

# 高效液相色谱法测定急支糖浆中原儿茶酸的含量

王勤<sup>1</sup>, 张永玲<sup>2</sup>, 侯铁军<sup>1</sup> (1. 甘肃省张掖市药品检验所, 甘肃 张掖 734000; 2. 甘肃省临夏州人民医院, 甘肃 临夏 731100)

**摘要:**目的 建立急支糖浆中原儿茶酸的含量测定方法。方法 高效液相色谱法测定, Lichrosorb ODS C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 以乙腈-水-冰醋酸 (8:100:0.2) 为流动相, 检测波长为 259 nm。结果 原儿茶酸进样量在 0.15 ~ 0.73 μg 范围内具有良好的线型关系,  $r=0.999\ 8$ , 平均加样回收率为 98.86%,  $RSD=0.70\%$  ( $n=5$ )。结论 所建立的定量方法准确、重复性好、专属性强, 可作为控制和评价本品质量的方法。

**关键词:** 高效液相色谱法; 急支糖浆; 原儿茶酸

作者简介: 王勤, 女, 副主任药师

Tel: (0936) 8292830

E-mail: wangqin690529@yahoo.com.cn

# Determination of Protocatechuic Acid in Jizhi Syrup by HPLC

WANG Qin<sup>1</sup>, ZHANG Yong-ling<sup>2</sup>, HOU Tie-jun<sup>1</sup> (1. Zhangye Institute for Drug Control, Zhangye 734000, China; 2. Linxia People's Hospital, Linxia 731100, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a HPLC method for the determination of protocatechuic acid in Jizhi Syrupus. **METHODS**

HPLC was used with Lichrosorb C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) Column. Acetonitrile-water-acetic acid glacial (8:100:0.2) was used as a mobile phase. The detection wavelength was 259 nm. **RESULTS** Protocatechuic acid showed a good linear relationship at a range of 0.15 ~ 0.73 μg,  $r = 0.9998$ , the average recovery was 98.86% and RSD was 0.70% ( $n = 5$ ). **CONCLUSION** The method was accurate, reliable and specific, It could be used for the quality control and evaluation of Jizhi Syrup.

**KEY WORDS:** RP-HPLC; Jizhi Syrup; protocatechuic acid

急支糖浆是以鱼腥草、金荞麦、四季青、麻黄等八味药材提取制成,具有清热化痰、宣肺止咳的作用,临床上主要用于治疗急性支气管炎,感冒后咳嗽,慢性支气管炎急性发作等呼吸系统疾病<sup>[1]</sup>,疗效确切,为《中国药典》2000年版和2005年版一部收载品种。标准对柚皮苷进行含量控制,对其中的原儿茶酸未进行测定。四季青作为君药,其主要活性成分原儿茶酸具有明显抑制血小板聚集活性和抗菌活性<sup>[2]</sup>,与急支糖浆主要药理作用相吻合,因此有必要对原儿茶酸进行含量控制,从而控制药品质量,保证疗效。目前测定原儿茶酸含量的方法有一阶导数光谱法<sup>[3]</sup>,薄层扫描法<sup>[4]</sup>,毛细管电泳法<sup>[5]</sup>和高效液相色谱法<sup>[6-7]</sup>等。由于本制剂含药味多,成分复杂,互相干扰大,通过试验,笔者建立了专属性强,分离效果好的高效液相色谱法测定急支糖浆中原儿茶酸的含量,结果满意,可作为本制剂质量控制指标之一。

## 1 仪器与试剂

Agilent1100 高效液相色谱仪:包括 G1311A 四元泵, G1315A DAD 检测器, Agilent1100 化学工作站; HITACHI 高效液相色谱仪:包括日立 L-6000 泵, L-4200H 检测器, D-2500 数据处理机;十万分之一电子天平(METTLER-D2025 型);超声波提取器(SB2200-T 上海必能信超声有限公司);原儿茶酸对照品(中国生物制品检定所,批号 809-200102);乙腈为色谱纯;水为重蒸馏水;其余试剂均为分析纯;急支糖浆由太极集团涪陵制药厂生产,阴性对照为取四季青外的七味药材按制备方法制备。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

Lichrosorb ODS C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);检测波长:259 nm;流动相:乙腈-水-冰醋酸(8:100:0.2);流速:1.0 mL · min<sup>-1</sup>;柱温:室温;进样量:10 μL;理论塔板数按原儿茶酸峰计算约为6 500,原儿茶酸与相邻色谱峰达到基线分离,且阴性对照无干扰,原儿茶酸峰的拖尾因子为1.08,峰形基本对称;用外标法定量。

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称定原儿茶酸对照品 9.10 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,超声处理 10 min,放至室温,作为对

照品储备溶液;精密吸取上述对照品储备溶液 5 mL,置 25 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,超声处理 10 min,放至室温,作为对照品溶液(每 1 mL 含原儿茶酸 36.4 μg)。

### 2.3 供试品溶液的制备

精密量取本品 3 mL,加稀盐酸调节 pH 至 2,置分液漏斗中,用乙醚轻轻振摇提取 4 次(20, 20, 15, 10 mL),合并乙醚液,用 5% 碳酸氢钠溶液提取 4 次,每次 15 mL,合并碳酸氢钠提取液,用盐酸中和并调节 pH 至 2,再用乙醚提取 4 次(20, 20, 15, 10 mL),合并乙醚液,低温挥干乙醚,残渣用流动相洗至 25 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,超声处理 10 min,放至室温,备用。

