

HPLC法测定鼻康合剂中绿原酸的含量

柯昌毅*, 谢凤英, 谢剑锋, 李 扬(重庆市第三人民医院, 重庆 400014)

中图分类号 R283.66*5; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)15-1409-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.15.21

摘要 目的: 建立测定鼻康合剂中绿原酸含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Hypersil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 10 μm), 流动相为 0.5% 磷酸溶液-甲醇(梯度洗脱), 柱温为 30 ℃, 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 327 nm。结果: 绿原酸的质量浓度在 5.20~62.46 μg/ml 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.9999$); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD<2%; 平均加样回收率为 98.80%, RSD=0.57% ($n=9$)。结论: 该方法简单、准确、重复性好, 可用于鼻康合剂的质量控制。

关键词 鼻康合剂; 高效液相色谱法; 绿原酸; 含量测定

Content Determination of Chlorogenic Acid in Bikang Mixture by HPLC

KE Chang-yi, XIE Feng-ying, XIE Jian-feng, LI Yang (Chongqing Third People's Hospital, Chongqing 400014, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of chlorogenic acid in Bikang mixture. METHODS: HPLC methods was adopted. The determination was performed on Hypersil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 10 μm) column with mobile phase consisted of 0.5% phosphoric acid-methanol (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 30 ℃, and the detective wavelength was 327 nm. RESULTS: The linear range of chlorogenic acid were 5.20-62.46 μg/ml ($r=0.9999$) with an average recovery of 98.80% (RSD=0.57%, $n=9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. CONCLUSIONS: The method is convenient, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Bikang mixture.

KEYWORDS Bikang mixture; HPLC; Chlorogenic acid; Content determination

苍耳子系菊科植物苍耳 *Xanthium sibiricum* Part. 的干燥成熟带总苞的果实^[1-2], 为中医临床常用药, 始载于《神农本草经》, 具有散风除湿、通鼻开窍的功效, 用于治疗风寒头痛、鼻渊流涕、风疹瘙痒和湿痹拘挛等证^[3-5]。我院以苍耳子为主药, 制备成鼻康合剂, 用于治疗急、慢性鼻炎及副鼻窦炎, 效果较好。由于苍耳子的主要活性成分为酚酸类化合物^[6], 其中绿原酸为主要成分^[7], 故本试验建立了以高效液相色谱(HPLC)法测定鼻康合剂中绿原酸含量的方法^[8-9], 旨在为该制剂的质量标准研究以及用药安全提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

1260 型 HPLC 仪, 含四元泵、1260 型化学工作站(美国安捷伦公司); AR224CN 型万分之一电子天平[奥豪斯仪器(上海)有限公司]; UV-2450 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。

1.2 药品与试剂

鼻康合剂(重庆市第三人民医院制剂室, 批号: 20120509、20120510、20120511); 绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110753-200413, 供含量测定用); 甲醇为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为注射用水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[1]与系统适用性试验

色谱柱: Hypersil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 10 μm); 流动相: 0.5% 磷酸溶液(A)-甲醇(B), 梯度洗脱(0~20 min, 80% A→

60% A; >20~50 min, 60% A→50% A; >50~60 min, 50% A→80% A); 检测波长: 327 nm; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 ℃; 进样量: 20 μl。理论板数按绿原酸峰计算应不低于 3 000; 绿原酸与相邻杂质峰的分度度>1.5。色谱见图 1。

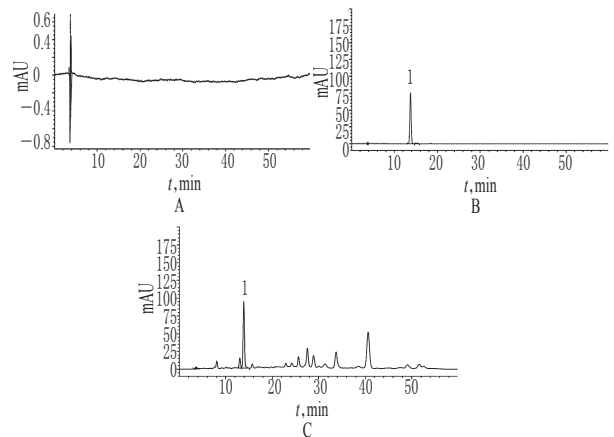


图 1 高效液相色谱图

A. 空白溶剂; B. 绿原酸对照品; C. 供试品; 1. 绿原酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank solvent; B. chlorogenic acid control; C. test sample; 1. chlorogenic acid

2.2 对照品溶液的制备

精密称取绿原酸对照品 10.41 mg, 置 100 ml 量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 即得质量浓度为 104.10 μg/ml 的对照品贮备液, 摇匀, 备用。精密量取对照品贮备液 2 ml, 置 5 ml 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为

* 主任药师。研究方向: 医院药学。电话: 023-63510273。E-mail: 6666666666666666@163.com

41.64 μg/ml的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密量取鼻康合剂(批号:20120509)2 ml,置于25 ml量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察

