

# HPLC法测定骨痛内消丸中绿原酸的含量

杨 斌\*(宜宾市第二人民医院,四川 宜宾 644000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)43-4101-02  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.43.24

**摘要** 目的:建立测定骨痛内消丸中绿原酸含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Eclipse XDB C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.2%磷酸溶液(8:92, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为327 nm,柱温为30 ℃。结果:绿原酸的进样量在0.035 1~0.702 4 μg范围内与峰面积积分值呈良好线性关系( $r=0.999 9$ );精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤1.8%;平均加样回收率为98.37%,RSD=1.93%( $n=9$ )。结论:本方法准确、快速,重复性好,可用于骨痛内消丸的质量控制。

**关键词** 高效液相色谱法;骨痛内消丸;绿原酸;含量测定

## Content Determination of Chlorogenic Acid in Guyong Neixiao Pill by HPLC

YANG Bin(Yibin Second People's Hospital, Sichuan Yibin 644000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of chlorogenic acid in Guyong neixiao pill. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on a Eclipse XDB C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% phosphonic acid(8:92, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 327 nm, and column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear range of chlorogenic acid was 0.035 1-0.702 4 μg( $r=0.999 9$ ). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1.8%. The average recovery of 98.37% (RSD=1.93%,  $n=9$ ). CONCLUSIONS: The method is accurate and rapid with good repeatability. It could be used for the quality control of this preparation.

**KEYWORDS** HPLC; Guyong neixiao pill; Chlorogenic acid; Content determination

骨痛内消丸系四川省宜宾县骨科医院根据传统验方研制的中药丸剂,由防风、当归、紫花地丁、蒲公英、金银花等20味中药组成,具有清热解毒、消肿溃坚、活血止痛的功效,临床主要用于骨髓炎初期、开放性骨折感染、脓肿疮疡或软组织损伤感染等。方中金银花、蒲公英、紫花地丁等药材均含有绿原酸,为该药的有效成分之一<sup>[1-4]</sup>。绿原酸又名咖啡单宁酸,化学名为3-*O*-咖啡酰奎尼酸,是由咖啡酸与奎尼酸组成的羧酸,具有多种生物活性,如心血管保护、抗氧化、抗紫外及抗辐射、抗诱变、抗癌、抗菌、抗病毒、降脂降糖和免疫调节等作用<sup>[5-6]</sup>。本试验采用高效液相色谱(HPLC)法测定骨痛内消丸中总绿原酸的含量,以期为骨痛内消丸的质量控制提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);CP225D型电子天平(德国赛多利斯公司,精度:0.01 mg)。

### 1.2 药品与试剂

骨痛内消丸(宜宾县骨科医院,批号:130215、131217、140321);绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110753-200413);乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent Eclipse XDB C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.2%磷酸溶液(8:92, V/V);流速:1.0 ml/min;检

测波长:327 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。在此色谱条件下,理论板数按绿原峰计不低于5 000;分离度>1.5。色谱见图1。

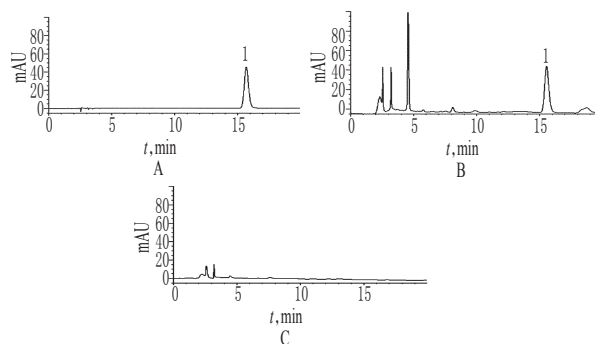


图1 高效液相色谱图

A. 绿原酸对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 绿原酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A. chlorogenic acid control; B. test sample; C. negative control; 1. chlorogenic acid

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取绿原酸对照品8.78 mg,置50 ml量瓶中,加50%甲醇使溶解,并稀释至刻度,摇匀,制得质量浓度为0.175 6 mg/ml的对照品贮备液。精密量取对照品贮备液5 ml,置25 ml量瓶中,加50%甲醇定容,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 精密称取骨痛内消丸粉末1 000 mg,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇20 ml,称定质量,85 ℃水浴回流0.5 h,放冷,再次精密称定,用50%甲醇补足缺失的质量,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按骨痛内消丸的处方和制剂工艺,制

\* 主管药师。研究方向:医院药学。E-mail: liuyan19780127@126.com

备不含金银花、蒲公英、紫花地丁、当归、栀子、黄连、茵花、防风等8味药材的阴性样品,并按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

