

HPLC法测定十全大补糖浆中芍药苷、阿魏酸、肉桂酸及甘草酸的含量

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法同时测定十全大补糖浆中芍药苷、阿魏酸、肉桂酸及甘草酸的含量。方法: 采用 Sepax C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 以乙腈 (A) - 0.1% 磷酸水溶液 (B) 为流动相进行梯度洗脱 (0~20 min, 15% A → 20% A; 20~40 min, 20% A → 70% A; 40~50 min, 70% A; 51~60 min, 15% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 0~15 min 时 230 nm (芍药苷), 15.1~30 min 时 320 nm (阿魏酸), 30.1~33 min 时 285 nm (肉桂酸), 33.1~60 min 时 250 nm (甘草酸); 柱温 40 °C。结果: 芍药苷、阿魏酸、肉桂酸及甘草酸的线性范围分别为 0.21~4.13, 0.10~2.02, 0.05~1.08, 0.19~3.88 μg (r ≥ 0.999); 平均回收率 (n = 6) 分别为 101.9% (RSD = 0.93%), 97.9% (RSD = 2.0%), 96.1% (RSD = 0.49%), 100.2% (RSD = 0.66%)。结论: 所建立的 HPLC法可同时测定十全大补糖浆中芍药苷、阿魏酸、肉桂酸及甘草酸的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 十全大补糖浆; 芍药苷; 阿魏酸; 肉桂酸; 甘草酸

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)09-1501-03

RP-HPLC analysis of paeoniflorin, ferulic acid, cinnamic acid and glycyrrhizic acid in Shiquan Dabu syrups

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

Abstract Objective To develop an HPLC method for determination of paeoniflorin, ferulic acid, cinnamic acid and glycyrrhizic acid in Shiquan Dabu syrups. **Methods** The analysis was carried out on an Sepax C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column. The mobile phase was composed of acetonitrile (A) and 0.1% phosphoric acid aqueous (B) with gradient elution (0~20 min, 15% A → 20% A; 20~40 min, 20% A → 70% A; 40~50 min, 70% A; 51~60 min, 15% A) and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelengths were set at 230 nm for paeoniflorin (0~15 min), 320 nm for ferulic acid (15.1~30 min), 285 nm for cinnamic acid (30.1~33 min), and 250 nm for glycyrrhizic acid (33.1~60 min); The column temperature was 40 °C. **Results** The linear ranges of paeoniflorin, ferulic acid, cinnamic acid and glycyrrhizic acid were 0.21~4.13, 0.10~2.02, 0.05~1.08, 0.19~3.88 μg (r ≥ 0.999, respectively); The average recoveries were 101.9%, 97.9%, 96.1%, and 100.2% (RSD < 2.0%, n = 6, respectively). **Conclusion** This method is simple and can be used to determine the above 4 components with satisfactoric accuracy and repeatability.

Key words HPLC; Shiquan Dabu syrups; paeoniflorin; ferulic acid; cinnamic acid; glycyrrhizic acid

十全大补糖浆^[1]由白芍、当归、川芎、肉桂、甘草等 10 味中药组成, 为十全大补丸^[2]的改剂型产品, 其质量标准收载于卫生部药品标准中药成方制剂第 20 册, 具有温补气血的功效, 用于气血两虚、面色苍白、气短心悸、头晕自汗、体倦乏力、四肢不温、月经量多。处方中白芍为君药, 当归及川芎为臣药,

甘草及肉桂为佐药共同加强君药白芍养血调经的效力, 因此建立 HPLC 法同时测定白芍、当归、川芎、肉桂及甘草中有效成分芍药苷、阿魏酸、肉桂酸及甘草酸含量, 对控制和提高十全大补糖浆的质量有重要的意义。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。

文献报道中对芍药苷、阿魏酸、肉桂酸、甘草酸进行单一成分或 2 种成分 HPLC 含量测定的方法较多^[3,4], 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、ChemStations 色谱工作站。

乙腈(色谱纯, 天津市康科德科技有限公司), 水为去离子水, 磷酸(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)、肉桂酸(批号: 110786-200503)及甘草酸铵(批号: 110731-200614)均购自中国药品生物制品检定所。十全大补糖浆样品为天津中新药业集团股份有限公司隆顺裕制药厂提供; 规格: 每瓶 100 mL; 批号: 0604001, 0604002, 0604003, 0604007。

