

HPLC 法测定抗感胶囊中绿原酸、咖啡酸、芍药苷、木犀草苷和芦丁

褚文静, 张 雪, 王 伟, 侯海妮, 黄喜茹

(河北医科大学药学院 分析化学教研室, 河北 石家庄 050017)

摘 要:目的 建立 HPLC 法同时测定抗感胶囊中绿原酸、咖啡酸、芍药苷、木犀草苷和芦丁的方法。方法 采用 Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温 30 °C; 体积流量: 1.0 mL/min; 流动相: 甲醇-0.5%冰醋酸, 梯度洗脱; 自动进样: 20 μL; 检测波长: 270 nm。结果 在此色谱条件下 5 种成分可完全分离。绿原酸、咖啡酸、芍药苷、木犀草苷和芦丁的线性范围分别为 0.231 0~3.465 0 μg ($r=1.000\ 0$)、0.037 8~0.567 0 μg ($r=0.999\ 9$)、0.292 4~4.386 0 μg ($r=0.999\ 7$)、0.045 2~0.678 0 μg ($r=0.999\ 8$)、0.143 8~2.157 μg ($r=0.999\ 9$)。平均回收率绿原酸为 98.5% (RSD 为 1.1%), 咖啡酸为 98.4% (RSD 为 0.9%), 芍药苷为 97.3% (RSD 为 1.1%), 木犀草苷为 98.6% (RSD 为 1.0%), 芦丁为 99.9% (RSD 为 0.28%)。结论 该方法专属性好、准确度高, 可用于综合评价抗感胶囊的质量。

关键词: 抗感胶囊; 绿原酸; 咖啡酸; 芍药苷; 木犀草苷; 芦丁; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2010)01-0066-03

抗感胶囊由金银花、赤芍、绵马贯众组成, 具有清热解毒的功效, 用于外感风热引起的发热、头痛、鼻塞、喷嚏、咽痛、全身乏力、酸痛等症。目前, 该制剂的质量控制, 已报道的只有以君药金银花的有效成分绿原酸作为指标的反相高效液相色谱法^[1]。本实验建立了 HPLC 法同时测定抗感胶囊中金银花的有效成分绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、芦丁和赤芍的有效成分芍药苷共 5 种成分的量, 为抗感胶囊的质量综合评价提供依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 全自动高效液相色谱仪(二极管阵列检测器、四元泵、柱温箱、自动控温进样器), Agilent 化学工作站。

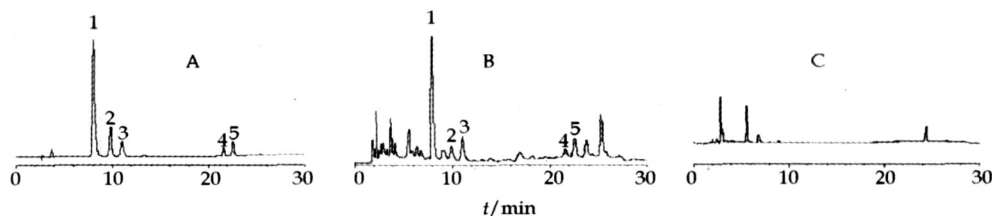
绿原酸(批号 110753-200212)、咖啡酸(批号 885-200102)、芍药苷(批号 110736-200320)、木犀草

苷(批号 111720-200603)、芦丁(批号 0080-9705)对照品均由中国药品生物制品检定所提供, 甲醇为进口色谱纯, 冰醋酸为分析纯, 水为重蒸水, 抗感胶囊由宁夏多维药业有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温 30 °C; 体积流量: 1.0 mL/min; 流动相: 甲醇(A)-0.5%冰醋酸(B), 梯度洗脱程序, 0~12 min, 34% A; 12~22 min, A 线性改变至 58%; 22~30 min, 58% A; 自动进样: 20 μL; 检测波长: 270 nm。理论塔板数按绿原酸计不低于 5 000, 按芍药苷计不低于 7 000, 5 种组分与相邻色谱峰的分离度均大于 1.5, 且各组分的色谱峰对称, 色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备: 分别精密称取绿原酸、咖



1-绿原酸 2-咖啡酸 3-芍药苷 4-木犀草苷 5-芦丁
1-chlorogenic acid 2-caffeic acid 3-paeoniflorin 4-luteoloside 5-rutin

图 1 混合对照品(A)、抗感胶囊(B)和阴性样品(C)的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substances (A), Kanggan Capsula (B), and negative sample (C)

收稿日期: 2009-05-31

基金项目: 河北省中医药局资助项目(05057); 河北省科技厅科技项目(062761372)

作者简介: 褚文静(1981—), 女, 河北赞皇人, 在读硕士研究生, 从事药物分析研究。Tel: (0311) 86265623 E-mail: wenjingchu@163.com

