

HPLC法测定血府逐瘀颗粒中芍药苷、阿魏酸、柚皮苷及甘草酸的含量

周军¹, 孙艳², 张晶³, 曲佳¹, 吕曙华¹

(1. 天津市药品检验所, 天津 300070 2. 天津天士力制药股份有限公司, 天津 300142

3. 天津中新药业集团有限公司乐仁堂制药厂, 天津 300380)

摘要 目的: 建立 HPLC法同时测定血府逐瘀颗粒中芍药苷、阿魏酸、柚皮苷及甘草酸的含量。方法: 采用 Sepax C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 以 0.1% 磷酸水溶液 (A) - 70% 乙腈 (B) 为流动相进行梯度洗脱 (0~30 min 24% B → 40% B 30~50 min 40% B → 100% B 51~60 min 24% B), 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 0~12 min 时 230 nm (芍药苷), 12.1~15.5 min 时 320 nm (阿魏酸), 15.6~30 min 时 283 nm (柚皮苷), 30.1~60 min 时 250 nm (甘草酸); 柱温 40℃。结果: 芍药苷、阿魏酸、柚皮苷及甘草酸的线性范围分别为 0.05~0.65 0.01~0.13 0.05~0.65 0.02~0.28 μg (r ≥ 0.9990); 平均回收率 (n = 6) 分别为 101.9% (RSD = 2.0%), 104.3% (RSD = 2.4%), 104.4% (RSD = 1.8%), 102.9% (RSD = 2.1%)。结论: 所建立的 HPLC法可同时测定血府逐瘀颗粒中芍药苷、阿魏酸、柚皮苷及甘草酸的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 血府逐瘀颗粒; 芍药苷; 阿魏酸; 柚皮苷; 甘草酸

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)08-1253-03

RP-HPLC analysis of paeoniflorin, ferulic acid, naringin and glycyrrhizic acid in Xuefu Zhuyu granules

ZHOU Jun¹, SUN Yan², ZHANG Jing³, QU Jia¹, LÜ Shu-hua¹

(1. Tianjin Institute of Drug Control, Tianjin 300070, China 2. Tianjin TASLY Pharmaceutical Corporation LTD, Tianjin 300142, China

3. Yuerentang Medicine Factory, Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Group Corporation LTD, Tianjin 300380, China)

Abstract Objective To develop an HPLC method for determination of paeoniflorin, ferulic acid, naringin and glycyrrhizic acid in Xuefu Zhuyu granules **Methods** The analysis was carried out on an Sepax C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column. The mobile phase was composed of 0.1% phosphoric acid aqueous (A) and 70% acetonitrile (B) with gradient elution (0~30 min 24% B → 40% B 30~50 min 40% B → 100% B 51~60 min 24% B) and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹; The detection wavelengths were set at 230 nm for paeoniflorin (0~12 min), 320 nm for ferulic acid (12.1~15.5 min) and 283 nm for naringin (15.6~30 min) and 250 nm for glycyrrhizic acid (30.1~60 min); The column temperature was 40℃. **Results** The linear ranges of paeoniflorin, ferulic acid, naringin and glycyrrhizic acid were 0.05~0.65 μg, 0.01~0.13 μg, 0.05~0.65 μg, 0.02~0.28 μg (r ≥ 0.9990, respectively); The average recoveries were 101.9%, 104.3%, 104.4% and 102.9% (RSD < 2.5%, n = 6, respectively). **Conclusion** This method is simple and can be used to determine the above 4 components with satisfactory accuracy and repeatability.

Key words HPLC; Xuefu Zhuyu granules; paeoniflorin; ferulic acid; naringin; glycyrrhizic acid

血府逐瘀颗粒是根据清代名医王清任所创的经典名方血府逐瘀汤生产的中药制剂, 由赤芍、当归、川芎、枳壳、甘草、牛膝、桔梗、桃仁、柴胡、红花、地黄共 11 味中药组成, 具有活血化瘀、行气止痛的功效, 用于瘀血内阻、头痛或胸痛、内热瞀闷、失眠多梦、心悸怔忡、急躁善怒^[1]。其中赤芍清热凉血、散瘀止

