

中药研究

高效液相色谱法测定银花感冒冲剂中绿原酸含量

陈 述 席桂同

(中国中医科学院西苑医院,北京,100091)

摘要 目的:建立测试银花感冒冲剂中绿原酸含量的高效液相方法,并对此方法进行系统的方法学验证,以确保应用该方法测试的结果准确、可靠。方法:采用色谱柱:Agilent TC-C₁₈柱(4.6 mm×150 mm,5 μm,Agilent,美国),流动相:甲醇-0.5%磷酸溶液(15:85),检测波长为 327 nm。结果:绿原酸在 25~800 μg/mL 范围内线性关系良好,得到线性回归方程为 $Y = 27.88X + 2.128$,相关系数为 0.999 8($n = 6$);低、中、高浓度精密度的 RSD 值分别为 0.59%、0.58%、0.44%;重复性 RSD 为 0.26%;低、中、高浓度的加样回收率分别为 99.24%、99.43%、99.75%;供试品溶液室温放置 8 h 稳定,RSD 为 0.29%。结论:本方法测定银花感冒冲剂中绿原酸的含量准确、可靠,操作简单、用时短,可用于银花感冒冲剂中绿原酸的含量测定。

关键词 高效液相色谱法;绿原酸;银花感冒冲剂;含量测定

Determination of the Contents of Chlorogenic Acid in Yinhuaganmao Granules by HPLC

Chen Shu, Xi Guitong

(Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

Abstract Objective: To establish a high performance liquid phase method to measure the content of chlorogenic acid of Flos Lonicerae in Ganmao granules, and to ensure that the results are accurate and reliable by systematic methodology. **Methods:** The chromatographic column: Agilent TC-C₁₈ column (4.6 × 150 mm, 5 μm, Agilent, American), a mobile phase of methanol: 0.5% phosphoric acid solution (15:85), the detection wavelength was 327 nm. **Results:** The chlorogenic acid in 25 μg mL⁻¹ - 800 μg mL⁻¹ linear relationship was good, the linear regression equation was $Y = 27.88X + 2.128$, correlation coefficient was 0.999 8 ($n = 6$); low, high concentrations of RSD precision, values were 0.59%, 0.58%, 0.44%; repetitive RSD 0.26%; low, recoveries. The high concentration were respectively 99.24%, 99.43%, 99.75%; the test solution was placed at room temperature for 8 h, and RSD was 0.29%. **Conclusion:** This method for determination of the content of chlorogenic acid in Flos Lonicerae cold granule is accurate and reliable with simple operation and short time. It can be used for the determination of chlorogenic acid in Flos Lonicerae in Ganmao granules.

Key Words HPLC; Chlorogenic acid; Yinhuaganmao granules; Content determination

中图分类号: R284.2 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2015.01.026

银花感冒冲剂是临床常用的感冒药,由金银花、连翘、防风、桔梗、甘草五味药制成,具有清热,解表,利咽功效,临床主要用于用于感冒发热、头痛、咽喉肿痛^[1]。绿原酸是金银花的主要有效成分之一,具有消炎抗菌、抗氧化、抗衰老、利胆降压、抗肿瘤等药理作用,是银花感冒冲剂质量控制的重要指标之一^[2]。笔者采用高效液相方法建立了实用、准确、可靠的绿原酸含量检测方法,通过方法学验证,具体叙述如下。

1 实验材料

1.1 仪器与设备 岛津 265 型紫外分光光度计; Agilent 1290 型高效液相色谱仪(配有脱气机、自动

进样器、恒温箱、液相色谱泵、柱温箱及荧光检测器),由 Chemstation 化学工作站系统控制(Agilent, 德国);METTLER TOLEDO AB135-S 型十万分之一天平(METTLER, 瑞士);XW-80A 涡旋混合器(上海沪西分析仪器厂);TGL16M 型冷冻离心机(长沙英泰仪器有限公司);AHL-2001-P 痕量型分析型超纯水机(艾科浦,重庆颐洋企业发展有限公司)。

1.2 试药与材料 绿原酸对照品:由中国药品生物制品检定研究院提供,批号:110753-200413;银花感冒冲剂:由内蒙古某股份有限公司提供,批号:140106、140113、140120、140127、140210;磷酸:天津科密欧化学试剂有限公司,分析纯,批号:130315;甲

