

3 讨论

3.1 从紫外吸收光谱图中可以看出,枸橼酸钾本身没有吸收峰,与 CuSO_4 络合后,产生紫外吸收,最大吸收波长在 $(238 \pm 0.5) \text{ nm}$ 处,可用于含量测定。

3.2 通过实验,枸橼酸钾和铜离子的络合比为 1:1,为保证络合完全,我们加入过量铜离子,本实验加入硫酸铜的量为 1.5 mL,保证枸橼酸钾和铜离子的比例 $>1:1.25$ 。

3.3 该方法与《中国医院制剂规范》的方法比较无显著性差异,而且比色法简便、稳定、快速、重复性好,可用于控制本制剂的内在质量。

参考文献

- [1] 夏曙辉,费建红,刘铮,等.枸橼酸盐合剂含量测定方法的改进[J].中国医院药学杂志,2001,21(5):281-282
- [2] 中华人民共和国卫生部药政局.中国医院制剂规范[M].北京:中国医药科技出版社,1996:7-7.
- [3] 安登魁.药物分析[M].济南:济南出版社,1992:66
- [4] 席枝侠,作文英,桂保松.浓缩枸橼酸钠透析液中枸橼酸钠的含量测定[J].中国医院药学杂志,2002,22(2):525-526

收稿日期:2005-02-22

高效液相色谱法同时测定蒲公英中咖啡酸和阿魏酸的含量

晏媛,刘世霆,许重远,谭亚非(南方医科大学南方医院药学部,广州 510515)

摘要:目的 建立了 RP-HPLC法对蒲公英中咖啡酸和阿魏酸同时定量,考察不同产地蒲公英中咖啡酸、阿魏酸的含量。方法 利用高效液相色谱法梯度洗脱。色谱条件为:Hypersil BDS C18分析柱($5\mu\text{m}, 4.6\text{mm} \times 250\text{mm}$),柱温 40°C ,流动相为甲酸钠 0.01M 磷酸二氢钾溶液(磷酸调 pH为 3.7)梯度洗脱,流速 $1.0\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 323nm 。结果 咖啡酸、阿魏酸浓度与峰面积呈良好线性关系,线性范围分别是:咖啡酸 $8.192 \sim 81.92\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $r=0.9991$ ($n=6$);阿魏酸 $1.96 \sim 39.2\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $r=0.9992$ ($n=6$);回收率咖啡酸为 $95.3\% \sim 98.2\%$,阿魏酸为 $92.1\% \sim 95.3\%$ ($n=9$)。结论 本方法测定了 9个不同产地或不同批号的蒲公英样品中咖啡酸、阿魏酸的含量,该方法分离度好,快速,简便,重现性好。

关键词:蒲公英;咖啡酸;阿魏酸;高效液相色谱法

中图分类号:R917.799.1 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2006)03-0229-03

Determination of caffeic acid and ferulic acid in Herba Taraxaci by RP-HPLC

YAN Yuan, LIU Shi-ting, XU Zhong-yuan, TAN Ya-fei (Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of caffeic acid and ferulic acid in a traditional Chinese medicine - Herba Taraxaci from different habitats. **METHODS** HPLC analysis was performed on a Hypersil BDS C₁₈ column ($4.6\text{mm} \times 250\text{mm}, 5\mu\text{m}$) with the methanol-potassium dihydrogen phosphate (pH=3.7) as mobile phase in gradient mode, the column temperature was set up 40°C , the flow rate was $1.0\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and the detecting wavelength was at 323nm . **RESULTS** The linear response ranges from 8.192 to $81.92\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of caffeic acid ($r=0.9991$, $n=6$) and from 1.96 to $39.2\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of ferulic acid ($r=0.9992$, $n=6$); the recoveries ($n=9$) of caffeic acid and ferulic acid were $95.3\% \sim 98.2\%$ and $92.1\% \sim 95.3\%$, respectively. **CONCLUSION** All 9 samples from different habitats were determined by HPLC. The method is a practicable method in determination of the caffeic acid and ferulic acid in the Herba Taraxaci.