### 2.3 线性关系考察

分别精密吸取对照品溶液1、2、5、10、15、20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以进样量( $x, \mu\text{g}$ )为横坐标,峰面积积分值( $y$ )为纵坐标,进行线性回归,得绿原酸的回归方程为 $y=3.107 \times 10^3 x - 6.913$  ( $r=0.9999$ )。结果表明,绿原酸的进样量在0.035 1~0.702 4 μg范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系。

### 2.4 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,重复6次,记录色谱图。结果, $RSD=0.3\%$  ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

### 2.5 稳定性试验

取同一批样品(批号:130215)制成的供试品溶液适量,分别于0、2、4、6、8 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,重复5次,记录色谱图。结果, $RSD=1.8\%$  ( $n=5$ ),表明供试品溶液在8 h内稳定。

### 2.6 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:130215)1 000 mg,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果, $RSD=1.2\%$  ( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

### 2.7 加样回收率试验

精密称取已知含量的同一批样品500 mg,共9份,置于具塞锥形瓶中,分别精密加入低、中、高浓度的对照品溶液适量,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,记录色谱图,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 ( $n=9$ )

取样量,mg	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x},\%$	RSD,%
506.5	0.351	0.176	0.525	98.86		
499.5	0.346	0.176	0.523	100.48		
494.9	0.343	0.176	0.520	100.59		
505.4	0.350	0.351	0.692	97.37		
529.1	0.367	0.351	0.698	94.40	98.37	1.93
503.2	0.349	0.351	0.692	97.80		
539.0	0.374	0.527	0.887	97.43		
521.7	0.362	0.527	0.885	99.33		
524.5	0.363	0.527	0.885	99.05		

### 2.8 样品含量测定

取3批骨痛内消丸粉末各1 000 mg,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,每批制备3份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,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	取样量,mg	绿原酸含量,mg/g	平均含量,mg/mg	RSD,%
130215	1 043	0.693		
	1 002	0.693	0.693	0.08
	1 008	0.694		
131217	1 012	0.714		
	1 016	0.715	0.715	0.21
	1 002	0.717		
140321	1 021	0.730		
	998	0.725	0.728	0.35
	1 014	0.728		

## 3 讨论

本试验分别采用了甲醇<sup>[7]</sup>、50%甲醇<sup>[8-9]</sup>、乙醇、50%乙醇<sup>[9]</sup>作为提取溶剂,结果50%甲醇提取的绿原酸含量较高,因此选择50%甲醇作提取溶剂。本试验还对提取方法(超声30 min、回流1 h)进行了考察,结果回流1 h测得的绿原酸含量较高。本试验还考察了回流时间(15、30、45、60、90 min),结果显示不同回流时间所测得绿原酸含量差异无统计学意义,为了确保绿原酸提取完全,本试验最终选择了回流30 min。

综上所述,本方法操作简便、迅速,精密度、重复性好,可用于骨痛内消丸中绿原酸的含量测定。

## 参考文献

- [1] 夏远,李弟灶,裴振昭,等.金银花化学成分的研究进展[J].中国现代中药,2012,14(4):26.
- [2] 李景华,刘玉芹,王黎明.蒲公英属植物研究进展[J].吉林医药学院学报,2011,32(3):160.
- [3] 黄美娥,卓儒洞,晏丽.4种堇菜科植物中绿原酸含量的比较[J].安徽农业科学,2009,37(34):16 851.
- [4] 刘娟,罗家函,刘德江,等.大孔吸附树脂纯化紫花地丁中绿原酸类成分的研究[J].黑龙江医药科学,2011,34(5):26.
- [5] 刘颖,郭明晔,白根本,等.绿原酸的研究进展[J].中药材,2012,35(7):1 180.
- [6] 吴卫华,康桢,欧阳冬生,等.绿原酸的药理学研究进展[J].天然产物研究与开发,2006(18):691.
- [7] 陶君彦,张晓昱,黄志军,等.HPLC法同时测定木瓜中绿原酸、咖啡酸的含量[J].中国药房,2007,18(125):912.
- [8] 张建伟,赵倩,何希荣,等.UPLC测定银黄颗粒中绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素6种成分[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(18):60.
- [9] 符史良,钟杰平,李海霞,等.从金银花中提取绿原酸的工艺研究[J].广东海洋大学学报,2007,27(4):70.

(收稿日期:2014-06-04 修回日期:2014-09-20)

《中国药房》杂志——《剑桥科学文摘》(CSA)收录期刊,欢迎投稿、订阅