醇:美国 Tedia 公司,色谱纯,批号:1202257;纯水:自制去离子超纯水。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent TC-C₁₈柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm, Agilent, 美国);保护柱:Gemini C₁₈(4 mm × 3.0 mm, 10 μm, Phenomenex, 美国);流动相:甲醇-0.5% 磷酸溶液(15:85);流速:1.2 mL/min;柱温:35 ℃;进样量:5 μL。检测波长 327 nm。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的配制 精密称取绿原酸对照品 50 mg,置于 50 mL 容量瓶中,加适量流动相溶解后,再用流动相稀释至刻度线,摇匀,即得浓度为 1 mg/mL 的绿原酸对照品储备溶液,置于 4 ℃ 冰箱保存。

2.2.2 供试品溶液的配制 取银花感冒冲剂 10 包,精密称定,研碎,精密称取适量(约 1 000 mg),置于带塞锥形瓶中,加入约 20 mL 50% 甲醇水溶液,超声处理 0.5 h,充分摇匀,冷却至室温,完全转移至 50 mL 的容量瓶中,再用 50% 甲醇水溶液定容至刻度线,摇匀。进样前用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后,取续滤液进样 5 μL。

2.2.3 阴性对照液 制备缺少金银花的空白银花感冒冲剂(金银花成分以基质代替,其余处方同银花感冒冲剂),再按“2.2.2 供试品溶液的配制”项下方法,配制成阴性样品溶液。

2.3 检测波长的选择 以流动相作为空白对照,将绿原酸对照液和供试品溶液在紫外分光光度计上扫描,扫描区间为 200 ~ 350 nm,结果得出,绿原酸在 327 nm 处显示有最大吸收。因此,选择 327 nm 作为检测波长。

2.4 系统适用性与专属性考察 分别取绿原酸对照品溶液、阴性对照液、供试品溶液适量,在上述色谱条件下进样 20 μL。记录并观察 3 份溶液的色谱图。结果得出,绿原酸峰的理论塔板数不低于 3 000,阴性对照液中无干扰峰干扰测定,对照液与供试液中绿原酸峰的保留时间一致,绿原酸峰周围无干扰峰,基质不干扰测定,本方法专属性好。典型色谱图如下图 1 所示。

2.5 线性关系考察 精密移取浓度为 1 mg/mL 的绿原酸对照品储备溶液适量,用流动相逐级稀释成含绿原酸浓度为 800 μg/mL、400 μg/mL、200 μg/mL、100 μg/mL、50 μg/mL、25 μg/mL 等 6 个浓度级别的系列对照品工作溶液,进样 5 μL。记录各浓度绿原酸对照液的峰面积。结果得出,绿原酸在 25 ~

800 μg/mL 范围内线性关系良好,以绿原酸浓度为横坐标,所得峰面积为纵坐标,得线性回归方程为 $Y = 27.88X + 2.128$,相关系数为 0.999 8($n = 6$)。

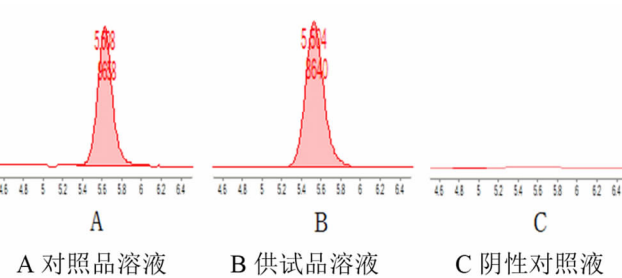


图 1 专属性考察图谱

2.6 精密度考察 配制低、中、高浓度(绿原酸浓度为 50 μg/mL、200 μg/mL、640 μg/mL)的对照品工作溶液,每个浓度平行配制 5 份,分别进样 5 μL,记录峰面积,见表 1。结果得出,低、中、高浓度绿原酸的 RSD 值分别为 0.59%、0.58%、0.44%,表明精密度良好。

表 1 精密度考察结果

组份	低浓度(50 μg/mL)		中浓度(200 μg/mL)		高浓度(640 μg/mL)	
	测得浓度 (μg/mL)	准确度 (%)	测得浓度 (μg/mL)	准确度 (%)	测得浓度 (μg/mL)	准确度 (%)
1	50.50	101.0	199.1	99.6	637.8	99.7
2	49.86	99.7	198.9	99.5	641.2	100.2
3	50.55	101.1	201.5	100.8	642.9	100.5
4	50.06	100.1	200.8	100.4	636.5	99.5
5	50.33	100.7	199.3	99.7	642.1	100.3
平均值	50.26	100.5	199.9	99.96	640.1	100.0
RSD(%)	0.59		0.58		0.44	

2.7 重复性考察 取同一批次的供试品 6 份,按照“2.2.2”项下方法配制成 6 份供试品溶液,进样 5 μL,记录峰面积,见表 2。结果得出绿原酸峰面积的 RSD 值为 0.26%,表明该方法重现性良好。