痛, 当归补血活血、调经止痛、润肠通便, 川芎活血行气、祛风止痛, 枳壳理气宽中、行滞消胀, 甘草补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药。因此建立 HPLC法同时测定赤芍、当归、川芎、枳壳和甘草中的主要有效成分芍药苷、阿魏酸、柚皮苷、甘草酸的含量, 对控制和提高血府逐瘀颗粒的质量有重

要的意义。

文献报道中对芍药苷、阿魏酸、柚皮苷、甘草酸进行单一成分^[2]或2种成分^[3]进行HPLC含量测定的方法较多,但未见同时对4种成分进行HPLC含量测定的方法。本文建立HPLC法同时测定上述4种成分的含量,方法简单、快速、准确。

1 仪器与试剂

Agilent 1200高效液相色谱仪,配有在线脱气机、四元泵、VWD检测器、自动进样器、Chem Stations 色谱工作站。SBATA超声波清洗器。

乙腈为色谱纯,天津市康科德科技有限公司;水为去离子水;磷酸为分析纯,天津市康科德科技有限公司。对照品芍药苷(批号110736-200731)、阿魏酸(批号110773-200611)、柚皮苷(批号110722-200610)、甘草酸铵(批号110731-200614)均购自中国药品生物制品检定所。血府逐瘀颗粒样品为内蒙古伊泰药业有限责任公司圣龙分公司生产;规格:每袋5g 批号:071101, 071103, 071104。

2 溶液制备

2.1 对照品溶液 取对照品芍药苷、阿魏酸、柚皮苷及甘草酸铵适量,精密称定,加70%甲醇制成每1mL均为30μg的混合溶液,即得。

2.2 供试品溶液 取本品适量,研细,取0.5g精密称定,精密加入70%甲醇25mL,称定重量,超声处理(功率500W,频率40kHz)60min,放冷,再称定重量,用70%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 阴性样品溶液 按处方制备分别不含赤芍、当归、川芎、枳壳、甘草的阴性样品及不含上述4味中药的阴性样品,按“2.2”项下方法操作,即得。

3 色谱条件

采用Sepax C₁₈(4.6mm×250mm, 5μm)色谱柱;以0.1%磷酸水溶液(A)-70%乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱(0~30min 24% B→40% B; 30~50min 40% B→100% B; 51~60min 24% B),流速1.0mL·min⁻¹;检测波长:0~12min时230nm(芍药苷),12.1~15.5min时320nm(阿魏酸),15.6~30min时283nm(柚皮苷),30.1~60min时250nm(甘草酸);柱温40℃;进样量5μL。在此色谱条件下,精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液进样,结果芍药苷、阿魏酸、柚皮苷和甘草酸的保留时间分别为9.4 14.5 17.5 43.4min,分离度均大于1.5,理论板数按芍药苷峰计算应不低于5000。结果表明样品中其他成分对芍药苷、阿魏

