

HPLC法测定金杏感冒止咳颗粒中绿原酸含量的研究

蔡勇科¹, 张火旺², 邱治汉¹

(1. 广东省河源市中医院, 广东 河源, 517000;

2. 广东省河源市药品检验所, 广东 河源, 517000)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法(HPLC)测定绿原酸含量的方法, 为药品出厂质量控制提供可靠数据支持。方法: 采用 Inertsil C₁₈ (250mm × 4.6mm, 5μm) 色谱柱, 以乙腈 - 0.4% 磷酸溶液 (10:90) 为流动相, 检测波长为 327nm, 流速为 1.0mL/min。结果: 绿原酸进样量在 0.1012μg ~ 0.3542μg 范围内与峰面积线性关系良好, 平均回收率为 99.78%, RSD 为 0.08%。结论: 高效液相色谱法简便、灵敏、稳定、准确, 无其他成分干扰, 可作为金杏感冒止咳颗粒质量控制的有效方法。

[关键词] 金杏感冒止咳颗粒; 绿原酸; 高效液相色谱法; 实验研究

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.04.069

Content determination of chlorogenic acid in Jinxing Ganmao Zhike granules by high-performance liquid chromatography

CAI Yong-ke¹, ZHANG Huo-wang², QIU Zhi-han¹

(1. Heyuan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Heyuan 517000, Guangdong, China;

2. Heyuan Institute for Drug Control, Heyuan 517000, Guangdong, China)

Abstract: Objective: To investigate the high-performance liquid chromatography (HPLC) method for determining the content of chlorogenic acid, and to provide reliable data for outgoing quality control of the medicinal product. Methods: HPLC was performed on an Inertsil C₁₈ column (250mm × 4.6mm, 5μm) with a mobile phase of acetonitrile - 0.4% phosphoric acid solution (10:90) at a detection wavelength of 327nm and a flow rate of 1.0mL/min. Results: There was a good linear relationship between chlorogenic acid and peak area within a range of

谱范围、光谱预处理方法对定量模型性能的影响。实验结果表明, 所建立的 NIRS 模型性能良好, 相对预测偏差 RSEP 总体控制在 5% 以内, 可用于对未知样品的快速定量分析; 并初步验证所建 NIRS 快速检测方法的准确度、精密度和重复性, 结果均良好。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(2015年版一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 158.
- [2] 陆小华, 马骁, 王建, 等. 赤芍的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(4): 595-602.
- [3] 涂瑶生, 毕晓黎, 罗文汇. 中药配方颗粒的质量控制研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2011, 13(1): 41-46.
- [4] 徐春波, 李振吉, 朱晓磊, 等. 中药配方颗粒国际组织标准的研究与制定[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2010, 12(6): 841-843.
- [5] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药配方颗粒标准[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2013: 101-103.

- [6] 泽郎尼玛. 近红外光谱分析技术的原理及在中药材中的应用[J]. 大家健康, 2015, 9(1): 278-279.
- [7] 胡小莉, 白雁, 雷敬卫, 等. NIRS 快速测定不同产地野菊花中总黄酮含量[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(3): 547-553.
- [8] 吴文辉, 唐小龙, 冯健, 等. 盐补骨脂配方颗粒中指标成分及水分测定的 NIR 模型建立[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13): 41-44.
- [9] 付小环, 胡军华, 李家春, 等. 应用近红外光谱技术对茯苓药材进行定性定量检测研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 280-286.
- [10] 徐茂玲. 近红外光谱定量技术应用于中药领域的最新研究[J]. 天津药学, 2015, 27(6): 65-67.
- [11] 陈雪英, 李页瑞, 陈勇, 等. 近红外光谱分析技术在赤芍提取过程质量监控中的应用研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(11): 1355-1358.
- [12] 柳艳云, 胡昌勤. 近红外分析中谱波长选择方法进展与应用[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(5): 968-971.

(收稿日期: 2017-11-07)

0.1012~0.3542 μg , with an average recovery rate of 99.78% (relative standard deviation = 0.08%). Conclusion: The HPLC method is simple, sensitive, stable, and accurate and is not influenced by other ingredients. Therefore, it can be used as an effective method for the quality control of Jinxing Ganmao Zhike granules.