表 2 重复性考察结果

编号	No.						Mean	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6		
峰面积	2104	2114	2117	2117	2107	2108	2111	0.26

表 3 加样回收率考察结果

组份	低浓度(50 μg/mL)		中浓度(200 μg/mL)		高浓度(640 μg/mL)	
	理论浓度 (μg/mL)	测得浓度 (μg/mL)	理论浓度 (μg/mL)	测得浓度 (μg/mL)	理论浓度 (μg/mL)	测得浓度 (μg/mL)
1	62.825	61.47	137.825	135.72	357.825	357.31
2	62.825	63.54	137.825	137.71	357.825	354.79
3	62.825	62.22	137.825	138.05	357.825	355.54
4	62.825	62.14	137.825	135.89	357.825	359.01
5	62.825	62.36	137.825	137.85	357.825	358.08
Mean	62.825	62.35	137.825	137.04	357.825	356.95
回收率(%)		99.24		99.43		99.75
RSD(%)		1.2		0.8		0.5

2.8 加样回收率考察 精密移取同一已知(75.65 μg/mL)的供试品溶液 1 mL,平行 5 份,分别加入低、

中、高浓度(绿原酸浓度为 50 μg/mL、200 μg/mL、640 μg/mL)的对照品工作溶液 1mL,混匀,进样,记录峰面积,见表 3。本实验所得绿原酸低、中、高浓度的加样回收率分别为 99.24%、99.43%、99.75%,RSD 分别为 1.2%、0.8%、0.5%。

2.9 稳定性考察 取同一份供试品溶液(75.65 μg/mL),分别在室温下放置 0 h、4 h、6 h、8 h 后测定,记录色谱峰,见表 4。结果得出,在室温下放置 8 h 后测定的 RSD 值为 0.29%,可说明绿原酸供试品溶液室温放置 8 h 稳定。

表 4 室温放置稳定性考察结果

时间	0 h	4 h	6 h	8 h
峰面积	2143	2131	2146	2126
	2137	2126	2139	2139
	2132	2125	2142	2142
	2147	2136	2139	2139
	2136	2135	2135	2135
Mean	2139	2131	2140	2136
RSD(%)	0.27	0.24	0.19	0.29
总 RSD(%)	0.29			

2.10 样品含量测定 取 5 个批次(批号分别为 140106、140113、140120、140127、140210)的银花感冒冲剂,按上述“2.2.2”项下方法配制成供试品溶液,取配制好的供试品溶液,进样 5 μL,每个批次平行测定 3 次,记录峰面积,采用外标法计算银花感冒冲剂中绿原酸的含量,含量计算结果见表 5。5 个批次的银花感冒冲剂中绿原酸的含量分别为 3.749 mg/g、3.751 mg/g、3.746 mg/g、3.746 mg/g、3.747 mg/g。

表 5 含量测定结果

批号	140106	140113	140120	140127	140210
绿原酸含量(mg/g)	3.740	3.759	3.749	3.747	3.745
	3.753	3.750	3.748	3.743	3.749
	3.755	3.744	3.742	3.748	3.747
Mean	3.749	3.751	3.746	3.746	3.747
RSD(%)	0.22	0.20	0.10	0.07	0.05

3 讨论

银花感冒冲剂是由金银花、连翘、防风、桔梗、甘草五味药制成,具有清热,解表,利咽功效,临床主要用于感冒发热、头痛、咽喉肿痛。方中金银花为君药,具有清热解毒、凉散风热的功效^[3]。金银花中含有的化学成分很多,主要包括有机酸类、挥发油类、黄酮类、皂苷类等。有机酸类化合物是金银花最重要的化学组成部分,也是最主要的有效成分,包括绿原酸、异绿原酸、棕榈酸等^[4]。绿原酸是其主要成

分,是金银花抗菌消炎药效特征的有效成分。绿原酸不仅仅是金银花生药材的质量控制指标,也是含有金银花的中成药或制剂的质量控制指标。

目前绿原酸的测定方法主要有紫外分光光度法、高效液相色谱法、液质联用法等。2010 版《中华人民共和国药典》中确定了金银花中绿原酸的高效液相测定方法,一些学者也进行了绿原酸的含量测定方法研究,并取得了很好的研究成果^[6-10]。肖文平等^[11]应用紫外分光光度法,对比分析对不同花期的金银花应用不同的提取方法所测得的金银花中绿原酸的含量,研究结果得出,乙醇回流法的提取效率高于超声提取,花苞期金银花中绿原酸的含量高于金银花原液。钟方晓^[12]采用了紫外分光光度法和高效液相色谱法两种方法分别测定了金银花中绿原酸和异绿原酸的含量,研究发现,紫外分光光度法测得结果为绿原酸和异绿原酸的总含量,高效液相方法则能将二者的含量分开测定,实验数据证实,高效液相法所得绿原酸和异绿原酸的含量之和与紫外分光光度计测得的数据基本相符。说明紫外分光光度法不适宜单独测定绿原酸的含量^[13-14]。