酸、柚皮苷和甘草酸的测定无干扰。见图1。

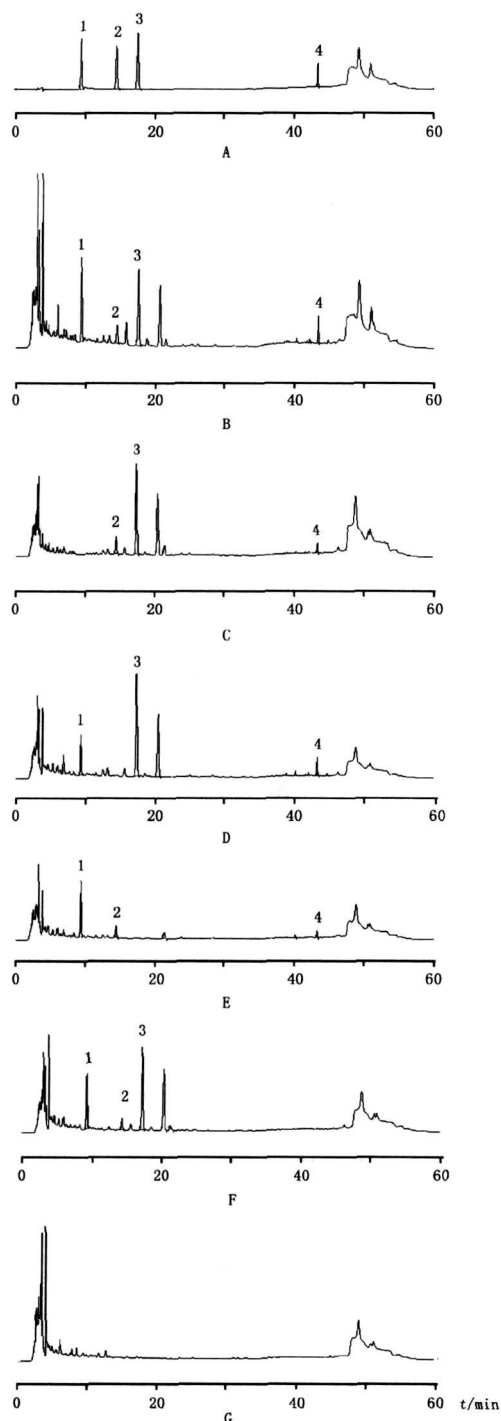


图1 对照品(A)、样品(B)、缺赤芍阴性样品(C)、缺当归和川芎阴性样品(D)、缺枳壳阴性样品(E)、缺甘草阴性样品(F)及阴性样品(缺赤芍、当归、川芎、枳壳及甘草)(G)色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances(A), sample(B), and negative samples without Radix Paeoniae Rubra(C), Radix Angelica Sinensis and Rhizome Chuanxiong(D), Fructus Aurantii(E), Radix Glycyrrhizae(F), and Radix Paeoniae Rubra, Radix Angelica Sinensis, Rhizome Chuanxiong, Fructus Aurantii and Radix Glycyrrhizae(G)

1. 芍药苷(paeoniflorin) 2. 阿魏酸(fennel acid) 3. 柚皮苷(naringin) 4. 甘草酸(glycyrrhizic acid)

4 方法学考察

4.1 线性关系的考察 精密称取对照品芍药苷、阿魏酸、柚皮苷和甘草酸铵适量,用 70% 甲醇分别制成各自浓度为 0.0650, 0.0275, 0.1351, 0.0576 mg·mL⁻¹ 的单一成分对照品溶液,分别均精密吸取上述溶液 1, 2, 4, 8, 12 mL, 一一对应分别置 25 mL 量瓶中,用 70% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列浓度混合对照品溶液,分别精密吸取 10 μ L 进样,按上述色谱条件测定峰面积,以对照品进样量 (μ g) 对峰面积值进行线性回归,求得回归方程。芍药苷、阿魏酸、柚皮苷和甘草酸回归方程分别为:

$$Y = -4.65 + 1.15 \times 10^3 X \quad r = 0.9992$$

$$Y = -3.81 + 5.46 \times 10^3 X \quad r = 0.9999$$

$$Y = 0.50 + 1.64 \times 10^3 X \quad r = 0.9999$$

$$Y = -0.19 + 0.70 \times 10^3 X \quad r = 0.9999$$

结果表明芍药苷进样量在 0.05~0.65 μ g, 阿魏酸进样量在 0.01~0.13 μ g, 柚皮苷进样量在 0.05~0.65 μ g, 甘草酸进样量在 0.02~0.28 μ g 范围内与峰面积具有良好的线性关系。

4.2 精密度试验 取供试品溶液连续进样 6 次,记录峰面积,计算芍药苷、阿魏酸、柚皮苷和甘草酸峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 0.21%, 0.23%, 0.14%, 0.32%。

4.3 重复性试验 取同一批号 (071104) 样品适量,共 6 份,研细,取 0.5 g 精密称定,按照“2.2”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下分别进样测定。结果样品中芍药苷、阿魏酸、柚皮苷和甘草酸平均含量 ($n=6$) 分别为 4.18, 0.23, 3.55, 1.43 mg·g⁻¹; RSD 分别为 0.74%, 1.5%, 0.85%, 0.76%。