*通讯作者 黄喜茹 Tel: (0311) 86265623 E-mail: hxiru@163.com

啡酸、芍药苷、木犀草苷、芦丁对照品适量,置 25 mL 棕色量瓶中,用 50 % 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度分别为 184.8、37.8、292.4、90.4、287.6 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液,在 4 条件下保存。分别精密吸取上述对照品储备液 2.5、2.0、2.0、1.0、1.0 mL 置 10 mL 量瓶中,用 50 % 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度分别为 46.2、7.56、58.48、9.04、28.76 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品试液的制备:取抗感胶囊 5 粒,倾出全部内容物,混匀,精密称取 0.693 2 g(约相当于 1.5 粒),置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 70 % 甲醇 10 mL,浸渍 12 h,称定质量,超声处理 30 min,取出,放冷,称定质量,用 70 % 甲醇补足减失的质量,摇匀,减压滤过,精密量取续滤液 2.5 mL 置 10 mL 量瓶中,用 70 % 甲醇稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

按抗感胶囊的生产工艺制备缺金银花、赤芍的阴性制剂,并按照供试品溶液的制备方法同法制备阴性溶液。

2.4 线性关系考察:取混合对照品溶液过 0.45 μm 滤膜后,按上述色谱条件分别进样 5、15、25、35、45、55、65、75 μL ,记录色谱峰面积,以峰面积对进样质量进行线性回归,得各组分的回归方程、相关系数及线性范围,见表 1。

2.5 检测限的测定:取混合对照品溶液逐步稀释后,注入高效液相色谱仪,以峰高为基线噪音 3 倍计,绿原酸、咖啡酸、芍药苷、木犀草苷和芦丁的最低检测限分别为 27.71、11.00、235.4、11.09、23.66 ng/mL 。

表 1 组分的线性回归方程和相关系数

Table 1 Linear regression equation and correlation coefficient of components

化合物	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
绿原酸	$A = 970.68 C - 8.969$	1.000 0	0.231 0 ~ 3.465 0
咖啡酸	$A = 2\,561.7 C - 2.741\,7$	0.999 9	0.037 8 ~ 0.567 0
芍药苷	$A = 115.98 C - 2.829\,8$	0.999 7	0.292 4 ~ 4.386 0
木犀草苷	$A = 2\,464.2 C - 0.082\,1$	0.999 8	0.045 2 ~ 0.678 0
芦丁	$A = 1\,139.9 C + 3.119$	0.999 9	0.143 8 ~ 2.157 0

2.6 专属性试验:取阴性溶液过 0.45 μm 滤膜后,按上述色谱条件进样 20 μL ,结果表明阴性样品对所测组分无干扰。

2.7 精密度试验:按上述色谱条件,取混合对照品溶液 20 μL 注入高效液相色谱仪,连续进样 6 次,绿原酸、咖啡酸、芍药苷、木犀草苷和芦丁的峰面积 RSD 分别为 0.36 %、0.55 %、0.84 %、0.34 %、0.17 %。

2.8 重现性试验:取批号为 080206 的样品,制备 6 份供试品溶液,各进样 20 μL ,测定,计算得绿原酸、咖啡酸、芍药苷、木犀草苷和芦丁的平均质量分数分别为 18.17 mg/g (RSD 为 0.35 %)、1.246 mg/g (RSD 为 1.1 %)、45.18 mg/g (RSD 为 0.81 %)、0.305 8 mg/g (RSD 为 1.0 %)、2.673 mg/g (RSD 为 0.94 %)。

2.9 稳定性试验:取批号为 080206 的供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样 20 μL ,测定,计算得绿原酸、咖啡酸、芍药苷、木犀草苷和芦丁峰面积的 RSD 分别为 1.8 %、1.5 %、0.76 %、1.0 %、0.52 %。表明供试品溶液 24 h 内稳定。

2.10 回收率试验:精密称取批号 080206 抗感胶囊内容物 69.33 mg ,置 50 mL 具塞锥形瓶中,分别加入不同体积的绿原酸、咖啡酸、芍药苷、木犀草苷、芦丁对照品溶液(绿原酸、咖啡酸、芍药苷测定时的加入体积为 1.2、1.6、2.0、2.4、2.8 mL;木犀草苷、芦丁测定时的加入体积为 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mL),制备供试品溶液,测定并计算各成分的回收率,结果回收率分别为 98.5 %、98.4 %、97.3 %、98.6 %、99.9 %,RSD 分别为 1.1 %、0.9 %、1.1 %、1.0 %、0.28 % ($n=5$)。

2.11 样品测定:按供试品溶液制备方法制备 3 个批号的抗感胶囊供试品溶液,在上述色谱条件下,每个样品溶液平行测定 3 次,按回归方程计算样品中 5 个活性成分的质量分数,结果见表 2。

表 2 抗感胶囊中 5 种有效成分的测定结果($n=3$)

Table 2 Determination of five active components in Kanggan Capsula ($n=3$)

