

UPLC 法同时测定胆木注射液中原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸

朱粉霞¹, 贾晓斌^{1*}, 李秀峰², 王静静¹, 郑红毅¹

1. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药口服释药系统重点研究室, 江苏 南京 210028

2. 海南制药厂有限公司 黎药工程中心, 海南 五指山 572200

摘要: 目的 建立同时测定胆木注射液中原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸的方法。方法 采用 UPLC 法, 色谱柱 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为甲醇 (A)-0.1%乙酸水溶液 (B), 梯度洗脱; 检测波长为 260 nm (原儿茶酸) 和 325 nm (新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸); 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 35 °C。结果 原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸分别在 3.984~159.400、1.440~57.600、1.204~48.160、1.056~42.240 μg/mL 内具有良好的线性关系; 平均回收率分别 98.66%、96.76%、101.1%、103.6%。结论 UPLC 分离效果及重复性好, 且快速、准确, 可作为胆木注射液的质量控制方法。

关键词: 胆木注射液; 原儿茶酸; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; UPLC

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)05-0571-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.05.014

Simultaneous determination of protocatechuic acid, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, and cryptochlorogenic acid in Danmu Injection by UPLC

ZHU Fen-xia¹, JIA Xiao-bin¹, LI Xiu-feng², WANG Jing-jing¹, ZHENG Hong-yi¹

1. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. Engineering Center for Li Nationality Medicine, Hainan Pharmaceutical Factory, Co., Ltd., Wuzhishan 572200, China

Key words: Danmu Injection; protocatechuic acid; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; UPLC

胆木注射液是由胆木单味药材开发研制而成的中药注射剂, 临床常用于治疗上呼吸道感染、支气管炎、急性扁桃体炎及咽喉炎等症。胆木药材为茜草科乌檀属植物, 是黎族医学常用植物药, 收载于《黎族医药》^[1], 其主要含有生物碱^[2-5], 为胆木注射液发挥疗效的药效组分。本课题组对胆木注射液中间体的化学成分进行系统研究, 发现原儿茶酸的量很高, 且从中鉴定出新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸等酚酸类物质, 这类化合物被证实具有良好抗氧化、抗炎、抗微生物等生物活性^[6-7], 很可能是胆木注射液发挥临床疗效的重要药效组分。

目前对胆木药材和胆木注射液的质量控制研究仅见生物碱异长春花苷内酰胺的定量测定^[8-9], 本实验选择了具有一定抗炎抗菌作用的酚酸类化合物作

为质量控制指标进行定量测定, 结果表明, 所建立的方法专属性强, 准确、快速, 可为全面控制胆木注射液质量提供新的分析手段, 并为胆木注射液的再评价提供新的研究思路。

1 仪器与试剂

Acquity UPLC (美国 Waters 公司, 包括二元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Empower 2 色谱工作站); Mettler Toledo AB135—S 分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); Milli—Q 超纯水机 (美国 Millipore 公司)。原儿茶酸 (批号 110809) 和绿原酸 (批号 110753) 对照品 (中国药品生物制品检定所), 新绿原酸 (批号 N100620) 和隐绿原酸 (批号 C100616) 购自成都普瑞科技发展有限公司; 甲醇 (色谱纯, 德国 Merck

收稿日期: 2012-06-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81203001)

作者简介: 朱粉霞 (1977—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为中药分析。Tel: (025)85608672 15850583116 E-mail: zfxjq@126.com

*通信作者 贾晓斌 Tel: (025)85608672 E-mail: xiaobin_jia_nj@126.com

网络出版时间: 2013-02-22 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130222.1655.007.html>

公司); 乙酸 (色谱纯, 美国 Tedia 公司); 胆木注射液 (批号 100101、100102、100201、100701), 海南制药厂有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精确称取原儿茶酸 9.96 mg、新绿原酸 2.40 mg、绿原酸 3.01 mg 和隐绿原酸 1.76 mg, 分别置 10 mL 棕色量瓶中, 以适量甲醇溶解, 以超纯水稀释至刻度, 制得对照品储备液, 其质量浓度分别为: 原儿茶酸 0.996 mg/mL, 新绿原酸 0.240 mg/mL、绿原酸 0.301 mg/mL 和隐绿原酸 0.176 mg/mL。