KEY WORDS: Herba Taraxaci; caffeic acid; ferulic acid; HPLC

蒲公英为菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand - Mass、碱地蒲公英 *T. sinicum* Kitag或同属种植物的干燥全草。我国蒲公英药用资源非常丰富,各地都有分布。蒲公英具清热解毒、消肿散结、利尿通淋的功效。近年来药理实验研究表明蒲公英具广谱抗菌作用,临床用于各种急慢性感染,其化学成分研究分离出的咖啡酸和阿魏酸具有广谱抗菌作用^[1-3]。中国药典 2000版一部采用高效液相色谱法测定中国现代应用药学杂志 2006年 6月第 23卷第 3期

其主要成分咖啡酸的含量,并规定含咖啡酸不得少于 0.02% ^[4]。本实验首次建立了 HPLC同时测定蒲公英中咖啡酸和阿魏酸的含量的方法,可用于蒲公英药材及其中成药制剂的质量控制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Waters公司高效液相色谱仪:Waters515型泵,996二极

Chin JMAP, 2006 June, Vol 23 No 3

· 229 ·

管阵列检测器, Millennium32 工作站, 超纯水器 (Mill-Qplus USA) SK5200LH 型超声波仪 (上海科导超声仪器有限公司, 200W, 59HZ), TGL-16B 离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

咖啡酸对照品 (供含量测定用, 批号: 885-200001) 中国药品生物制品检定所提供。阿魏酸对照品 (供含量测定用, 批号: 0773-9910) 中国药品生物制品检定所提供。蒲公英药材为市售品, 购自广东省药材公司并经鉴定为菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand-Mazz 的干燥全草。甲醇为色谱纯 (天津四友生物医学技术有限公司)、磷酸二氢钾、甲酸、磷酸等均为分析纯。

1.2 色谱条件

色谱柱: Hypersil BDS C_{18} 分析柱 (5 μm , 250 mm \times 4.6 mm), (大连依利特科学仪器有限公司), 流动相 A 为甲醇; 流动相 B 为 0.01 mol \cdot L⁻¹ 的磷酸二氢钾溶液 (1% 磷酸调 pH 为 3.7); 梯度洗脱条件: 流动相 A 从 30% 到 85%, 分析时间为 18 min, 时间为 0, 15, 18 min; A (%) 为 30, 85, 85; 流速: 1 mL \cdot min⁻¹; 检测波长: 323 nm; 柱温: 40 ; 进样量: 10 μL 。

1.3 溶液的制备

1.3.1 咖啡酸对照品溶液的制备 精密称取咖啡酸对照品 2 mg 于 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至 25 mL, 然后精密量取 1, 2, 3, 4, 5 mL 分别置 10 mL 量瓶中, 得 8, 16, 24, 32, 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液, 用 0.45 μm 的脂溶性滤膜过滤, 续滤液至样品小瓶中备用。

1.3.2 阿魏酸对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸对照品 2 mg 于 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至 50 mL, 然后精密量取 0.5, 1, 2, 4, 5 mL 分别置 10 mL 量瓶中, 得 2, 4, 8, 16, 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液, 用 0.45 μm 的脂溶性滤膜过滤, 续滤液至样品小瓶中备用。

1.3.3 蒲公英样品溶液的制备 蒲公英样品 60 干燥后粉碎成细粉, 过 100 目筛。精密称取生药粉末 1 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 5% 甲酸的甲醇溶液 10 mL, 密塞, 摇匀, 称定重量, 超声提取 30 min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用 5% 甲酸的甲醇溶液补足减失的重量, 摇匀, 离心, 取上清液, 用 0.45 μm 的脂溶性滤膜过滤, 续滤液至样品小瓶中备用。

2 结果

2.1 流动相及洗脱方式的考察优化

分别用乙腈、甲醇与 pH 为 3.2, 3.7, 4.2 的磷酸二氢钾溶液组合成不同流动相体系进行洗脱, 结果发现甲醇-磷酸二氢钾 (pH=3.7) 体系得到的色谱峰形较好, 且较稳定。以梯度洗脱法在 18 min 内可使全部色谱峰流出, 且咖啡酸和阿魏酸能得到较好的基线分离。理论塔板数以咖啡酸计算为 13071, 以阿魏酸计算为 5512, 见图 1。

