

HPLC法测定复方鼻咽洗剂中绿原酸的含量*

黄小玲¹, 彭解人², 梁象逢², 卢日铭³

(1. 深圳市慢性病防治院, 广东深圳 518019; 2. 中山大学附属第二医院, 广东广州 510120;

3. 深圳市中医院, 广东深圳 518033)

[摘要] 目的: 建立复方鼻咽洗剂中绿原酸含量的测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 DIKMA Diamonsil C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 40℃, 流动相为乙腈-0.4%磷酸溶液(13:87), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 327 nm。结果: 绿原酸的回归方程为 $Y=2\ 468\ 778.008\ 2X+2\ 128.139\ 3$, 相关系数 $r=0.999\ 6$, 线性范围 0.04~0.40 μg, 平均回收率为 99.75%, $RSD=1.82\%(n=9)$ 。结论: 本法简便、准确、重现性好、适用性强, 可作为复方鼻咽洗剂的质量控制方法。

[关键词] 高效液相色谱法; 复方鼻咽洗剂; 绿原酸; 含量测定

[中图分类号] R917

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-7210(2007)08(b)-088-03

Content determination of chlorogenic acid in compound nasopharyngeal lotion by HPLC

HUANG Xiao-ling¹, PENG Jie-ren², LIANG Xiang-feng², LU Ri-ming³

(1. Shenzhen Chronic Disease Prevention and Treatment Hospital, Shenzhen 518019, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 3. Shenzhen Hospital of Chinese Medicine, Shenzhen 518033, China)

[Abstract] Objective: To establish a method for the determination of chlorogenic acid in compound nasopharyngeal lotion. **Methods:** HPLC was used with chromatographic conditions including DIKMA Diamonsil C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm). The column temperature was 40℃, the mobile phase was acetonitrile-phosphoric acid (13:87), the flow rate was 1.0 ml/min, and the detection wavelength was 327 nm. **Results:** The linear calibration curve ($Y=2\ 468\ 778.008\ 2X+2\ 128.139\ 3$, $r=0.999\ 6$) was obtained in the concentration range of 0.04~0.40 μg/ml, and the average recovery was 99.75% with RSD of 1.82% ($n=9$). **Conclusion:** The method is simple and accurate with good reproducibility, suitable for quality control of compound nasopharyngeal lotion.

[Key words] HPLC; Chlorogenic acid; Compound nasopharyngeal lotion; Assay

复方鼻咽洗剂由白花蛇舌草、野菊花、银花、薄荷、天花粉等十二味中草药组成, 具有清热解毒、排脓生肌、活血祛瘀、养阴血、扶正祛邪之功效, 临床用于鼻咽癌放疗的辅助性治疗和护理作用, 经医院临床应用具有良好的效果。为了加强该制剂的质量控制, 完善其质量标准, 本文采用 HPLC 法对该制剂中野菊花、银花药材所含的绿原酸进行了含量测定研究^[1]。结果表明, 本文实验方法成熟、可行, 可为该制剂的质量控制提供定量依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

SPD-10AVP 型色谱仪(日本岛津); DIKMA Diamonsil C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)。

1.2 试剂

绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 0773-0508, 供含量测定用); 水为纯水; 乙腈为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 供试品(本院自制样品 10 批)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

C₁₈ 色谱柱 (DIKMA Diamonsil, 150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.4%磷酸 (13:87); 流速: 1.0 ml/min; 柱温

40℃; 检测波长为 327 nm[取绿原酸对照品溶液置紫外分光光度计中进行全波长扫描, 结果表明, 对照品溶液在波长 327 nm 处有最大吸收(图 1), 并参照有关文献报道^[2,3], 故选择 327 nm 为绿原酸的测定波长]。

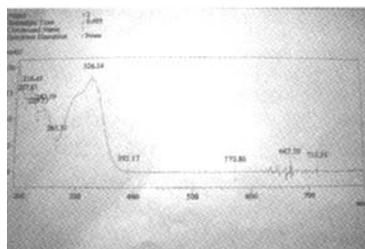


图 1 绿原酸对照品全波长扫描图

2.2 供试品溶液的制备

精密量取样品 2 ml, 置 25 ml 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 称定重量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过; 精密量取续滤液 2 ml, 置 25 ml 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 对照品溶液的制备