2.2 供试品溶液制备

量取胆木注射液 1.0 mL (2 mL/支) 于 10 mL

量瓶中, 以超纯水定容, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 滤液作为供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为甲醇 (A)-0.1% 乙酸水溶液 (B), 梯度洗脱, 0~2 min, 3%~5% A, 2~5 min, 5%~6% A, 5~12 min, 6%~8% A; 检测波长: 260 nm (原儿茶酸) 和 325 nm (新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸); 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 5 μL 。在上述色谱条件下, 对照品及胆木注射液样品 UPLC 色谱图见图 1。

2.4 线性关系、检测限 (LOD) 及定量限 (LOQ)

取“2.1”项下各对照品储备液, 配制成含原儿

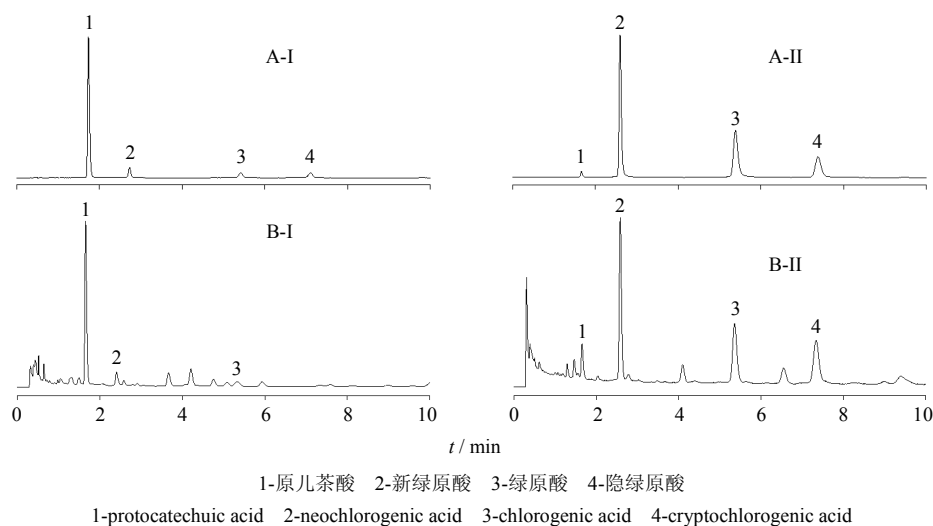


图 1 对照品 (A) 和样品 (B) 在 260 nm (I) 和 325 nm (II) 的 UPLC-DAD 图

Fig. 1 UPLC-DAD chromatograms of reference substance (A) and sample (B) determined at 260 (I) and 325 nm (II)

茶酸、新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸的质量浓度分别为 159.36、57.60、48.16、42.24 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液, 以超纯水稀释, 稀释倍数分别为 2、4、8、10、20、40, 得到系列对照品溶液。原儿茶酸的质量浓度依次为 79.680、39.340、19.920、15.940、7.970、3.984 $\mu\text{g/mL}$; 新绿原酸的质量浓度依次为 28.800、14.400、7.200、5.760、2.880、1.440 $\mu\text{g/mL}$;

绿原酸的质量浓度依次为 24.080、12.040、6.020、4.820、2.410、1.204 $\mu\text{g/mL}$; 隐绿原酸的质量浓度依次为 21.120、10.560、5.280、4.220、2.110、1.056 $\mu\text{g/mL}$, 过 0.22 μm 微孔滤膜后, 依前述色谱条件进样。以峰面积积分值 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归, 得到各成分的回归方程、相关系数和线性范围, 见表 1。

表 1 原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸的回归方程、LOD 和 LOQ

Table 1 Linear regression equations, LOD, and LOQ for protocatechuic acid, neochlorogenic acid, chlorogenic acids, and cryptochlorogenic acid

化合物	回归方程	线性范围 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	r	LOD / ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ / ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
原儿茶酸	$Y=50\ 881 X+57\ 225$	3.984~159.400	0.999 8	12.01	41.01
新绿原酸	$Y=21\ 725 X+26\ 303$	1.440~57.600	0.999 6	32.02	89.09
绿原酸	$Y=17\ 497 X+16\ 809$	1.204~48.160	1.000 0	36.11	93.12
隐绿原酸	$Y=24\ 349 X+15\ 989$	1.056~42.240	0.999 5	22.81	96.10

将混合对照品以超纯水不断稀释后分析,得到4种成分的检测限(LOD, $S/N \approx 3 \sim 4$)和定量限(LOQ, $S/N \approx 10 \sim 12$),结果见表1。

