

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.13.005

高效液相色谱法测定清热解毒分散片中绿原酸含量

吴建明,丁京伟,赵 准[△],朱 婷,叶志学,沈汉福,沈彩虹

(浙江维康药业股份有限公司,浙江 丽水 323000)

摘要:目的 建立测定清热解毒分散片中绿原酸含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Agilent SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.4%磷酸(10:90),流速为 1 mL/min,检测波长为 327 nm。结果 绿原酸进样量在 0.14~0.98 μg 范围内与峰面积线性关系良好, $r=0.9999$ ($n=6$),平均回收率为 97.71%, RSD 为 1.37% ($n=6$)。结论 该方法简便、结果准确、重复性好,可用作清热解毒分散片的质量控制方法。

关键词: 高效液相色谱法;清热解毒分散片;绿原酸;质量控制

中图分类号:R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)13-0015-03

Content Determination of Chlorogenic Acid in Qingre Jiedu Dispersible Tablets

Wu Jianming, Ding Jingwei, Zhao Zhun, Zhu Ting, Ye Zhixue, Shen Hanfu, Shen Caihong

(Zhejiang Wecome Pharmaceutical Company Limited, Lishui, Zhejiang, China 323000)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for content determination of chlorogenic acid in Qingre Jiedu Dispersible Tablets.

Methods The Agilent SB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted with the mobile phase of acetonitrile-0.4% phosphoric acid (10:90), the flow rate was 1 mL/min, and the detection wavelength was 327 nm. **Results** Chlorogenic acid showed the linear relationship within the range of 0.14-0.98 μg, $r=0.9999$ ($n=6$), the average recovery was 97.71%, RSD=1.37% ($n=6$).

Conclusion The method is simple, specific, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Qingre Jiedu Dispersible Tablets.

Key words: HPLC; Qingre Jiedu Dispersible Tablets; chlorogenic acid; quality control

清热解毒分散片为复方中成药,其配方起源于清热解毒片,由生石膏、金银花、玄参、地黄、连翘、栀子、甜地

丁、黄芩、龙胆、板蓝根、知母、麦冬 12 味中药组方,功能主治为清热解毒,用于治疗流感、上呼吸道感染及各种

第一作者:吴建明,男,大学本科,工程师,研究方向为生物化学及微生物学,(电话)0578-2950555(电子信箱)985978031@qq.com。

[△]通信作者:赵准,女,大学本科,工程师,研究方向为药理学,(电话)0578-2950000(电子信箱)974925292@qq.com。

- Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(34): 12159-12164.
- [7] 魏 伟,方 玲,王 柠,等. 福建汉族氯吡格雷药物代谢相关基因 CYP2C19 的多态性分布研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2012, 29(4): 420-425.
- [8] 张冬青,王海滨,刘 森,等. CYP2C19、ALDH2 和 MTHFR 基因多态性与冠心病的相关性研究[J]. 标记免疫分析与临床, 2015, 22(3): 207-210.
- [9] 孟 帅,李 红,金泽宁. 支架内血栓与 CYP2C19*2, CYP2C19*3 基因多态性的相关性研究[J]. 中国医药导报, 2016, 13(23): 79-82.
- [10] Akasaka T, Hokimoto S, Sueta D. Gender differences in the impact of cyp2c19 polymorphisms and low-grade inflammation on coronary microvascular disorder[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016, 310(11): 1494-1500.
- [11] Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, et al. Genetic determinants of response to dipyridol and cardiovascular events[J]. N Engl J Med, 2009, 360(4): 363-375.
- [12] Gladding P, White H, Voss J, et al. Pharmacogenetic testing for clopidogrel using the rapid IFINITI analyzer: a dose-escalation study[J]. JACC Cardiovasc Interv, 2009, 2(11): 1095-1101.
- [13] 冯端浩,刘 震,赵冠人,等. 依据 CYP2C19 基因型调整首次 PCI 术后患者氯吡格雷给药剂量初步研究[J]. 解放军药学报, 2012, 28(6): 487-490.
- [14] 王 红,李瑜元,聂玉强,等. 广州地区肝酶 CYP2C19 基型人群调查[J]. 广东医学, 2004, 25(10): 1204-1206.
- [15] 张莉蓉,张 伟,阴振坤,等. 河南地区汉族人群药物代谢酶 CYP2C19, NAT2 和 TPMT 基因多态性分析(英文)[J]. 中国新药与临床杂志, 2006, 25(8): 561-566.
- [16] 简 斌,张 涛,肖俊会,等. 云南汉族人群 CYP2C19 基因多态性分析[J]. 昆明医科大学学报, 2015, 36(11): 17-19.
- [17] 郭 涛,左金梁,夏东亚,等. 中国汉族和回族药物代谢酶细胞色素 P450(CYP) 3A4, CYP2C9, CYP2C19 及 CYP2D6 基因多态性分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2012, 28(4): 281-284.
- [18] 秦延海,古丽扎尔·买买提明,帕丽达·阿不来提. 维吾尔族,哈萨克族,汉族人群 CYP2C19 基因多态性分析[J]. 重庆医学, 2015, 44(33): 4632-4634.
- [19] 张兴华,郑连斌,宇克莉,等. 闽南人的体质特征[J]. 人类学学报, 2015, 34(4): 516-527.