批号	绿原酸		咖啡酸		芍药苷		木犀草苷		芦丁	
	质量分数/ ($\text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$)	RSD/ %	质量分数/ ($\text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$)	RSD/ %	质量分数/ ($\text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$)	RSD/ %	质量分数/ ($\text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$)	RSD/ %	质量分数/ ($\text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$)	RSD/ %
080206	8.163	0.02	0.562 2	1.07	20.37	0.43	0.137 9	0.73	1.201	0.11
080910	8.201	0.59	0.561 0	0.76	20.48	0.38	0.138 5	1.24	1.118	0.97
080912	8.186	0.76	0.568 9	0.93	20.06	1.16	0.132 6	0.85	1.237	0.68

3 讨论

3.1 检测波长的选择:用二极管阵列检测器分别对 5 种成分进行全波长扫描得知,绿原酸、咖啡酸、芍药苷、木犀草苷和芦丁的最大吸收波长分别为 327、324、232、350、357 nm,为兼顾各组分的检测信号强度和检测灵敏度,选择 270 nm 作为检测波长。

3.2 流动相的选择:分别考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.4%磷酸、乙腈-0.1%磷酸溶剂系统,分离结果均不理想。采用甲醇-0.5%冰醋酸作流动相,进

行梯度洗脱可将 5 个组分完全分离,且基线稳定,峰形好,出峰快,缩短了分析周期,降低了成本。

3.3 超声溶剂及超声时间的考察:为了从抗感胶囊内容物中最大限度地提取出各种有效成分,实验对超声溶剂和超声时间进行了考察,结果表明,用 70%甲醇提取的有效成分数目多,峰面积较大;超声 30 min 即能提取完全。

参考文献:

- [1] 栾雨,曹云飞. RP-HPLC 法测定抗感胶囊中绿原酸的含量[J]. 江苏大学学报:医学版,2006,16(1):64-65.

苍耳丸的质量标准研究

林 宏

(天津市儿童医院,天津 300074)

摘 要:目的 建立苍耳丸的质量控制方法。方法 采用薄层色谱法对连翘、苍耳子、白芷进行定性鉴别,采用高效液相色谱法测定金银花中绿原酸。结果 薄层色谱法对检出连翘、苍耳子、白芷进行鉴别;HPLC 法定量绿原酸,绿原酸在 0.106 5~2.130 0 μg 与峰面积的线性良好($r=0.999\ 9$),平均回收率为 103.0%,RSD 为 0.5%($n=6$)。结论 该方法简便、准确、重复性好,可有效控制苍耳丸的质量。

关键词:苍耳丸;连翘;苍耳子;白芷;薄层色谱;绿原酸;高效液相色谱

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2010)01-0068-03

苍耳丸由菊花、金银花、连翘、苍耳子、白芷等 7 味中药组成,具有清热解毒,通鼻窍之功效,用于治疗鼻窦炎,疗效甚佳,临床应用多年。为了有效控制制剂质量,本实验采用薄层色谱法对方中连翘、苍耳子、白芷进行了鉴别,并采用高效液相色谱法对苍耳丸中的绿原酸进行了测定,方法简便易行,可以用于控制产品质量。

1 仪器与试剂

LC-2010A 高效液相色谱仪(日本岛津);LC solution 色谱工作站;双频恒温数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

绿原酸对照品(批号 110753-200413)、连翘苷对照品(批号 110821-200609)、苍耳子对照药材(批号 121168-200604)、白芷对照药材(批号 120945-200707)均由中国药品生物制品检定所提供;乙腈、磷酸为色谱纯,水为纯净水,其他试剂为化学纯;硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂);苍耳丸(本院自制,批号为 20080922、20081103、20090101)。

2 薄层色谱鉴别

2.1 白芷的 TLC 鉴别^[1]:取本品(批号 20080922) 9 g,加硅藻土 4 g,研匀,加乙醚 40 mL,超声处理 2 次,每次 5 min,滤过,药渣备用,滤液挥干,残渣加醋酸乙酯 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取白芷对照药材 0.5 g,加乙醚 10 mL,同法制成对照药材溶液。再按处方配比,取除白芷外的其他药味,按供试品溶液的制备方法制得阴性对照溶液。照薄层色谱法^[2]试验,吸取上述 3 种溶液各 2~4 μL ,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(30~60)-乙醚(3:2)为展开剂,在 25 以下展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果在供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性对照溶液无此斑点,见图 1。

2.2 苍耳子的 TLC 鉴别:取 2.1 项下的药渣,挥干溶剂,加无水乙醇 50 mL,加热回流 40 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 3 mL 使溶解,静置,取上清液作为供试品溶液。另取苍耳子对照药材 1 g,加无水乙醇 20 mL,加热回流 40 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为对照药材溶液。再按处

收稿日期:2009-03-23

作者简介:林宏(1969—),女,黑龙江省甘南县人,高级工程师,医学硕士,主要从事医院药学工作。

Tel: (022) 23519506 E-mail: eoylinvip@126.com