精密量取绿原酸对照品贮备液0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 ml,分别置于10 ml棕色量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,得质量浓度分别为5.20、10.41、20.82、41.64、62.46 μg/ml的系列对照品溶液。分别取上述溶液按“2.1”项下色谱条件进样分析,进样量为20 μl。以对照品溶液质量浓度(x, μg/ml)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=0.0135x-0.3047$ ($r=0.9999$, $n=5$)。结果表明,绿原酸质量浓度在5.20~62.46 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取绿原酸对照品溶液(41.64 μg/ml)20 μl,注入液相色谱仪,按“2.1”项下色谱条件进样分析,重复进样5次,测定峰面积。结果显示,绿原酸的平均峰面积积分值为1874.4, RSD=0.74%($n=5$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:20120509)适量,室温下放置12 h,分别于0、2、4、6、8、10、12 h按“2.1”项下色谱条件进样分析,测定峰面积。结果显示,绿原酸的平均峰面积积分值为1802.0, RSD=0.16%($n=7$),表明室温条件下供试品溶液在12 h内稳定。

2.7 重复性试验

取鼻康合剂样品(批号:20120509)适量,共6份,精密量取,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样分析,测定峰面积,计算样品含量。结果显示,6份样品中绿原酸的平均质量浓度为0.3030 mg/ml, RSD=1.34%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密量取已测定质量浓度(0.3030 mg/ml)的同一批(批号:20120509)样品9份,各1.0 ml,每3份为一组,分别按低、中、高质量浓度精密加入适量绿原酸对照品贮备液,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样分析,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=9$)

序号	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
1	0.3030	0.1041	0.4052	98.17		
2	0.3030	0.1041	0.4056	98.56		
3	0.3030	0.1041	0.4063	99.23		
4	0.3030	0.5205	0.8182	98.98		
5	0.3030	0.5205	0.8174	98.83	98.80	0.57
6	0.3030	0.5205	0.8137	98.12		
7	0.3030	1.0410	1.3410	99.71		
8	0.3030	1.0410	1.3370	99.33		
9	0.3030	1.0410	1.3260	98.27		

2.9 样品含量测定

分别精密量取3批鼻康合剂各2 ml,按“2.3”项下方法制备供试品溶液。精密量取供试品溶液与对照品溶液各20 μl,注入液相色谱仪,按“2.1”项下色谱条件进样分析,测定峰面积,以峰面积计算样品中绿原酸的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of content determination of samples($n=3$)

批号	绿原酸质量浓度,mg/ml	\bar{x} ,mg/ml
20120509	0.3030	
20120510	0.3120	0.3070
20120511	0.3080	

3 讨论

在检测波长的选择中,取绿原酸对照品10 mg,置50 ml量瓶中,加50%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取5 ml,置100 ml量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得每1 ml含绿原酸10 μg的溶液。照分光光度法^[2]测定,以50%甲醇为空白对照,在波长200~400 nm波长范围内扫描,可得绿原酸在327 nm波长处有较强吸收(吸光度为0.558),故确定检测波长为327 nm。紫外扫描曲线见图2。

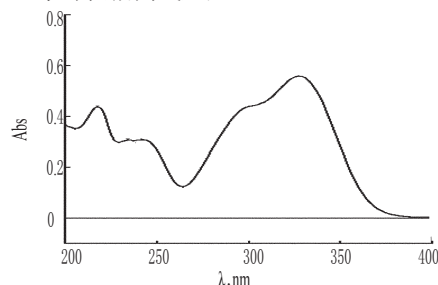


图2 对照品在波长200~400 nm范围内的紫外扫描曲线
Fig 2 Scanning absorption curves of substance control in the wavelength range of 200-400 nm

在流动相的选择中,笔者主要考察了甲醇-磷酸系统和乙腈-磷酸系统对色谱峰的影响。结果表明,甲醇-磷酸系统的分离效果较好,因此选择甲醇-0.5%磷酸溶液为流动相,进行梯度洗脱。

综上所述,本方法简单、准确、重复性好,可用于鼻康合剂的质量控制。

参考文献

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会.中国植物志:第75卷[M].北京:科学出版社,1985:324.
- [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,2010:151、附录30.
- [3] 姜萧,隋进江.浅谈中药苍耳子毒性及中毒的抢救方法[J].黑龙江中医药,2000,20(4):63.
- [4] 李华,张春玲.苍耳子的临床应用概述[J].吉林中医药,1993(3):45.
- [5] 刘玉红,郝震峰.苍耳子化学成分及药理作用研究进展[J].山东医药工业,2003,22(1):22.
- [6] 韩婷,李慧梁,胡园,等.苍耳子中酚酸类化合物及不同品种和居群苍耳子中总酚酸含量的测定[J].中西医结合学报,2006,4(2):194.
- [7] 邱玉玲,代英辉,王东,等.苍耳子的化学成分[J].中国药物化学杂志,2010,20(3):214.
- [8] 明乾良,高翔,张宏,等.用HPLC法测定不同地区三种苍耳子中绿原酸的含量[J].药学服务与研究,2008,8(4):258.
- [9] 杨柳,吴金雄,许舜军,等.苍耳子中酚酸类化合物的鉴别及绿原酸的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(19):85.

(收稿日期:2013-07-30 修回日期:2014-02-11)