

小儿感冒颗粒中绿原酸测定方法的改进

吴平平^{1,2}, 李桂龙², 靳文仙², 王成港², 王春龙^{2*}

1. 天津医科大学, 天津 300070

2. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 对小儿感冒颗粒中绿原酸测定的 HPLC 等度洗脱法进行改进, 为更好地控制小儿感冒颗粒质量提供一种简便、快速、可靠的测定方法。方法 色谱柱为 Dikma C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1 mol/L 磷酸二氢钠 (pH 3.40, A)-甲醇 (B), 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 328 nm。结果 绿原酸在 2.02~25.25 μg/mL 呈良好线性关系 ($r=0.999\ 9$), 平均加样回收率为 99.83%, RSD 为 1.15%。结论 采用 HPLC 梯度洗脱法测定绿原酸专属性强, 准确度高, 重现性好, 简便、快速, 能更加有效地控制小儿感冒颗粒产品的质量。

关键词: 小儿感冒颗粒; 绿原酸; HPLC; 梯度洗脱; 质量控制

中图分类号: R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)06-1135-03

Improvement in determination of chlorogenic acid in Xiao'er Ganmao Granula

WU Ping-ping^{1,2}, LI Gui-long², JIN Wen-xian², WANG Cheng-gang², WANG Chun-long²

1. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Key words: Xiao'er Ganmao Granula; chlorogenic acid; HPLC; gradient elution; quality control

小儿感冒颗粒是临床上用于治疗小儿感冒的中药复方制剂。《中国药典》2010 年版关于小儿感冒颗粒的质量标准中, 仅对颗粒剂常规检查项进行检查及对靛蓝进行薄层色谱鉴别, 无含量测定项。文献报道的测定多以板蓝根及大青叶的共同有效成分靛蓝及靛玉红^[1-3]、连翘中的连翘苷^[4-5]作为测定指标, 以绿原酸为测定指标鲜有报道。菊花为处方中的君药^[6], 其有效成分绿原酸具有抗菌、抗病毒等作用^[7], 测定绿原酸可以更好地控制小儿感冒颗粒的质量。文献报道的 HPLC 等度洗脱法^[8]测定绿原酸, 分离效果好, 但进样 150 min 仍有吸收峰, 测定时间较长, 若测定时间设置为 40 min, 会影响后续进样的测定结果。国内也有绿原酸梯度洗脱测定方法的报道^[9-12], 但用于小儿感冒颗粒中绿原酸测定, 其分离效果不佳或样品中极性较低成分未完全洗脱。本实验对等度洗脱法^[9]进行改进, 为小儿感冒颗粒的质量控制提供一种简便、快捷、准确、可靠的方法。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪: Lab Alliance Series III 泵、Model 1201⁺ 检测器 (美国 lab Alliance); Lab Alliance 工作站; AG245 型电子天平 (Mettler-Toledo 公司)。

绿原酸对照品 (批号 110753-200413, 中国药品生物制品检定所); 小儿感冒颗粒 (批号 080701、080702、080703, 承德新爱民制药有限公司); 甲醇为优级纯, 磷酸二氢钠为分析纯, 水为重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 等度洗脱法 参考文献的色谱条件^[8], 色谱柱为 Dikma C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1 mol/L 磷酸二氢钠-甲醇 (80:20), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 328 nm, 柱温 35 °C, 进样量 20 μL。

2.1.2 梯度洗脱法 流动相为 0.1 mol/L 磷酸二氢钠 (pH 3.40, A)-甲醇 (B), 梯度洗脱程序: 0~20 min, 80% A; 20~25 min, 80%~20% A; 25~35 min,

收稿日期: 2010-12-14

作者简介: 吴平平 (1986—), 女, 海南省儋州市人, 硕士研究生, 主要从事药物制剂方面研究。Tel: 13902152901 E-mail: wumuping@126.com

*通讯作者 王春龙 Tel: (022)23003212 E-mail: dds-wcl@vip.sina.com

20% A; 35~40 min, 20%~80% A; 其余色谱条件同等度洗脱法。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取绿原酸对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇溶解并稀释制成 5 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液, 并于 10 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 取小儿感冒颗粒细粉约 5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入 50% 甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 5 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 阴性对照液的制备 取缺菊花的处方药, 按制备工艺制备成阴性对照颗粒剂, 按供试品溶液的制备方法制备阴性对照液。

2.3 测定方法的选择

分别采用等度洗脱法和梯度洗脱法测定供试品溶液, 色谱图见图 1。采用等度洗脱法, 绿原酸峰与相邻杂质峰均能达到很好的分离 (R 均大于 1.5), 但样品在进样约 150 min 时仍有较大的吸收峰, 测定时间较长。为了达到准确、简便、快速测定绿原酸的目的, 选择 HPLC 梯度洗脱法测定小儿感冒颗粒中绿原酸。

