

高效液相色谱法测定接骨片中阿魏酸和芍药苷

甘井山, 邹爱英*, 刘莹, 何颖, 刘秀书, 曹艳

天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150

摘要: 目的 建立同时测定接骨片中阿魏酸和芍药苷的高效液相色谱(HPLC)方法。方法 色谱柱为安捷伦 Zorbax SB C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(12:88); 检测波长为230 nm; 体积流量为1.0 mL/min; 柱温为30 ℃; 进样量为10 μL。结果 HPLC方法总运行时间为20 min, 阿魏酸和芍药苷在线性范围内均呈现良好线性关系($r>0.999\ 9$), 方法的精密度、重复性、加样回收率均符合要求。结论 本法灵敏准确、重复性好、操作简便, 可作为接骨片中阿魏酸和芍药苷的测定及质量控制方法。

关键词: 接骨片; 阿魏酸; 芍药苷; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2013)03-0347-03

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2013.03.021

Determination of ferulic acid and paeoniflorin in Jiegu Tablets by HPLC

GAN Jing-shan, ZOU Ai-ying, LIU Ying, HE Ying, LIU Xiu-shu, CAO Yan

The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300150, China

Abstract: **Objective** To establish a quantitative method for simultaneous determination of ferulic acid and paeoniflorin in Jiegu Tablets by HPLC. **Methods** The separation was performed on an Agilent Zorbax SB C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid solution (12:88), at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 230 nm. The column temperature was 30 ℃. The injection volume was 10 μL. **Results** The total running time was 20 min. The linear relationship between the concentration and peak areas of the two compounds were all linear ($r>0.999\ 9$). The precision, recovery, and repeatability tests met the demands for quantitative determination well. **Conclusion** The method could be used for the quality control of Jiegu Tablets with a good sensitivity, accuracy, and reproducibility.

Key words: Jiegu Tablets; ferulic acid; paeoniflorin; HPLC

接骨片为天津中医药大学第二附属医院的院内制剂, 由当归、赤芍、乳香、没药制成, 具有活血化瘀、消肿止痛、壮骨强筋之功效, 临床用于身体各部位复位后骨折的治疗以及跌打损伤、闪腰岔气、伤筋动骨、瘀血肿痛、损伤红肿等症。阿魏酸^[1]和芍药苷^[2-4]分别被认为是主药当归和赤芍的最主要代表性成分。为了更好的控制接骨片的质量, 本实验建立了HPLC法同时测定该制剂中阿魏酸和芍药苷, 为该制剂提供质控方法。

1 仪器和试剂

美国 Waters Alliance 2695 高效液相色谱仪, 包括四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器(PDA)和 Empower 2 工作站; 塞多利斯

BS 210 S 万分之一和十万分之一天平; HU3120B 超声波仪(天津市恒奥科技发展有限公司)。

阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110773-200714); 芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110736-200527); 色谱纯乙腈(天津康科德科技有限公司, 批号 090425); 分析纯甲醇(天津康科德科技有限公司, 批号 090731); 接骨片由天津中医药大学第二附属医院提供, 0.6 g/片, 批号 110501、110502、110503。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为安捷伦 Zorbax SB C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶

收稿日期: 2013-01-31

作者简介: 甘井山, 男, 主管药师, 硕士研究生, 研究方向为药物合理应用。Tel: (022) 60335452 E-mail: 535266007@qq.com

*通信作者 邹爱英

液 (12:88); 检测波长为 230 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30 °C; 进样量为 10 μ L。理论板数按阿魏酸和芍药苷峰计算应均不低于 3 000。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取阿魏酸和芍药苷对照品 10.17、9.99 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加适量甲醇, 超声溶解, 放冷, 加甲醇定容摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取本品 20 片, 除去包衣, 精密称定, 研细, 取约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70%

甲醇适量, 密塞, 称定质量, 超声 (功率 250 W, 频率 20 kHz) 处理 40 min 取出, 放冷, 再称定质量, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 专属性考察

按处方配比取除去当归和赤芍的各药, 制成阴性对照, 按供试品溶液的制备方法处理。精密吸取对照品、供试品和阴性对照溶液注入液相色谱仪, 按上述条件测定, 结果表明, 阴性对照溶液色谱图中, 在与对照品相同保留时间处无干扰, 见图 1。