(收稿日期:2017-12-09;修回日期:2018-01-17)

发热性疾病^[1]。分散片是指在水中能迅速崩解并均匀分散的片剂^[2],中药分散片同时具备液体制剂和固体剂型的独特优势,分散度大,溶出迅速,生物利用度高,服用方式多样化,制备方法简单易行,是一种应用前景广阔的中药口服新剂型^[3]。金银花为方中君药,具有清热解毒、疏散风热之功效。绿原酸类化合物如绿原酸和异绿原酸是金银花的主要有效成分,绿原酸为其主要活性成分之一^[4]。本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法测定金银花中绿原酸含量,进一步对清热解毒分散片进行质量控制^{[5][22]}。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪,包括 G1311A 泵、G1329A 进样器、G1314B 检测器、G1316A 柱温箱(美国安捷伦公司);BS124S 型电子分析天平(检测精度为 0.1%,德国赛多利斯股份有限公司);KQ-500DB 型超声波清洗器(功率为 500 W,昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,质量分数以 99.3% 计,批号为 110753-201716);清热解毒分散片(浙江维康药业股份有限公司,批号分别为 B161201, B161202, B161203);甲醇(色谱纯,批号为 164488,纯度为 99.9%),乙腈(色谱纯,批号为 1606018,纯度为 99.9%),均购于赛默飞世尔科技有限公司;甲醇(分析纯,批号为 20151216,国药集团化学试剂有限公司,纯度不低于 99.5%);水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱:Agilent SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.4% 磷酸(10:90);柱温:30℃;检测波长:327 nm;流速:1 mL/min。理论板数按绿原酸峰计算应不低于 3 000。