为了更方便快捷、准确有效的做好银花感冒冲剂的质量控制工作,笔者应用高效液相方法对银花感冒冲剂中绿原酸的含量进行了测定,对各项条件进行了摸索,最终确定了适宜的流动相,波长,供试品处理方法等条件,建立了一套高效、可靠的方法。流动相是应用甲醇-0.5%磷酸溶液(15:85),流速为 1.2 mL/min,该色谱条件下,绿原酸峰型良好,能取得很好的分离度,绿原酸峰周围无干扰峰,无基质干扰测定。通过方法学验证得出结果,低、中、高浓度的精密度良好,RSD 值分别为 0.59%、0.58%、0.44%;重现性好,重现性 RSD 值为 0.26%;该方法实验所得低、中、高浓度的加样回收率分别为 99.24%、99.43%、99.75%。实验测得本次抽取的 5 个批次(批号分别为 140106、140113、140120、140127、140210)的银花感冒冲剂中绿原酸的含量分别为 3.749 mg/g、3.751 mg/g、3.746 mg/g、3.746 mg/g、3.747 mg/g。本研究结果与李建芳等人研究结果大体一致^[2],但本实验制剂中所含绿原酸的含量略高,这与制剂配方及金银花的类别,供试品的提取处理方法有一定的关系。

总之,本方法用于测定银花感冒冲剂中绿原酸的含量准确、可靠,操作简单、用时短,可用于银花感冒冲剂的含量测定,用于该制剂的质量控制。

(下接第 103 页)

能与配方颗粒在浓缩与喷雾干燥过程中受热有关^[13-18]。从表 7、表 8 可以看出,不同批次配方颗粒组成的生脉散配方颗粒汤剂中,5-羟甲基糠醛含量有一定差异,其可能是药材来源、质量不同所致。10 批生脉散配方颗粒含量在 7.26~23.22 mg/剂之间。随着加热时间的推移,配方颗粒汤剂中 5-羟甲基糠醛含量会逐渐增多,说明加热有可能使配方颗粒汤剂中其他物质转化为 5-羟甲基糠醛^[19]。

4 讨论

传统煎煮方法由于受到诸多不易规范统一的因素影响,如个人习惯、对火候的判断、加水量多少等,皆可导致传统饮片汤剂中有效成分的溶出含量变化较大^[10]。而中药配方颗粒采用同一工艺规程生产,有效成分含量相对稳定。在临床应用中,配方颗粒汤剂比传统饮片汤剂更有利于稳定地发挥疗效。

本实验发现,生脉散配方颗粒汤剂成分与传统饮片汤剂并无区别,含量甚至优于传统饮片汤剂,说明从化学成分上中药配方颗粒在替代传统饮片汤剂中应用可行。但中药的成分相当复杂,不能单以一个或几个指标成分的相当或不相当来进行评价,研究配方颗粒在临床上替代传统饮片汤剂的可行性,还需进行药效学及临床疗效的对比研究来加以验证。

参考文献

- [1] 雷鹏,李媛,李新中,等. 四物汤饮片与配方颗粒汤剂中没食子酸、5-羟甲基糠醛含量比较[J]. 中药新药与临床药理,2009,20(5): 468-470.
- [2] 李明,程艳玲,麻京豫. 生脉饮内涵、外延及应用探讨[J]. 中国社区医师,2012,15(14):240-241.
- [3] 陈惠,孙朦朦,安然. 生脉散治疗糖尿病研究进展[J]. 辽宁中医杂志,2013,40(10):2170-2172.
- [4] 丁霞,王明艳,余宗亮,等. 山茱萸中 5-羟甲基糠醛的分离鉴定及

生物活性研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(4):392-394.

