

高效液相色谱法测定止咳宁嗽胶囊中的绿原酸和橙皮苷

许海棠^{*}, 卢建芳, 蓝虹云
(广西民族大学化学与生态工程学院, 南宁 530006)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法同时测定止咳宁嗽胶囊中的有效成分绿原酸和橙皮苷的方法。方法: 样品用甲醇超声提取, 在 Zorbax SB-C₁₈(3.0 mm ×250 mm, 5 μm) 色谱柱上分离, 以含 1% 乙酸的水(A) -乙腈(B) 体系为流动相进行阶梯洗脱, 程序为 0 min(82 :18) ~5 min(82 :18) ~5.1 min(75 :25) ~20 min(75 :25); 流速为 0.35 mL·min⁻¹; 327 nm 紫外检测。结果: 绿原酸在进样量为 0.4 ~10.0 μg·mL⁻¹ 内呈良好的线性关系; 橙皮苷在进样量为 6.2 ~155.0 μg·mL⁻¹ 内呈良好的线性关系。绿原酸的平均回收率为 99.2%, RSD 为 1.0%。橙皮苷的平均回收率为 99.6%, RSD 为 0.9%。结论: 该方法简便快速, 结果准确, 重复性好, 可为止咳宁嗽胶囊的质量控制提供参考依据。

[关键词] 止咳宁嗽胶囊; 绿原酸; 橙皮苷; 高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010) 08-0044-03

Simultaneous Determination of Chlorogenic acid and Hesperidin in Zhike Ningsou Capsule by HPLC

XU Hai-tang^{*}, LU Jian-fang, LAN Hong-yun

(School of Chemistry and Ecological Engineering, Guangxi University for Nationalities, Nanning 530006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for simultaneous determination of chlorogenic acid and hesperidin in Zhike Ningsou Capsule . **Method:** The sample was extracted with methanol under ultrasonication. The HPLC separation was performed on a Zorbax SB C₁₈(3.0 mm ×250 mm, 5 μm) column, using water containing 1% acetic acid(A) – acetonitrile(B) as the mobile phase, in stepwise elution: 0 min(82 :18) ~5 min(82 :18) ~5.1 min(75 :25) ~20 min(75 :25) , at a flow rate of 0.35 mL·min⁻¹. **Result:** The linear range was 0.4 ~10.0 μg·mL⁻¹ and 6.2 ~155.0 μg·mL⁻¹ for chlorogenic acid and hesperidin; the average recovery was 99.2% and 99.6%; RSD 1.0% and 0.9%, respectively. **Conclusion:** This method can be applied for the quality control of Zhike Ningsou Capsule.

[Key words] Zhike Ningsou Capsule; chlorogenic acid ; hesperidin; HPLC; assay

止咳宁嗽胶囊为部颁药品标准中药成方制剂第九册收载的品种。由桔梗、荆芥、百部、款冬花、陈皮、防风等 11 味中药研制而成, 具有疏风散寒、宣肺解表、镇咳祛痰的功效, 临床用于风寒咳嗽、呕吐、咽喉肿痛等症状。款冬花中的绿原酸具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌抗病毒、免疫调节等多种作用^[1]; 陈

皮中的橙皮苷具有抗氧化、抗菌抗病毒、抗癌、祛痰平喘等药理活性^[2]。目前, 已有报道采用高效液相色谱法测定该制剂中的橙皮苷的含量^[3-4]和麻黄碱的含量^[5]。但同时测定该制剂中的绿原酸和橙皮苷含量的方法尚未见报道。为了更好地控制该制剂的质量, 本文建立了高效液相色谱法同时测定止咳宁嗽胶囊中的这 2 种有效成分的方法, 旨在为该制剂的质量控制提供实验依据。

1 仪器与试药

Agilent1100 高效液相色谱仪(德国), 包括 VWD 检测器、自动进样器等; Waters pro plus 超纯水仪(美

[收稿日期] 2009-11-06
[基金项目] 广西民族大学 学校重点科研项目 2009MDZD43
[通讯作者] 许海棠, Tel: (0771) 3260558; E-mail: xhthellen@ yahoo. com. cn