2.4 梯度洗脱方法学考察

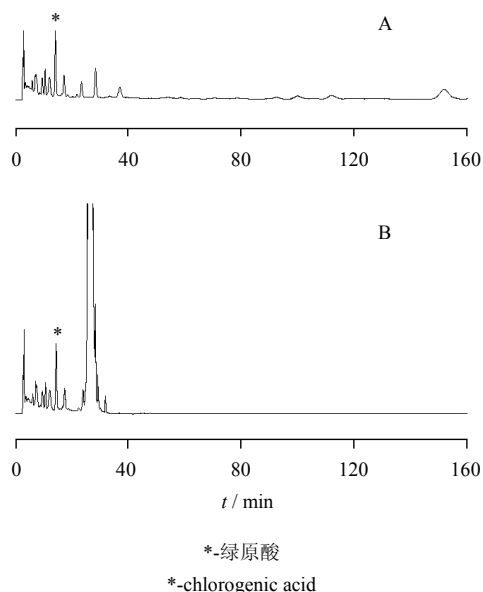


图 1 等度洗脱 (A) 和梯度洗脱 (B) 供试品的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of sample used in isocratic elution (A) and gradient elution (B)

2.4.1 专属性试验 将阴性对照液、对照品溶液、供试品溶液分别进样测定, 记录色谱图 (图 2)。可知样品中绿原酸与其他成分能完全分离 ($R > 1.5$), 且阴性对照无干扰。

2.4.2 线性关系考察 称取绿原酸对照品约 5 mg,

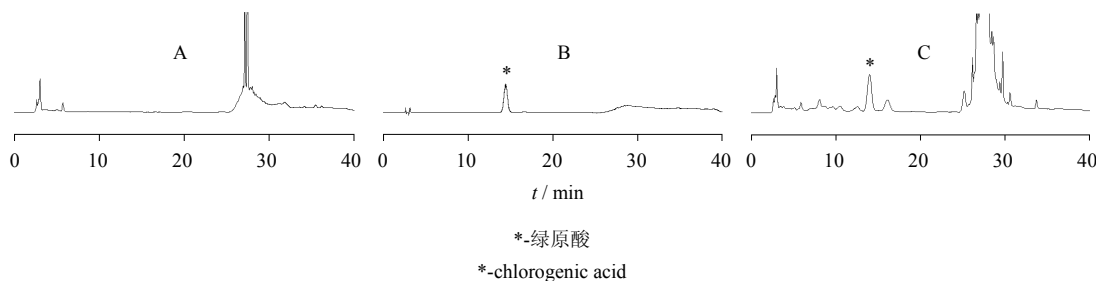


图 2 阴性对照 (A)、对照品 (B)、供试品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of negative sample (A), reference substance (B), and sample (C)

精密称定, 置 50 mL 棕色量瓶中, 加 50% 甲醇溶解定容, 得对照品储备液。分别移取 0.2、0.6、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 储备液置 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 依次进样测定, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y = 77\,256X + 4\,607.3$, $r = 0.999\,9$, 表明绿原酸在 2.02~25.25 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.4.3 精密度试验 取批号 080701 的供试品溶液, 连续进样测定 6 次, 记录峰面积, 计算得绿原酸峰

面积的 RSD 为 0.81%。

2.4.4 稳定性试验 取批号 080701 的供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8 h 进样测定, 记录峰面积, 计算得绿原酸峰面积的 RSD 为 1.14%。表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.4.5 重现性试验 取批号 080701 的样品 6 份, 制备供试品溶液, 分别进样测定, 记录峰面积, 计算得绿原酸质量分数的 RSD 为 1.00%。

2.4.6 加样回收率试验 取批号 080701 的小儿感

冒颗粒适量,研细后,取2.5 g细粉9份,精密称定,分别加入0.75、1.10、1.30 mg绿原酸对照品,制备供试品溶液,分别进样测定,计算得绿原酸平均加样回收率为99.83%,RSD为1.15%。

2.5 2种方法的样品测定结果

分别取3批样品制备供试品溶液,各采用等度洗脱和梯度洗脱法进行测定,连续进样测定3批样品,每批测定3次,结果见表1。

表1 样品测定结果 ($n=3$)
Table 1 Determination of samples ($n=3$)

批号	梯度法		等度法	
	绿原酸/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	测定时间/ min	绿原酸/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	测定时间/ min
080701	0.382		0.376	
080702	0.380	40	0.373	160
080703	0.378		0.381	

