

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.05.015

高效液相色谱法测定枇杷叶膏中绿原酸含量

辜俊鑫¹, 辜瑜², 张学霞¹, 魏晓玲¹, 王成琼¹, 曾容¹, 谯春燕¹

(1. 北京同仁堂科技发展成都有限公司, 四川 成都 610100; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要:目的 建立测定枇杷叶膏中绿原酸含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱采用 Amethyst C₁₈-H 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.4% 磷酸溶液(10:90), 检测波长为 327 nm, 柱温为 30 ℃, 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 10 μL。结果 绿原酸的进样量在 0.204 955 2~0.717 343 2 μg 范围内与峰面积线性关系良好, $r=0.999\ 9$ ($n=6$); 平均回收率为 92.46%, RSD 为 2.10% ($n=6$)。结论 该方法简便、准确、可靠, 可用于枇杷叶膏的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 枇杷叶膏; 绿原酸; 含量测定

中图分类号: R932; R284.2; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)05-0043-03

Content Determination of Chlorogenic Acid in Pipaye Ointment by HPLC

GU Junxin¹, GU Yu², ZHANG Xuexia¹, WEI Xiaoling¹, WANG Chengqiong¹, ZENG Rong¹, QIAO Chunyan¹

(1. Beijing Tongrentang Technologies Chengdu Co., Ltd., Chengdu, Sichuan, China 610100; 2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China 201203)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for content determination of chlorogenic acid in Pipaye Ointment. **Methods** The chromatographic column was Amethyst C₁₈-H column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.4% phosphoric acid solution(10:90), the detection wavelength was 327 nm, the column temperature was 30 ℃, the flow rate was 1.0 mL/min, and the sample size was 10 μL. **Results** The chlorogenic acid showed a good relationship within the range of 0.204 955 2-0.717 343 2 μg, $r=0.999\ 9$ ($n=6$), the average recovery rate was 92.46%, RSD was 2.10% ($n=6$). **Conclusion** The method is simple, accurate, reliable, which can be used for quality control of Pipaye Ointment.

Key words: HPLC; Pipaye Ointment; chlorogenic acid; content determination

枇杷叶膏收载于 2015 年版《中国药典(一部)》,由 枇杷叶经水煮浓缩加炼蜜或蔗糖溶化,再浓缩到规定的

第一作者: 辜俊鑫,男,大学本科,工程师,研究方向为药物质量控制、中药提取物及单体开发,(电话)028-62413851(电子信箱)1521951498@qq.com。

维持在 60~70/40~50 mmHg,但神志仍不清楚,立即请重症医学科、麻醉科会诊,1:15 给予气管插管,简易呼吸器辅助呼吸,再次静脉注射肾上腺素 1 mg,1:25 心电监护仍示等电线,1:30 心电监护示心室颤动,予 200 J 双相波电除颤 1 次,1:35 心电监护仍显示心室颤动,复给 200 J 电除颤 1 次,之后间断给予肾上腺素 1 mg、异丙肾上腺素 1 mg 等,经抢救至 1:50 心跳、呼吸仍无法恢复,双侧瞳孔散大固定,对光反射消失,宣布死亡。

2 讨论

胺碘酮是Ⅲ类抗心律失常药,可治疗多种房性和室性心律失常,尤其适用于器质性心脏病、心功能不全、急性冠状动脉综合征(ACS)患者的抗心律失常治疗。胺碘酮不良反应主要为肝损害、肺纤维化、甲状腺功能亢进或减退、静脉炎等^[1],而过敏性休克非常罕见^[2]。胺碘酮引起过敏反应的机制尚不明确,可能为胺碘酮属于含碘化合物,可引起嗜酸性粒细胞及肥大细胞脱颗粒,释放组胺、5-羟色胺等介质,从而引起过敏反应^[3]。此患者既往做过强化 CT,使用过含碘造影剂,未见过敏反应,此次过敏由胺碘酮中的碘导致可能性小。

此患者因胰及十二指肠切除术后房颤给予静脉泵

入胺碘酮治疗,用药约 2 min 时出现过敏性休克症状,立即停止给药。虽请重症医学科、麻醉科共同参与抢救,最终因抢救无效而死亡,患者未合并使用其他药物,故考虑过敏性休克很可能与胺碘酮有关。患者既往对注射用脂溶性维生素(Ⅱ)、雷尼替丁胶囊、丹参片过敏,推测属于过敏体质,此次仅使用胺碘酮出现过敏性休克并死亡可能与患者自身情况(如性别、年龄、免疫力下降、原患疾病及过敏体质)有关。提示临床医师对于此类过敏体质患者,应在用该药前防范过敏风险的发生,需详细询问患者既往用药情况及过敏史,用药过程中(特别是首次使用时)要密切观察患者的反应,若出现不适需提高警惕,及时停药,积极对症处理,并做好急救准备。

参考文献:

- [1] 高冠男,刘玉清,李一石,等. 189 例静脉注射胺碘酮不良反应分析[J]. 中国药物警戒,2014,11(11):679-682.
- [2] 高历男,赵迎,王欣越,等. 胺碘酮静脉滴注引起休克 2 例[J]. 药物不良反应杂志,2009,11(1):67-68.
- [3] 尹晓飞,姜静岩. 盐酸胺碘酮注射液致过敏性休克 1 例[J]. 解放军药学学报,2017,33(5):484.

