

RP-HPLC 法测定尿感宁颗粒中秦皮乙素、咖啡酸和迷迭香酸

蔡 瑜, 王书芳, 瞿海斌

浙江大学药物信息学研究所, 浙江 杭州 310058

摘 要: 目的 建立同时测定尿感宁颗粒中秦皮乙素、咖啡酸和迷迭香酸的反相液相色谱 (RP-HPLC) 法。方法 采用 Lichrospher C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-0.05% 甲酸梯度洗脱, 检测波长 329 nm。结果 秦皮乙素、咖啡酸和迷迭香酸质量浓度的线性范围分别为 0.400~200、0.100~500、0.100~500 mg/L; 质量检测下限分别为 0.984、0.462、0.268 ng; 秦皮乙素、咖啡酸和迷迭香酸的平均回收率分别为 97.3%、99.6%、96.8%, RSD 分别为 1.6%、2.6%、1.5%。结论 该方法同时测定尿感宁颗粒中秦皮乙素、咖啡酸和迷迭香酸具有简便、快速、准确等优点。

关键词: 尿感宁颗粒; 秦皮乙素; 咖啡酸; 迷迭香酸; 高效液相色谱

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)01-0088-03

Determination of aesculetin, caffeic acid, and rosmarinic acid in Niaoganning Granula by RP-HPLC

CAI Yu, WANG Shu-fang, QU Hai-bin

Institute of Pharmaceutical Informatics, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Key words: Niaoganning Granula; aesculetin; caffeic acid; rosmarinic acid; HPLC

尿感宁颗粒是由海金沙藤、连钱草、凤尾草、葎草和紫花地丁制成的复方制剂, 具有清热解毒、利尿通淋的功效, 用于膀胱湿热所致淋症及急性尿路感染等症。该制剂收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》第 5 册。方中海金沙藤具有清热解毒、利湿、利胆、消肿的功效, 为治疗尿路感染、尿路结石、湿热肿满、泌尿系统感染等症的常用中药^[1-2], 咖啡酸、对香豆酸是其主要的有效成分^[3-4]; 连钱草具有利湿通淋、清热解毒、散瘀消肿的功效, 其水提物中分离得到的咖啡酸和迷迭香酸作为天然抗氧化剂, 具有多种药理作用^[5-6]; 紫花地丁属蒙药, 具有清热解毒、凉血消肿等功效, 秦皮乙素是其所含成分^[7-8]。原标准对此药中成分的测定无规定。因此本实验采用反相高效液相色谱法建立了同时测定尿感宁颗粒中秦皮乙素、咖啡酸和紫花地丁的方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型 HPLC 仪 (UV 检测器, Agilent Chemstation 数据处理系统), Agilent 1100 LC-DAD-MS 液质联用仪, pHs-3C 型 pH 计 (上海雷磁仪器厂), AE240 电子分析天平 (梅特勒-托

利多仪器有限公司), Buchi 旋转蒸发仪 (Buchi 公司), 调温电热器 (上海电理仪器厂), KQ-250E 型超声清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), XW-80A 旋涡混合器 (上海医科大学仪器厂)。

秦皮乙素 (质量分数>98%, 批号 080921)、迷迭香酸 (质量分数>98%, 批号 080712) 对照品购于上海融禾医药科技有限公司, 咖啡酸对照品 (质量分数≥98%, 购于中国药品生物制品检定所, 批号 110885-200102), 尿感宁颗粒 (每袋装 5 g) 为杭州正大青春宝药业有限公司产品, 药材缺味的阴性对照样本为按照该公司的制剂工艺自制, 甲酸为分析纯, 乙腈和甲醇为色谱纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱分析条件

色谱柱为 Lichrospher C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.05% 甲酸, 梯度洗脱, 0~35 min、5%~10% 乙腈, 35~60 min、10%~27% 乙腈, 60~70 min、27%~90% 乙腈; 体积流量为 1 mL/min; 柱温为 35 °C; 检测波长 329 nm; 进样体积 10 μL。

收稿日期: 2010-06-06

基金项目: 新世纪优秀人才支持计划 (NCET-06-0515)

作者简介: 蔡 瑜 (1985—), 女, 浙江省台州市人, 硕士, 主要从事中药分析方法学研究。Tel: 13858091280 E-mail: dearcaiuyu@yahoo.com.cn

*通讯作者 瞿海斌 Tel: (0571)88208428 E-mail: quhb@zju.edu.cn

2.2 供试品溶液的制备

取尿感宁颗粒适量,碾成粉末,取约 0.50 g,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加 20%甲醇溶液 5 mL,称定质量,超声提取 10 min,再次称定质量,加 20%甲醇溶液补足超声过程损失的质量,提取液涡旋 30 s,于 10 000 r/min 离心 10 min。取上清液,即得。

