

高效液相色谱法测定喉舒宁片中对香豆酸的含量

姚国灿, 赵敏杰, 潘永玉, 郭兴杰*

(沈阳药科大学药学院, 辽宁沈阳 110016)

喉舒宁片由白花蛇舌草、穿心莲、山芝麻 3 味中药制备而成, 具有清热解毒, 散结止痛之功效。临床上用于急慢性咽喉炎, 急性扁桃体炎等疾病的治疗。该制剂的质量标准^[1]只规定了鉴别项目, 尚无指标性成分的含量测定方法。

对香豆酸为芳香族酯肪酸类化合物, 具有抗癌^[2]和抗心血管病^[3]的作用, 并对肝的诱变和氧化损伤具有保护作用^[4]。此类化合物如桂皮酸、咖啡酸、绿原酸等均有明显的药理活性, 且对人体安全。白花蛇舌草药材中含有对香豆酸。对收集到的全国 12 个产地的白花蛇舌草药材中对香豆酸的测定结果表明, 该药材中含有对香豆酸为 $0.469 \sim 1.884 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[5]。有文献报道用薄层扫描法^[6]测定喉舒宁片中齐墩果酸的含量、用反相高效液相色谱法测定该制剂中的穿心莲和脱水穿心莲的含量^[7], 但未见有测定该制剂中对香豆酸含量方法发表。本研究建立了喉舒宁片中对香豆酸含量测定的反相高效液相色谱法, 该法具有分离效果好、灵敏、准确等优点, 可与其他成分的含量测定方法一起, 用于该产品的质量的控制。

1 仪器和试剂

LC-10AT 型高效液相色谱仪 (日本岛津), SPD-10A 型紫外检测器 (日本岛津), CKCHROM 色谱工作站 (日本岛津); AS3120B 超声波振荡器 (日本岛津), 甲醇 (色谱纯, 山东禹王化学试剂厂), 冰醋酸 (分析纯, 山东禹王化学试剂厂), 重蒸水 (自制), 对香豆酸对照品 (由沈阳药科大学分析教研室精制, 纯度大于 99.5%)。喉舒宁片 (批号 20050701, 20050623, 20050709 自制; 20030105, 20030701 市售)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C_{18} 色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相甲醇-1% HAc (35:65), 流速

$1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 308 nm, 进样量 20 μL。在供试品中对香豆酸色谱峰与其相邻峰达到完全分离, 样品中其他成分不干扰对香豆酸测定, 以对香豆酸峰计算理论板数不低于 3 000。

2.2 对香豆酸对照品溶液的配制 精密称取对香豆酸精制品适量, 用甲醇稀释并制成 1 mL 含对香豆酸 1.02 mg 的对照品贮备液。取一定量的对照品贮备液, 用甲醇稀释成质量浓度为 $2.04 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取本品 20 片, 除去糖衣, 精密称定, 研细, 取约 1 g, 精密称定, 加甲醇 10 mL, 称重。超声 30 min, 用甲醇补足损失的重量, 摇匀, 离心, 取上清液, 过 0.45 μm 滤膜, 进样。

2.4 阴性对照液的制备 按 2.3 项下方法制备不含白花蛇舌草的阴性对照溶液。

2.5 专属性试验 取阴性对照溶液、对香豆酸对照品溶液 ($2.04 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和供试品溶液在上述色谱条件下进样, 色谱图见图 1。

