

HPLC 测定退热解毒注射液中绿原酸和咖啡酸含量

索银科¹, 王永平²

(1. 宝鸡市药品检验所 陕西 宝鸡 721001; 2. 中铁一局集团中心医院 陕西 华县 714100)

关键词: 高效液相色谱法; 退热解毒注射液; 绿原酸; 咖啡酸

摘要: 目的: 建立退热解毒注射液中绿原酸和咖啡酸的高效液相色谱分析方法。方法: 以 Hypersil ODS 柱 0.01 mol/L 磷酸二氢钠溶液 (1% 磷酸溶液调节 pH 值至 3.9) - 甲醇 (15 : 85) 为流动相 流速为 1.0 mL/min 柱温 30 °C 于 323 nm 测定退热解毒注射液中绿原酸和咖啡酸。结果: 绿原酸在 0.40 ~ 200 mg/L 咖啡酸在 0.16 ~ 160 mg/L 内线性关系良好; 平均回收率和 RSD 分别为 99.4%、100.9%; 1.0%、1.6%; 检测限 (S/N = 3) 分别为 0.013、0.005 mg/L; 定量限 (S/N = 10) 分别为 0.040、0.016 mg/L。结论: 本法简便、准确、无干扰, 可用于控制退热解毒注射液的质量。

中图分类号: R927.2

文献标识码: B

文章编号: 1001-1528(2010)04-0695-02

退热解毒注射液由金银花、连翘、牡丹皮、蒲公英、金钱草、柴胡、夏枯草、石膏共八味药材组方, 具有清热解毒的功能^[1]。绿原酸和咖啡酸具有抗病毒、抗菌、利胆、止血等药理作用^[2]。蒲公英、金银花中均含有绿原酸和咖啡酸^[3,4], 文献中报道分析方法较多^[5-7], 但尚未见同时测定退热解毒注射液中的此两组分。部颁标准采用高效液相色谱法只测定该制剂中的绿原酸^[1], 本试验采用高效液相色谱法同时测定了绿原酸和咖啡酸的含量, 样品不需要特殊处理, 具有简便、准确、无干扰的特点。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪 (单元泵 G1310A, VWD 检测器 G1314A, 7725i 进样阀 G1328B, 20 μL 定量环, Agilent Chem Station revision B. 02. 01-SR1 [260]); TU-4901 紫外可见分光光度计; 绿原酸对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 110753-200413, 供含量测定用) 和咖啡酸对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 110885-200102, 供含量测定用); 退热解毒注射液市售品为陕西某制药企业产品 3 批 (批号 080417, 080717, 080718); 甲醇 (HPLC, 天津市科密欧试剂有限公司); 重蒸馏水; 其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil ODS 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 柱温: 30 °C; 流动相: 0.01 mol/L 磷酸二氢钠溶液 (1% 磷酸溶液调节 pH 值至 3.9) - 甲醇 (85 : 15); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 323 nm; 进样量: 20 μL。

2.2 对照品溶液制备 精密称取减压干燥 (真空度 0.075 MPa, 温度 20 °C, 干燥剂五氧化二磷) 24 h 的绿原酸对照品 20.0 mg、咖啡酸对照品 8.0 mg, 分别置 50 mL 量瓶中; 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即分别得浓度为 400 mg/L 的绿原酸和 160 mg/L 的咖啡酸对照品溶液。

2.3 样品溶液制备 取 5 支注射液, 混匀, 精密量取 1.0

mL, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 阴性样品溶液制备 按处方称取除金银花、蒲公英外各味药材相当 10 mL 量, 照退热解毒注射液生产工艺制备阴性样品, 精密量取 1.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.5 方法的专属性 在拟定的色谱条件下测定, 吸取 40 mg/L 绿原酸、20 mg/L 咖啡酸对照品溶液、样品溶液和阴性样品溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图见图 1。对比保留时间可知, 保留时间为 11.325 min 和 25.013 min 分别是绿原酸峰和咖啡酸峰, 经计算其理论板数分别为 863 和 5 276, 二者与相邻峰的分离度为 6.34 和 9.36, 阴性样品溶液色谱图显示在绿原酸和咖啡酸峰位置处无干扰, 表明其他组分和辅料不影响对二者同时测定。

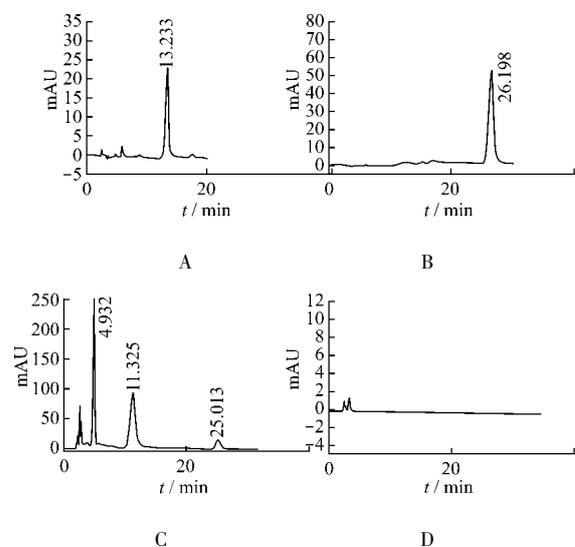


图 1 绿原酸对照品 (A)、咖啡酸对照品 (B)、样品 (C) 和阴性样品 (D) 的 HPLC 色谱图

收稿日期: 2009-01-19

作者简介: 索银科 (1969 -) 男, 副主任药师, 从事药品检验工作。Tel: (0917) 3518773 E-mail: Albert_saw@126.com