### 2.4 线性关系考察

精密吸取上述对照品储备溶液 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,超声处理 10 min,放至室温。精密吸取上述五种溶液各 10 μL,按上述色谱条件,分别进样,测定。以对照品进样量(μg)为横坐标,以峰面积积分为纵坐标进行线性回归,得回归方程  $Y = 1037404.5X + 8701.1$ ,  $r = 0.9998$ 。结果表明原儿茶酸对照品进样量在 0.15 ~ 0.73 μg 内具有良好的线性关系。

### 2.5 重复进样精密度试验

精密吸取对照品溶液,在确定的色谱条件下连续进样 6 次,原儿茶酸峰面积的相对标准偏差 RSD% 为 0.42%,精密度良好。

### 2.6 重复性试验和稳定性试验

取同一样品(含量为 0.536 mg · mL<sup>-1</sup>)6 份,按“2.3”项下的方法提取得到供试品溶液,按“2.9”项下测定法测定,结果平均含量为 0.536 mg · mL<sup>-1</sup>,RSD 为 0.45%;取上述样品在 4, 8, 12, 24, 48 h 分别测定,结果平均含量为 0.534 mg · mL<sup>-1</sup>,RSD 为 0.52%,表明被测样品溶液在 48 h 内基本稳定。

### 2.7 加样回收试验

取已知含量的样品(含量为 0.536 mg · mL<sup>-1</sup>)9 份,各加入一定量的对照品溶液,按“2.3”项下的方法提取得到样品溶液,按“2.9”项下方法吸取 10 μL 进样测定,每份重复 5 次,计算回收率,结果见表 1。

表1 急支糖浆中原儿茶酸加样回收率实验结果( n = 5 )

Tab 1 Results of protocatechuic acid in Jizhi Syrup’s recovery test ( n = 5 )

| 样品含量<br>/mg | 加入对照<br>品量/mg | 实测量<br>/mg | 回收率<br>/% | 平均<br>回收率/% | RSD<br>/% |
|-------------|---------------|------------|-----------|-------------|-----------|
| 0.804       | 0.637         | 1.434      | 98.90     |             |           |
| 0.804       | 0.637         | 1.431      | 98.43     |             |           |
| 0.804       | 0.637         | 1.432      | 98.59     |             |           |
| 0.804       | 0.819         | 1.613      | 98.78     |             |           |
| 0.804       | 0.819         | 1.615      | 99.02     | 98.86       | 0.70      |
| 0.804       | 0.819         | 1.628      | 100.61    |             |           |
| 0.804       | 1.001         | 1.790      | 98.50     |             |           |
| 0.804       | 1.001         | 1.787      | 98.20     |             |           |
| 0.804       | 1.001         | 1.792      | 98.70     |             |           |

2.8 耐用性试验

分别采用 Lichrosorb C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Zorbax SB-C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)和 Hypersil ODS 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)进行分析,原儿茶酸的保留时间基本一致,样品分离情况良好。

2.9 样品测定

照供试品溶液制备法制备3批供试品溶液,分别取配制的对照品溶液、供试品溶液,经0.45 μm 针筒过滤器过滤,精密吸取10 μL 进样,以峰面积按外标法计算,被测样品中原儿茶酸的含量分别为0.519,0.536,0.604 mg • mL<sup>-1</sup>。

3 讨论

3.1 系统性试验中,从DAD检测器收集到的信息可知,原儿茶酸在222,259,293 nm 处均有最大吸收,且在259 nm 处的响应较大,故确定259 nm 为检测波长。在确定色谱分离条件时,对甲醇-水-冰醋酸、乙腈-水-冰醋酸等不同流动相进行多次选择比较,确定本实验的流动相,原儿茶酸能够达到基线分离,峰形好,保留时间相对适中,分离度较好,与甲醇-水-冰醋酸液比较,柱压明显降低,其他成分无干扰。

3.2 本实验尝试在酸性条件下,以乙醚萃取,5% NaHCO<sub>3</sub> 返

提;在酸性条件下重新提取后,蒸干溶剂,加定量流动相溶解后进样的方法进行测定,可有效分离出原儿茶酸,减少了部分非测定物质的干扰。萃取次数的比较,选定萃取四次,结果表明四次可完全提出,减少提取次数,会增大测定误差。

3.3 本实验建立的含量测定方法专属性强,对于成分复杂,互相干扰大的中成药制剂分离效果好,可排除其他非测定物质的干扰,测定结果准确,相关性好,可作为该药的质量控制手段。

REFERENCES

[1] Ch. P(2005) Vol I (中国药典2005年版.一部)[S]. 2005: 541-542.

[2] YANG D M, SU SH W, LI X, *et al.* Studies on bioactive constituents from the excreta of *Trogopterus Xanthipes Milne-edwards* [J]. *Acta Pharm Sin*(药学报),1987,22(10):765-766.

[3] FENG T J, SUN Y B. Content determination of protocatechuic acid in Jizhi syrup by 1st derivative spectrum [J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药),1992,14(12):11-12.

[4] ZHU Y Q, YU R G. Quantitative determination of protocatechuic aldehyde and protocatechuic acid by thinlayer chromatographic densitometry[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志),1983,3(5):265-267.

[5] RUI J ZH, ZOU H F, YUAN Y SH, *et al.* Separation of water-soluble active principles of Danshen(*Salvia miltiorrhiza*) Danshensu, protocatechuic aldehyde and protocatechuic acid by HPCE [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2000,31(5):337-339.

[6] ZHANG ZH B, WU P Y, QI Q, *et al.* Determination of protocatechuic aldehyde and protocatechuic acid in compound sijiqing tablets by HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药),2004,26(9):719-721.

[7] XU Y H, CHAO R B. Determination of protocatechuic acid in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2004,35(7):817-818.