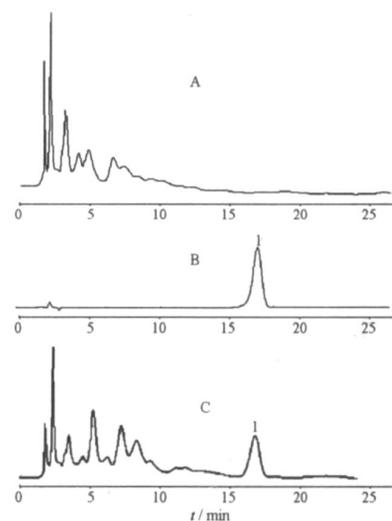


图 1 喉舒宁片 HPLC 图

A. 阴性; B. 对照; C. 样品; 1. 对香豆酸

2.6 线性关系和检测限 分别取 2.2 项下系列对香豆酸对照品溶液 20 μL, 取对香豆酸对照品贮备

[收稿日期] 2006-02-09

[通讯作者] * 郭兴杰, Tel: (024) 23986285, E-mail: gxjhyz@

yahoo.com.cn

· 1470 ·

液,用甲醇稀释制成 0.204, 0.510, 1.02, 2.04, 3.06, 4.08, 5.10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,在上述色谱条件下进行测定,以峰面积 (Y) 对质量浓度 ($X, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行线性回归,得回归方程 $Y = 9.12 \times 10^4 X - 501$, $r = 0.9996$ 。对香豆酸在 0.204 ~ 5.10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。当 $S/N = 3$ 时对检测限进行测定,对香豆酸的检测限为 0.4 ng。

2.7 精密度和稳定性试验 精密吸取供试品溶液 20 μL ,重复进样 6 次,记录峰面积, RSD 为 1.7%。

供试品溶液配制后分别于室温避光放置 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 后进样测定,计算其峰面积的 RSD 为 1.3%,表明供试品溶液中的对香豆酸至少在 24 h 内稳定。

2.8 重复性试验 取同一批号片剂粉末 6 份,按含量测定方法操作制备供试品溶液,在上述色谱条件下测定,计算含量, RSD 为 1.6%。表明本法重复性良好。

2.9 回收率试验 精密称取已知含量的喉舒宁片剂粉末 0.5 g,共 6 份,分别加入对照品溶液 (5.10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1.8 mL,按再加入甲醇 8.2 mL,按 2.3 项下操作制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样,计算回收率。结果见表 1。

表 1 对香豆酸加样回收率

样品中含量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
8.71	9.18	17.87	99.8	99.4	1.6
9.83	9.18	18.78	97.5		
9.15	9.18	18.52	102.1		
8.79	9.18	17.88	99.0		
7.74	9.18	16.77	98.4		
8.60	9.18	17.75	99.7		

2.10 样品测定 取 3 批自制 2 批市售的喉舒宁片,按 2.3 项下操作制备供试品溶液。分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL ,进样,按外标法以峰面积计算片剂中对香豆酸的含量,见表 2。

3 结果与讨论

表 2 样品中对香豆酸含量 ($n = 3$)

批号	对香豆酸 / μg /片	RSD /%
20050819	4.40	1.3
20050623	4.38	1.0
20050709	4.28	1.7
20030105	3.69	2.1
20050701	3.97	0.9

选择超声法提取对香豆酸,操作方法简单,省时。对超声提取时间考察结果表明,提取时间大于 20 min 即可提取完全,故规定提取时间为 30 min。

比较了用氨基柱和 C_{18} 柱分离喉舒宁中的对香豆酸。结果显示,2 种色谱柱均能很好分离对香豆酸和样品中的其他组份。氨基柱分离对香豆酸保留时间短,柱效高。但由于 C_{18} 柱更为常用,适用性更强,且流动相中有机相比例较小,成本相对较低,故最终用 C_{18} 柱分离喉舒宁中的对香豆酸。

对香豆酸为有机弱酸,流动相中加入少量酸能抑制其解离,提高柱效,故本实验中选用了甲醇和含冰醋酸的水溶液作为流动相;由于对香豆酸见光易分解,精制品及供试品溶液均应避光操作。

[参考文献]

- [1] 广东省卫生厅. 广东省药品标准 [S]. 上册. 1987: 557.
- [2] Ferguson L R, Shu S T, Harris J P. Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells [J]. Mol Nutr Food Res, 2005, 49: 585.
- [3] W Wallerath T, Li H G, Forstemann U, et al. A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase [J]. Nitric Oxide, 2005, 12: 97.
- [4] Yeh C T, Yen G C. Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance associated protein 3mRNA expression [J]. J Nutr, 2006, 136 (1): 11.
- [5] 张才华, 郭兴杰, 宝炉丹, 等. 反相高效液相色谱法测定不同产地白花蛇舌草中的对香豆酸 [J]. 色谱, 2005, (2): 180.
- [6] 傅军, 邓红, 钟兆键. 喉舒宁质量标准初步研究 [J]. 中药材, 1997, 20 (6): 306.
- [7] 宋粉云, 毋福海, 梁汉明, 等. 喉舒宁片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的 HPLC 测定 [J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33 (11): 560.

[责任编辑 鲍雷]

欢迎投稿 欢迎刊登广告