

高效液相色谱法同时测定银菊清肝解毒颗粒中 绿原酸和迷迭香酸含量

肖健¹, 刘旺培², 陈华龙^{2△}

(1. 粤北人民医院, 广东 韶关 512026; 2. 广东省韶关市食品药品检验所, 广东 韶关 512028)

摘要:目的 建立同时测定银菊清肝解毒颗粒中绿原酸和迷迭香酸含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱采用 C₁₈, 流动相为乙腈-0.4% 磷酸溶液(梯度洗脱), 检测波长为 330 nm。结果 绿原酸和迷迭香酸质量浓度分别在 1.066 7~106.670 0 μg/mL 和 0.514 0~51.400 0 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好, 相关系数均为 0.999 9; 加样回收率分别为 98.82% 和 99.95%, RSD 分别为 0.93% 和 0.81% (n=9)。结论 该方法简便、快速、准确、重复性好, 可用作银菊清肝解毒颗粒的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 银菊清肝解毒颗粒; 绿原酸; 迷迭香酸; 含量

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)23-0034-03

Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid and Rosmarinic Acid in Yinju Qinggan Jiedu Granules by HPLC

XIAO Jian¹, LIU Wangpei², CHEN Hualong²

(1. Yuebei People's Hospital, Shaoguan, Guangdong, China 512026; 2. Shaoguan Institute for Food and Drug Control, Shaoguan, Guangdong, China 512028)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the simultaneous determination of chlorogenic acid and rosmarinic acid in Yinju Qinggan Jiedu Granules. **Methods** The chromatographic column was C₁₈ column, the mobile phase was acetonitrile-0.4% phosphoric acid solution (gradient elution), and the detection wavelength was 330 nm. **Results** The chlorogenic acid and rosmarinic acid showed good linear relationship with peak area in the ranges of 1.066 7-106.670 0 μg/mL and 0.514 0-51.400 0 μg/mL ($r=0.999\ 9$), respectively. The recoveries were 98.82% and 99.95%, respectively. RSDs were 0.93% and 0.81% ($n=9$), respectively. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Yinju Qinggan Jiedu Granules.

Key words: HPLC; Yinju Qinggan Jiedu Granules; chlorogenic acid; rosmarinic acid; content

银菊清肝解毒颗粒由金银花、夏枯草、桑叶、菊花 4 味药材组方, 具有清肝明目, 疏风散热, 除湿、痹, 解疮毒, 功效用于治疗感冒风热、目赤头痛、高血压、咽喉肿痛、疔疮肿毒等。金银花和夏枯草为主药, 绿原酸和迷迭香酸分别为金银花和夏枯草的主要成分。绿原酸具有广谱抗菌、抗病毒、抗肿瘤、增强免疫及解毒抗炎作用^[1-2]; 迷迭香酸具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抗炎活性和免疫抑制活性、抗血栓等作用^[3-5]。目前, 银菊清肝解毒颗粒质量标准中未见含量测定方法, 国内已有文献记载金银花和夏枯草或其制剂中的绿原酸和迷迭香酸的含量测定方法^[6-14]; 2015 年版《中国药典(一部)》金银花和夏枯草质量标准已分别制订了绿原酸和迷迭香酸的含量测定方法^[15]。本研究采用高效液相色谱法同时测定银菊清肝解毒颗粒中绿原酸和迷迭香酸的含量, 对方中金银花和夏枯草以绿原酸和迷迭香酸计的含量进行研究, 为更好地监控和评价银菊清肝解毒颗粒的质量提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1200 型高效液相色谱仪(包括 G1311A 四元梯度泵, 自动进样器, G1314B VWD 紫外检测器, 美国安捷伦公司); XSE205 型电子天平(瑞士梅特勒公司); HT-300BQ 型数控超声波清洗器(济宁恒通超声电子设备有限公司)。

