

HPLC法测定中药山楂中有效成分绿原酸的含量

梁睿姝¹, 张川², 邹豪², 金磊² (1. 广东双林生物制药有限公司, 广东 湛江 524009; 2. 第二军医大学药学院新药研究中心, 上海 200433)

[摘要] 目的 建立测定山楂中绿原酸含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为Sunfire C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm), 流动相为甲醇-0.1 mol/L磷酸二氢钠缓冲液(25:75), 流速为1.0 ml/min, 柱温为28 °C, 检测器波长为327 nm。结果 绿原酸的质量浓度在7.03~70.3 μg/ml范围内与峰面积值线性关系良好($r^2=0.9996$), 精密度RSD为0.27%, 平均加样回收率为96.92%, RSD为0.92% ($n=6$)。结论 HPLC法简便易行、结果可靠, 可以快速、准确地测定山楂中绿原酸的含量。

[关键词] 绿原酸; 高效液相色谱; 山楂

[中图分类号] R284

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2012)06-0457-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.06.018

Determination of chlorogenic acid in hawthorn by HPLC

LIANG Rui-shu¹, ZHANG Chuan², ZOU Hao², JIN Lei² (1. Guang Dong Shuang Lin Bio-pharmacy Company Limited, Zhanjiang 524009, China; 2. New Drug Research Center, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To establish a HPLC method for determination of chlorogenic acid in the hawthorn. **Methods** Sunfire C₁₈ (4.6 mm × 250 mm 5 μm) column was used. The mobile phase was methanol: sodium dihydrogen phosphate (25:75). The flow rate was 1.0 ml/min, and the temperature was at 28 °C. The detection wavelength was 327 nm. **Results** The calibration curve was at the range of 7.03~70.3 μg/ml ($r=0.9996$), RSD was 0.92% ($n=6$) and the average recovery was 96.92%. **Conclusion** The method was simple, reliable, accurate for determination of chlorogenic acid in the hawthorn.

[Key words] chlorogenic acid; HPLC; hawthorn

山楂为蔷薇科植物(Rosaceae)山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. major N. E. Br, 山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 及野山楂 *Crataegus cuneata* Sieb et Zucc. 的干燥成熟果实, 又称山楂果、山里红、山梨、红果等^[1,2]。山楂的化学成分主要为有机酸类、酚酸类、三萜酸类、黄酮类^[3]。绿原酸作为其中的主要成分之一, 是卫生部质量标准鉴别项下重要的质控指标。

目前, 绿原酸的含量测定方法主要有紫外可见分光光度法^[4]、薄层色谱扫描法^[5]、高效毛细管电泳法^[6]、高效液相色谱法等^[7]。在这些方法中, 高效液相色谱法(HPLC)具有高效、准确, 受其他成分影响小的优点。用高效液相色谱法对山楂活性成分分析的报道较多, 但很多报道都是测定黄酮类成分, 对山楂中绿原酸的分析报道较少^[8,9]。本研究完成了通过方法学研究, 建立绿原酸含量测定方法, 证明该法具有准确、重现性好、专属性强、快捷简便等特

点, 可用于控制本品的内在质量。

1 材料与仪器

1.1 材料 山楂(产自山东); 甲醇(分析纯, 国药集团试剂公司); 磷酸(分析纯, 国药集团试剂公司); 甲醇(色谱纯, 美国J. T. Baker公司); 水(娃哈哈纯净水); 绿原酸(中国药品生物制品检定所, 批号: 117053-200413)。

1.2 仪器 DK-8D型电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司); 超越系列XP205电子天平(METTLER TOLEDO); 旋转蒸发器R-210(瑞士BUCHI公司); e2695高效液相色谱仪(美国Waters公司); 2489紫外分光光度计(美国Waters公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1 mol/L磷酸二氢钠缓冲液(25:75); 流速为1.0 ml/min; 柱温: 28 °C; 检测波长: 327 nm; 进样量: 10 μl。

2.2 溶液的制备

[作者简介] 梁睿姝(1985-), 女, 硕士研究生。Tel: (0759) 3231999。
[通讯作者] 金磊。Tel: (021) 81871359, E-mail: jinl_2001@126.com.