3 讨论

3.1 测定方法的选择

根据参考文献报道方法^[8],供试品溶液在进样40 min后(约100、110、150 min)仍有较大吸收峰,原因可能是小儿感冒颗粒为复方制剂,成分较多,一些极性相对较低的成分在色谱柱上的吸附较强难以被洗脱,若进样时间设置为40 min,极性较低成分会干扰连续进样的测定结果。参照《中国药典》2010年版菊花中绿原酸测定的梯度法,40 min时供试品溶液非极性成分未被洗脱;采用梯度洗脱程序^[9-12],分别以甲醇-0.4%磷酸溶液、甲醇-0.5%冰醋酸、乙腈-2%冰醋酸、甲醇-水-乙酸进行梯度洗脱,小儿感冒颗粒中绿原酸不能完全分离或程序时间(40 min)内洗脱不完全。本实验在等度洗脱的基础上,通过改变洗脱过程中流动相各溶剂组成的比例,使测定方法简便、快速,降低了成本,同时又能准确测定绿原酸的含量。

3.2 提取工艺考察

考察超声与回流对菊花中绿原酸提取效率的影响时,分别回流提取2 h和超声30 min,测得绿原酸的量分别为0.400、0.388 mg/g,两种方法的提取效率相当。但由于回流操作繁琐费时,误差较大,因此选择超声提取,方法简便,且易于重复操作。绿原酸为极性较强的有机酸,易溶于水和甲醇^[7],分别考察纯水、30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、甲

醇作为溶剂对绿原酸提取效率的影响,结果测得绿原酸的量分别为0.384、0.383、0.388、0.250、0.283 mg/g。当甲醇比例大于50%时,提取不完全;甲醇比例小于50%时,提取效果相当,但随着水相比例的增加,提取液中水溶性成分增多而使得测定变得麻烦,故选择50%甲醇作为提取溶剂。

3.3 水相pH值的考察

配制0.1 mol/L磷酸二氢钠-磷酸调整pH值分别为3.30、3.35、3.40、3.45、3.50,考察不同pH值条件下样品中绿原酸的分离情况。结果表明pH值对绿原酸与相邻后峰的分离度无明显影响,都能达到完全分离($R>1.5$);对绿原酸与相邻前峰的分离影响较大, R 值分别为0.98、1.90、1.53、1.84、1.06,可知水相pH值在3.35~3.45分离效果较好,因此选择水相pH值为3.40。

参考文献

- [1] 熊印华,曹玉秀,王晶,等. HPLC法测定小儿感冒颗粒中靛蓝[J]. 中草药,2006,37(6): 862-863.
- [2] 彭文进,赵士治,冯秀珍,等. 高效液相色谱法测定小儿感冒颗粒中靛蓝与靛玉红含量[J]. 中国现代药物应用,2009,3(6): 1-2.
- [3] 冯家龙. 高效液相色谱法测定小儿感冒颗粒中靛玉红含量[J]. 药物鉴定,2010,19(8): 39.
- [4] 张锦,毛庆,郑小平,等. RP-HPLC法测定小儿感冒颗粒中连翘苷的含量[J]. 药物分析杂志,2007,27(7): 1065-1067.
- [5] 崔俊凤,张军华,傅勇. HPLC法测定小儿感冒颗粒中连翘苷的含量[J]. 中国药事,2008,22(1): 59-60.
- [6] 国家药监局安全监管司. 国家基本药物(中成药)[M]. 北京: 人民卫生出版社,2002.
- [7] 王辉,田呈瑞,马守磊,等. 绿原酸的研究进展[J]. 食品工业科技,2009,30(5): 341-345.
- [8] 田雅琴. HPLC法测定小儿感冒颗粒中绿原酸及连翘苷含量[J]. 中成药,2009,31(12): 1965-1967.
- [9] 赵容,王栋. HPLC梯度洗脱法测定双黄连片中黄芩苷和绿原酸的含量[J]. 黑龙江医药,2010,23(6): 874-876.
- [10] 褚文静,张雪,王伟,等. 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[J]. 中草药,2010,41(1): 66-68.
- [11] 池玉梅,崔小兵,陈维,等. HPLC双波长梯度洗脱同时测定通塞脉微丸中绿原酸、阿魏酸、甘草苷的含量[J]. 中国药理学杂志,2007,42(17): 1348-1350.
- [12] 孙晓东,王文辉,杨俊,等. 高效液相梯度洗脱法测定银黄含片中黄芩苷、绿原酸和芦丁[J]. 光谱实验室,2010,27(4): 1282-1285.