2.2 线性关系考察

分别精密吸取浓度为 8, 16, 24, 32, 40, 80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的咖啡酸对照品溶液 10 μL , 按上述色谱条件分别进样, 以咖啡酸浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程: $Y = 53.737.3X - 36.730.4$ $r = 0.9991$ 在 8.192 ~ 81.92 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈线性关系 ($n=6$)。分别精密吸取浓度为 2, 4,

8, 16, 20, 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的阿魏酸对照品溶液 10 μL , 按上述色谱条件分别进样, 以阿魏酸浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程: $Y = 51.874.3X - 2.647.27$, $r = 0.9992$ 在 1.96 ~ 39.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈线性关系 ($n=6$)。

2.3 精密度试验

分别精密吸取 32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}$ 的咖啡酸、8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}$ 的阿魏酸对照品溶液 10 μL , 在上述色谱条件下, 重复进样 5 次, 分别计算咖啡酸、阿魏酸的峰面积, 咖啡酸 RSD 为 1.2%; 阿魏酸 RSD 为 1.3%。

2.4 重复性考察

精密称取同一蒲公英粉末样品 5 份, 每份 1 g, 照样品溶液制备方法进行提取处理后, 精密吸取 10 μL 在上述色谱条件下进样分析, 计算峰面积考察方法的重复性, 咖啡酸的 RSD 为 1.8%, 阿魏酸为 RSD = 1.6%, 结果说明使用该法处理样品重现性良好。

2.5 稳定性实验

蒲公英样品溶液制备后, 分别在 0, 2, 4, 8, 24 h 测定咖啡酸、阿魏酸的峰面积, 结果表明咖啡酸、阿魏酸在 24 h 内稳定性良好, RSD 分别为 2.8%, 2.3%。

2.6 加样回收率试验

分别精密吸取一定量的对照品溶液, 挥干溶剂后, 依次加入精密称取的已测知含量的甘肃产蒲公英 9 份, 各 1 g, 3 份为 1 组, 按样品溶液制备项下处理, 在上述色谱条件下进样分析, 回收率结果见表 1。

表 1 回收率实验结果 ($n=3$)

组分	加入量 (μg)	测得量 (μg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
咖啡酸	102.4	99.9	97.6	3.5
	204.8	195.1	95.3	2.1
	307.2	301.7	98.2	2.8
阿魏酸	98.0	90.3	92.1	2.7
	196.0	186.8	95.3	3.1
	294.0	278.7	94.8	1.8

2.7 样品测定

收集不同产地、不同批号的蒲公英药材 9 批, 按样品溶液制备项下处理后, 在上述色谱条件下进样分析, 用外标法计算蒲公英药材中咖啡酸、阿魏酸的含量, 结果见表 2, 色谱图见图 1。

表 2 样品测定结果 (%)

编号	产地	咖啡酸含量 (mg/g)	阿魏酸含量 (mg/g)
1	甘肃 ()	0.392	0.0731
2	甘肃 ()	0.259	0.0542
3	甘肃 ()	0.310	0.0318
4	广州	0.268	0.0254
5	内蒙古	0.352	0.0915
6	河北	0.205	0.0307
7	哈尔滨	0.302	0.0546
8	湖南	0.224	0.0433
9	成都	0.186	0.0350

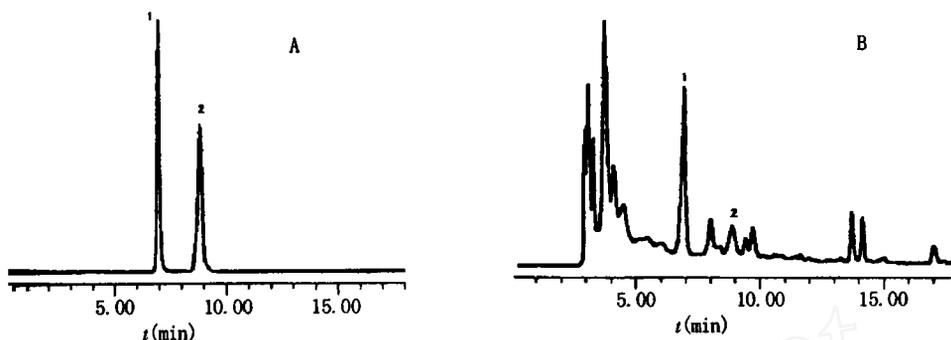


图 1 对照品 (A)、蒲公英药材 (B) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substance (A) and Herba Taraxaci (B)