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品 7.03 mg, 置 100 ml 量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀得浓度 70.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 母液, 置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.2.2 供试品溶液的制备 称取山楂样品粗粉 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇 30 ml, 密塞, 称定重量, 加热回流处理 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 10 ml 蒸干, 残渣加水 5 ml 使其溶解, 再

加入氯仿 5 ml 萃取, 浸渍 3 min, 离心, 抽取上清液 1 ml, 用微孔滤膜 ($0.45\text{ }\mu\text{m}$) 滤过, 取续滤液待测。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性实验 按 2.1 项的色谱条件下, 以对照品溶液、样品溶液分别进样, 根据色谱参数计算系统适用性。样品中绿原酸保留时间是 9.658 min, 拖尾因子 0.99, 理论塔板数大于 4000, 分离度为 2.1。对照品和样品的色谱图见图 1。

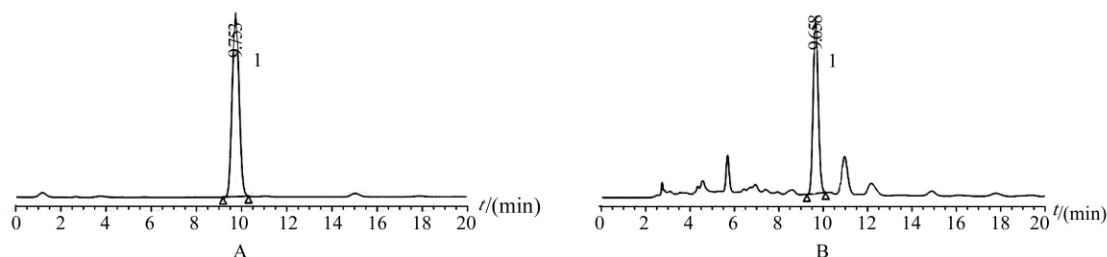


图 1 绿原酸对照品(A)和供试品(B) HPLC 色谱图
1-绿原酸

2.3.2 标准曲线的制备 精密吸取上述对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0 ml 置于 10 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得 7.03、14.06、21.09、28.12、42.18、56.24、70.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液, 分别进样 10 μl , 按上述色谱条件测定绿原酸峰面积, 以绿原酸峰面积为纵坐标(Y), 对照品浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)为横坐标(X), 绘制标准曲线, 求得回归方程为 $Y = 28\ 743X - 46\ 672$, $r = 0.999\ 6$, 绿原酸含量在 7.03 ~ 70.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间呈良好线性。

2.3.3 日内精密度的考察 精密吸取 7.03、28.12、70.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 低、中、高 3 个浓度对照品, 按上述液相色谱条件 1 h 内重复进样 5 次, 结果绿原酸平均峰面积

值分别为 181 677.33、751 378.33、1 992 169.33, 峰面积相对标准偏差为 0.16%、0.27% 和 0.70%。

2.3.4 稳定性的考察 精密称取绿原酸供试品溶液, 按上述液相色谱条件, 每隔一定时间进样一次, 结果供试品溶液中绿原酸在 24 h 内峰面积无明显变化, 绿原酸峰面积相对标准差为 0.70%。

2.3.5 重现性考察 取山楂供试品适量 5 份, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 依法测定, 绿原酸平均含量为 0.394 7 mg/g, RSD = 3.14%。

2.3.6 回收率的测定 精密称取 0.25 g 山楂样品, 向其中添加绿原酸对照品 (70 $\mu\text{g}/\text{g}$) 按上述供试品溶液的制备项下进行操作, 测定计算回收率, 结果见表 1。

表 1 回收率实验结果 ($n = 6$)

取样量 (g)	供试品含量 (μg)	添加绿原酸量 (μg)	实测值 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.240	189.4	200.0	385.4	98.00		
0.251	198.1	200.0	392.4	97.15		
0.251	198.1	200.0	391.5	96.70	96.92	0.92
0.247	194.9	200.0	389.7	97.40		
0.249	196.5	200.0	387.2	95.35		
0.252	198.9	200.0	392.7	96.90		

2.3.7 山楂含量测定 对 3 个不同批次的山楂按供试品溶液制备处理后, 测定其含量。结果批号为 110914、111008、111205 的山楂中绿原酸平均含量分别为 0.386 1、0.365 8、0.394 7 mg/g ($n = 3$)。

3 讨论

《中国药典》一部中, 山楂药材只采用滴定法测定了枸橼酸的含量。本实验经过摸索供试品的制备方法及其适应的色谱条件, 采用 HPLC 法测定山楂中绿原酸的含量, 而且取得较好的分离测定效果。

(下转第 477 页)

卷成绩各占一定的比例得出综合成绩。

3.2 考核内容、题型的改革 考试内容和题型设置方面,结合考试大纲,同时参考执业药师资格考试特点,考试题型可以采用执业药师资格考试的A、B、X题型,还可增加名词解释、简答或论述题,这都为将来参加执业药师资格考试奠定了基础。

4 突出重点,与时俱进^[6]

