·研究简报·

文章编号: 1008-9926(2004)05-0373-02 中图分类号: R927.2 文献标识码: A

HPLC法测定咽炎合剂中绿原酸的含量

盛 杰①, 邱建国, 古丽萍, 杨 煊, 罗 玫, 王 杰
(中国人民解放军兰州军区总医院, 安宁临床部 甘肃 兰州 730070)

摘 要: 目的 建立一种测定咽炎合剂中绿原酸含量的高效液相色谱分析方法, 以控制制剂质量。方法 Waters高效液相色谱仪 C_{18}分析柱; 流动相: 甲醇-5%冰乙酸(4∶1); 流速: 0.7ml/min; 检测波长: 327nm。结果 绿原酸在38.0~304.0μg·ml^{-1}范围内有良好的线性关系。回归方程: Y=181 613.57X+48 236.29(r=0.999 9)平均加样回收率为98.02%, RSD=0.21%(n=5)。低、中、高三种浓度日内日间变异均小于1%。结论 本方法简便、灵敏、准确、快速、重复性好。可用于本制剂的质量控制。

关键词: 绿原酸; 高效液相色谱法; 咽炎合剂

Determination of the content of chlorogenic acid in Yanyan mixture by HPLC

SHENG Jie, QIU Jiar-Guo, GU Li-Ping, YANG Xuan, LUO Mei, WANG Jie
(Clinical Dept in Anning Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730070, Gansu China)

ABSTRACT: Aim To establish an HPLC method for determination of the content of chlorogenic acid in Yanyan mixture so as to control the quality of this perparation. **Methods** The colum was C_{18}. The mobile phase was methanol - 5% acetic acid (4∶1). The flow rate was 0.7ml/min. The detection wavelength was at 327nm. **Results** There was a good linear relationship in range of chlorogenic acid 38.0~304.0μg·ml^{-1}. The linear regression equation: Y=181 613.57X+48 236.29(r=0.999 9). The average recovery was 98.02% with RSD=0.21% (n=5). The intra-day and inter-day RSD were less than 1%. **Conclusion** This method is simple, sensitive, accurate, rapid, repeatable and could be used for quality control of this preparation.

KEY WORDS: Chlorogenic acid; Yanyan mixture; HPLC

咽炎合剂是由金银花、桔梗、板蓝根等十二味中药组成, 在我院临床应用多年, 具有扶正滋阴、清热化痰、利咽开音等功效。用于治疗急慢性咽喉炎、扁桃体炎、阴虚发热、久咳咽干、音哑等症。绿原酸是本制剂主药金银花的主要活性成分, 拟订绿原酸的含量测定指标, 可反应和控制本制剂的内在质量。

1 仪器与试药

高效液相色谱仪 C_{18}柱(3.9mm×100mm); 含510型泵; 481型紫外检测器; U_{6K}-030433型进样器; 740型数据处理仪(美国Waters公司); SK3300Lh型超声清洗机(上海科导超声仪器有限公司); TG-328电光分析天平(上海天平三厂); 电动离心机(天津市医疗器械三厂)。绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号0773-9910); 咽炎合剂(本院制剂室, 批号参见表2); 甲醇为色谱纯; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 绿原酸对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品适量, 用5%冰乙酸-70%乙醇混合液(以下简称混合溶媒)溶解并定容于50ml棕色容量瓶中, 制成每毫升含绿原酸400μg的对照品溶液。精密称取对照品溶液适量, 加混合溶媒稀释至38.0~304.0μg·ml^{-1}7个标准对照溶液备用。

2.2 阴性对照品溶液的制备 按处方去除金银花和桑叶的条件下, 按处方工艺制成合剂, 再按样品溶液的制备方法制成阴性对照品溶液。

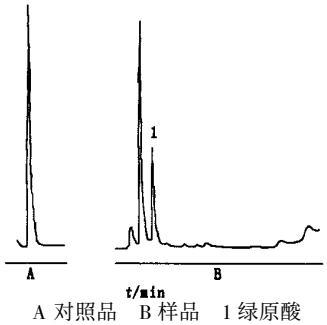
2.3 样品溶液的制备 精密量取本品5.0ml, 用5%碳酸钠溶液调至中性, 离心沉淀15min, 取上清液, 沉淀用水洗涤、离心沉淀二次, 合并三次上清液,

① 作者简介: 盛 杰(1962-), 男, 河南商丘人, 理学硕士, 主任药师。研究方向: 药物分析。Tel: (0931) 7712255; E-mail: LKYYSJ@163.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用稀盐酸调节 pH 值至 1~ 2, 用乙酸乙酯 15ml 分三次萃取, 合并乙酸乙酯液, 水浴蒸干, 残渣用混合溶媒溶解并定容至 50ml, 摇匀滤过。滤液作为供试品溶液。