(收稿日期:2018-11-12)

相对密度即得,具有清肺润燥、止咳化痰的功效。其质量标准中的检验项目有性状、相对密度、不溶物、装量及微生物限度,无成分的定量项,不能客观地反映产品的质量情况。为解决枇杷叶膏生产过程中的枇杷叶前处理和提取,并开发出用于提取车间申报的定量分析方法。前期分析了熊果酸、齐墩果酸^[1]、儿茶素、苦杏仁苷、槲皮素、山柰素^[2-3]和绿原酸^[4],发现有的成分含量太低,不适合定量分析,有的成分在不同药材中的重复性不好,时有时无,最终确定以绿原酸作为定量指标。本研究中采用高效液相色谱法测定枇杷叶膏中的绿原酸含量,作为其质量控制指标之一。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(安捷伦科技<中国>有限公司);T9S 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);MS205DU 型电子天平(梅特勒-托利多公司);AS10200B 型超声波处理器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 试剂

甲醇(分析纯,成都市科龙化工试剂厂);乙腈(色谱纯, Fisher 公司);磷酸(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);水为自制二次重蒸馏水;绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 110753-201716,含量为 99.3%);枇杷叶膏(市售品,批号分别为 17132754, 17132755, 17132756)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Amethyst C₁₈-H 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相: 乙腈-0.4% 磷酸溶液(10:90);检测波长: 327 nm;柱温: 30 °C;流速: 1.0 mL/min;进样量: 10 μL。在拟订色谱条件下绿原酸的分离度在 3.0 以上,对称因子为 1.02,理论板数以绿原酸峰计不低于 15 000。以峰面积外标法定量。色谱图见图 1。

2.2 溶液制备

称取枇杷叶膏 4.2 g,置 100 mL 容量瓶中,加入甲醇-水(50:50)约 80 mL,超声溶解 30 min,放冷至室

温,再用甲醇-水(50:50)定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。取绿原酸对照品适量,精密称定,加甲醇-水(50:50)制成每 1 mL 含 40 μg 的对照品溶液。按制备工艺方法制备不含枇杷叶的阴性样品,按上述试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

阴性干扰试验:分别取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液各适量,按拟订色谱条件各进样 10 μL 测定。记录色谱图。可见,供试品溶液色谱图中,在与对照品溶液相应位置处有相应色谱峰,阴性对照无干扰。

线性关系考察:取 10.32 mg 经五氧化二磷(P₂O₅)干燥 12 h 后的绿原酸对照品,精密称定,置 100 mL 容量瓶中,用甲醇-水(50:50)超声溶解并定容至刻度,作为绿原酸对照品贮备液。分别吸取绿原酸对照品贮备液 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 mL,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇-水(50:50)制成质量浓度分别为 20.495 52, 30.743 28, 40.991 04, 51.238 8, 61.486 56, 71.734 32 μg/mL 的溶液,按拟订色谱条件测定峰面积。以峰面积(Y)为纵坐标、绿原酸进样量(X)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 3149.4X + 8.1641$, $r = 0.9999$ ($n = 6$)。结果表明,绿原酸进样量在 0.204 955 2 ~ 0.717 343 2 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,精密吸取 10 μL,重复进样 6 次,测定峰面积。结果的 RSD 为 0.97% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批样品 6 份,依法制备供试品溶液并测定绿原酸含量。结果的 RSD 为 1.2% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,于室温条件下放置 10 h,每隔 2 h 进样 1 次,测定峰面积。结果的 RSD 为 0.83% ($n = 6$),表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

加样回收试验:取绿原酸对照品 10.65 mg,精密称定,置 100 mL 容量瓶中,用甲醇-水(50:50)超声溶解并定容至刻度,摇匀,作为对照品溶液(绿原酸质量浓度为 105.754 5 μg/mL);精密称取已知含量的样品(批号为 17132754)适量,共 6 份,分别加入上述对照品溶液

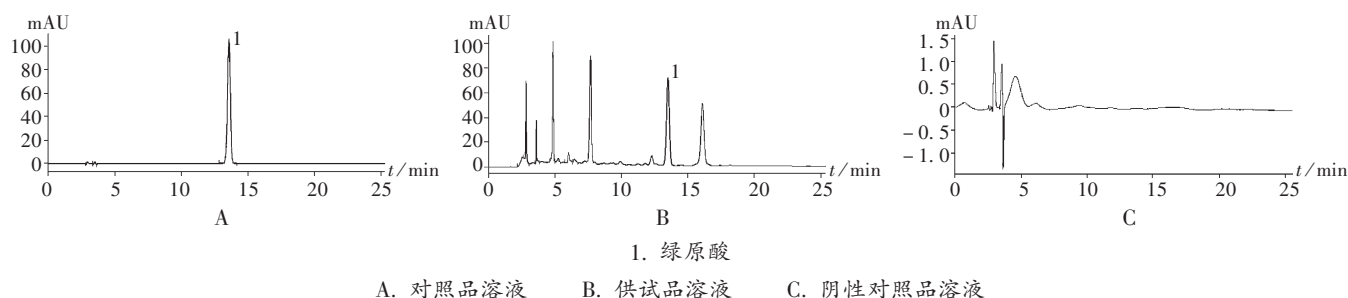


图 1 高效液相色谱图

6.0, 6.0, 12.0, 12.0, 18.0, 18.0 mL, 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件进行测定, 计算回收率。结果见表1。

