

HPLC法同时测定复方北豆根氨酚那敏片中绿原酸、咖啡酸和蒙花苷的含量

赵佳丽*, 周燕, 徐宏祥(嘉兴市食品药品检验所, 浙江嘉兴 314001)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)03-0416-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.03.42

摘要 目的:建立同时测定复方北豆根氨酚那敏片中绿原酸、咖啡酸和蒙花苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C₁₈,流动相为乙腈-0.5%磷酸溶液(梯度洗脱),检测波长为326 nm,柱温为25℃,流速为1.0 ml/min,进样量为10 μl。结果:绿原酸、咖啡酸和蒙花苷的质量浓度分别在3.17~79.20、0.10~2.57、0.60~15.05 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系($r=0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$ 、 $0.999\ 7$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD≤1.59%;绿原酸、咖啡酸和蒙花苷的平均加样回收率分别为98.89%、97.78%、98.70%,RSD分别为0.7%、1.3%、0.3%($n=6$)。结论:该方法简便、快速,结果准确、可靠,可用于复方北豆根氨酚那敏片的质量控制。

关键词 复方北豆根氨酚那敏片;绿原酸;咖啡酸;蒙花苷;高效液相色谱法

Simultaneous Content Determination of Chlorogenic Acid, Caffeic Acid and Linarin in Compound Paracetamol Tablets by HPLC

ZHAO Jia-li, ZHOU Yan, XU Hong-xiang (Jiaxing Institute for Food and Drug Control, Zhejiang Jiaxing 314001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of chlorogenic acid, caffeic acid and linarin in Compound paracetamol tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.5% phosphoric acid (gradient elution) at flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 326 nm, and column temperature was 25 °C. The sample size was 10 μl. RESULTS: The linear range were 3.17-79.20 μg/ml of chlorogenic acid ($r=0.999\ 9$), 0.10-2.57 μg/ml for caffeic acid ($r=0.999\ 9$) and 0.60-15.05 μg/ml for linarin ($r=0.999\ 9$). RSDs of precision, stability and repeatability tests were ≤1.59%. The average recoveries were 98.89% (RSD=0.7%, $n=6$), 97.78% (RSD=1.3%, $n=6$) and 98.70% (RSD=0.3%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid, accurate and reliable, and can provide reference for quality control of Compound paracetamol tablets.

KEYWORDS Compound paracetamol tablets; Chlorogenic acid; Caffeic acid; Linarin; HPLC

复方北豆根氨酚那敏片是由金银花、野菊花、北豆根提取物,与对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏及辅料制成的中成药,为解热镇痛药,临床一般用于治疗流行性感、上呼吸道感染等症。原质量标准收载于《化学药品地方标准上升国家标准》(第四册)^[1],但其“含量测定”项下只对对乙酰氨基酚和咖啡因的含量设定了标准,而未对绿原酸、咖啡酸和蒙花苷的含量作控制要求。处方中,金银花 *Lonicerae Japonicae* flos 的功效为清热解毒、疏散风热,其主要药效成分为绿原酸^[2-6];野菊花 *Chrysanthemi Indici* flos 的功效为清热解毒、泻火平肝,其药效成分为蒙花苷和绿原酸^[2-5]。绿原酸为单咖啡酸奎尼酸类成分,具有显著的抗微生物、保护肝细胞以及抑制血小板聚集的作用^[7];咖啡酸具有较广泛的抗菌作用,具有止血、镇咳、祛痰等功;蒙花苷为黄酮类成分,具有明显的保肝利胆和止咳平喘作用。此2味中药与北豆根和方中其余化学药一起,可起到协同作用,增强解热镇痛的疗效。笔者查阅了相关资料,有不少研究者采用高效液相色谱(HPLC)法分别测定不同中成药

中绿原酸、咖啡酸和蒙花苷的含量,取得了一定的进展^[3-10];但以绿原酸、咖啡酸和蒙花苷为指标对复方北豆根氨酚那敏片中金银花和野菊花进行含量测定的报道在国内还未曾发现。由于不同产地的野菊花中绿原酸、咖啡酸和蒙花苷含量存在显著差异,为了提高其质量控制标准,笔者参考有关文献^[3-10],采用HPLC法同时测定复方北豆根氨酚那敏片中绿原酸、咖啡酸和蒙花苷的含量,以为复方北豆根氨酚那敏片质量标准的提高提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1200型HPLC仪,配有二极管阵列检测器(美国安捷伦公司);DS-5510 DT型超声波清洗器(上海生析超声仪器有限公司);BP211D型电子天平(德国赛多利斯公司);MilliQ-H-1416型密理博超纯水器(美国密理博公司)。

1.2 药品与试剂

复方北豆根氨酚那敏片(江西南大博仕制药有限公司,批号:1304012、1306005、1402005);绿原酸对照品(批号:110753-

* 主管药师。研究方向:药品检验。电话:0573-83388073。E-mail:627113375@qq.com

200413)、咖啡酸对照品(批号:110885-200102)、蒙花苷对照品(批号:1528-200001)均由中国食品药品检定研究院提供;甲醇为色谱醇,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.5%磷酸溶液(B),采用梯度洗脱,梯度洗脱程序见表1;流速:1.0 ml/min;检测波长:326 nm;柱温:25 ℃;进样量:10 μl。色谱见图1。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution condition