1.2 试剂

绿原酸对照品(批号为 110753-201817, 含量为 96.8%), 迷迭香酸对照品(批号为 111871-201706, 含量为 90.5%), 均由中国食品药品检定研究院提供; 银菊清肝解毒颗粒(粤北人民医院自制, 批号分别为 171030, 180620, 181106); 乙腈(色谱纯, 美国 TIDDI 公司, 批号为 17090576); 磷酸(分析纯, 广州化学试剂厂, 批号为 20171101)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: 菲罗门 Luna[®] C₁₈(2) 100A 柱(250 mm ×

第一作者: 肖健, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为医院药学, (电子信箱)77460526@qq.com。

△通信作者: 陈华龙, 男, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为药品检验, (电子信箱)765482622@qq.com。

4. 6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈(A) - 0.4% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱 (0 ~ 12 min、12% A, 12.1 ~ 25 min、30% A, 25.1 ~ 35 min、12% A); 检测波长: 330 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ L。

2.2 溶液制备

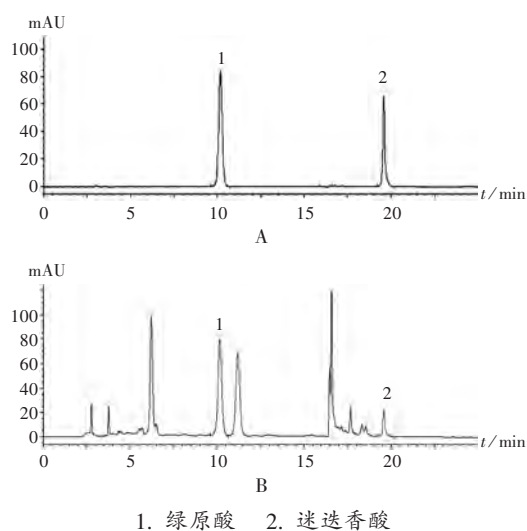
混合对照品溶液: 分别取绿原酸、迷迭香酸对照品适量, 加 50% 甲醇制成每 1 mL 含 0.106 67 mg 绿原酸、0.051 4 mg 迷迭香酸的混合对照品溶液。

供试品溶液: 取银菊清肝解毒颗粒研细, 精密称取细粉约 2 g, 置烧杯中, 加甲醇 50 mL, 超声 (功率为 150 W, 频率为 50 kHz) 处理 10 min, 静置, 上清液过滤; 药渣加甲醇 20 mL, 超声处理 10 min, 静置, 过滤, 合并滤液, 滤液置水浴中挥干, 残渣加 50% 甲醇溶解, 转移至 50 mL 容量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 即得。

阴性样品溶液: 按处方和制备工艺要求分别制作缺金银花和缺夏枯草的阴性样品, 按供试品溶液制备方法分别制备缺金银花和缺夏枯草的阴性样品溶液。

2.3 方法学考察

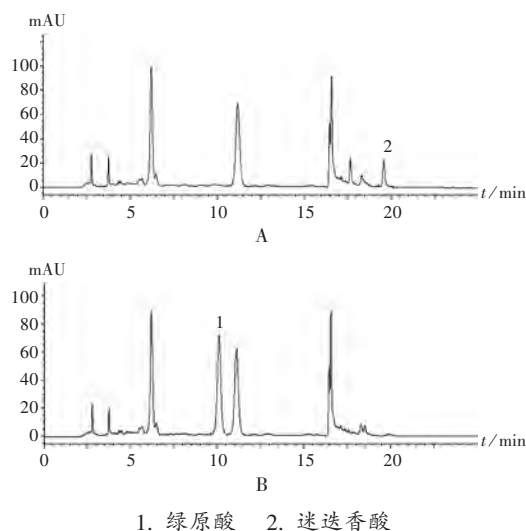
系统适用性试验: 分别吸取供试品溶液、对照品溶液, 按拟订色谱条件进样测定, 对系统适用参数进行考察, 绿原酸、迷迭香酸色谱峰的保留时间分别为 10.14 min 和 22.12 min; 2 个色谱峰与相邻色谱峰的分度均大于 1.5, 绿原酸、迷迭香酸色谱峰的理论板数分别为 10 963 和 384 181。色谱图见图 1。



1. 绿原酸 2. 迷迭香酸
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液
图 1 系统适用性试验高效液相色谱图