1. 咖啡酸 (caffeic acid); 2. 阿魏酸 (ferulic acid)

3 讨论

3.1 实验通过对蒲公英药材甲醇超声提取, 甲醇索氏提取, 乙醇渗漉提取浓缩后用不同有机相萃取等提取方法进行优选后, 选用了简便、快速、得率较高的甲醇超声提取方法。

3.2 中国药典规定: 蒲公英中咖啡酸含量不得少于 0.02%。本实验中 9 个不同产地或不同批号的蒲公英药材相比, 因蒲公英药材的来源、产地不同, 其所含咖啡酸的含量也有很大差异, 就同一产地而言, 批号不同的蒲公英, 其咖啡酸及阿魏酸的含量也有明显不同, 这可能与药材采挖时间等有关。

3.3 有文献^[3]报道: 通过测定蒲公英中咖啡酸和绿原酸的含量来控制中药蒲公英的质量, 我们在研究过程中没发现绿原酸的峰, 质谱分析中没有绿原酸的离子峰, 也没发现阿魏酸的离子峰, 但液质联用时中没发现绿原酸的离子峰, 却发现阿魏酸的离子峰, 便采用分离酚酸类化合物的流动相^[5]对蒲公英药材进行色谱分离, 获得较好的分离效果。参照中国药典的方法只能获得咖啡酸的色谱峰, 无法区分阿魏酸。本实验首次采用了咖啡酸和阿魏酸 2 种对照品, 对蒲公英进行质量标准的考察, 这对蒲公英的质量控制具有重要意义。

3.4 在选择流动相时, 用乙腈-磷酸盐做流动相, 样品分离度不好; 换甲醇-磷酸盐为流动相后, 咖啡酸和阿魏酸的分离度好, 峰形较好。缓冲液 pH 选择: 本实验比较 pH 为 3.2, 3.7, 4.2 的磷酸二氢钾溶液, 结果发现, pH = 3.7 时, 基线平稳, 峰形尖锐、对称并达到基线分离。虽然咖啡酸和阿魏酸均在 10min 内出峰, 但等度洗脱没找到合适的浓度比将两者分离并使后面的峰尽快流出, 最终选择梯度洗脱。

参考文献

- [1] 赵守训, 杭秉倩. 蒲公英的化学成分和药理作用 [J]. 中国野生植物资源, 2001; 20 (3): 1.
- [2] 凌云, 鲍燕燕, 张永林, 等. 兴安蒲公英的化学成分研究 [J]. 中草药, 2000; 31 (1): 10.
- [3] 凌云, 范国强, 肖榭, 等. 中药蒲公英的质量标准研究 [J]. 中草药, 1999; 30 (12): 897.
- [4] 中国药典 2000 年版一部 [S]. 2000: 289.
- [5] Li Z, Wang L, Yang G, *et al*. Study on the determination of polyphenols in tobacco by HPLC Coupled with ESI-MS after solid phase extraction [J]. J Chromatogr Sci, 2003, 41 (1): 36.

收稿日期: 2005-05-25

金翘感冒口服液的质量标准研究

王芳¹, 申屠少婷² (1. 广东省江门市中心医院药剂科, 广东 江门 529030; 2. 浙江大学医学院附属妇产科医院, 杭州 310006)

摘要: 目的 研究金翘感冒口服液的质量标准。方法 对金翘感冒口服液中主要药物金银花、连翘、甘草进行薄层色谱鉴别; 采用 RP-HPLC 法测定绿原酸的含量。结果 薄层色谱检出绿原酸、连翘药材、甘草次酸特征斑点, 绿原酸进样量在 0.224 ~ 1.120 μg 线性关系良好, 平均加样回收率 99.81%, RSD 为 0.89%。结论 方法简便易行, 灵敏, 结果准确, 重现性好, 可有效控制金翘感冒口服液的质量。

关键词: 金银花; 连翘; 甘草; 绿原酸; 高效液相色谱法

中图分类号: R926.23 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693 (2006) 03-0231-04

Study on quality standard of Jinqiao Ganmao Koufuye

作者简介: 王芳 (1981 -), 女, 副主任药师