时间,min	流动相A,%	流动相B,%
0	14	86
8	30	70
17	14	86
20	14	86

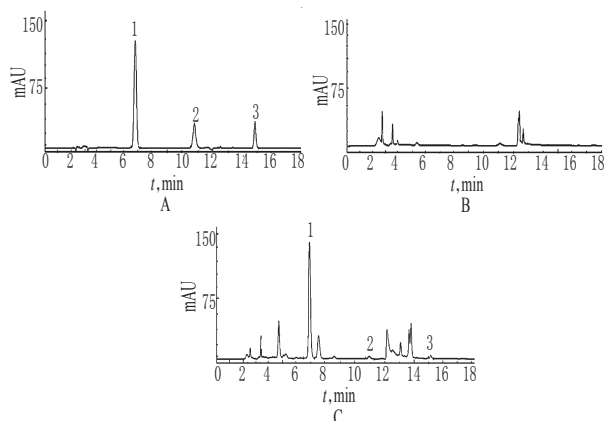


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.阴性对照;C.供试品;1.绿原酸;2.咖啡酸;3.蒙花苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A.substance control; B. negative control; C. test sample; 1. chlorogenic acid; 2. caffeic acid; 3. linarin

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取经五氧化二磷减压干燥12 h的绿原酸、咖啡酸和蒙花苷对照品各适量,加70%甲醇溶解,制成每1 ml含绿原酸30 μg、咖啡酸1 μg、蒙花苷6 μg的混合对照品溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液 取复方北斗根氨酚那敏片20片,精密称定(平均片重为0.4923 g),研细,取约0.5 g,精密称定,置于25 ml棕色量瓶中,加70%甲醇适量,超声(功率:200 W,频率:50 kHz)处理50 min,放冷,加70%甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 取按处方比例及工艺制备的缺金银花和野菊花的阴性样品各适量,按“2.2.2”项下质量浓度方法制备阴性对照溶液,即得。

2.3 线性关系考察

取绿原酸、咖啡酸、蒙花苷对照品溶液各1、5、10、20、25 μl,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,绘制标准曲

线,得绿原酸的回归方程为 $y=28.66x+0.0090$ ($r=0.9999$),咖啡酸的回归方程为 $y=51.87x+0.0002$ ($r=0.9999$),蒙花苷的回归方程为 $y=4.60x+0.1611$ ($r=0.9997$)。结果表明,绿原酸、咖啡酸、蒙花苷对照品的质量浓度分别在3.17~79.70、0.10~2.57、0.60~15.05 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系。

2.4 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液10 μl,按“2.1”项下色谱条件重复进样5次,记录峰面积。结果,绿原酸、咖啡酸、蒙花苷峰面积的RSD分别为1.12%、0.95%、0.97%,表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液各适量,分别于制备后0、2、4、6、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸、咖啡酸、蒙花苷峰面积的RSD分别为0.63%、0.81%、0.30%,表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.6 重复性试验

取同一批样品(批号:1304012)各适量,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量。结果,绿原酸、咖啡酸、蒙花苷的含量分别为2.48、19.00、0.88 mg/片,峰面积的RSD分别为1.26%、1.32%、1.59%,表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取已知含量的复方北斗根氨酚那敏片(批号:1304012)适量,研细,取约0.25 g,精密称定,共6份,分别精密加入绿原酸对照品溶液(质量浓度为30 μg/ml)5 ml、咖啡酸对照品溶液(质量浓度为1 μg/ml)3 ml和蒙花苷对照品溶液(质量浓度为6 μg/ml)5 ml,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率,结果见表2。

2.8 样品含量测定

精密称取3批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,重复3次,计算样品含量,结果见表3。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

采用紫外-可见分光光度法对绿原酸、咖啡酸和蒙花苷对照品溶液在200~400 nm波长范围进行扫描测定。结果显示,绿原酸、咖啡酸和蒙花苷分别在327、323、334 nm波长处附近有最大吸收峰,绿原酸、咖啡酸和蒙花苷在326 nm波长处都有比较好的吸收,因此选择326 nm作为本研究的检测波长。

