

反相高效液相色谱法测定金银花合剂中的绿原酸含量

周静安¹, 蒋忠文¹, 叶夔² (1. 浙江省衢州市药品检验所, 浙江 衢州 324002; 2. 浙医一院, 浙江 杭州 310003)

摘要:目的 建立一种用反相高效液相色谱法测定金银花合剂中绿原酸的含量。方法 以 shim-pack CLC- ODS (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 用甲醇-水-冰醋酸(35:65:0.5) 作流动相, 检测波长为 327 nm, 流速:1.0 mL/min, 柱温:常温, 外标法定量。结果 绿原酸在 15 μg·mL⁻¹ ~ 105 μg·mL⁻¹ 范围内呈现出良好的线性关系, ($r=0.9999$), 方法平均回收率为:100.25%, RSD为 0.48% ($n=4$)。结论 该方法简便、快速, 测定结果准确可靠, 可用于金银花合剂的质量控制。

关键词:金银花合剂; 绿原酸; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R917.01 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2004)06-0511-03

Determination of chlorogenic acid in flos loniceræ mixture by RP- HPLC

ZHOU Jing-an¹, JIANG Zhong-wen¹, YE Yan² (1. Quzhou institute for drug control of Zhejiang province, Quzhou 324002, China; 2. The first Affiliated hospital of Zhejiang Medical University, Hangzhou 310003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish RP- HPLC method for the determination of Chlorogenic Acid in Flos Loniceræ mixture by RP- HPLC. **METHOD** The shim-pack CLC- ODS (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used as analytical column. The mobile phase was methanol- water- acetic acid (35: 65: 0.5). The detection wavelength was 327 nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 20 °C. External standard method was used. **RESULTS** The linear range of Chlorogenic Acid was 15 ~ 105 μg·min⁻¹, ($r=0.9999$), the average recovery was 100.25%, the RSD was 0.48% ($n=5$). **CONCLUSION** The method is simple, rapid and accurate. It is available to the quality control of Flos Loniceræ of mixture.

KEY WORDS: Flos Loniceræ mixture; Chlorogenic Acid; RP- HPLC

金银花合剂是由忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 红腺忍冬 *Lonicera hypoglauca* Miq. 山银花 *Lonicera*

confusa DC.或毛花柱忍冬 *Lonicera dasystyla* Rehd. 的干燥花蕾或带初开的花提取的制剂,具有清热解毒,凉散风热功效,临床上常用于暑热口渴,热毒血痢,小儿痄毒,风热感冒,温病发热。《中国药典》2000年版一部,对药材金银花中绿原酸采用 HPLC 法控制含量^[1]。但在金银花合剂的质量标准中,未见有关含量测定方法。本文采用反相高效液相色谱法测定金银花合剂中绿原酸的含量,经方法学研究,证明本法可行,可用于金银花合剂的质量控制方法。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10 AD 高效液相色谱仪,SPD-10A 紫外检测器,N-2000 型色谱数据工作站(浙江大学智能信息工程研究所),BOLONG USC-302 超声波清洗器(上海波龙电子设备有限公司)。日本岛津 UV-2450 型紫外分光光度计。

甲醇为色谱纯;醋酸乙酯(分析纯);冰醋酸(分析纯);水为重蒸溜水;对照品 绿原酸(批号:0753-9910 供含量测定用中国药品生物制品检定所);金银花合剂(浙江泰康制药有限公司生产 规格:100 ml/瓶 批号:010211,010210,010209,030105)。

2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:shim-pack CLC-ODS (200 mm × 4.6 mm 5 μm);流动相:甲醇-水-冰醋酸^[2](35:65:0.5);检测波长为:327 nm;流速:1.0 mL/min,柱温:常温;进样量:10 μL;面积外标法定量,理论板数按绿原酸峰计算不应低于 2000。