2 溶液制备

2.1 对照品溶液 取芍药苷、阿魏酸、肉桂酸及甘草酸铵对照品适量, 精密称定, 加 50% 乙醇制成每 1 mL 均为 30 μ g 的混合溶液, 即得。

2.2 供试品溶液 精密取样品 10 mL, 置 50 mL 棕色量瓶中, 用 50% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 阴性样品溶液 按处方分别制备缺白芍阴性样品、缺当归和川芎阴性样品、缺肉桂阴性样品、缺甘草阴性样品及同时缺白芍、当归、川芎、肉桂及甘草阴性样品, 按“2.2”项下方法操作, 即得。

3 色谱条件

采用 Sepax C₁₈ (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m) 色谱柱; 以乙腈(A) - 0.1% 磷酸水溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~20 min 15% A $\rightarrow$ 20% A; 20~40 min 20% A $\rightarrow$ 70% A; 40~50 min 70% A; 51~60 min 15% A), 流速 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹; 检测波长: 0~15 min 时 230 nm (芍药苷), 15.1~30 min 时 320 nm (阿魏酸), 30.1~33 min 时 285 nm (肉桂酸), 33.1~60 min 时 250 nm (甘草酸); 柱温 40 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L。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 10 μ L 进样, 结果芍药苷、阿魏酸、肉桂酸和甘草酸的保留时间分别为 11.58、18.05、31.11、35.40 min, 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、肉桂酸和甘草酸的测定无干扰。见图 1。

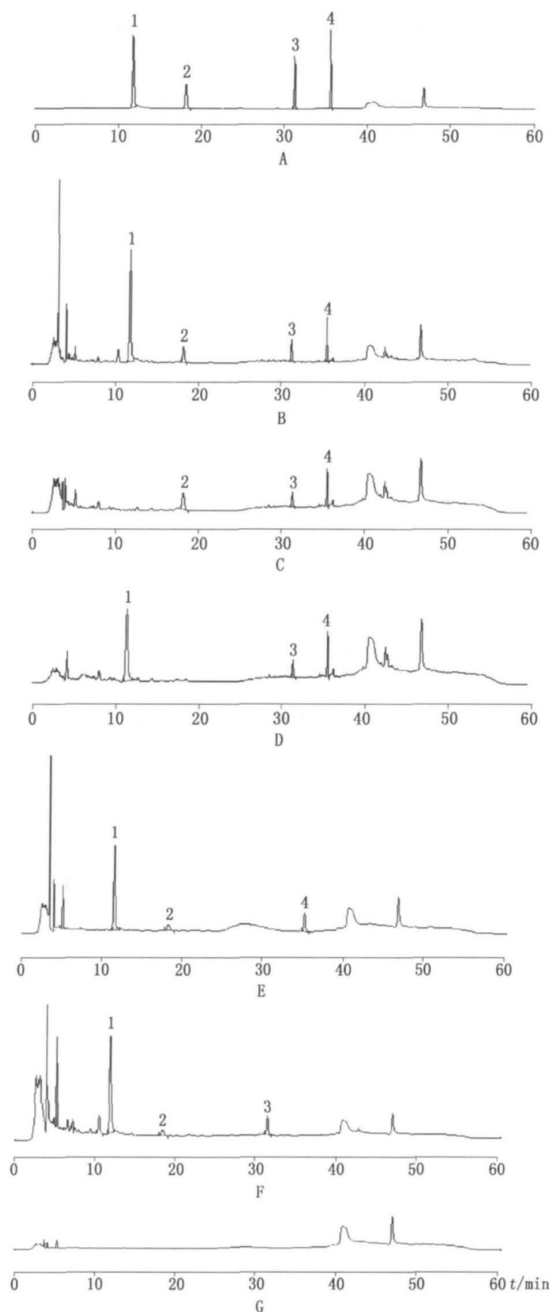


图 1 对照品(A)、样品(B)、缺白芍阴性样品(C)、缺当归和川芎阴性样品(D)、缺肉桂阴性样品(E)、缺甘草阴性样品(F)及阴性样品(G)色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances(A), sample(B), and negative sample without Radix Paeoniae Alba(C), Radix Angelicae Sinensis and Rhizoma Chuanxiong(D), Cortex Cinnamomi(E), Radix Glycyrrhizae(F), and Radix Paeoniae Alba Radix Angelicae Sinensis Rhizoma Chuanxiong Cortex Cinnamomi Radix Glycyrrhizae(G)

1. 芍药苷(paeoniflorin) 2. 阿魏酸(ferulic acid) 3. 肉桂酸(cinnamic acid) 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、肉桂酸和甘草酸铵适量, 用 50% 乙醇分别制