3.2 溶剂的选择

笔者曾分别尝试甲醇、50%甲醇溶液、70%甲醇溶液和流动相溶液作为提取溶剂,结果发现,用70%甲醇溶液的提取效率均高于其余3种溶剂。

3.3 提取方法的选择

笔者分别考察了不同提取方法(超声、加热回流)、提取时

表2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	称样量, g	已知含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
绿原酸	0.250 8	1 263.42	150	1 412.10	99.12	98.89	0.7
	0.251 1	1 264.94	150	1 412.51	98.38		
	0.252 0	1 269.47	150	1 419.02	99.70		
	0.250 9	1 263.93	150	1 412.00	98.71		
	0.251 4	1 266.45	150	1 415.78	99.55		
	0.251 9	1 268.97	150	1 415.80	97.89		
咖啡酸	0.250 8	9.68	3	12.55	95.67	97.78	1.3
	0.251 1	9.69	3	12.63	98.00		
	0.252 0	9.73	3	12.65	97.33		
	0.250 9	9.68	3	12.61	97.67		
	0.251 4	9.70	3	12.67	99.00		
	0.251 9	9.72	3	12.69	99.00		
蒙花苷	0.250 8	448.31	30	477.88	98.57	98.70	0.3
	0.251 1	448.85	30	478.44	98.63		
	0.252 0	450.46	30	479.94	98.27		
	0.250 9	448.49	30	478.22	99.10		
	0.251 4	449.38	30	479.11	99.10		
	0.251 9	450.28	30	479.84	98.53		

表3 样品含量测定结果(n=3, mg/片)

Tab 3 Results of content determination of samples(n=3, mg/table)

待测成分	批号		
	1304012	1306005	1402005
绿原酸	2.48	2.32	2.25
咖啡酸	19.00	15.80	16.25
蒙花苷	0.88	0.68	0.75

间(20、30、50、60 min)的提取效果。结果显示超声50 min时3种成分的提取比较完全,故本研究最终选择超声50 min作为提取方法。另考虑到绿原酸易分解的特点,本研究均采用避光操作。

3.4 流动相的考察

本研究选择乙腈-0.5%磷酸溶液作为流动相进行梯度洗脱。流动相比例为14:86(V/V)时,绿原酸在7 min左右出峰;保留时间8 min后,改流动相比例为30:70(V/V),兼顾了绿原

酸出峰快和蒙花苷出峰慢的问题,缩短了检测周期。在该流动相下,检测出绿原酸、咖啡酸和蒙花苷3种成分只需要20 min;制剂中3个主峰均与其他杂质峰能够达到完全分离;色谱图基线平稳,分离度、拖尾因子等色谱参数都能达到要求。

综上所述,该方法简便、快速,结果准确、可靠,可用于复方北豆根黄酮那敏片的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.国家药品标准:化学药品地方标准上升国家标准:第四册[S].WS-10001-(HD-0352)-2002.
- [2] 国家药典委员会.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、295.
- [3] 陈靖,庞燕军,曹春英,等.高效液相色谱法测定野菊花绿原酸含量[J].医药导报,2009,28(8):1 078.
- [4] 李志浩,李鹏,朱雪松,等.反相高效液相色谱法同时测定神农香菊中绿原酸木犀草苷和蒙花苷的含量[J].医药导报,2010,29(4):527.
- [5] 吴明侠,崔永霞,许闽.不同产地加工方法对野菊花中三种活性成分含量的影响[J].中国医药工业杂志,2014,45(5):428.
- [6] 刘琴,潘文琴.高效液相色谱法测定金银花中绿原酸和木犀草苷的含量[J].中国医院用药评价与分析,2014,14(1):52.
- [7] 王乃东,孙鲁江.复方罗布麻片(II)中蒙花苷的含量测定研究[J].中国实用医药,2012,7(27):252.
- [8] 李小平,张菁华.反相高效液相色谱法同时测定荨麻中绿原酸和咖啡酸[J].中国医药导报,2012,9(31):112.
- [9] 徐海燕,李子鸿,刘东文,等.高效液相色谱法测定薄荷中咖啡酸与蒙花苷的含量[J].中国药物经济学,2014(3):16.
- [10] 张丽云.中药黄金菊汤剂君药的6种抗炎药效组分含量测定[J].北方药学,2014,11(5):8.

(收稿日期:2014-07-08 修回日期:2014-09-24)

(编辑:孙冰)

崔丽副主任出席人民卫生出版社有限公司第一次党员代表大会

本刊讯 2014年12月18日,国家卫生计生委党组成员、副主任、直属机关党委书记崔丽同志出席了中共人民卫生出版社有限公司第一次党员代表大会并讲话。

崔丽同志在讲话中充分肯定了人卫社党委认真学习贯彻党的各项方针政策,按照委党组的决策部署,团结带领人卫社全体党员职工,围绕卫生计生中心工作,解放思想,勇于担当,加快企业发展,坚持业务党建两手抓、两促进,在编写医学教材工作,做好大众健康科普,特别是在做好卫生应急和重大传染病防控等综合出版宣传工作中所发挥的基层党组织战斗堡垒作用和党员的先锋模范作用。对进一步做好人卫社的党建工作,提出了殷切希望:要紧紧围绕委中心任务,切实增强落

实中央重大决策和各项部署的自觉性;全面落实主体责任,充分发挥党委在现代企业中的政治核心作用;以文化建设为依托,切实加强思想组织作风和党风廉政建设;以聚精会神谋发展为根本,加强党委纪委班子建设。

大会审议通过了人卫社党委工作报告、纪委工作报告以及关于党费收缴、使用和管理情况的报告,选举产生了中共人民卫生出版社有限公司第一届委员会、中共人民卫生出版社有限公司第一届纪律检查委员会。

国家卫生计生委直属机关党委相关负责同志参加了会议。