药事管理学科的时效性和政策性较强,其教学内容经常随着我国有关药品管理的法律、法规、规章的不断修订、颁布、废止而改变,是一种动态发展的学科。因而这要求我们教师除了将书本理论知识讲述清楚外,还必须经常通过报刊杂志、网络媒体等途径及时了解药事管理的新理论、新知识和新动态,关注国家有关药品管理的政策变化,何时发布新的法规、规章,何时开始实施,都应成为学生了解的最新内容。例如讲述国家药物政策相关内容时,着重介绍我国在2009年8月发布国家基本药物目录(基层医疗卫生机构配备使用部分)及基本药物的遴选、生产、经营配送、价格和使用等方面监督管理。再如,讲述药品生产质量监督管理相关内容时,因国家卫生部于2011年2月刚颁布了新版药品生产质量管理规范(GMP),我们先给学生介绍新版GMP的特点,并对照旧版GMP,着重介绍新版GMP在章节、结构框架等方面与旧版的不同点及新版GMP增加的新内容、新理念。

5 优化师资队伍的建设

近年来,随着学科队伍的建设,各院校的师资方面有了很大的提高,但由于药事管理学科实践性、政策性较强,除了配备专职教师外,还应配备或聘请兼职教师、一线专家,采用多种教学形式提高教学质量。这样通过专职教师学生能系统接受理论知识学习,而兼职教师则可以结合实践工作,具体生动地介绍药品生产、经营质量管理、药品注册管理及药品监管手段在监督管理过程中的应用。总之,药事管理学作为自然科学与社会科学相互交叉、相互渗透的边缘学科,其在药学领域中所处的地位日趋重要和突出,那么何在有限学时数内使学生更好地掌握这门学科,需要我们教师不断探索和充分应用各种行之有效的教学方法。

【参考文献】

- [1] 杨世民. 药事管理学[M]. 第5版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 7.
- [2] 杜 鹃, 陈 玲, 徐爱荣. 在案例教学法中要重视案例库建设[J]. 上海金融学院学报, 2005, 17(3): 61.
- [3] 刘全礼, 宋 森, 韦新城, 等. 案例教学法在药事管理学教学中的应用[J]. 包头医学院学报, 2009, 25(5): 91.
- [4] 陈 洁. 浅谈药事管理学几点教学方法[J]. 中国中医药现代远程教育, 2010, 8(21): 48.
- [5] 丛军兹, 王景欣, 王广伟, 等. 《药事管理学》的教学体会与教学方法探讨[J]. 牡丹江医学院学报, 2010, 31(3): 107.
- [6] 张朝燕, 刘承初, 吴文惠, 等. 基于综合素质培养的药学管理实践探索[J]. 中国教育导刊, 2007, 17: 31.

[收稿日期]2011-12-29

[修回日期]2012-05-21

(上接第458页)

3.1 提取方法的研究 采用不同浓度(25%、50%、75%、100%)的甲醇对山楂中的绿原酸进行提取,结果发现纯甲醇的提取得率较高,故采用纯甲醇提取绿原酸。加热回流时间的考察中,分别考察了30、60、90、120 min,实验结果表明,30 min加热回流已将绿原酸提取完全。

3.2 色谱条件的选择 按相关文献报道方法,分别以甲醇-磷酸二氢钠、乙腈-磷酸等系统为流动相进行多次实验,结果表明,在色谱条件:甲醇-0.1 M磷酸二氢钠缓冲液(25:75),流速为1.0 ml/min时,250mm C₁₈色谱柱,绿原酸的分离度为2.1,故采用以上的色谱条件。

【参考文献】

- [1] 郑虎占,董泽宏,余 靖. 中药现代研究与应用: 第一卷[M]. 北京: 学苑出版社, 1997: 597.

- [2] 冯凤莲,张卉朱. 山楂的研究进展[J]. 河北医科大学学报, 1997, 18(6): 383.
- [3] 高光跃,冯毓秀,秦秀琴. 山楂类果实的化学成分分析及其质量评价[J]. 药学学报, 1995, 30(2): 138.
- [4] 袁 华,邓 良,孙炎彬,等. 可见分光光度法测定杜仲叶中的绿原酸[J]. 生物加工过程, 2007, 5(1): 71.
- [5] 朱 玉,张书胜,张西林,等. 薄层色谱法分析葵花仁粕中的绿原酸[J]. 色谱, 2001, 19(1): 82.
- [6] 张风云,毛富春. 用毛细管区带电泳技术测定杜仲叶中绿原酸含量的研究[J]. 分析测试学报, 1996, 15(3): 66.
- [7] 崔伟伟,范永春. 不同提取方法测定野马追药材中绿原酸含量比较研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(3): 178.
- [8] 韩 哲,崔 同,锁 然,等. 山楂果实中活性成分的高效液相色谱法[J]. 食品科技, 2006(6): 124.
- [9] 胡志国,王远兴. 反相高效液相色谱法测定山楂中绿原酸的含量[J]. 食品科学, 2007(11): 407.

[收稿日期]2012-06-01

[修回日期]2012-09-12