成浓度为 0.5165, 0.2525, 0.135, 0.485 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单一成分对照品溶液, 分别均精密吸取上述溶液 1, 5, 10, 15, 20 mL, 一一对应地分别置于 25 mL 量瓶中, 用 50% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得系列浓度混合对照品溶液, 分别精密吸取 10 μL 进样, 按上述色谱条件测定峰面积, 以对照品进样量 (μg) 对峰面积值进行线性回归, 求得芍药苷、阿魏酸、肉桂酸和甘草酸回归方程分别为:

$$Y = 0.46 + 1.26 \times 10^3 X \quad r = 0.9991$$

$$Y = 1.02 + 0.76 \times 10^3 X \quad r = 0.9990$$

$$Y = 16.2 + 1.44 \times 10^3 X \quad r = 0.9992$$

$$Y = 0.07 + 0.71 \times 10^3 X \quad r = 0.9999$$

结果表明芍药苷进样量在 0.21 ~ 4.13 μg 阿魏酸进样量在 0.10 ~ 2.02 μg 肉桂酸进样量在 0.05 ~ 1.08 μg 甘草酸进样量在 0.19 ~ 3.88 μg 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、肉桂酸和甘草酸峰面积的 $\text{RSD}(n=6)$ 分别为 0.32%, 0.43%, 0.63%, 0.82%。

4.3 重复性试验 取同一批号 (0604007) 样品, 精密量取 10 mL, 共 6 份, 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、肉桂酸及甘草酸平均含量 ($n=6$) 分别为 0.68, 0.029, 0.023, 0.21 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; RSD 分别为 0.15%, 0.64%, 2.0%, 0.16%。

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、肉桂酸和甘草酸峰面积的 $\text{RSD}(n=7)$ 分别为 0.23%, 1.2%, 1.8%, 0.54%。表明供试品溶液中芍药苷、阿魏酸、肉桂酸和甘草酸在 24 h 内均稳定。

4.5 加样回收率试验 取同一批号 (0604007) 样品, 精密量取 5 mL, 共 6 份, 分别精密加入混合对照品溶液 (含芍药苷 140.64 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、阿魏酸 4.858 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、肉桂酸 4.84 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及甘草酸 38.72 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 25 mL, 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、肉桂酸及甘草酸平均回收率 ($n=6$) 分别为 101.9%, 97.9%, 96.1%, 100.2%; RSD 分别为 0.93%, 2.0%, 0.49%, 0.66%。

5 样品测定

取 4 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 不同批号十全大补糖浆样品中芍药苷、阿魏酸、肉桂酸及甘草酸的含量 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Tab 1 Contents of paeoniflorin, ferulic acid, cinnamic acid and glycyrrhizic acid in Shiquan Dabu syrups

批号 (Lot No.)	芍药苷 (paeoniflorin)	阿魏酸 (ferulic acid)	肉桂酸 (cinnamic acid)	甘草酸 (glycyrrhizic acid)
0604001	0.97	0.035	0.033	0.31
0604002	0.99	0.036	0.031	0.31
0604003	0.99	0.036	0.031	0.32
0604007	0.68	0.029	0.023	0.21

6 讨论

6.1 供试品溶液制备方法的确定 本品为糖浆剂, 样品较粘稠, 经试验确定用 50% 乙醇稀释后, 用 0.45 μm 过滤, 进样测定, 方法简便, 节省提取时间。阿魏酸与肉桂酸均见光易分解, 因此稀释时采用棕色量瓶, 提取过程中应注意避免阳光照射。

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, 确定以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相。在本试验采用的梯度洗脱系统下, 样品色谱中 4 个成分的峰形好, 出峰时间较快, 与杂质峰的分度均大于 1.5。

6.3 检测波长的确定 本试验采用 VWD 紫外检测器, 在 230 nm 检测芍药苷, 在 320 nm 检测阿魏酸, 在 285 nm 检测肉桂酸, 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 种成分均有最大的响应, 便于对各组分的含量进行准确测定。

6.4 小结 本文采用 HPLC 法同时测定十全大补糖浆中芍药苷、阿魏酸、肉桂酸及甘草酸的含量, 可基本全面反映制剂质量, 方法简单, 结果准确可靠, 可用于十全大补糖浆的质量控制。

参考文献

- 1 Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health PR China (中华人民共和国卫生部药品标准). WS₃-B-3738-98
- 2 ChP 中国药典. 2005. Vol II (一部): 298
- 3 ChP (中国药典). 2005. Vol II (一部): 68, 89, 555, 59
- 4 LI Tao (李涛), WANG Tian-zhi (王天志), XU Yu (许宇), et al. Determination of the contents of glycyrrhizine 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)