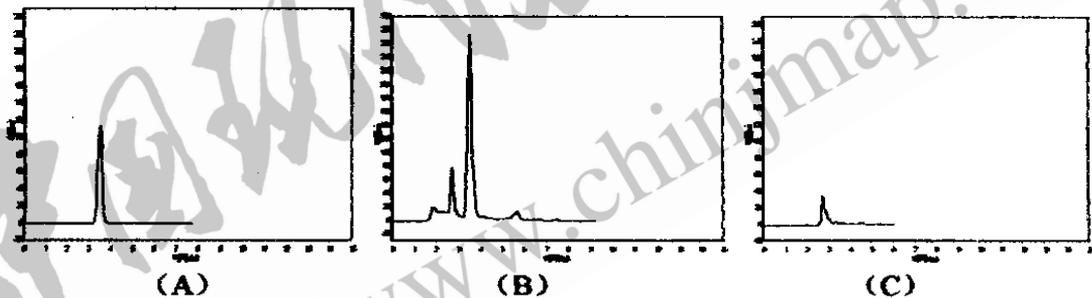


图 1 对照品绿原酸(A)和样品(B)以及阴性空白对照品(C)液相色谱图

Fig 1 HPLC Chromatogram of Chlorogenic acid(A) and test Solution(B)

A. 绿原酸对照品图谱;B. 样品图谱;C. 阴性空白对照品图谱

A. Standard; B. Sample; C. blank

3.3 线性关系的考察

精密称取绿原酸对照品 18.8 mg, 置 50 mL 棕色量瓶中,加 60% 甲醇适量,超声溶解并稀释至刻度,摇匀,分别精密吸取 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中,用 60% 甲醇溶解并稀释至刻度,得绿原酸对照品系列标准浓度溶液,按上述色谱条件,进样 10 μL,测定峰面积,以峰面积积分值(y)为纵坐标,绿原酸量(x)为横坐标绘制标准曲线,计算,得回归方程。结果表明绿原酸的溶液在 15.04 μg·mL⁻¹ ~ 105.28 μg·mL⁻¹ 之间呈良好的线性关系。回归方程: Y = 26875 X - 7168, r = 0.999 9

3.4 精密度试验

精密吸取绿原酸对照品溶液 10 μL,重复进样 5 次,测定绿原酸峰面积积分值和保留时间(t_R),结果峰面积和保留时间(t_R)值基本不变,RSD 值分别为 1.01% 和 0.25%。说明

3 方法与结果

3.1 供试品溶液的制备

3.1.1 样品溶液的制备 精密量取样品 10 mL 置 25 mL 棕色量瓶内,加甲醇稀释至刻度,摇匀,静置 2 h,取适量溶液置 5 mL 离心管中,以 4000 r/min, 5 min,再精密吸取上清液 1 mL 置 10 mL 棕色量瓶内,加 60% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

3.1.2 阴性空白对照溶液的制备 按其质量标准中处方比例制备不含金银花的阴性样品溶液,照上述供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

3.1.3 对照品溶液的制备 精密称取经五氧化二磷真空干燥至恒重的绿原酸对照品 18.8 mg, 置 50 mL 棕色量瓶中,加 60% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取 3 mL 置 25 mL 棕色量瓶中,加 60% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 45.12 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。

3.2 检测波长的选择和空白试验

取上述绿原酸对照品溶液,用日本岛津 UV-2450 紫外分光光度计在波长 200 ~ 400 nm 处扫描,结果绿原酸对照品溶液在 327 nm 波长处有最大吸收。故以 327 nm 为检测波长。取对照品溶液、阴性对照溶液和供试品溶液,在上述色谱条件下测绘 HPLC 图谱,结果见(图 1)。由图谱可知,阴性对照样品在绿原酸出峰时间区域没有干扰峰出现,故对绿原酸的测定无干扰作用。

仪器性能良好。见表 1

表 1 精密度试验结果

Tab 1 The experiment result of the accuracy

进样量(μL)	峰面积(A)	保留时间(t _R)	RSD(%)	
10	407712	3.723	1.01	0.25
10	400105	3.727		
10	401098	3.752		
10	400701	3.747		
10	396489	3.755		
10	396489	3.755		

3.5 重复性试验

取同一批号样品 5 份,按供试品溶液的制备方法,依法操作平行测定 5 次,结果:绿原酸含量基本相同,RSD 为 0.91%。说明方法重复性良好。见表 2

表 2 重复性试验结果

Tab 2 The experimental result of the reproduce

编号	含量(%) (mg / ml)	平均含量(%) (mg / ml)	RSD(%)
1	1.352		
2	1.351		
3	1.331	1.348	0.91
4	1.341		
5	1.365		

3.6 稳定性试验

取同一批号样品溶液,按供试品溶液的制备方法,每间隔 2h 测定一次,连续共测定 5 次,结果表明样品溶液中绿原酸,在 12h 内稳定性良好。RSD 为 1.12%,见表 3