2.2 溶液制备

对照品溶液:取绿原酸对照品适量,精密称定,加 50% 甲醇制成每 1 mL 含 80 μg 的溶液,即得。

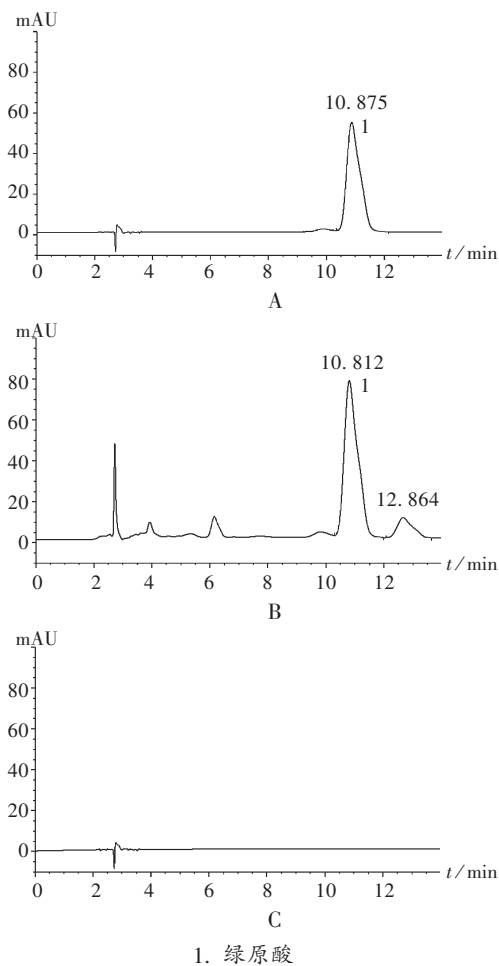
供试品溶液:取本品 10 片,除去包衣,精密称定,研细,取 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 50 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,弃初滤液,取续滤液,再用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

阴性对照品溶液:取按样品制备工艺制备的缺金银花阴性样品,按供试品溶液制备方法制备,即得。

2.3 方法学考察

专属性试验:取 2.2 项下 3 种溶液各 10 μL,进样测定。结果阴性对照品溶液在对照品溶液及供试品溶液

色谱峰相应位置无绿原酸峰出现,阴性对照无干扰,表明专属性良好。色谱图见图 1。



1. 绿原酸
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液
图 1 高效液相色谱图

线性关系考察:取绿原酸对照品适量,精密称定,加 50% 甲醇制成每 1 mL 含绿原酸 0.07 mg 的溶液,摇匀,作为对照品溶液,分别精密吸取对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 14 μL,按拟订色谱条件进行分析,测定峰面积。以进样量(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 2 \times 10^6 X - 10\,383$, $r = 0.999\,9$ ($n = 6$)。结果表明,绿原酸进样量在 0.14~0.98 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取同一对照品溶液,连续进样 5 次。结果绿原酸面积的 RSD 为 0.29% ($n = 5$),表明仪器精密程度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于 0, 4, 8, 12, 16 h 时进样测定。结果绿原酸含量的 RSD 为 0.28% ($n = 5$),表明供试品溶液在 16 h 内稳定。

重复性试验:取同一批(批号为 B161201)样品 5 份,依法制备供试品溶液,进样测定。结果绿原酸平均含量为每片 1.55 mg, RSD 为 1.60% ($n = 5$),表明方法重复

性良好。

加样回收试验:精密称取6份已知含量的样品(批号为B161201)约0.5 g,分别加入绿原酸对照品溶液0.8,1.0,1.2 mL,依法制备供试品溶液,进样测定,计算回收率。结果见表1。

表1 绿原酸加样回收试验结果($n=6$)

取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.5013	1.554	1.376	2.900	97.82	97.71	1.37
0.4987	1.546	1.376	2.906	98.84		
0.5028	1.559	1.720	3.208	95.87		
0.5054	1.567	1.720	3.222	96.22		
0.5007	1.552	2.064	3.591	98.79		
0.4996	1.549	2.064	3.586	98.69		

2.4 样品含量测定

取清热解毒分散片3批,依法检测。结果批号分别为B161201,B161202,B161203的3批样品中绿原酸含量分别为每片1.55,1.57,1.64 mg。

3 讨论

3.1 色谱柱选择

曾选择3种不同厂家的色谱柱 Agilent SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),YMC-ODS 分析柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),Phenomenex-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),考察了方法的耐用性,分离度、理论板数均能满足系统适用性试验的要求。综合对称因子等各种因素,选择 Agilent SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)为色谱柱。

3.2 检测波长选择

对绿原酸进行紫外扫描(200~600 nm),发现绿原酸在327 nm波长处有最大吸收,且吸收强度适宜,其他组分响应值相对较小,结合文献[6-7],选择327 nm作为检测波长。

