高效液相色谱法测定金丹活血明目丸中绿原酸含量

万 彦*, 李浩然, 马俊奇, 宋君军

(河南省漯河市食品药品检验所, 河南 漯河 462008)

[摘要] **目的**: 建立金丹活血明目丸中绿原酸的含量测定方法。**方法**: 采用 HPLC 法。色谱柱为 Kromasil C_{18} 柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温为25 ℃; 流动相为乙腈-0.1% 的磷酸溶液(10∶90); 流速为 1.0 mL·min^{-1}; 检测波长为 327 nm。**结果**: 绿原酸质量浓度的线性范围为0.009 03 mg·mL^{-1}~ 0.090 3 mg·mL^{-1}, 平均回收率为 99.6%, RSD= 0.97%。**结论**: 方法准确、简便、易行, 可用于该制剂的质量控制。

[关键词] 金丹活血明目丸; 高效液相色谱法; 绿原酸

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)08-0022-02

Determination of Chlorogenic Acid in Jindan Huoxue Mingmu Pill by HPLC

*WAN Yan**, *LI Hao-ran*, *MA Jun-qi*, *SONG Jun-jun*

(*Luohe Instituute for Drug Control of Henan province*, *Luohe* 462008, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To develop an HPLC method to determine the content of chlorogenic acid in Jindan Huoxue Mingmu pill. **Methods**: The determina- tion was performed on a Kromasil C_{18} column(200 mm × 4.6 mm, 5 μm). The column temperature was set at 25 ℃. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% H_3PO_4(10∶90). The UV detection wavelength was 327 nm and the flow rate was 1.0 mL·min^{-1}. **Results**: The linear range of chlorogenic acid was within 0.009 2~ 0.092 mg·mL^{-1}, with a correlation coefficient of 0.999 9. The average recovery was 99.6% and RSD was 0.97%. **Conclusion**: The method is accurate, simple, feasible, and can be used effectively for the quality control of Jindan Huoxue Mingmu pill.

[**Key words**] Jindan Huoxue Mingmu pill; HPLC; chlorogenic acid

金丹活血明目丸由金银花、丹参、茯苓、车钱子、牡丹皮、郁金、当归、柴胡、赤芍、黄芩、桃仁、红花 12 味药组成, 具有活血化瘀, 清热利湿, 明目等功效, 主要用于治疗视网膜炎, 视神经炎等症。为了更好地控制该制剂的质量, 选择用高效液相色谱法测定该制剂中的主药金银花的有效成分绿原酸的含量。结果表明: 该方法专属性强, 结果稳定可靠。

1 仪器与试药

SP2000 高效液相色谱仪, 包括 SPUV-1000 检测器, CH_{25} 柱温箱, ANASTAR 工作站等; 绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所提供, 批号: 110753-200212) 金丹活血明目丸(漯河市中医院制剂室) 批号: 20070301; 20070501; 20071011); 乙腈, 甲醇为色谱纯; 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

[收稿日期] 2009-02-25

[通讯作者] * 万 彦, Tel: 13938036856; E-mail: lhwy1108@sina.com

2.1 色谱条件与系统适用性 色谱柱为 Kromasil C_{18} 柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温为25 ℃; 流动相为乙腈-0.1% 的磷酸溶液(10∶90)[1]; 流速为 1.0 mL·min^{-1}; 检测波长为 327 nm; 进样量 20 μL; 理论塔板数按绿原酸峰计算应不低于1 200。结果绿原酸与样品中其他成分的峰均分离良好(见图 1、图 2)

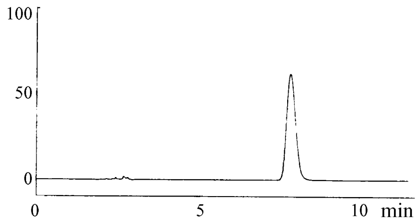

图 1 对照品色谱图

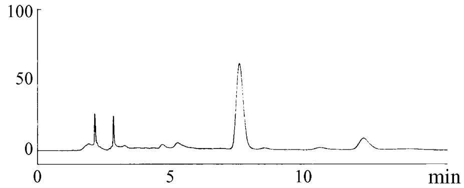

图 2 供试品色谱图

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品 9.03 mg, 置 10 mL 的棕色量瓶中, 加 50% 的甲醇溶解[2], 稀释至刻度, 摇匀。取溶液过 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 作为绿原酸对照品贮备液。