国); Sartorius ME 215S 电子分析天平(德国)。

对照品橙皮苷(批号 110721-200613) 和绿原酸(批号 110753-200413) 均购自中国药品生物制品检定所; 样品止咳宁嗽胶囊为吉林省吉春制药有限公司生产(批号 080101, 080322, 080603)。甲醇、乙腈(色谱纯, Fisher 公司), 乙酸(色谱纯, 天津光复精细化工研究所), 其他试剂均为分析纯, 所有用水均为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Zorbax SB-C₁₈(3.0 mm × 250 mm, 5 μm) 柱; 流动相 1% 乙酸的水(A)-乙腈(B); 阶梯洗脱程序为 0 min(82 :18) ~5 min(82 :18) ~5.1 min(75 :25) ~20 min(75 :25); 流速 0.35 mL·min⁻¹; 检测波长 327 nm; 柱温 25 °C; 进样量 2 μL。

2.2 对照品溶液的制备 准确称取绿原酸和橙皮苷对照品适量, 用甲醇溶解, 配成浓度为 1.01mg·mL⁻¹的绿原酸和 1.55 mg·mL⁻¹的橙皮苷对照品储备液; 其他不同质量浓度的对照品溶液由储备液稀释得到。

2.3 供试样品溶液的制备 取本品 20 粒, 倒出内容物, 研细, 取约 3.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 40 mL, 密塞, 超声提取 30 min, 放冷, 移入 50 mL 量瓶并定容。用时摇匀, 静置, 吸取上清液经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 即得。

2.4 干扰试验 按处方量配制缺款冬花和陈皮的阴性对照样品, 按含量测定项下方法, 比较供试品溶液、对照品溶液、阴性对照品溶液的色谱图, 结果样品中绿原酸和橙皮苷峰与其它组分色谱峰能较好分离, 阴性对照样品中色谱峰对测定无干扰, 见图 1。

2.5 线性关系考察 分别吸取对照品储备液适量, 以甲醇稀释配制成 0.4, 1.0, 2.0, 4.0, 6.1, 10.1 μg·mL⁻¹的绿原酸系列溶液; 浓度为 6.2, 15.5, 31.0, 62.0, 93.0, 155.0 μg·mL⁻¹的橙皮苷系列溶液。取系列对照品溶液各 2 μL 进样分析。以峰面积积分值为纵坐标(Y), 进样量为横坐标(X), 绘制标准曲线。结果表明绿原酸进样量在 0.8 ~20.2 ng 呈良好的线性关系, 回归方程 $Y = 11.09X + 2.28$, $r = 0.9995$; 橙皮苷进样量在 12.4 ~310.0 ng 呈良好的线性关系, 回归方程 $Y = 1.74 \times 10^3 X + 0.43$, $r = 0.9995$ 。