3.3 流动相选择

绿原酸为含有羟基和邻二酚羟基的强极性有机酸^[8],溶于水后有部分解离,容易发生主峰拖尾、重复性差等现象,因此需在流动相中加入一定比例的酸,能抑制酸解离,有助于提高主峰与干扰峰的分离度,改善峰形^[9-10]。试验选用甲醇-水-甲酸(30:70:0.2)和乙腈-0.4%磷酸(10:90)为流动相,对流动相不同组分和比例进行调节,让其能排除其他成分的干扰,绿原酸保留时间和峰形都适宜,最后选定流动相为乙腈-0.4%磷酸(10:90)。

3.4 提取溶剂选择

绿原酸易溶于醇、水,难溶于氯仿、乙醚。试验分别考察乙醇、甲醇、50%甲醇提取溶剂,超声提取、加热回流提取方法及20,30,40 min超声提取时间对结果的影响,结果30 min后测定值达到稳定值,超声提取和回流

提取所提取出的绿原酸含量结果非常接近,但超声提取比回流提取更简便快捷。由于样品溶液中成分相对复杂,用50%甲醇方法提取效果较好,提取比较完全,而且杂质峰相对较少。故基于操作简便等各方面考虑,以50%甲醇为提取溶剂,超声处理30 min即可^[11-12]。

3.5 质控指标选择

清热解毒分散片是一种新型现代化中药剂型,2015年版《中国药典(一部)》收载了清热解毒口服液和清热解毒片,清热解毒口服液质量标准对黄芩苷进行了含量测定^[5]^[552],清热解毒片质量标准对黄芩苷和栀子苷2种成分进行了含量测定^[5]^[553],但未对组方中的其他组分进行含量测定。考虑到清热解毒分散片方中金银花的用量和功效远远高于黄芩和栀子,绿原酸为金银花中的主要活性成分之一,对绿原酸含量的测定能直接反映药品质量,确保疗效,控制产品质量。且不同厂家生产的品种中绿原酸的含量会存在一定差异,故本试验以绿原酸为质控指标^[13-15]。

参考文献:

- [1] WS₃-B-3996-98,卫生部药品标准·中药成方制剂(第二十册)[S].
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:通则0100.
- [3] 代玉玲,普俊学,廖荣,等. 中药分散片与其他中药口服制剂特点比较[J]. 中国民族民间医药,2017,26(8):63-65.
- [4] 杨詹詹,鲁道旺,卢忠英. 传统中药金银花的药理作用研究进展[J]. 广州化工,2016,44(20):18-19.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [6] 陈乃江,张宏. HPLC测定清热解毒片中绿原酸的含量[J]. 首都医药,2008(16):52.
- [7] 文志云,陆国寿. 清热解毒颗粒中绿原酸的含量测定[J]. 医学文选,2005,24(6):892-894.
- [8] 卢卫平,胡耿. 清热解毒片中绿原酸含量的HPLC测定[J]. 江西中医药,2008,39(12):78.
- [9] 李欣荣,曹志胜,柏茗. 中药制剂中绿原酸测定样品预处理方法研究[J]. 中国中药杂志,1997,22(4):220-221.
- [10] 郑佰平. HPLC测定清热解毒口服液中绿原酸含量[J]. 科技论坛,2011(30):30.
- [11] 陈通,陈勇,刘瑛丽,等. 清热解毒颗粒的质量标准研究[J]. 实用临床医药杂志,2008,12(7):51-57.
- [12] 刘志荣,李安平,杨锡,等. 清热解毒胶囊质量研究[J]. 分析仪器,2007(3):88-94.
- [13] 袁梦哲,李绍峰. HPLC法测定清热解毒口服液中绿原酸的含量[J]. 数理医药学杂志,2011,24(1):91-92.
- [14] 张贞良,高毅,范积平,等. 清热解毒胶囊的质量标准研究[J]. 中药材,2007,30(11):1472-1473.
- [15] 教书华,顾鹏飞. 高效液相色谱法测定清热解毒口服液中绿原酸含量[J]. 医药导报,2007,26(5):553-554.

(收稿日期:2017-12-28;修回日期:2018-03-28)