

反相高效液相色谱法测定野菊花中绿原酸的含量

徐韧柳¹,李丽华²,康怀萍³ (1.河北省药品检验所,河北 石家庄 050011; 2.河北医科大学中医学院,河北 石家庄 050000; 3. 河北科技大学,河北 石家庄 050018)

摘要:目的 建立野菊花中绿原酸的含量测定方法,控制其质量。方法 采用高效液相色谱法,以 Agilent ZORBAX SB-C₁₈柱为色谱柱,乙腈-0.1%磷酸溶液(9:91)为流动相,检测波长为 327nm,流速 1.0mL/min,采用面积外标法计算。结果 绿原酸浓度在 1.02~102.0mg/L 范围内与峰面积呈良好线性关系, $r=0.9998$,平均加样回收率为 99.82% (RSD=1.2%, $n=9$)。结论 本方法简便易行,结果准确,可有效控制生药的质量。

关键词: 高效液相色谱法;野菊花;绿原酸

中图分类号: R917.799.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2005)04-0333-02

Determination of chlorogenic acid in Flos Chrysanthemi Indici by RP-HPLC

XU Ren-liu¹, LI Li-hua², KANG Huai-ping³ (1. Hebei Provincial Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; 3. Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a method for the determination of chlorogenic acid in Flos Chrysanthemi Indici. **METHOD** High performance liquid chromatography (HPLC) method was applied to determine the content. Analysis column of Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (4.6mm × 250mm, 5μm), mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (9:91), detective wavelength at 327nm, flow rate of 1.0mL/min and external standard method were selected in assay. **RESULTS** The method was linear over the range of 1.02~102.0mg/L, $r=0.9998$, the average recovery was 99.82% (RSD=1.2%, $n=9$). **CONCLUSION** This method is proved to be simple and reliable and can be used for the quality control of Flos Chrysanthemi Indici.

KEY WORDS high performance liquid chromatography; Flos Chrysanthemi Indici; chlorogenic acid

野菊花为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序。它具有清热解毒的功效,用于疮痈肿痛,目赤肿痛,头痛眩晕等症^[1]。收载于中国药典 2000 年版一部,现行标准中没有含量测定项。有关野菊花有效成分的含量测定报道较少,为了有效控制药材的质量,建立野菊花中绿原酸的高效液相测定方法。该方法简便易行,结果准确,不仅适用于野菊花药材的质量分析,还可供野菊花单方或复方制剂借鉴。

1 实验方法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪:日本岛津 LC-10ADVP 泵;SPD-M10AVP 二极管阵列检测器;CLASS-VP/LC 色谱工作站。美国 7725 手动进样器。

绿原酸对照品购自中国药品生物制品检定所(供含量测定用),野菊花为河北以岭医药研究院有限公司和河北华加药业有限公司提供,乙腈为色谱纯,磷酸为优级纯,其他试剂为分析纯。

1.2 色谱条件

色谱柱:USA Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(规格 4.6mm × 150mm, 5μm)。柱温:室温。流速:1.0mL/min。流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(体积比为 9:91)。检测波长 327nm。进样量 20μL。理论板数按绿原酸峰计算不低于 4000。

1.3 样品测定方法

对照品溶液的制备 精密称取干燥的绿原酸对照品约 10mg,置 50mL 棕色量瓶中,用甲醇溶液并稀释至刻度,摇

作者简介:徐韧柳(1962-),女,河北省人,主任药师。主要研究方向:中药制剂工艺与质量标准研究。电话:(0311) 85212008-8045

匀,精密量取 5 mL,置 100 mL 棕色量瓶中,加体积分数为 50%甲醇至刻度,摇匀,即得(每 1 mL 中含绿原酸 10 μg,10℃以下保存)。

供试品溶液的制备 取本品粉末(过 3 号筛)约 0.4 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入体积分数为 70%甲醇 20 mL,密塞,称定重量,超声处理 30 min,放冷,再称定重量,用体积分数为 70%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 10 mL,置 25 mL 棕色量瓶中,用体积分数为 50%甲醇稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液作为供试品溶液。

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,测定,即得。

2 结果与讨论

2.1 样品提取条件的比较

野菊花用甲醇提取所测含量不如用含水甲醇提取测得含量高,对比了体积分数为 50%甲醇与体积分数为 70%甲醇的提取效果,两者没有明显差异,由于体积分数为 70%甲醇的提取易于滤过被选用。对超声处理时间进行了考察,根据实验结果确定超声处理时间为 30 min。