Key words: Jinxing Ganmao Zhike granule; chlorogenic acid; high-performance liquid chromatography; experimental study

金杏感冒止咳颗粒是我院沿用多年的制剂,疗效确切,由金银花、牛蒡子、桑白皮、连翘、板蓝根、紫苏叶、麦冬、前胡、防风、姜活、苦杏仁、陈皮、川芎13味中药组成,具有宣肺止咳、清热解毒的作用,常用来治疗头痛发热、鼻塞、流鼻涕、咳嗽、咽痛、肢体酸痛等症状^[1-2]。但目前的现行标准^[3]中,只有金银花、连翘的定性鉴别,对于含量的测定少有提及,从而无法确定药物质量。绿原酸为该药中消炎抗菌的有效成分,本文拟采用高效液相色谱法建立该制剂中绿原酸的含量测定方法,并测定金杏感冒止咳颗粒中绿原酸的含量^[4-5],现报告如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津LC-2010AHT(日本岛津)高效液相色谱仪;CP225D型多功能电子天平;SB2200超声处理器(上海科导超声清洗仪有限公司)。

1.2 试剂 乙腈(色谱纯, TEDIA);磷酸(广州化学试剂厂20170701-1);水为超纯水;绿原酸对照品(绿原酸批号:110831-201704供含量测定用)均购自中国药品生物制品检定所,含量均为100%;金杏感冒止咳颗粒:批号分别为170401、170501、170301。

2 方法与结果

2.1 标准品溶液的配制 对照样品溶液的配制:取绿原酸对照品10.12mg,置于20mL量瓶中,然后以50%的甲醇溶

液将其溶解至刻度并充分混匀,而后取5.0mL于100mL量瓶中,同样以50%甲醇溶液溶解至刻度并充分混匀后即为对照样品液。样品液的配制:取本品适量均匀研细后称取约0.5g置于具塞锥形瓶,加入50%甲醇溶液50.00mL后闭塞,称重,然后以16KHZ,296W超声处理30min后自然冷却,再次称重,比较2次重量的差距,以50%甲醇液补充至超声处理前重量,充分搅匀后滤过,取出续滤液,于0.45 μm 微孔滤膜上过滤,即得样品液。阴性对照液的配制:按质量标准中规定的处方比例同法配制不含金银花、牛蒡子、白桑皮、连翘的阴性样品,按样品液配制方法法配制成相应的阴性对照液。

2.2 色谱条件与进样分析 十八烷基硅烷键合硅胶柱 Inertsil C₁₈ (250mm × 4.6mm, 5 μm) 填充柱,流动相为乙腈-0.4%磷酸溶液(10:90),没食子酸检测波长为327nm,流速为1.0mL/min,进样量为20 μL ,柱温25℃;以峰面积外标法定量^[6]。在本色谱条件下,金杏感冒止咳颗粒中绿原酸的色谱峰与其他组分峰均取得较好分离,干扰性较小。

2.3 结果

2.3.1 干扰测试结果 分别取对照品溶液、样品溶液、阴性对照液,按上述色谱条件进样测绘 HPLC 图谱,组分的出峰时间区域相互分离,未发现明显干扰峰,结果表明处方中其他成分及辅料对绿原酸的测定无干扰作用。(见图1)