2.3 阴性对照溶液的制备

按处方组成,分别去除含有秦皮乙素、咖啡酸或迷迭香酸的药材,按制备工艺,分别制得不含秦皮乙素、咖啡酸或迷迭香酸的喷雾制粒前药材共煎液,挥干溶液得固体粉末,按供试品溶液制备方法,以一定量 20%甲醇溶液溶解上述粉末,于 10 000 r/min 离心 10 min。取上清液进样,分别得缺秦皮乙素、缺咖啡酸和缺迷迭香酸的阴性对照色谱图,见图 1。

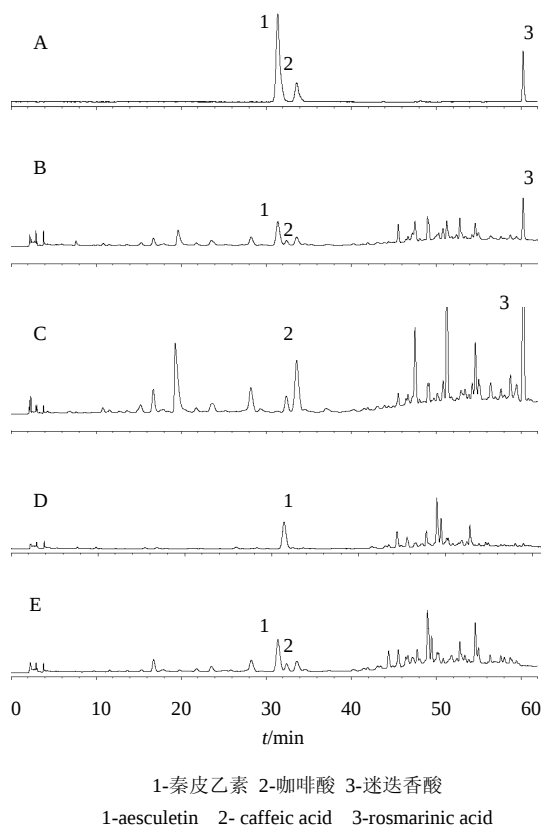


图1 对照品(A)、尿感宁颗粒(B)、缺秦皮乙素阴性样品(C)、缺咖啡酸阴性样品(D)和缺迷迭香酸阴性样品(E)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A), Niaoganning Granula (B), negative sample without aesculetin (C), negative sample without caffeic acid (D), and negative sample without rosmarinic acid (E)

2.4 线性范围和检测限

分别取秦皮乙素、咖啡酸和迷迭香酸对照品适

量,精密称定,分别用 20%甲醇溶液溶解并定容至 5 mL,然后配制一系列质量浓度梯度的含秦皮乙素、咖啡酸和迷迭香酸的混合溶液。在上述优化色谱条件下,各分析物峰面积与其质量进行线性回归,得到回归方程。秦皮乙素: $Y=30.5 X+6.47$ ($r=1.000 0$),线性范围 0.400~200 mg/L;咖啡酸: $Y=53.5 X+14.5$ ($r=0.999 9$),线性范围 0.100~500 mg/L;迷迭香酸 $Y=28.3 X+29.2$ ($r=0.999 9$),线性范围 0.100~500 mg/L。

用 20%甲醇溶液配制不同质量浓度的秦皮乙素、咖啡酸和迷迭香酸对照品,在上述色谱分析条件下按信噪比(S/N) > 3 计算,3种物质的检测限分别为 0.984、0.462、0.268 ng。

2.5 精密度试验

取批号 0810006 的尿感宁颗粒制备供试品溶液,连续进样 5 次,根据峰面积计算,得秦皮乙素的 RSD 为 0.3%,咖啡酸的 RSD 为 0.5%,迷迭香酸的 RSD 为 0.6%。

2.6 稳定性试验

取批号 0810006 的尿感宁颗粒制备的供试品溶液,分别在 0、4、8、16、24 h 进样 10 μ L,测定秦皮乙素、咖啡酸和迷迭香酸的峰面积,其 RSD 分别为 0.6%、0.7%、0.9%。

2.7 重现性试验

分别取批号 0810006 的尿感宁颗粒粉末 6 份,每份约 0.50 g,精密称定,按供试品溶液的制备方法制备 6 份供试品溶液,进样分析,计算制剂中各成分的质量分数,结果制剂中秦皮乙素、咖啡酸和迷迭香酸质量分数的 RSD 分别为 1.9%、1.5%、1.0%。

2.8 回收率试验

分别取批号 0810006 的尿感宁颗粒粉末 9 份,每份约 0.25 g,精密称定,按制剂中 3 种成分质量的 120%、100%、80%分别准确加入一定量的秦皮乙素、咖啡酸和迷迭香酸对照品,每个水平平行操作 3 份,制备供试品溶液,进样测定秦皮乙素、咖啡酸和迷迭香酸的质量浓度,分别计算 3 种成分的加样回收率,结果平均回收率分别为 97.3%、99.6%、96.8%,RSD 分别为 1.6%、2.6%、1.5%。

2.9 样品分析

平行取同一批的尿感宁颗粒粉末样品 0.50 g,共 3 份,制备供试品溶液,进样分析,计算所测的 6 批次制剂中秦皮乙素、咖啡酸和迷迭香酸的质量分数,见表 1。

表 1 尿感宁颗粒中 3 种成分的测定结果 ($n=3$)Table 1 Determination of three components in Niaoganning Granula ($n=3$)