2.6 精密度试验 取对照品溶液与供试品溶液, 在上述色谱条件下连续进样 6 次, 测定峰面积。结

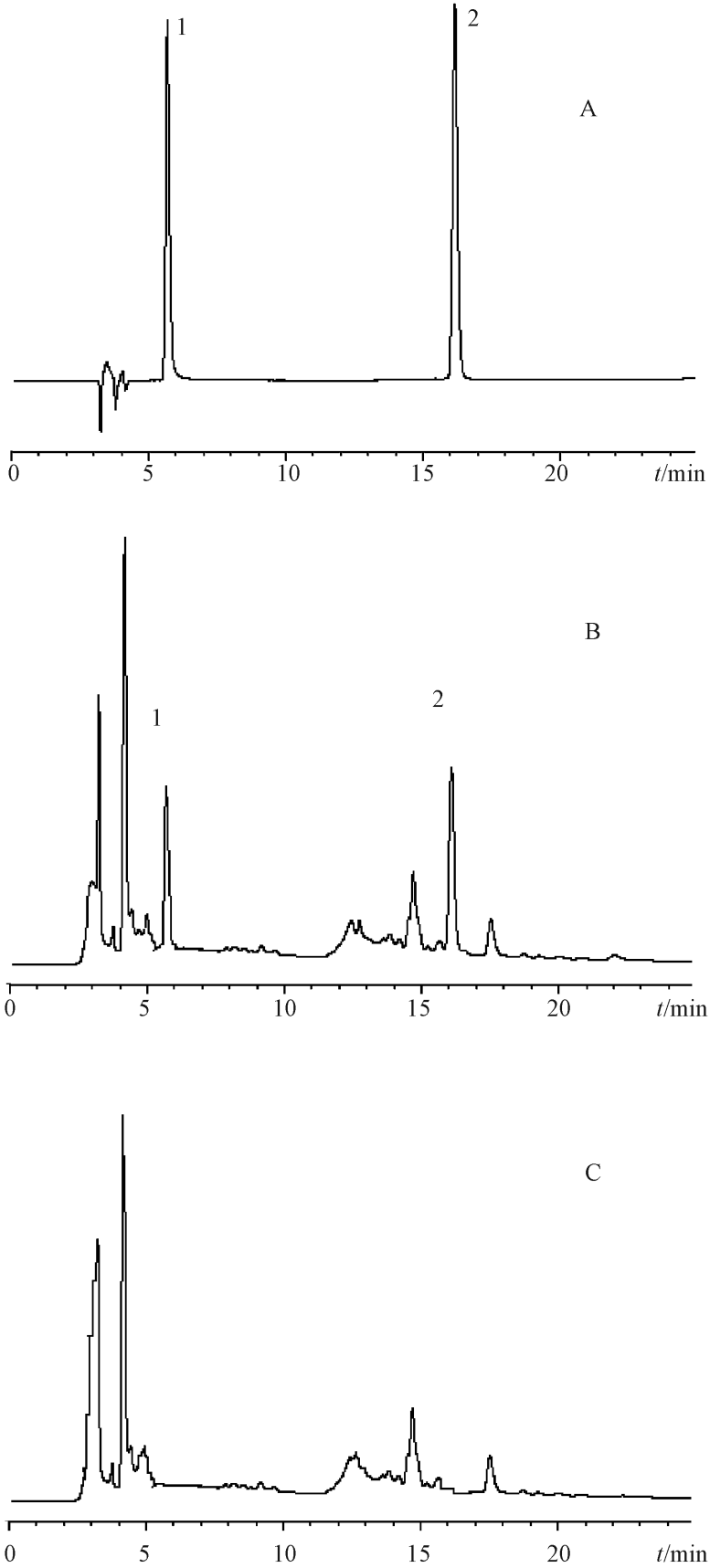


图 1 绿原酸(1)、橙皮苷(2) 对照品(A), 止咳宁嗽胶囊(B) 及阴性样品(C) 的 HPL 图

果对照品中绿原酸的 RSD 为 0.4%、橙皮苷的 RSD 为 0.3%; 样品中绿原酸的 RSD 为 0.9%、橙皮苷的 RSD 为 0.7%, 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取对照品溶液与供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 10, 12, 24 h 进样, 测定峰面积。结果对照品中绿原酸的 RSD 为 1.0%、橙皮苷的 RSD 为 0.9%; 样品中绿原酸的 RSD 为 1.4%、橙皮苷的 RSD 为 1.2%, 说明被测组分在 24 h 内检测稳定。

2.8 重复性试验 取同一批样品 6 份, 按供试品溶液的制备方法制备。样品中绿原酸的平均含量为

0.478 mg·g⁻¹, RSD 为 1.8%; 橙皮苷的平均含量为 5.081 mg·g⁻¹, RSD 为 1.6%, 表明重复性好。

2.9 回收率试验 取已测知含量(绿原酸 0.478 mg·g⁻¹, 橙皮苷 5.081 mg·g⁻¹) 的止咳宁嗽胶囊内容物共 9 份, 每份约 3.0 g, 精密称取, 3 份为 1 组, 按低、中、高 3 个浓度分别加入对照品溶液, 按“2.3”项下的方法制备试验用溶液进行测定, 分别计算 2 种成分的平均回收率, 结果见表 1。