4.4 稳定性试验 取同一供试品溶液分别在 0, 2, 4, 8, 12, 18, 24 h 进样测定,结果芍药苷、阿魏酸、柚皮苷和甘草酸峰面积的 RSD ($n=7$) 分别为 0.42%, 1.2%, 0.66%, 0.33%。表明供试品溶液中芍药苷、阿魏酸、柚皮苷和甘草酸在 24 h 内均稳定。

4.5 加样回收率试验 取同一批号 (071104) 样品适量,研细,取 0.25 g 共 6 份,精密称定,分别精密加入混合对照品溶液 25 mL (含芍药苷 43.32 μ g·mL⁻¹、阿魏酸 2.202 μ g·mL⁻¹、柚皮苷 34.59 μ g·mL⁻¹ 及甘草酸 13.82 μ g·mL⁻¹), 按照“2.2”项下方法制备所需溶液,在上述色谱条件下测定,计算回收率。结果芍药苷、阿魏酸、柚皮苷及甘草酸平均回收率 ($n=6$) 分别为 101.9%, 104.3%, 104.4%, 102.9%; RSD 分别为 2.0%, 2.4%, 1.8%, 2.1%。

5 样品的测定

取 3 个批号的样品,按照“2.2”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下测定,记录峰面积,

按外标法计算含量。结果见表 1。

表 1 不同批号血府逐瘀颗粒样品中芍药苷、阿魏酸、柚皮苷及甘草酸的含量 (mg·g⁻¹)

Tab 1 Contents of paeoniflorin, ferulaic acid, naringin and glycyrrhizic acid in Xuefu Zhuyu granules

批号 (Lot No.)	芍药苷 (paeoniflorin)	阿魏酸 (ferulaic acid)	柚皮苷 (naringin)	甘草酸 (glycyrrhizic acid)
071101	4.21	0.24	3.40	0.97
071103	4.24	0.24	3.42	0.98
071104	4.18	0.23	3.55	1.43

6 讨论

6.1 供试品溶液制备方法的考察 ①比较萃取、大孔树脂纯化等处理方法,结果采用 70% 甲醇超声提取,简化提取步骤,减少试验误差;②分别考察甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇 3 种溶剂超声提取及加热回流提取的效果,结果采用 70% 甲醇超声提取 60 min 即可;③对不同体积的 70% 甲醇加入量进行比较,结果使用 25 mL 溶剂即可。

6.2 流动相的选择 因为测定多个成分的含量,采用梯度洗脱,节省了分析时间。在流动相选择中,采用不同比例的乙腈-水、乙腈-磷酸溶液、甲醇-水、甲醇-磷酸溶液系统,经过试验,比较分离效果和基线平稳情况,确定以 0.1% 磷酸水溶液-70% 乙腈为流动相。在本试验采用的梯度洗脱系统下,样品色谱中芍药苷、阿魏酸、柚皮苷及甘草酸 4 个成分的峰形好,出峰时间较快,与杂质峰的分度度均大于 1.5。

6.3 检测波长的确定 本试验采 VWD 紫外检测器,在 230 nm 检测芍药苷,在 320 nm 检测阿魏酸,在 283 nm 检测柚皮苷,在 250 nm 检测甘草酸,检测波长设定为各成分的最大吸收处,使上述 4 种成分均有最大的相应,便于对各组分的含量进行准确测定。

6.4 小结 本文采用 HPLC 法同时测定血府逐瘀颗粒中芍药苷、阿魏酸、柚皮苷及甘草酸的含量,可基本全面反映制剂质量,方法简单,结果准确可靠,可用于血府逐瘀颗粒的质量控制。

参考文献

- Drug Specification Promulgated by the Ministry of Public Health P R China (中华人民共和国卫生部药品标准). WS₃-B-0928-91
- ChP (中国药典). 2005. Vol II (一部): 109, 89, 28, 171, 59
- LI Tao (李涛), WANG Tian-zhi (王天志), XU Yu (许宇), et al. Determination of the contents of glycyrrhizic acid and paeoniflorin in Fubao Danggui Jiao by RP-HPLC (RP-HPLC 测定妇宝当归胶中甘草酸和芍药苷的含量). Chin Tradit Pat Med (中成药), 2002, 24 (11): 834

(本文于 2008 年 12 月 25 日收到)