

RP-HPLC 法测定四藤片中绿原酸的含量

杨文红, 罗丽娟 (广东省汕头市药品检验所, 汕头 515041)

摘要: 建立 HPLC 法测定四藤片中绿原酸的含量。采用 Diamonsil C₁₈ 柱; 以甲醇- 1. 2% 冰醋酸 (v/v) (15: 85) 为流动相; 检测波长为 327nm。绿原酸进样量在 0. 02~ 1. 0μg 范围内线性关系良好, $r=0. 99999$, 加样回收率为 104. 40%, RSD% 为 0. 49%。所建立的方法简便易行、准确、重现性好, 可用于四藤片的质量控制。

关键词: 四藤片; 绿原酸; HPLC 法; 含量测定

中图分类号: R927. 2 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777 (2008) 01-0046-03

Determination of Chlorogenic Acid in Siteng Tablets by RP-HPLC

Yang Wenhong and Luo Lijuan (Shantou Institute for Drug Control, Guangdong Province, Shantou 515041)

ABSTRACT A HPLC determination method of chlorogenic acid in Siteng Tablets was established. A Diamonsil C₁₈ column was used with methanol and 1. 2% glacial acetic acid (15: 85) as mobile phase, the detection wavelength was 327nm. A good linear was obtained in the range of 0. 02~ 1. 0μg ($r=0. 99999$). The average recovery was 104. 40% (RSD= 0. 49%). The method is simple, accurate and reproducible, and it can be used for the quality control.

KEY WORDS Siteng Tablets; chlorogenic acid; RP-HPLC; determination

四藤片为《卫生部药品标准》中药成方制剂第十册收载品种^[1], 由异型南五味子、石蒲藤、忍冬藤、春根藤等四味中药组成, 具有祛风利湿, 消炎镇痛的功效, 临床上用于治疗风湿性关节炎。原质量标准中无含量测定项, 为有效控制产品质量, 本文对方中的忍冬藤所含的主要药用成分绿原酸^[2]进行定量研究, 绿原酸又名 3- 咖啡酰奎尼酸, 具有显著的抗菌、消炎等药效活性, 其含量测定方法有多种^[3-4], 本文建立 HPLC 法对绿原酸进行了含量测定, 结果满意, 可以很好地控制该制剂的质量。

1 仪器与试剂

1. 1 仪器

高效液相色谱仪 (①Agilent 1100 型, ②岛津 LC- 10ATvp 型); 紫外- 可见分光光度计 (岛津 2201 型); 超声波清洗器 [KUDOS SK 250 LHC 型 (300W、50kHz)]。

1. 2 试剂

绿原酸对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号为 110753- 200413, 供含量测定用); 四藤片样品 (广东万年青制药有限公司, 批号为 060501、060502、060503、061104、061105、061106、061207、061208、061209、061210); 四藤片缺忍冬藤阴性制剂 (广东万年青制药有限公司)。甲醇为色谱纯; 水为超纯水; 冰醋酸为分析纯。

2 方法与结果

2. 1 色谱条件

色谱柱: [①Dikma Diamonsil C₁₈ (4. 6mm × 250mm, 5μm), ②Kromasil 100- 5 C₁₈ (4. 6mm × 250mm, 5μm)]; 流动相: 甲醇- 1. 2% 冰醋酸 (v/v) (15: 85); 检测波长: 327nm; 流速: 1. 0mL · min⁻¹; 柱温: 35℃; 进样量: 20μL。理论板数按绿原酸峰计算应不低于 4000。

2. 2 对照品溶液贮备液和对照品溶液的制备

精密称取经五氧化二磷减压干燥 24 小时的绿

原酸对照品适量，精密称定，置棕色量瓶中，加 50% 甲醇适量使溶解并制成每 1mL 约含绿原酸 0.2mg 的溶液，作为对照品溶液贮备液；再取对照品贮备液适量，加 50% 甲醇制成每 1mL 约含绿原酸 8μg 的溶液，作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取本品 10 片，精密称定，研细，取适量（约相当于本品 1 片），精密称定，置 50mL 棕色量瓶中，加 50% 甲醇约 40mL，超声处理（300W、50kHz）30 分钟，放冷，加 50% 甲醇稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.4 阴性对照溶液的制备