取绿原酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 制成每 1 ml

*2003 广东省中医药局立项课题(编号: 103121)

含 20 μg 的溶液,即得。

2.4 阴性对照品溶液的制备

取除野菊花、银花以外按本品处方比例的原药材,按样品制备工艺制成阴性对照样品,再按供试品溶液的制备方法制成阴性对照品溶液,即得。

2.5 线性关系考察

精密吸取绿原酸对照品溶液(浓度为 0.201 2 mg/ml,配制方法:精密称取绿原酸对照品 10.06 mg,加甲醇溶解并定容至 50 ml)1、3、5、7、10 ml,分别置 50 ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀;然后分别精密吸取 10 μl(绿原酸量分别为:0.040 24、0.120 72、0.201 20、0.281 68、0.402 40 μg),注入液相色谱仪,测定其峰面积,以绿原酸浓度为横坐标,峰面积值为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程: $Y=2\ 468\ 778.008\ 2X+2\ 128.139\ 3$,相关系数 $r=0.999\ 6$,结果表明绿原酸在 0.04~0.40 μg 范围内呈良好线性关系,见表 1 和图 2。

表 1 线性关系考察

绿原酸含量(μg)	峰面积		
	面积 1	面积 2	平均值
0.040 24	98 345	97 361	97 853
0.120 72	297 352	310 382	303 867
0.201 20	495 588	517 588	506 588
0.281 68	693 823	679 847	686 835
0.402 40	991 176	1 005 688	998 432

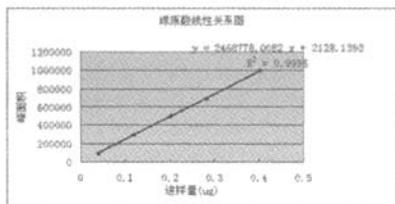


图 2 绿原酸线性关系图

2.6 专属性试验

在选定的色谱条件下,参照高效液相色谱法进行试验,结果表明绿原酸对照品及复方鼻咽洗剂样品在相同的保留时间处($t_R=8.571\ min$)有色谱峰,而缺野菊花、银花的复方鼻咽洗剂阴性样品溶液无相应的色谱峰,不干扰样品测定,见图 3~5。

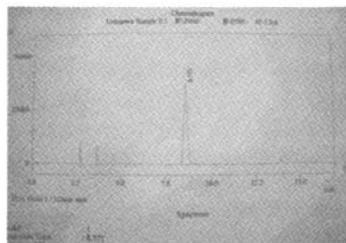


图 3 绿原酸对照品色谱图

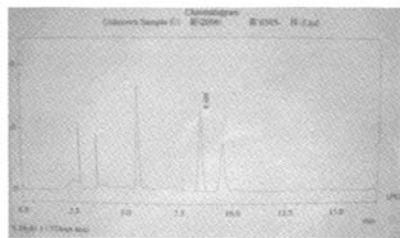


图 4 复方鼻咽洗剂样品色谱图

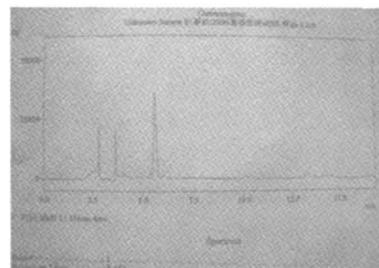


图 5 绿原酸阴性对照品样品(缺野菊花、银花)色谱图

2.7 稳定性试验

精密吸取绿原酸对照品溶液 10 μl,每隔一定时间进样 1 次,共 6 次, $RSD=2.14\%(n=6)$,表明绿原酸在 24 h 内基本稳定,结果见表 2。

表 2 稳定性试验

时间(h)	峰面积	RSD(%)
0	504 816	2.14
1	495 588	
3	505 634	
9	498 463	
15	481 642	
24	482 319	

