 | 102.0 | | |
| 3 | 0.505 6 | 0.768 2 | 0.728 4 | 1.507 7 | 101.5 | | |
| 4 | 0.503 1 | 0.764 4 | 0.728 4 | 1.535 2 | 103.6 | | |
| 5 | 0.506 8 | 0.770 0 | 0.728 4 | 1.523 4 | 103.4 | | |
| 6 | 0.502 4 | 0.763 3 | 0.728 4 | 1.481 9 | 98.7 | | |

2.9 样品含量测定

分别取 3 批复方银连颗粒各 10 g，研细，取约 1 g，按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，并按上述色谱条件测定样品中绿原酸的含量，结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 ($n=3$)

Tab 2 Results of content determination of samples ($n=3$)

| 批号 | 样品含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ | | | \bar{x} | RSD/% |
|--------|-------------------------------------|---------|---------|-----------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| 100901 | 1.505 8 | 1.516 6 | 1.535 8 | 1.519 4 | 1.86 |
| 100903 | 1.575 2 | 1.596 8 | 1.538 3 | 1.570 1 | |
| 100906 | 1.578 4 | 1.581 6 | 1.546 3 | 1.568 8 | |

3 讨论

3.1 流动相的选择

《中国药典》和某些文献采用不同比例的乙腈-0.4%磷酸溶液^[1~5]作为流动相测定绿原酸的含量，但该流动相酸度较大，易损伤柱子，缩短柱子的寿命。因此，笔者通过参考文献^[6,7]，采用乙腈-0.1%磷酸溶液 (10:90) 作为流动相。结果表明，绿原酸的峰分离效果与峰形的对称性等方面与乙腈-0.4%磷酸溶液作流动相时比较无显著差异，故选择该系统作为流动相。

3.2 供试品溶液制备方法的选择

笔者曾对比乙醇超声提取法^[8~10]和纯净水超声提取法对供试品制备的影响，结果表明，采用乙醇超声法制备供试品时，绿原酸的提取量仅约为纯净水超声法提取量的 69%；同时曾采用乙酸乙酯萃取法^[11,12]对供试品进行纯化，结果表明此法虽能除去部分杂质，但绿原酸损耗较高。综合考虑，选择纯净水超声提取法作为供试品的制备方法。

综上，本方法操作简便、可靠，可用于复方银连颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典 (一部) [S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 205-206.
- [2] 张伟敏, 蒲云峰, 钟耕. 金银花中绿原酸的分析测定方法 [J]. 中国食品添加剂分析测试, 2005, 9(25): 155.
- [3] 崔岚, 祝德秋, 王晓晓, 等. 反相高效液相色谱法测定清炎颗粒中绿原酸的含量 [J]. 中国药房, 2004, 15(6): 368.
- [4] 张全梅, 刘冰, 阿孜古丽. RP-HPLC 法测定肺炎合剂中绿原酸的含量 [J]. 中国药房, 2008, 19(8): 205.
- [5] 白雪梅, 吴健翎, 罗强, 等. HPLC 法测定四地产金银花中绿原酸的含量 [J]. 河北北方学院学报, 2004, 21(5): 30.
- [6] 武焯, 黎晓敏, 熊仲良, 等. 山东和河南及重庆产金银花中绿原酸含量的研究 [J]. 西南农业大学学报 (自然科学版), 2006, 28(3): 436.
- [7] 杨红娟. 金银花质量控制方法的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2003.
- [8] 何刚, 刘贤桂, 李樊, 等. 金银花叶片绿原酸提取及工艺参数优化的研究 [J]. 江西农业大学学报, 2008, 30(1): 136.
- [9] 蒋受军, 朱斌. 高效液相色谱法测定金银花中绿原酸的含量 [J]. 广西医科大学学报, 2002, 19(5): 695.
- [10] 朱青, 李光慧, 侯晓明, 等. HPLC 法测定金银花及利咽止咳冲剂中绿原酸的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 1996, 2(5): 5.
- [11] 朱凯峰. 绿原酸提取分离方法研究进展 [J]. 黑龙江医药, 2008, 6(21): 59.
- [12] 徐跃成. 金银花中绿原酸的提取分离及其抑菌作用研究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2008.

(收稿日期: 2011-05-12 修回日期: 2011-06-27)

《中国药房》杂志——《国际药学文摘》(IPA) 收录期刊, 欢迎投稿、订阅