取缺忍冬藤的阴性制剂适量（约相当于供试品的量），按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。

2.5 线性关系考察

精密吸取对照品溶液贮备液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、4.0、5.0μL（采用自动进样器），注入液相色谱仪，记录色谱图。以对照品进样量（μg）为横坐标，以与其相应的峰面积为纵坐标，求得绿原酸的回归方程为：

$Y = 2.9684 \times 10^3 X - 1.4208 \times 10$ $r = 0.9999$
结果表明绿原酸进样量在 0.02~1.0μg 范围内与峰面积具有良好的线性关系。

2.6 精密度试验

2.6.1 进样重复性

取含量测定项下的对照品溶液连续进样 8 次，绿原酸峰面积的 RSD 为 0.53%（n = 8）。

2.6.2 重复性试验

取同一批号的四藤片（批号为 060501）6 份，依法制备供试品溶液，测定，平均含量为 0.3348（mg/片），RSD 为 0.43%（n = 6）。

2.6.3 中间精密度

取同一批号的四藤片（批号为 060501），分别由不同实验者采用不同高效液相色谱仪、不同色谱柱依法测定（实验者①采用 Agilent 1100 高效液相色谱仪，色谱柱 Dikma Diamonsil C₁₈，4.6mm × 250mm，5μm；实验者②采用岛津 LC-10ATvp 高效液相色谱仪，色谱柱 Kromasil 100-5 C₁₈，4.6mm × 250mm，5μm），结果见表 1。

2.6.4 稳定性试验

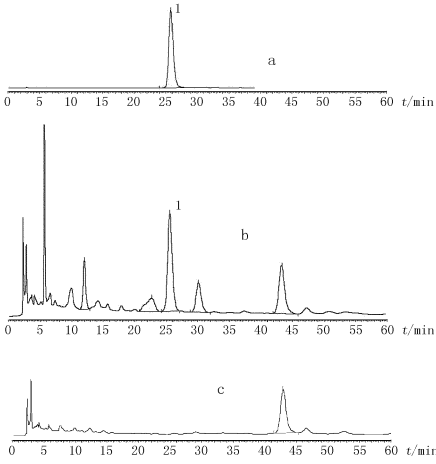
取同一份供试品溶液（批号为 060501），在不同时间分别进样 20μL，结果表明在 24 小时内所得的峰面积稳定，峰面积 RSD 为 1.48%（n = 6）。

表 1 中间精密度

实验者	测得量① (mg/片)	测得量② (mg/片)	平均 (mg/片)
实验者①	0.3356	0.3350	0.3348
	0.3347	0.3337	
实验者②	0.3471	0.3442	0.3464
	0.3476	0.3466	

2.7 专属性考察

照上述色谱条件，吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各 20μL，分别注入液相色谱仪，进行测定。结果，缺忍冬藤的阴性制剂色谱在绿原酸对照品色谱相应位置上无干扰。供试品色谱的绿原酸峰与相邻峰分离度大于 1.5，符合《中国药典》2005 年版一部附录的有关要求，见图 1。



a 对照品；b 样品；c 阴性对照；1 绿原酸。

图 1 四藤片 HPLC 色谱图

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量样品（批号为 060501）共 6 份，每份取样量为供试品取样量的 50%，以当前取样含量的 1:1，分别精密加入对照品溶液贮备液适量，按样品测定项下制备供回收用的供试品溶液，依法测定，即得。回收测定结果见表 2。

表 2 加样回收率试验

样品原含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.1713	0.1709	0.3488	103.86	104.40	0.49
0.1728	0.1709	0.3520	104.86		
0.1709	0.1709	0.3491	104.27		
0.1744	0.1709	0.3536	104.86		
0.1783	0.1709	0.3574	104.80		
0.1766	0.1709	0.3539	103.74		