2.2 流动相的选择

药典^[2]所用流动相乙腈-0.4%磷酸溶液(13:87) pH 值偏低,根据本品的实际情况调整为乙腈-0.1%磷酸溶液(9:91),这样供试品既能够达到较好的色谱分离,又使流动相 pH 值较适宜,利于色谱柱的保护。

2.3 检测波长的选择

绿原酸 HPLC 法测定波长一般为 327 nm^[1-3],按照野菊花供试品溶液制备方法制成供试品溶液。将绿原酸对照品溶液、供试品溶液分别注入液相色谱仪中,以二极管阵列检测器进行测定,得到它们的色谱扫描图及光谱吸收曲线。绿原酸对照品、野菊花供试品所含绿原酸的光谱吸收曲线相一致,均在 326 nm 左右有最大吸收,确定 327 nm 为检测波长,供试品与绿原酸对照品在相应位置上有相似的吸收峰且分离度良好。

2.4 线性关系考察

配制绿原酸对照品溶液(204.0 mg/L),稀释使绿原酸的浓度分别为 1.02, 5.10, 10.20, 20.40, 40.80, 61.20, 81.60, 102.0 mg/L 的溶液,进样各 20 μL,按拟定色谱条件测定,以进样的对照品溶液浓度为横坐标,以峰面积积分值为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程 $Y = 71753.439X + 7114$, $r = 0.9998$ 。表明绿原酸进样量在 0.0204 ~ 2.04 μg 范围内与峰面积呈线性关系。

2.5 精密度和稳定性试验

精密吸取某一对照品溶液和供试品溶液各 20 μL,重复进样 5 次,测定峰面积,绿原酸对照品峰面积分别为 712 976, 705 963, 704 616, 702 036, 705 749, RSD 为 0.6%,供试品绿原酸峰面积分别为 1 803 889, 1 786 219, 1 807 107, 1 795 690, 1 808 107, RSD 为 0.6%。取同一对照品溶液和供

试品溶液,分别在 0, 3, 6, 20, 24, 28 h 进样测定,绿原酸对照品峰面积的 RSD 为 1.1%,供试品绿原酸峰面积的 RSD 为 1.1%,说明绿原酸至少在 28 h 内稳定。

2.6 重复性试验

对同一批号的样品依上述的含量测定方法按取样量的 80%, 100% 和 120% 称样(共 9 份),进行提取测定,计算,含量为 0.1790%, 0.1791%, 0.1796%, 0.1803%, 0.1809%, 0.1773%, 0.1777%, 0.1759%, 0.1790%, 平均含量为 0.1788%, RSD 为 0.9%。

2.7 回收率试验

精密称取半量已知含量的样品 9 份,分别加入绿原酸对照品(3 个剂量,均以溶液形式加入),按上述方法进行测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 野菊花中绿原酸的加样回收试验结果

Tab 1 Result of recovery of chlorogenic acid in Flos Chrysanthemi Indici

编号	样品中含绿原酸的量 (mg)	添加绿原酸对照品的量 (mg)	测出绿原酸的总量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.3688	0.2848	0.6488	98.31		
2	0.3629	0.2848	0.6425	98.17		
3	0.3739	0.2848	0.6624	101.30		
4	0.3588	0.3591	0.7217	101.06		
5	0.3646	0.3591	0.7204	99.08	99.82	1.2
6	0.3732	0.3591	0.7337	100.39		
7	0.3604	0.4334	0.7956	100.42		
8	0.3693	0.4334	0.8027	100.00		
9	0.3634	0.4334	0.7953	99.65		

2.8 样品测定结果

按前述方法测定样品 5 批,样品含量见表 2。

表 2 野菊花药材中绿原酸的含量测定结果

Tab 2 Content of chlorogenic acid in Flos Chrysanthemi Indici

样品编号	绿原酸含量 (%)
1	0.18
2	0.30
3	0.31
4	0.32
5	0.30

参考文献

[1] 中国药典.一部[S]. 2000. 255; 177.
[2] 黎小伟,叶小强. HPLC 测定复方鱼腥草片中绿原酸的含量[J]. 中成药, 2003, 25(1): 66.
[3] 白海波,王剑飞,周蒂. 金银花提取条件对绿原酸含量的影响[J]. 中国现代应用药学, 2003, 20(2): 130-132.

收稿日期: 2003-12-23