2.2.2 供试品溶液的配制[2] 精密称取研细后的金丹活血明目丸 5.8 g, 置 50 mL 的棕色量瓶中, 加 50% 的甲醇, 超声处理 30 min, 放冷, 稀释至刻度, 摇匀。精密量取续滤液 1 mL, 置 10 mL 棕色量瓶中, 用 50% 甲醇定容, 得供试品溶液。

2.3 线性关系考察 精密吸取绿原酸对照品储备液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置 10 mL 棕色量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 然后分别进样 20 μL, 测得峰面积。以峰面积(A) 为纵坐标, 以绿原酸浓度(C) 为横坐标, 绘制标准曲线, 求得回归方程为: $A = 6.58 \times 10^7 C + 1.81 \times 10^4$, ($n = 6$) $r = 0.999\,9$; 结果表明绿原酸对照品在 0.009 03 ~ 0.090 3 mg·mL^{-1} 范围内与峰面积线性关系良好。

2.4 精密度试验 精密吸取绿原酸对照品储备液 1.0 mL, 至 10 mL 棕色量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度; 连续进样 5 次, 绿原酸峰面积 RSD 值为 0.19%。

2.5 重复性试验 取同批样品(批号: 20070301) 按 3.2 项下分别制备 5 份供试品溶液, 进行测定, 绿原酸的含量 RSD 为 0.59%, 表明方法的重复性好。

2.6 稳定性实验 取 3.2 项下的供试品溶液, 分别在 0, 3, 6, 9, 12 h 测定, 结果表明, 测得的绿原酸峰面积 RSD 为 0.64%, 表明该溶液在 12 h 内稳定。

2.7 阴性对照试验 按处方比例配制缺金银花的阴性样品, 按含量测定方法进行测定, 结果见图 3, 表明其它药味对绿原酸测定无干扰。

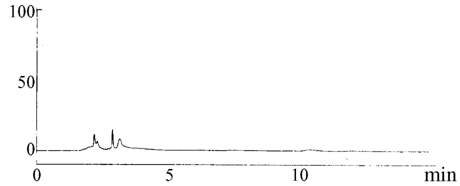

图 3 阴性样品色谱图

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品(批号为 20070301), 分别精密加入绿原酸对照品, 照供试品溶液的方法制备, 测定含量, 结果见表 1。

表 1 绿原酸加样回收试验结果($n = 6$)

样品取样量(g)	样品中绿原酸含量(mg)	加入绿原酸量(mg)	测定结果(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
5.743 1	8.20	6.43	14.59	99.4		
5.743 1	8.20	6.43	14.56	98.9		
5.743 1	8.20	8.17	16.29	99.0		
5.743 1	8.20	8.17	16.27	98.8	99.6	0.97
5.743 1	8.20	9.85	18.15	101.0		
5.743 1	8.20	9.85	18.12	100.7		

2.9 样品测定 精密量取绿原酸对照品储备液 0.2 mL, 置 10 mL 棕色量瓶中, 加 50% 的甲醇定容, 即得对照品溶液; 依照"3"项下的方法制备供试品溶液, 测定 3 批样品, 每批 3 份; 按色谱条件, 分别精密吸取上述对照品溶液与供试品溶液各 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 外标法计算金丹活血明目丸中绿原酸的含量, 结果分别为 1.43, 1.52, 1.48(mg·g^{-1})。

3 讨论

供试品溶液的制备参考中国药典 2005 年版一部金银花含量测定项下的方法。经方法学考察, 证明用在金丹活血明目丸中绿原酸的含量测定是可行的。金丹活血明目丸为医院中药复方制剂, 药味较多, 仅靠以前制剂质量标准中的鉴别难以控制其质量, 本文采用高效液相色谱法测定主药金银花中的绿原酸的含量, 方法灵敏, 重复性好, 可作为金丹活血明目丸制剂的质量控制方法。

[参考文献]

[1] 张小琼. HPLC 法测定银翘解毒片中绿原酸的含量[J]. 中药材, 2001, 24(9): 676.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005: 177, 592.