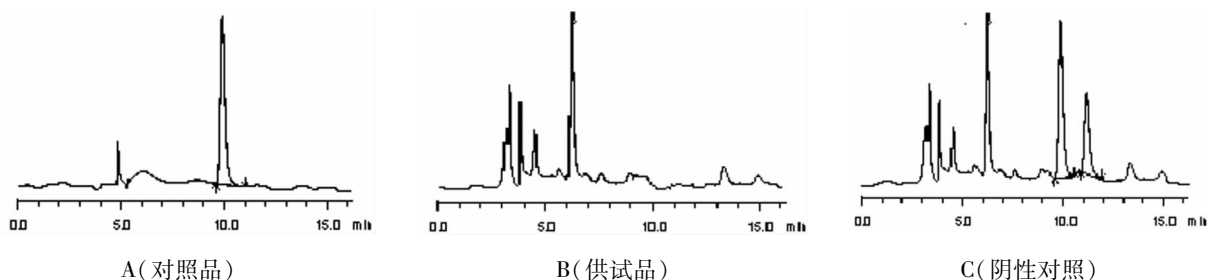


图1 HPLC 色谱图

2.3.2 线性关系的考察 分别精密量取绿原酸对照品储备液4、6、8、10、12、14mL置于20mL量瓶中,通过甲醇定容至要求刻度,充分摇匀后得到一系列标准溶液。按上述色谱条件分别进样10 μL ,进行峰面积的测定,以峰面积(A)为纵坐标,绿原酸对照品浓度(C)为横坐标绘制标准曲线,进行线性回归,计算得回归方程。绿原酸 $A = 6858480.2372C - 29101$ ($r = 0.9980$),结果表明绿原酸的溶液在0.1012~0.3542 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

2.3.3 HPLC 测定方法特性分析 取同一对照品溶液连续

重复进样6次,进样量20 μL ,测定峰面积,计算RSD分别为0.11% ($n = 6$),结果表明该方法使用的仪器具有良好精密性;取同一批号供试品,精密称取6份,按样品测定方法平行测定含量,绿原酸的RSD为0.36% ($n = 6$),结果表明该方法重复性好;取同一样品溶液,在室温放置,每隔2h测定1次,连续测定6次,结果绿原酸含量的RSD为0.73% ($n = 6$),说明样品溶液在12h内测定,结果稳定性良好。

2.3.4 加样回收率试验结果 精密称取已知绿原酸含量的样品(批号:170401,绿原酸含量:3.2858mg/包,1包=

10.38g) 适量至具塞锥形瓶中,共 6 份,分别加入上述绿原酸对照品贮备液(绿原酸:0.5060mg/mL)1、2、3mL,密塞,称定重量,超声处理(16KHz,296W)30min,自然冷却后再次称重,2 次称重的差距以 50% 甲醇补充,充分摇匀后滤过,取过滤液,用微孔滤膜(0.45μm)再次过滤即得。分别量取以上 6 份溶液 20μL,注入液相色谱仪进行测定并计算绿原酸的回收率。结果见表 1。

表 1 绿原酸加样回收试验结果(n=6)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率X(%)	$\bar{X}$	RSD(%)
2.5809	0.8170	1.5180	2.3329	99.86	99.78	0.08
2.5818	0.8173	1.5180	2.3316	99.76		
2.5945	0.8213	1.0120	1.8301	99.72		
2.5962	0.8218	1.0120	1.8322	99.84		
2.5875	0.8190	0.5060	1.3244	99.87		
2.5985	0.8226	0.5060	1.3266	99.61		

2.3.5 样品绿原酸含量测定结果 取不同时间生产的 3 批银杏感冒止咳颗粒进行绿原酸含量的测定,按“2.1”项下方法进行配制待测样品液,进样 20μL,记录峰面积,按外标法计算绿原酸含量,结果见表 2。根据 3 批样品所测绿原酸含量结果,暂定银杏颗粒中绿原酸含量定量限为 3.0mg/包。

表 2 3 批样品含量测定结果(n=3)

厂家	批号	绿原酸含量(mg/包)
1	170401	3.2858
2	170501	3.1966
3	170301	3.2147

3 讨 论

银杏感冒止咳颗粒是目前我院沿用较长时间的一种治疗感冒的药物,绿原酸是其主要发挥作用的活性成分^[6]。绿原酸又称咖啡鞣酸,是一类人工提取自忍冬科植物的化学物质^[7]。研究^[8]表明,绿原酸提取过程中往往可因水解和内酯基变构而发生结构异构。由于其特殊的分子结构组成,绿原酸的萃取可以通过乙醇和甲醇等,但其结构的易变性使其提取时必须保持常温或低温,不能强光照射^[9]。

