高效液相色谱法测定抗感口服液中绿原酸的含量

张云,徐照辉* (浙江中医药大学,杭州 310053)

摘要:目的　建立测定抗感口服液中绿原酸的含量测定方法。方法　采用高效液相色谱法,C_{18}(250 mm × 4.6 mm,5 μm)色谱柱,流动相为甲醇-0.4%磷酸溶液(15∶85),检测波长为 327 nm。结果　回归方程 $Y = 47778X + 540$, $r = 0.9998$。线性范围在 0.12 ~ 15 μg。结论　此方法提取简单,准确度与重复性均符合测定要求。

关键词:抗感口服液;高效液相色谱法;绿原酸
中图分类号:R917.101;R931.6　　文献标识码:B　　文章编号:1007-7693(2007)07-0631-03

Determination of Chlorgenic Acid in Kanggan Oral Liquid by HPLC

ZHANG Yun, XU Zhao-hui* (*Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou* 310053, *China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE　To establish HPLC method determination of chlorgenic acid in kanggan oral liquid. **METHODS**　HPLC method was used with C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile was methanol-0.4% H_3PO_4 (15∶85). Detection wavelenth

作者简介:张云,男,副主任中药师　Tel:(0571)85351856　E-mail:zhangyunl6@163.com　* 通讯作者:徐照辉　Tel:(0571)85379660

was 326 nm. **RESULTS** The linear rang was 0.12~15 μg. The standard curve equation was Y = 47778X + 25840, and the relevant coefficient was 0.9998. **CONCLUSION** It was decided sample volume injected on determination of chlorogenic acid. The method is accurate, rapid and reproducible and be used for the quality study of fanggan spray.

KEY WORDS: kanggan oral liquid; HPLC; chlorogentic acid

流行性感冒(简称流感)是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病,治疗时需要针对病情,及时使用疗效好,起效快的药物[1]。经多年临床应用发现,抗感口服液(由金银花、连翘、石膏等药味组成)在预防和治疗流感方面具有确切的疗效。本实验在原有研究基础上,采用高效液相色谱法,建立抗感口服液中君药金银花中指标性成分绿原酸的含量测定方法,为该制剂的进一步开发,质量标准的制定提供科学的依据。

1 仪器、试剂与材料

绿原酸对照品由中国药品生物制品检定所提供(批号:110753-200212),采用峰面积归一化法测定其含量为99.68%。试剂除高效色谱流动相用色谱纯外,其余均为分析纯。抗感口服液由浙江省中医院制剂室提供。

2 方法与结果

2.1 仪器与色谱条件

METTLER TOLEDO AG135电子天平,岛津 LC-10AD液相色谱仪,SPD-10A紫外检测器,色谱柱:C_{18}(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相:甲醇-0.4%磷酸溶液(15∶85),检测波长为 327 nm。理论塔板数按绿原酸峰计算应不低于2500。在本色谱条件下,对照品与样品的色谱图见图 1。

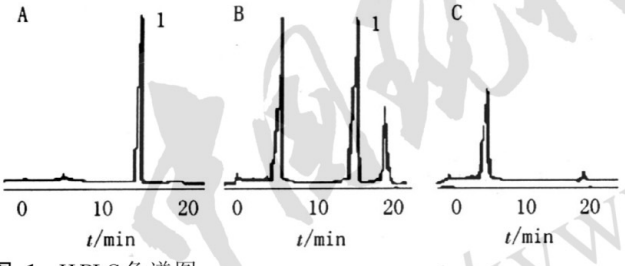

图 1 HPLC色谱图

A.对照品; B.样品; C.阴性对照样品; 1.绿原酸

Fig 1 HPLC Chloromatogram

A. reference substance; B. sample; C. nagative reference; D. chlorogentic acid

2.2 标准品液和样品液的制备

精密称量绿原酸对照品 4.8 mg 置 10 mL量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

取本品 1 mL,至 200 mL量瓶中,加 50%甲醇 20 mL,超声 10 min,冷却,8000 r·min^{-1}离心 15 min,取上清液,加50%甲醇至刻度,微孔滤膜(0.45 μm)过滤,作为样品液。

2.3 线性关系考察

精密吸取标准品液 500 μL,置 2 mL微量离心管,加50%甲醇 500 μL稀释,摇匀,对其进行对半递减稀释,制备若干份,注入液相色谱仪 20 μL,以浓度为横坐标,峰面积值为纵坐标,进行线性回归,求得回归方程:Y = 47778X + 540, r = 0.9998。结果表明绿原酸在 0.12~15 μg范围内,与峰面积呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验