2 9 样品含量测定

取不同批号的 10 批四藤片，依法测定，以外标法计算含量，结果见表 3。

表 3 四藤片中的绿原酸含量测定结果 (n= 4)

批号	平均(mg/ 片)	RSD(%)
060501	0 3348	0 24
060502	0 3427	1 28
060503	0 3362	0 32
061104	0 3484	0 51
061105	0 3422	0 23
061106	0 3444	0 43
061207	0 1717	0 42
061208	0 1716	0 55
061209	0 1837	0 36
061210	0 1845	0 59

3 讨论

3 1 提取溶媒的选择

根据文献^[57] 报道，丙酮、乙醇、甲醇、水、50% 甲醇均可作为绿原酸的提取溶媒，经试验，将批号为 060501 样品分别用上述几种溶媒提取后测定，结果以 50% 甲醇的提取率较高且杂质较少，故选用 50% 甲醇作为提取溶媒。

3 2 提取溶媒用量的选择

取同一批号的样品（批号 060501）粉末分别称取 3 份，精密称定，按供试品溶液制备方法操作，提取溶媒（50% 甲醇）用量分别如下：① 25mL；②50mL；③100mL ；分别取续滤液作为供试品溶液，依法测定，结果表明用提取溶媒 25mL 已基本提取完全，但考虑到投料的每批药材的含量高低不同，为稳妥起见，确定提取溶媒用量为 50mL。

3 3 提取时间的选择

取同一批号的样品（批号 060501）粉末分别称取 3 份，精密称定，按供试品溶液制备方法操作，用 50% 甲醇 50 mL 超声提取，提取时间分别

如下：①20 分钟；②30 分钟；③40 分钟 ；分别取续滤液作为供试品溶液，依法测定，结果表明超声处理 20 分钟的提取率与 30 分钟、40 分钟一致，但考虑到投料的每批药材的含量高低不同，为稳妥起见，确定提取时间为 30 分钟。

3 4 测定波长的选择

取绿原酸对照品的 50% 甲醇溶液（0 01mg • mL⁻¹），于紫外分光光度计上在 200~ 400nm 波长间扫描。结果在 327. 2nm 波长处有最大吸收，与文献^[8]所用的测定波长一致，故选择 327nm 为本品的测定波长。

3 5 流动相的选择

曾试用下列流动相：①乙腈- 0. 4% 磷酸（10：90）（康红英等，2005 全国中药研究暨中药房管理学术研讨会论文汇编）；②甲醇- 1. 2% 冰醋酸（v/v）（15：85）；采用流动相②所得的供试品色谱中绿原酸色谱峰与相邻的杂质峰得到较好分离，在不同色谱柱的分离度均达 1. 5 以上，峰形对称，理论板数 6000 以上，且全程洗脱时间较短，故选择此流动相组成及比例。

参考文献:

[1] 卫生部药品标准 [S] . 中药成方制剂. 第十册, 1995

[2] 高锦明, 张鞍灵, 张康健, 等. 绿原酸分布、提取与生物活性研究综述 [J] . 西北林学院学报, 1999, 14 (2): 73

[3] 陈发奎. 常用中草药有效成分含量测定 [M] . 北京: 人民卫生出版社, 1997: 421.

[4] 刘如钢, 何培新. 忍冬藤中绿原酸的含量测定 [J] . 河南科学, 2006, 24 (1): 38

[5] 国家医药管理局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册 [M] . 北京: 人民卫生出版社, 1986: 209

[6] 刘祥兰, 刘重芳, 张英, 等. 金银花中绿原酸提取工艺的优化研究 [J] . 中成药, 2000, 22 (6): 402

[7] 刘贵银, 李兰忠, 张胜波. 正交试验优化忍冬藤中绿原酸的提取工艺 [J] . 济宁医学院学报, 2003, 26 (3): 37

[8] 中国药典 [S] . 一部, 2005: 133