- [5] 耿欣,王喜军. 5-羟甲基-2-糠醛(5-HMF)在中药复方中的研究现状及相关药效探讨[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2005,7(6):52-54.
- [6] 朱丹妮,李志明,严永清,等. 生脉散复方化学动态变化与药效关系研究——生脉散复方化学的研究(Ⅱ)[J]. 中国中药杂志,1998,23(5):291-293.
- [7] 季光琼,刘艳菊,王萍,等. HPLC 法测定苍术及麸炒苍术中 5-羟甲基糠醛的含量[J]. 湖北中医杂志,2014,36(2):73-74.
- [8] 崔小兵,李伟,文红梅. UPLC 法测定白术不同炮制品中 5-羟甲基糠醛的含量[J]. 南京中医药大学学报,2012,28(5):355.
- [9] 黄洪新,徐道华,刘俊臣,等. 地黄炮制前后 5-羟甲基糠醛含量的研究[J]. 时珍国医国药,2012,23,(4):938-939.
- [10] 温远珍,马兰,黄素芳,等. 黄精煎剂中 5-羟甲基糠醛的含量测定[J]. 广州中医药大学学报,2010,27(5):507-509.
- [11] 芮海波,赵学龙,谈喧忠,等. 不同炮制程度牡丹皮炭中 5-羟甲基糠醛含量的变化[J]. 河北中医,2010,32,(9):1399-1400.
- [12] 杨培民. 地黄清蒸不同时间梓醇和 5-羟甲基糠醛的含量比较[J]. 中华中医药杂志,2010,25(7):1096-1098.
- [13] 曹雨诞,和颖颖,张丽,等. 白茅根炭炒前后 5-羟甲基糠醛的变化研究[J]. 中草药,2010,41(9):1475-1477.
- [14] 刘佳鑫,李古月,才谦. 苍术麸炒后增量成分研究[J]. 中国医药导报,2014,11(5):105-108.
- [15] 叶莉莉,祝子铜,戴勤娟,等. 温度对不同花蜜中 5-羟甲基糠醛含量的影响[J]. 中国蜂业,2013,64:62-64.
- [16] 鲜洁晨,张宁,冯怡,等. 中药蜜丸炼蜜过程中果糖、葡萄糖、5-羟甲基糠醛的热稳定性研究[J]. 中药材,2011,34(9):1434-1437.
- [17] 张令志,吴皓,李伟,等. HPLC 法测定薏苡仁不同炮制品中 5-羟甲基糠醛及糠醛的含量[J]. 药学与临床研究,2012,20(6):574-575.
- [18] 曹岗,季金玉,丛晓东,等. 玄参蒸制不同时间 5-羟甲基糠醛的含量比较[J]. 中国新药杂志,2012,21(8):936-942.
- [19] 杨立伟,刘潇潇,李泳雪. 中药注射液 5-羟甲基糠醛来源探讨[J]. 中国药品标准,2012,13(2):104-107.

(2014-11-06 收稿 责任编辑:王明)

(上接第 99 页)

参考文献

- [1] 许佩兰. 复方银花感冒颗粒质量标准的研究[J]. 内蒙古中医药,2011,30(9):114.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:205.
- [3] 李建芳,黄劲通. 高效液相色谱法测定银花感冒冲剂中绿原酸含量[J]. 中国药业,2013,22(14):63-64.
- [4] 李锦葵,吴洪文. HPLC 同时测定山银花中绿原酸和木犀草苷的含量[J]. 北方药学,2013,10(8):10-11.
- [5] 周惠燕,陈珏. 金银花提取物中绿原酸含量测定[J]. 中国中医药信息杂志,2011,18(11):61-62.
- [6] 张莉,王学芳,李德华. HPLC 法测定银花利咽片中绿原酸的含量[J]. 海峡药学,2011,23(11):68-70.
- [7] 张雷. 抗感冒冲剂质量标准研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2012,14(4):231-232.

- [8] 唐德智. HPLC 测定银花感冒颗粒中绿原酸含量[J]. 中医药导报,2009,15(8):73-74.
- [9] 江帆,郭培果. HPLC 法测定儿感口服液绿原酸的含量[J]. 中国药房,2009,20(33):2600-2602.
- [10] 何兵,田吉,肖顺汉. HPLC 测定槲木叶中绿原酸的含量[J]. 泸州医学院学报,2010,33(3):229-231.
- [11] 马彦芳. 金银花中总黄酮的含量测定[J]. 青海科技,2007,14(4):29-30.
- [12] 钟方晓. 高效液相及紫外分光光度法测定金银花中绿原酸和异绿原酸含量方法学比较[J]. 时珍国医国药,2005,16(3):212.
- [13] 邓育平. 高效液相色谱法测定金银花含片中绿原酸含量[J]. 现代农业科技,2008(14):11-12.
- [14] 汪洪武,刘艳清. HPLC 测定复方金银花颗粒中绿原酸与黄芩苷含量[J]. 中国药学杂志,2009,44(9):706-708.

(2014-04-26 收稿 责任编辑:王明)