批 号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			RSD/%		
	秦皮乙素	咖啡酸	迷迭香酸	秦皮乙素	咖啡酸	迷迭香酸
0804008	368.5	70.2	261.6	0.3	1.6	0.7
0810002	303.7	48.3	333.8	0.6	0.9	0.6
0712005	115.9	65.0	337.7	0.5	0.6	0.2
0806004	467.2	55.9	238.1	0.3	0.7	0.7
0708007	170.4	63.2	427.1	0.9	2.6	0.5
0709001	178.6	52.1	283.0	1.0	1.2	0.4

3 讨论

3.1 检测波长的选择

曾用 HPLC-DAD 获得混合对照品溶液的色谱图,由秦皮乙素、咖啡酸和迷迭香酸的吸收光谱图可知,秦皮乙素最大吸收波长为 206、227、298、346 nm;咖啡酸最大吸收波长为 218、240、326 nm;迷迭香酸最大吸收波长为 329 nm。同时测定这 3 种物质的量,可选多波长或改变波长检测模式。当采用 329 nm 波长检测时,3 种化合物的检测灵敏度仍较高,故本实验采用 329 nm 为检测波长。

3.2 流动相的影响

3 种物质均有弱酸性,因此在水相中添加甲酸。考察了水相中甲酸的比例为 0.03%、0.05%、0.07% 时的色谱图,发现比例为 0.03% 时,各物质出峰均有所提前。在 0.05%~0.07% 时,各物质的出峰时间无明显差别,但比例为 0.05% 时,秦皮乙素和咖啡酸及其旁边的杂峰得到最好的分离。因此选择水相中甲酸的比例为 0.05%。

3.3 柱温的影响

考察了同一色谱条件下,25、30、35、40 °C 柱温下的色谱图变化,发现随着柱温上升,各物质出峰均有所提前。秦皮乙素、咖啡酸以及它们之间的杂质峰对柱温特别敏感,并且由于对柱温变化的敏感程度不同,分离度也受到柱温变化较大的影响。研究发现柱温过低时,咖啡酸与其后的杂质峰之间的分离度变差;而当温度过高时,秦皮乙素与咖啡酸的分离度变差。因此,当确定其他色谱条件后,可通过选择合适的柱温,使得秦皮乙素与咖啡酸及其旁边的杂质峰均得到较好的分离。

3.4 提取溶剂和提取时间的影响

虽然制剂为经药材水提物制得,但由于某些成分在纯水中溶解性较差,而若用纯甲醇作为样品溶剂,进样量大时色谱峰会展宽,因此经试验考察,

选择用 20% 甲醇溶液作为溶剂。另外比较了用 20% 甲醇超声提取不同的时间对秦皮乙素、咖啡酸和迷迭香酸的提取率的影响,分别超声处理同一批样品 10、20、30 min,结果表明,经 20% 甲醇溶液超声提取不同时间后,3 种物质的质量分数无明显差别,考虑到超声时间长,提取的杂质增多,且增加样品预处理的时间,故选择 10 min 为超声提取时间。

3.5 阴性对照的选择

紫花地丁中含秦皮乙素,连钱草中含迷迭香酸;海金沙藤和连钱草中含咖啡酸,但实验中发现并经 HPLC-DAD-MS 提供的色谱峰的质谱图和紫外吸收光谱图验证:葎草中含有秦皮乙素,凤尾草中含咖啡酸,因此,最终缺秦皮乙素的阴性对照样品中缺紫花地丁和葎草药材;缺咖啡酸的阴性对照样品中缺海金沙藤、凤尾草和连钱草药材;缺迷迭香酸的阴性对照样品中缺连钱草药材。这从另一方面说明本实验所建立的尿感宁颗粒中这 3 种成分的测定方法,可较全面地反映尿感宁颗粒的质量。

参考文献

- [1] 楼英. 海金沙藤治疗带状疱疹 5 例分析 [J]. 浙江临床医学, 2002, 4(4): 265-265.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上册. 上海: 上海人民出版社, 1978.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 下册. 上海: 上海人民出版社, 1985.
- [4] 金继曙, 都述虎. 海金沙草利胆有效成分对香豆酸及其衍生物对甲氧基桂皮酸的合成 [J]. 中草药, 1994, 35(6): 330-330.
- [5] 田萍, 王道平, 朱海燕, 等. 高效液相色谱法测定连钱草中迷迭香酸的含量 [J]. 贵州大学学报: 自然科学版, 2008, 25(2): 169-171.
- [6] 张前军, 杨小生, 朱海燕, 等. 连钱草中三萜类化学成分 [J]. 中草药, 2006, 37(12): 1780-1781.
- [7] 陈胡兰, 董小萍, 张梅, 等. 紫花地丁化学成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 874-877.
- [8] 郭晓秋. HPLC 法测定紫花地丁中秦皮乙素的含量 [J]. 江西中医学院学报, 2006, 18(1): 34.