表 1 绿原酸、橙皮苷回收率试验

被测成分名称	样品中含量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
绿原酸	0.478	0.30	0.771	97.7	99.2	1.0
	0.478	0.30	0.774	98.7		
	0.478	0.30	0.773	98.3		
	0.478	0.50	0.981	100.6		
	0.478	0.50	0.977	99.8		
	0.478	0.50	0.974	99.2		
	0.478	0.80	1.281	100.4		
	0.478	0.80	1.274	99.5		
	0.478	0.80	1.268	98.7		
	0.478	0.80	1.268	98.7		
橙皮苷	5.081	3.00	8.063	99.4	99.6	0.9
	5.081	3.00	8.039	98.6		
	5.081	3.00	8.057	99.2		
	5.081	5.00	10.106	100.5		
	5.081	5.00	10.021	98.8		
	5.081	5.00	10.046	99.3		
	5.081	8.00	13.113	100.4		
	5.081	8.00	13.177	101.2		
	5.081	8.00	13.025	99.3		

2.10 样品测定 分别精密称取不同批号样品, 按“2.3”项下的方法制备样品溶液, 每批样品测定 3 次, 代入回归方程计算 3 批止咳宁嗽胶囊样品中的 2 种有效成分的含量, 结果见表 2。

3 讨论

3.1 流动相的选择 曾选用甲醇-水及乙腈-水为流动相, 试验结果表明使用乙腈-水体系作流动相时灵敏度明显高于甲醇-水体系。考察了将 0~2.0% 的

表 2 止咳宁嗽胶囊样品含量测定(n = 3)

No.	绿原酸 /mg·g ⁻¹	RSD /%	橙皮苷 /mg·g ⁻¹	RSD /%
1	0.478	0.7	5.081	0.9
2	0.496	0.9	4.987	1.2
3	0.483	0.8	4.893	1.0

乙酸溶液加入到流动相进行试验, 发现酸度对绿原酸的峰形影响较大, 当乙酸浓度为零时, 拖尾严重; 当含量为 1% 时其色谱峰的对称性得到很好的改善。因此确定流动相为含有 1.0% 乙酸的水-乙腈溶液。

3.2 提取方法 试验过程中对供试品溶液的处理方法进行了考察。通过用不同浓度(50%, 75%, 100%) 的甲醇进行提取和不同的提取时间(20 min, 30 min, 45 min, 60 min) 进行比较试验, 最终确定用甲醇超声提取 30 min 为最佳方案。

3.3 检测波长的选择 分别取绿原酸、橙皮苷对照品溶液在 200~400 nm 进行光谱扫描, 绿原酸最大吸收为 327 nm, 橙皮苷最大吸收为 280 nm。提取各波长下色谱进行比较, 选择 327 nm 为检测波长, 保证了低含量组分绿原酸有较高的信噪比, 检测灵敏。

3.4 本研究的试验结果表明, 样品处理方法简单, 测定方法稳定, 精密度高, 重复性好, 可以为止咳宁嗽胶囊的质量控制提供依据。

[参考文献]

[1] 吴卫华, 康桢, 欧阳冬生, 等. 绿原酸的药理学研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 691.

[2] 张冬松, 高慧媛, 吴立军. 橙皮苷的药理活性研究进展[J]. 中国现代中药, 2006, 8(7): 25.

[3] 邓芳, 刘涛, 刘映. 高效液相色谱法测定止咳宁嗽胶囊中橙皮苷含量[J]. 中国药业, 2008, 17(21): 34.

[4] 苏彦斌, 张凤荣, 苏彦文. 高效液相色谱法测定止咳宁嗽胶囊中橙皮苷的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(3): 243.

[5] 赵丽茹, 张小兰, 王永生. 止咳宁嗽胶囊质量标准的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(6): 1452.

[责任编辑 顾雪竹]