表 3 稳定性试验结果(n = 5)

Tab 3 The experimental result of the stability(n = 5)

时间(h)	进样量(μ l)	平均峰面积(A)	RSD(%)
2	10	1441850	
4	10	1440944	
6	10	1418919	1.12
8	10	1430439	
10	10	1462601	

3.7 回收率试验

采用加样回收法,精密吸取已知含量的样品溶液 9 份,分别添加一定量的绿原酸对照品溶液,混匀,按“样品溶液的制备”项下操作制备供试液,分别制成低、中、高三种不同浓度的溶液。(每一浓度三份)分别进样,测定峰面积,计算结果见表 4。

表 4 回收率测定结果

Tab 4 The experimental results of the recoveries

序号	样品含量 (μ g / ml)	对照品加入量 (μ g / ml)	测得量 (μ g / ml)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
1	27.3	37.6	65.1	100.30		
2	28.2	103.7	130.8	99.17		
3	26.9	155.6	184.8	101.26	100.25	0.48
4	28.7	230.8	255.6	99.96		

3.8 样品的含量测定

精密量取样品 10 mL 置 25 mL 棕色量瓶内,加甲醇稀释至刻度,摇匀,静置 2h,取适量溶液置 5 mL 离心管中,以 4000r / min,5 分钟,再精密吸取上清液 1 mL 置 10 mL 棕色量瓶内,加 60% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。另精密称取经五氧化二磷真空干燥至恒重的绿原酸对照品适量,同 3.1.3 项下操作制备对照品溶液,按上述色谱条件进样 10 μ L,记录绿原酸峰面积,按外标法计算含量。结果见表 5

表 5 样品含量测定结果(n = 4)

Tab 5 The experimental results of the contents in the samples (n = 4)

样品批号	平均含量(%) (mg / ml)	RSD(%)
------	--------------------------	----------

样品批号	平均含量(%) (mg / ml)	RSD(%)
010211	1.36	0.60
010210	1.34	0.75
010209	1.42	1.46
030105	1.41	1.23

4 讨论

4.1 绿原酸为金银花合剂中的主要活性成分,具有抑菌消炎的作用,故应以绿原酸作为控制本产品质量的主要指标依据。本文建立了合剂中绿原酸的反相高效液相色谱测定法。

4.2 提取方法的选择

本实验通过分别采用以下方法进行比较:(1)醋酸乙酯萃取法(2)通过 D101 型大孔树脂柱吸附法;(3)甲醇沉淀杂质法,对同一批号的金银花合剂进行提取、分离,并按含量测定方法测定供试品溶液中绿原酸的含量。见表 6

表 6 提取方法的选择

Tab 6 Selection of extract method

提取、分离方法	绿原酸的含量(%)
(1)醋酸乙酯萃取法	1.23
(2)通过 D101 型大孔树脂柱吸附法	0.82
(3)甲醇沉淀杂质法	1.41

结果以采用直接取样加甲醇沉淀方法,测定样品中绿原酸的含量最高。说明前两种方法对金银花合剂中绿原酸的提取不完全,而导致含量结果偏低。故采用甲醇沉淀杂质法,操作方便,结果更为准确。

4.3 样品中加入甲醇溶液沉淀杂质,静置时间的考察

根据实验取同一批号的样品,加入甲醇摇匀,分别取经静置 1,2,3,4,5,6h 后的供试品液,按含量测定方法分别测定样品中绿原酸的峰面积值,结果在 2h 以后绿原酸峰面积基本变化不大(RSD 为 1.56%)。故选择在样品溶液中加入甲醇沉淀静置时间为 2h。

表 7

Tab 7

静置时间(h)	绿原酸的峰面积	RSD(%)
1	1382795	
2	1441658	
3	1444610	1.56
4	1451876	
5	1446532	
6	1438774	

4.4 绿原酸溶液性质不稳定,遇光易分解,需要避光保存。故在实验过程中对照品溶液以及供试品溶液的制备、提取和分析中应使用棕色量瓶,尽量避光操作。

参考文献

[1] 中国药典[S]一部,2000,177.
[2] 程斌,刘启,邹红,等.高效液相色谱法测定消炎冲剂中绿原酸的含量[J].中国医院药学杂志,1995,15(7):309.

收稿日期:2003-03-10