阴性干扰试验: 金银花中含有绿原酸、木犀草苷等成分, 夏枯草中含有迷迭香酸、咖啡酸等成分。分别取缺金银花和缺夏枯草的阴性样品溶液, 按拟订色谱条件, 进样测定, 记录色谱图。结果阴性样品溶液色谱图中未出现绿原酸、迷迭香酸色谱峰, 表明处方中的其他成分

对绿原酸、迷迭香酸的检测无干扰。色谱图见图 2。



1. 绿原酸 2. 迷迭香酸
A. 缺金银花阴性样品溶液 B. 缺夏枯草阴性样品溶液
图 2 阴性对照试验高效液相色谱图

线性范围考察: 分别精密吸取混合对照品溶液适量, 加 50% 甲醇稀释 100, 50, 10, 5, 1 倍, 分别精密吸取上述溶液各 20 μ L, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以质量浓度 (X) 为横坐标, 以峰面积 (Y) 为纵坐标, 进行线性回归, 绿原酸、迷迭香酸的回归方程分别为 $Y_{\text{绿}} = 60.568\ 70 X_{\text{绿}} - 14.109\ 61$, $r = 0.999\ 9$; $Y_{\text{迷}} = 61.275\ 07 X_{\text{迷}} + 4.257\ 22$, $r = 0.999\ 9$ 。结果表明, 绿原酸、迷迭香酸质量浓度分别在 1.066 7 ~ 106.670 0 μ g/mL 和 0.514 0 ~ 51.400 0 μ g/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

最低检测限考察: 将混合对照品溶液逐步稀释后, 分别精密量取 20 μ L, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以信噪比 (S/N) = 3 考察最低检测限。结果绿原酸、迷迭香酸的最低检测限分别为 0.213 3 μ g/mL 和 0.102 8 μ g/mL。

精密度试验: 取混合对照品溶液, 精密量取 20 μ L, 重复进样 6 次。结果绿原酸、迷迭香酸峰面积的 RSD 分别为 0.33% 和 0.52% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

重复性试验: 取同批样品 (批号为 171030) 6 份, 依法制备供试品溶液, 照含量测定项方法进样测定, 分别计算含量。结果, 绿原酸、迷迭香酸含量的 RSD 分别为 1.12% 和 1.31% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

稳定性试验: 取同一供试品溶液, 置室温下, 分别于 0, 2, 4, 6, 10, 12, 24 h 时进样测定。结果绿原酸、迷迭香酸峰面积的 RSD 分别为 0.82% 和 1.22% ($n = 7$), 表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定性良好。

加样回收试验: 取已知含量的样品约 1.0 g, 精密称定, 置 50 mL 容量瓶中, 分别加入对照品溶液适量, 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件进样测定, 计算加样回

表1 加样回收试验结果($n=9$)

取样量(g)		样品含量(μg)		加入量(μg)		测得量(μg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1.045 2	1.026 3	1 016.33	33.72	853.36	24.67	1 851.53	58.21	97.87	99.27				
1.012 9	1.003 4	984.92	32.97	853.36	24.67	1 823.33	57.23	98.25	98.34				
1.033 2	1.014 5	1 004.66	33.34	853.36	24.67	1 859.74	58.18	100.20	100.69				
1.048 9	1.002 8	1 019.93	32.95	1 066.70	30.84	2 072.35	64.14	98.66	101.13				
1.014 6	1.009 6	986.58	33.18	1 066.70	30.84	2 040.95	63.98	98.84	99.87	98.82	99.95	0.93	0.81
1.056 3	1.012 3	1 027.12	33.26	1 066.70	30.84	2 070.35	64.21	97.80	100.36				
1.008 5	1.021 9	980.65	33.58	1 280.04	37.01	2 265.38	70.62	100.37	100.08				
1.025 7	1.016 2	997.37	33.39	1 280.04	37.01	2 262.54	70.35	98.84	99.86				
1.025 4	1.008 8	997.08	33.15	1 280.04	37.01	2 258.18	70.14	98.52	99.95				