2.4 色谱条件 色谱柱: C_{18} 分析柱(ø 3.9mm × 100nm 美国 Waters 公司); 检测灵敏度: 0.02AUF; 检测波长: 327nm; 流动相[3]: 甲醇- 5% 冰乙酸(4: 1) (pH= 3.2); 流速: 0.7ml/min; 柱温: 室温; 进样量: 5μl。所有进样溶液均经 0.45μm 的滤膜滤过, 超声脱气。绿原酸保留时间为 3min 左右。分离度(R) > 1.5, 理论塔板数(n) 以绿原酸峰计算不低于 4 000。在此条件下绘制绿原酸对照品和样品液相色谱图, 结果见图 1。样品色谱与对照品色谱图一致, 阴性对照无干扰。



A 对照品 B 样品 1 绿原酸

图 1 绿原酸的高效液相色谱图

Fig 1 Chromatogram of Chlorogenic acid by HPLC

2.5 标准曲线的制作 分别精密吸取对照品溶液 38、76、114、190、228、266、304μg·ml^{-1}进样, 按色谱条件测定各浓度的峰面积。以峰面积为纵坐标、绿原酸浓度为横坐标绘制标准曲线, 结果在 38.0μg~ 304.0μg·ml^{-1}范围内有良好的线性关系, 回归方程为:

$$Y= 181\ 613.57X+ 48\ 236.29,\ r = 0.999\ 9$$

2.6 精密度试验 精密吸取绿原酸对照品溶液(浓度 190μg·ml^{-1}) 5μl 在上述色谱条件下, 重复进样 5 次, 测定峰面积, 结果 *RSD* 为 1.55%, 说明精密度较好。

2.7 重复性试验 取同一批号样品(批号 030123) 5 份, 按供试品溶液制备方法制备, 测定其含量, 重复测定 5 次, 测得绿原酸的平均含量为 485.30μg·ml^{-1}, 结果 *RSD* 为 1.68% (n = 5), 说明重复性较好。

2.8 加样回收率试验 精密量取已知含量的同一批样品(批号 030123), 精密加入绿原酸对照品溶液适量, 按标准溶液对照法测定。结果见表 1。

2.9 稳定性试验 取 2.5 项下低、中、高三种浓度对照品溶液分别于 3h、6h、8h、4d、8d 进样, 样品溶液(批号 030123) 在 8h 进样, 对照品溶液在 8h、4d、8d 的 *RSD* 分别为 0.40%, 0.47%, 0.51%, 样品溶液在 8h 的 *RSD* 为 0.38%。结果表明在对照品溶液及样品溶液稳定性较好。

表 1 咽炎合剂加样回收率试验($\bar{x} \pm s$, n = 5)

Tab 1 Recovery of chlorogenic acid($\bar{x} \pm s$, n = 5)

绿原酸加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	*RSD* (%)
45.60	44.77	98.18		
53.20	52.24	98.20		
60.80	59.46	97.80	98.02	0.21
68.40	67.10	98.10		
96.00	93.87	97.78		

2.10 样品含量测定 取 5 批样品, 按标准溶液对照法测定。结果见表 2。

表 2 咽炎合剂样品中绿原酸含量测定结果

Tab 2 Contents of chlorogenic acid in Yanyan mixture

批 号	平均含量(μg·ml^{-1})
011211	486.00
011220	485.10
020216	485.38
021214	490.62
030123	485.30

3 讨论

3.1 文献报道绿原酸在 327、320、280nm 波长处均有最大吸收峰, 样品经处理后在 327nm 波长处分离较好, 故选此波长为测定波长。

3.2 不同 pH 值的流动相, 在相同波长处的出峰时间、分离度、峰形均不同, 试验结果表明: pH 值在 3.2 左右出峰时间最短, 分离度最大, 峰形最好。

3.3 绿原酸性质不稳定, 作者分别比较了 50% 甲醇、70% 乙醇混合液、5% 冰乙酸- 70% 乙醇三种溶媒及在避光、冷藏、避光+ 冷藏三种贮存条件, 结果表明: 5% 冰乙酸- 70% 乙醇混合液的对照品溶液避光放置, 在 8d 内稳定, 无分解峰出现。

参考文献:

[1] 赵国玲, 刘佳佳, 林 丹, 等. 金银花化学成分及药理研究进展[J]. 中成药, 2002, 24(12): 973

[2] 孙 莲, 张丽静, 孟 磊, 等. RP- HPLC 法测定桑叶中绿原酸含量[J]. 中草药, 2003, 34(5): 78

[3] 汤明辉, 黎秀盛, 杨 生, 等. HPLC 法测定复方双花喷雾泡腾片中绿原酸含量[J]. 中草药, 2002, 33(12): 1089

(收稿日期: 2003- 08- 25; 修回日期: 2004- 05- 20)

(本文编辑 王绪明)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net