表1 绿原酸加样回收试验结果 ($n=6$)

称样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
1.6607	1419.90	634.53	2024.10	95.22	92.46	2.10
1.5247	1303.62	634.53	1898.45	93.74		
1.6743	1431.53	1269.05	2617.00	93.41		
1.6551	1415.11	1269.05	2572.17	91.18		
1.7092	1461.37	1903.58	3185.03	90.55		
1.4865	1270.78	1903.58	2995.90	90.63		

2.4 样品含量测定

取3批样品, 依法制备供试品溶液, 并精密称取绿原酸对照品适量, 同法制成质量浓度为 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液, 精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 $10 \mu\text{L}$, 注入液相色谱仪, 依法测定, 用外标法计算含量。结果见表2。

表2 3批样品中绿原酸含量测定结果 (mg/g , $n=3$)

批号	1	2	$\bar{X}$
17132754	0.850	0.859	0.854
17132755	0.736	0.780	0.758
17132756	0.769	0.720	0.744

3 讨论

3.1 色谱条件选择

在选择检测波长时, 取绿原酸对照品溶液, 用甲醇-水 (50:50) 为空白溶剂, 经紫外-可见分光光度计扫描, 绿原酸在 328 nm 波长下有最大吸收, 参考《中国药典》金银花中绿原酸的检测波长为 327 nm^[5], 故确定 327 nm 作为绿原酸的检测波长。曾以乙腈-0.4% 磷酸溶液 (13:87) 为流动相, 但样品分离度和主峰形不好; 用乙腈-0.4% 磷酸溶液 (10:90) 为流动相时, 主峰形对称, 分离效果好。由于枇杷叶膏很黏稠, 用甲醇-水 (50:50) 超声溶解时, 不定时振摇有助于样品溶解; 比较超声 20 min 和 30 min 的效果发现, 超声 30 min 时提

取完全, 故最终采用甲醇-水 (50:50) 超声溶解 30 min。方法学考察结果表明, 所建立的方法回收率、精密度、重复性均符合 2015 年版《中国药典(四部)》药品质量标准分析方法验证指导原则的相关规定^[6], 且操作简便、快捷, 本方法的建立, 可弥补现行药典标准中无成分定量的现状, 有利于更好地提高和控制枇杷叶膏的药品质量。

3.2 不足

枇杷叶中绿原酸受各地环境不同、生长时间长短、采收加工时间不同、加工工艺不同影响, 其含量会有差异, 导致成品枇杷叶膏中绿原酸的含量差异较大。故未对枇杷叶膏中绿原酸的含量做出建议值, 如要规定其含量值, 应更多地考察和研究枇杷叶在不同产地、不同加工时间段、不同生产工艺对绿原酸的影响, 同时比较不同厂家生产的枇杷叶膏的绿原酸含量及绿原酸在枇杷叶膏中的稳定性, 为确定一个科学、有效、客观的含量值, 提供更多、更全面、更公正的数据。

本研究中还发现, 与绿原酸面积归一百分比相近的还有 3 个主要成分峰, 如能确定其中 1 个成分峰, 使用 2 个成分指标定量, 将更有利于提高枇杷叶膏质量标准。

参考文献:

- [1] 相延英, 杨光. 常用中药中齐墩果酸和熊果酸的含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2004, 24(5): 316-318.
- [2] 黄锁义, 李卫彬, 阳文辉, 等. 超声提取枇杷叶总黄酮及其鉴定[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(3): 629.
- [3] 何英姿. 枇杷叶有效成分提取及药理作用研究进展[J]. 广西工学院学报, 2007, 18(2): 81-84.
- [4] 刘磊, 何再安, 余子川, 等. 高效液相色谱法测定金银花提取物中绿原酸的含量[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(10): 2416-2417.
- [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: 221.
- [6] 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: 374-377.

(收稿日期: 2018-01-10; 修回日期: 2018-07-04)

中国科技核心期刊 中国科技论文统计源期刊

《中国药业》杂志 特别欢迎重点科研、基金项目论文投稿!

网上投稿: <http://www.zhongguoyaoye023.com> 或 中国药业在线投稿系统

投稿备份: (E-mail) zguyaoye@vip.tom.com 电话兼传真: (023) 86592565

邮发代号: 78-130, 各地邮局均可订阅; 补订、破月订可向本刊发行部办理

编辑部地址: 重庆市渝中区长江一路 61 号地产大厦 1 号楼 19 层 邮政编码: 400014