2.6 线性关系考察 分别精密量取 400 mg/L 绿原酸对照品溶液 0.01、0.1、0.3、1.0、3.0、5.0 mL 和 160 mg/L 咖啡酸对照品溶液 0.01、0.06、0.6、2.0、5.0、10 mL, 依次分别置 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 制成表 1 所示浓度的绿原酸和咖啡酸对照品溶液, 精密吸取上述各溶液 20

μL, 按上述色谱条件进行测定, 分别以绿原酸和咖啡酸对照品溶液 (X : mg/L) 为横坐标与其相应的峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 结果见表 1。测得绿原酸、咖啡酸检测限 ($S/N=3$) 分别为 0.013、0.005 mg/L; 定量限 ($S/N=10$) 分别为 0.040、0.016 mg/L。

表 1 绿原酸和咖啡酸标准曲线

化合物	浓度/(mg/L)	标准曲线	相关系数 r	线性范围/(mg/L)
绿原酸	0.40、4.00、12.00、40、120、200	$Y=395.3X+23.6$	0.999 6	0.40~200
咖啡酸	0.16、0.96、9.6、32、80、160	$Y=1392X-215.3$	0.998 6	0.16~160

2.7 稳定性试验 精密吸取同一批号的退热解毒注射液样品溶液, 分别在 0、0.5、1、2、4、12 h 时测定, 结果绿原酸、咖啡酸的峰面积 RSD 值分别为 1.4% 和 1.6%, 表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.8 精密度试验 取同一批号的退热解毒注射液样品溶液, 精密量取 20 μL, 连续进样 5 次, 结果绿原酸、咖啡酸的峰面积 RSD 值分别为 1.2% 和 1.4%, 表明该方法精密度良好。

2.9 重复性试验 取批号 080417 退热解毒注射液, 按 2.3 项制备供试品溶液 5 份, 精密量取 20 μL, 各溶液进样分析 2 次, 以平均峰面积按标准曲线法计算, 测得绿原酸和咖啡酸含量分别为 1.5 mg/mL (RSD 为 1.4%, $n=5$), 0.13 mg/mL (RSD 为 1.7%, $n=5$)。

2.10 加样回收率试验 精密量取本品 1.0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 分别精密加入表 2 所示量绿原酸和咖啡酸对照品溶液, 用流动相定容至刻度, 摇匀, 作供试液。吸取 20 μL 进样分析 2 次, 记录色谱图, 以平均峰面积按标准曲线法计算, 测得绿原酸和咖啡酸平均回收率分别是 99.4% (RSD = 1.0%), 100.9% (RSD = 1.6%)。见表 2。

表 2 绿原酸和咖啡酸的回收率 ($n=6$)

加入绿原酸/mg	测得绿原酸/mg	回收率/%	加入咖啡酸/μg	测得咖啡酸/μg	回收率/%
1.00	1.00	100.0	16.0	16.0	100.0
0.80	0.79	98.8	8.0	8.2	102.5
0.96	0.94	97.9	16.0	15.8	98.7
1.20	1.19	99.2	12.0	12.2	101.7
1.60	1.61	100.6	24.0	24.0	100.0
2.00	2.00	100.0	32.0	32.1	102.7

2.11 样品含量测定 取 5 支注射液, 混匀, 精密量取 1.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得供试液。精密吸取 20 μL 进样分析 2 次, 记录色谱图, 以平均峰面积按标准曲线法计算样品中绿原酸与咖啡酸含量。重复实验 2 次, 样品测定结果见表 3。

表 3 样品中绿原酸和咖啡酸含量 ($n=3$)

样品批号	绿原酸/(mg/mL)	咖啡酸/(mg/mL)
080417	1.5	0.13
080717	1.6	0.16
080718	1.3	0.15

3 讨论

3.1 咖啡酸在 323 nm 处有最大吸收, 绿原酸在 327 nm 处有最大吸收。考虑供试品咖啡酸含量较低, 所以选用 323 nm 为检测波长, 此波长下绿原酸吸光度也较大。

3.2 本试验进行了两味药材阴性对照试验, 证实此两味药之间无相互干扰。实验中各样品均用流动相稀释, 消除了溶剂峰干扰。

3.3 考察了水-甲醇-乙腈-冰醋酸、甲醇-磷酸水溶液、甲醇-磷酸盐缓冲液等流动相, 最终确定甲醇-磷酸二氢钠溶液 (pH 值为 3.9) (15:85) 流速: 1.0 mL/min, 分离效果良好, 绿原酸、咖啡酸分别在 11 min、25 min 左右出峰, 保留时间适中, 重复性好, 回收率高, 可用于退热解毒注射液的质量控制。

参考文献:

- [1] 卫生部药品标准中药成方制剂[S]. 第 20 册. 1998:250-251.
- [2] 国家中医药管理局中药情报中心站. 植物药有效成分手册[M]. 北京:人民卫生出版社, 1986:159-161, 209-210.
- [3] 肖培根, 李大鹏, 杨世林. 新编中药志[M]. 第三卷. 北京:化学工业出版社, 2002:363-373.
- [4] 肖培根, 李大鹏. 新编中药志[M]. 第五卷. 北京:化学工业出版社, 2007:988-995.
- [5] 中国药典[S]. 一部. 2005:152-153, 244-245.
- [6] 孙国祥, 刘唯芬, 朱澄云, 等. RP-HPLC 测定射干抗病毒注射液 中绿原酸和咖啡酸含量[J]. 中成药, 2006, 28(7):962-965.
- [7] 李喜凤, 师绘敏, 陈随清, 等. HPLC 同时测定蒲公英中绿原酸和咖啡酸的含量[J]. 中成药, 2008, 30(10):1553-1555.