2.5 精密度试验

取同一份供试品溶液(批号100102),在相同色谱条件下连续进样6次,测定各色谱峰的峰面积,计算RSD。4种成分的RSD分别为0.87%、1.24%、1.12%、1.09%,表明方法精密度良好。

2.6 稳定性试验

取供试品溶液(批号100102),于0、2、4、6、7 h进样5 μL ,测定各色谱峰的峰面积,计算RSD,4种成分的RSD分别为1.10%、1.31%、1.22%、1.30%,表明供试品溶液中4种成分在7 h内稳定。

2.7 重复性试验

取6支胆木注射液(每支2 mL,批号100102),混匀,按“2.2”项下制备6份供试品溶液,进行重复性试验。测定各色谱峰的峰面积,计算RSD,4种成分的RSD分别为2.25%、1.72%、0.78%、1.27%,表明方法的重复性好。

2.8 加样回收率试验

取“2.1”项下各对照品储备液,配制成含原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸的质量浓度依次为199.2、96.0、90.3、52.8 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液,分别精密量取混合对照品溶液1.0 mL和已知质量分数的供试品(批号100102)1.0 mL 6份,置10 mL量瓶中,以超纯水定容,制备6份加样回收样品。按上述色谱条件测定,分别计算回收率。原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸的平均回收率分别为98.66%、96.76%、101.1%、103.6%,RSD分别为1.74%、3.57%、2.40%、2.67%。

2.9 样品测定

分别取4个不同批号的胆木注射液按“2.2”项下方法操作,按上述色谱条件进样分析,以外标法计算,测定结果见表2。

表2 胆木注射液中4种成分的测定

Table 2 Determination of four components in Danmu Injection

批号	质量浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)			
	原儿茶酸	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸
100101	233.5	65.9	63.1	34.2
100102	210.6	114.7	119.9	59.7
100201	238.5	67.3	63.3	34.6
100701	193.3	155.0	153.0	83.6

3 讨论

经二极管阵列检测器对4种成分进行全波长扫描,原儿茶酸最大吸收波长为260 nm,新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸最大吸收波长为325 nm,本实验采用两个检测波长测定4种酚酸类化合物,即260 nm下测定原儿茶酸,325 nm下测定新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸。

本实验首次利用UPLC-PDA法对胆木注射液中的原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸进行同时测定,分析方法灵敏、准确、快速,分析效率高,12 min内即可同时完成4种成分的准确测定,溶剂消耗少,UPLC作为一种新的色谱技术应用于中药材及其制剂质量控制有着非常广阔的前景。

4批胆木注射液样品中的绿原酸类化合物测定结果差异较大,分析其原因可能有两方面,一是绿原酸类化合物本身不稳定;二是胆木药材中绿原酸类化合物的量差异较大,导致成品中的量差异较大,需要进一步考察。

胆木注射液的临床疗效主要是抗炎作用,其主要含生物碱成分,而具有一定抗炎作用的酚酸类成分的定量测定未见报道,本实验可为全面控制胆木注射液质量提供新的分析手段,并为进一步研究胆木注射液的药理药效提供实验依据,为胆木注射液的再评价提供新的思路。

参考文献

- [1] 钟捷东. 黎族医药 [M]. 海南: 海南出版社, 2008.
- [2] 宣伟东. 中药胆木和云南狗牙花活性成分研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2005.
- [3] 孙敬勇. 胆木和山香圆化学成分及其生物活性研究 [D]. 济南: 山东大学, 2008.
- [4] 胡欣. 乌檀化学成分分离分析与相关成分活性、药理学研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2009.
- [5] 陶佳颐, 戴胜军, 刘军锋, 等. 胆木化学成分的研究 [J]. 中草药, 2007, 38(8): 1155-1156.
- [6] T W 古德温, E I 默塞尔. 植物生物化学导论 [M]. 西北农业大学植物生理生化教研室, 译. 杨陵: 天则出版社, 1988.
- [7] 张鞍灵, 马琼, 高锦明. 绿原酸及其类似物与生物活性 [J]. 中草药, 2001, 32(2): 173-176.
- [8] 张俊清, 毛彩霓, 杨卫丽, 等. 胆木不同部位异长春花苷内酰胺的含量研究 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(10): 1654-1657.
- [9] 李明慧, 丁岗, 沈鸣, 等. 胆木及其制剂中异长春花苷内酰胺的分离鉴定和含量测定 [J]. 中国天然药物, 2006, 4(2): 104-106.