取同一对照品溶液(批号为 20050404),每次 20 μL,连续进样 5次,测定样品中绿原酸含量,结果 RSD为 0.39%,表明精密度良好。

2.5 重复性试验

取同一批样品(批号为 20050404)5份,分别按样品测试条件测定,结果 RSD为 1.27%,表明本法重复性良好。

2.6 加样回收试验

精密量取已知绿原酸含量的制剂(批号为 20050404)1 mL,平行 5份,分别精密添加已知浓度绿原酸对照品适量。按"2.3"项测定绿原酸的含量,计算回收率。结果见表 1。

表 1 回收率试验

Tab 1 Recovery test

编号	1	2	3	4	5
样品量/μg·mL^{-1}	6.9420	7.2607	8.0823	7.3420	6.8467
加入量/μg·mL^{-1}	7.5000	7.5000	7.5000	7.5000	7.5000
测得量/μg·mL^{-1}	14.0856	14.7232	15.2999	14.7342	14.8005
回收率/%	0.9525	0.9950	0.9623	0.9856	1.0364
平均回收率/%			98.64		
RSD%			2.97		

2.7 稳定性试验

取 1份供试品溶液(在室温 25℃下保存),按上述实验方法在 0.1, 4, 8, 12, 24 h分别测定峰面积。实验结果表明:供试品溶液在 24 h内测定是稳定的。

2.8 样品中绿原酸的含量测定

分别精密吸取样品溶液 20 μL,注入液相色谱仪,测定,结果见表 2。

表 2 样品的含量测定

Tab 2 Determination of sample

批号	绿原酸含量/mg·mL^{-1}					平均含量/mg·mL^{-1}
	1	2	3	4	5	
20050404	0.2111	0.2076	0.2037	0.2156	0.2018	0.2080
20050406	0.1932	0.1889	0.1901	0.1894	0.1916	0.1906
20050407	0.1795	0.1803	0.1778	0.1834	0.1768	0.1796

http://www.chinjmap.com

2.9 阴性干扰情况

按照处方比例,取除去金银花的其他药味,按制备工艺制得阴性样品。并采用上述条件与方法试验,结果阴性样品在与对照品色谱峰相应的位置上,无吸收峰。说明处方中其他药味对测定结果无影响。结果见图 2-C。

3 讨论

3.1 本制剂为中药复方口服液,方中君药金银花的指标性成分为绿原酸,故对其进行含量测定。

3.2 实验过程中,曾对样品的前处理进行考察:①取样品用 50%甲醇稀释 25 倍;②样品加甲醇稀释后,用乙酸乙酯提取;③取样品加稀盐酸调 pH 至 2,加乙酸乙酯提取 5 次,每次 20 mL,提取液蒸干,加 50%甲醇溶解稀释[2-4]。结果表明,方法①样品无损失,含量稳定,回收率高,所测高效液相图谱中绿原酸峰无杂质干扰,方法简便;方法②虽然能沉淀一些杂质,但与①法比较,绿原酸含量偏低;方法③与方法①比较测得含量结果基本一致,含有杂质相差无几,但方法繁琐。

3.3 曾选用乙腈-0.4%磷酸,水-甲醇-冰醋酸等流动相试验,结果绿原酸出峰时间过早,分离效果不好,经反复试验,文中所选流动相较合适,分离度好。

参考文献

[1] WANG Y F, HE Z J, GUO C T. General situation and progress of the research on antiviral drugs of influenza[J]. International Journal of Epidemiology and Infectious Disease(国际流行病学传染病学杂志), 2007, 34(1): 37.

[2] DENG S L, YU J H, DENG F Q. Comparative on Different Extraction Processes of Chlorogenic Acid in Flos Loniceae[J]. Journal of Jishou University(吉首大学学报), 2007, 2: 29.

[3] XIANG Z N, NING Z X. Comparison of Technologies of Extraction and Purification of Chlorogenic Acid from Honeysuckle[J]. Chemistry and Industry of Forest Products(林产化学与工业), 2006, 1: 26.

[4] ZHAO Z X, WEI T Y, HAO R R. Improvement of Technology to Extract Chlorogenic Acid in Flos Loniceae[J]. Lishizhen Medicine and Maieria Medical Research(时珍国医国药), 2004, 12: 17.

收稿日期:2007-06-29