注:A为绿原酸,B为迷迭香酸。下表同。

收率。结果见表1。

2.4 样品含量测定

分别取3批样品,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,以外标法对峰面积定量,代入线性回归方程,计算绿原酸、迷迭香酸的含量。结果见表2。

表2 样品含量测定结果

批号	含量($\mu\text{g/g}$)		RSD(%)	
	A	B	A	B
171030	972.38	32.86	0.82	0.91
180620	968.42	33.58	0.58	0.62
181106	952.74	31.35	0.43	0.81

3 讨论

3.1 提取方法选择

银菊清肝解毒颗粒不仅含金银花、夏枯草、桑叶、菊花4味药材,还含较多的糖和淀粉。本研究中采用甲醇作为提取溶剂,即有效除去糖、淀粉等大量杂质,又保证了目标成分绿原酸和迷迭香酸能有效溶出。残渣加50%甲醇溶解可有效去除绿原酸和迷迭香酸色谱峰的溶剂效应,使绿原酸峰和迷迭香酸峰更好地与相邻杂质分离,测量结果更准确。

3.2 流动相选择

迷迭香酸与绿原酸的极性相差较大,迷迭香酸的极性较小,当流动相中有机相比比例较小时,迷迭香酸将不能被洗脱出来;当流动相中有机相比比例较大时,绿原酸峰出峰太早,难与杂质分离。经过反复试验,本研究中以乙腈-0.4%磷酸溶液为流动相梯度洗脱,既保证迷迭香酸能被洗脱出来且分离度良好,又保证绿原酸能与相邻杂质分开。

3.3 小结

采用高效液相色谱法同时测定银菊清肝解毒颗粒中绿原酸和迷迭香酸的含量,简便、快速、准确、重复性好,可提高银菊清肝解毒颗粒质量标准,为其质量监控提供参考。

参考文献:

- [1] 田靖,朱淑芬.重症医学科下呼吸道感染患者病原菌分析[J].内科急危重症杂志,2015,21(2):114-115.
- [2] 刘君玲.革兰氏阴性菌在重症加强监护病房重症感染患者中的耐药性分析[J].中华老年医学杂志,2014,33(1):70-72.
- [3] 顾晓洁,钱士辉,李友宾,等.夏枯草的化学成分及药理作用研究进展[J].中国野生植物资源,2007,26(2):5-7.
- [4] 崔体圣,苗明三.夏枯草的化学、药理及临床应用探讨[J].中医学报,2014,29(3):386-388.
- [5] 李良.夏枯草药理作用研究[J].中国现代医生,2013,51(4):120-121.
- [6] 陈言.HPLC法测定不同产地金银花中绿原酸和木犀草苷的含量[J].北方药学,2019,16(2):3-4.
- [7] 肖作为,谢梦洲,甘龙,等.山银花、金银花中绿原酸和总黄酮含量及抗氧化活性测定[J].中草药,2019,50(1):210-216.
- [8] 梁海月,刘学杰.HPLC法测定抗感颗粒中绿原酸与芍药苷的含量[J].甘肃医药,2018,37(3):268-270.
- [9] 邹晓华,戴安印,何伟康,等.感冒热毒清合剂质量标准研究[J].中国药业,2016,25(7):48-52.
- [10] 孙凤霞,张宗保.祛痰胶囊的制备及其哈巴昔和迷迭香酸含量测定[J].中国药业,2014,23(6):31-33.
- [11] 林巧之.高效液相色谱法测定香菊片中迷迭香酸的含量[J].海峡药学,2017,29(9):56-57.
- [12] 罗勇,方铁铮,姚江雄,等.夏桑菊颗粒中迷迭香酸的含量测定[J].中国民族民间医药,2016,25(12):44-46.
- [13] 黄明霞,邹堃,贺凯,等.夏枯草颗粒质量标准提高的实验研究[J].宁夏医学杂志,2016,38(4):329-331.
- [14] 彭丽英,彭攸灵,杨先国.RP-HPLC测定夏桑菊颗粒中迷迭香酸的含量[J].中国当代医药,2014,21(20):8-9.
- [15] 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,2015:221,280.

(收稿日期:2019-05-21)

本栏目由
重庆英康医疗器械有限公司
协办