绿原酸具有多方面的生物活性,如抗感染、抗微生物、抗病毒、降火、降血脂及降血压等,其作用机制目前多已明确,如抗菌消炎作用的关键在于杜仲绿原酸,而桃叶珊瑚苷则具有明显的光谱抑菌作用,对病毒也有一定的抑制作用^[10]。此外,绿原酸还是一种有效的抗氧化成分,其分子结构中有一定量的羟基,能形成还原性强的氧自由基,从而保护机体免受氧化的损伤,进而可抑制衰老和色素斑的形成^[11]。

高效液相色谱法(HPLC)在选择检测波长时,用二极管阵列检测器在 200~400nm 波长范围内扫描得到绿原酸的最大吸收波长在 327nm。在测试结果中发现,波长设置为

327nm 时,绿原酸的吸收率最大,测量的灵敏度较高,此外,设置此长度波长时,色谱峰对称分布,干扰小,效果佳,故选择 327nm 作为最终样品绿原酸的检测波长。提取方法的选择中分别选取了 50% 甲醇、60% 甲醇、70% 甲醇等不同浓度溶剂进行超声提取,结果以 50% 甲醇超声处理分离效果最好,故选择了 50% 甲醇对样品进行溶解。分别通过超声处理样品 10min、20min、30min、40min 4 个时间跨度,最终测得绿原酸的含量最高的为超声处理 30min 和 40min 组,认为在超声 30min 基本提取完全,故最终选用 50% 甲醇超声处理 30min。

本试验以高效液相色谱法(HPLC)法测定银杏感冒止咳颗粒中绿原酸含量,通过测试,最终确定以 372nm 为检测波长,50% 甲醇为提取液,提取时间设置为 30min,可获得精确、可重复和稳定的测定结果。该法操作较为便捷,样品回收率高,稳定性高,重复性好,是银杏感冒止咳颗粒质量控制的有效方法,本法的建立有利于更好地控制产品质量。

参考文献

[1] 陈述,席桂同. 高效液相色谱法测定银花感冒冲剂中绿原酸含量[J]. 世界中医药,2015(1):97-99.

[2] 张晓霞,房经贵,陈世忠,等. 高效液相色谱法测定中药梅花中绿原酸、芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷的含量[J]. 中国医院药学杂志,2016,36(2):107-109.

[3] 陈佩毅,吴生齐,唐年忠.《医疗机构制剂注册管理办法(试行)》实施后广东省医疗机构中药新制剂注册情况分析[J]. 中医药管理杂志,2009,17(6):487-489.

[4] 曲明,程杨,曹春梅,等. 高效液相色谱法测定金银花中绿原酸的含量[J]. 食品研究与开发,2015,36(22):145-147.

[5] 李长萍,徐焕焕,邵冬艺. 高效液相色谱法测定通络脉合剂中绿原酸含量[J]. 北京中医药,2015(1):61-62.

[6] 王省超,孙颖,王瑞英,等. 超声提取-高效液相色谱法测定新疆昆仑雪菊中绿原酸的含量[J]. 分析科学学报,2016,32(2):285-287.

[7] 李永伟,何兵,周德兵,等. 高效液相色谱法同时测定鱼腥草中绿原酸和金丝桃苷含量[J]. 中国药业,2015(7):49-51.

[8] Skalicka-Woźniak E S K. Isolation of chlorogenic acid from Mute-llina purpurea L. herb using high-performance counter-current chromatography[J]. Natural Product Research, 2014, 28(21):1936-1939.

[9] 魏明,杨晓梅,刘佳红,等. 绿原酸的药理作用研究进展[J]. 陕西中医,2016,37(4):511-512.

[10] 庞美蓉,刘零怡,高汪磊,等. 绿原酸调节糖脂代谢的作用机制研究进展[J]. 中草药,2015,46(2):305-312.

[11] 戴艺,徐明生,上官新晨,等. 绿原酸对小鼠腹腔巨噬细胞免疫调节作用的研究[J]. 天然产物研究与开发,2015(12):2128-2133.

(收稿日期:2017-12-13)