2.8 精密度试验

精密吸取绿原酸对照品溶液 10 μl,重复进样 6 次,测定其峰面积, $RSD=1.22\%(n=6)$,表明仪器进样精密度良好,结果见表 3。

表 3 精密度试验

编号	峰面积	RSD(%)
1	496 531	1.22
2	489 356	
3	502 648	
4	487 829	
5	496 532	
6	487 925	

2.9 重复性试验

取供试品(批号 050127)6 份,按样品测定方法测定, $RSD=$

表4 重复性试验

次数	取样量 (ml)	绿原酸含量 (mg/ml)	平均含量 (mg/ml)	RSD (%)
1	2	2.725 1	2.698 3	1.89
2	2	2.620 2		
3	2	2.680 9		
4	2	2.754 8		
5	2	2.740 3		
6	2	2.668 7		

1.89%(n=6),说明该含量测定方法可行,结果见表4。

2.10 加样回收试验

采用加样回收法,精密吸取已知含量的内容物(批号:050127,含量为2.698 3 mg/ml)1 ml共9份,分别精密加入浓度为1.356 4 mg/ml的绿原酸对照品的甲醇溶液1、1、1、2、2、2、3、3、3 ml(配制方法:称取绿原酸对照品33.91 mg,加甲醇溶解并定容至25 ml)。照供试品溶液制备方法处理并测定,计算得平均回收率为99.75%,RSD=1.82%(n=9)。结果表明,本法回收率良好,见表5。

表5 加样回收率试验

编号	取样量(ml)	样品中含量(mg)	对照品加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	1	2.698 3	1.356 4	4.025 9	99.29	99.75	1.82
2	1	2.698 3	1.356 4	4.057 7	100.07		
3	1	2.698 3	1.356 4	4.031 9	99.44		
4	1	2.698 3	2.712 8	5.334 1	98.58		
5	1	2.698 3	2.712 8	5.444 2	100.61		
6	1	2.698 3	2.712 8	5.397 8	99.75		
7	1	2.698 3	4.069 2	6.738 2	99.57		
8	1	2.698 3	4.069 2	6.828 5	100.90		
9	1	2.698 3	4.069 2	6.737 0	99.55		

2.11 样品的含量测定 取10批复方鼻咽洗剂产品照含量测定方法测定,结果见表6。

表6 样品测定

样品批号	绿原酸含量(mg/ml)
0512101	2.58
051211	2.61
051212	2.75
050825	2.85
050417	2.56
050418	2.98
050419	3.03
050126	2.86
050127	2.70
050128	2.75

3 讨论

我们曾试验过多种流动相,如甲醇-1%磷酸(24:76)、甲醇-0.5%醋酸(35:65)、乙腈-0.016 mol/L 磷酸二氢钾(1:4)、甲醇-水-甲酸(40:80:1)、甲醇-水溶液(磷酸调pH至2.7)、甲醇-磷酸缓冲液(23:77)等,分离效果均不理想。最终确定流动相为乙腈-0.4%磷酸(13:87)。

本文测定方法经各项试验考察,结果表明方法简便、快速、准确、重现性好、稳定性高,可用于测定复方鼻咽洗剂中野菊花、银花药材所含绿原酸的含量,以利于产品质量控制。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国国家药典委员会.中国药典[S].一部.北京:化学工业出版社,2000.附录VID.
- [2] 熊慧敏. HPLC法测定金银花口服液中绿原酸含量[J].微量元素与健康研究,2003,20(4):41-42.
- [3] 张华年,杨少芳. HPLC同时测定双黄连注射剂中氯原酸和黄芩苷2种指标成份含量[J].中国现代应用药学杂志,1999,16(6):47-49.

(收稿日期:2007-06-06)

本刊药物研究栏目征稿

药物研究:论文内容涉及中药化学成分的提取、分离、纯化、结构确证等(中药材的使用应注明来源和鉴定),药物的鉴定、含量测定研究,药物的稳定性研究,药物剂型研究,药物的生物等效性试验和化合物的合成工艺等。

来稿请寄:北京市朝阳区通惠家园惠润园(壹线国际)5-3-601《中国医药导报》杂志社

邮政编码:100025

电话:010-59679076 59679077 转 8001

传真:010-59679056

E-mail:yyzx99@163.com