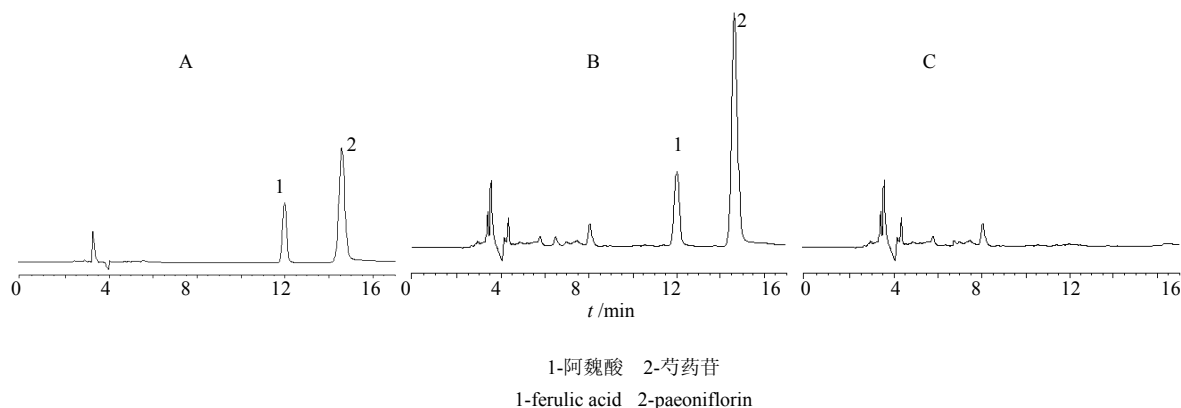


图 1 混合对照品 (A)、接骨片 (B) 和阴性样品 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Jiegu Tablets (B), and negative sample (C)

2.5 线性关系考察

将阿魏酸和芍药苷对照品储备液分别稀释成 0.005、0.01、0.02、0.04、0.05、0.06 mg/mL, 分别按上述下色谱条件测定芍药苷色谱峰面积。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标进行回归, 制定标准曲线, 计算各自的回归方程和线性范围。阿魏酸 $Y=2.37 \times 10^7 X - 3\,438.1$, $r=0.999\,9$, 芍药苷回归方程 $Y=1 \times 10^7 X - 1\,920.6$, $r=0.999\,9$ 。结果表明, 阿魏酸和芍药苷进样量在 0.499 5~1.498 5 mg 与峰面积呈良好线性关系。以最低定量限采用信噪比 $S/N=10$ 为原则, 分别计算阿魏酸和芍药苷的定量限为 1.07、3.63 ng。

2.6 精密度试验

取含阿魏酸和芍药苷均 0.02 mg/mL 混合对照品溶液, 按照上述色谱条件连续进样 6 次, 测定峰面积, 依据峰面积计算得 RSD 值分别为 0.3%、0.2%。

2.7 稳定性试验

取批号 110502 样品制备的供试品溶液, 分别在 0、4、8、16、24 h 进样分析, 计算阿魏酸和芍药苷的质量分数, 其 RSD 值分别为 1.3%、1.1%。结果

表明, 阿魏酸和芍药苷在 24 h 内保持稳定。

2.8 重复性试验

取批号 110502 样品 6 份, 精密称定, 制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 计算阿魏酸和芍药苷的质量分数, 其 RSD 值分别为 1.7%、1.1%。

2.9 加样回收率试验

取批号 110502 样品 6 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 加入 0.06 mg/mL 阿魏酸对照品溶液 2 mL 和 0.1 mg/mL 芍药苷对照品溶液 3 mL, 制备供试品溶液, 按上述色谱条件进行测定, 计算得阿魏酸、芍药苷的平均回收率分别为 98.23%、97.49%, RSD 值分别为 1.3%、1.8%。

2.10 样品测定

取 3 批接骨片样品各 20 片, 每批样品 3 份, 制备供试品溶液。分别精密吸取上述各供试品溶液 10 μ L 注入液相色谱仪, 测定色谱峰峰面积, 以外标法计算阿魏酸和芍药苷质量分数, 结果见表 1。

3 讨论

3.1 测定指标的确定

接骨片由当归、赤芍、乳香、没药制成, 方中

表 1 接骨片中阿魏酸与芍药苷的测定结果 ($n=3$)Table 1 Determination of ferulic acid and paeoniflorin in Jiegu Tablets ($n=3$)

批 号	阿魏酸/(mg·g ⁻¹)	芍药苷/(mg·g ⁻¹)
110501	0.56	1.35
110502	0.58	1.39
110503	0.57	1.31

4 味药相辅相成共同发挥治疗作用。当归是伞形科当归属多年生草本植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根。其药用历史悠久, 始载于《本经》谓之“当归味温, 主呃逆上气”被列为中品^[5]。其味甘、辛, 性温, 有补血活血、调经止痛、润肠通便之功效^[6], 为医家常用药, 素有“十方九归”之称。阿魏酸一直被认为是当归的最主要代表性成分, 也是当归有机酸中含量最高的代表性成分。赤芍为毛茛科芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 或川赤芍 *P. veitchii* Lynch 的干燥根。其味苦, 微寒, 归肝经, 具有清热凉血、散瘀镇痛之功效。主治目赤肿痛、肝郁胁痛、跌扑损伤、痈肿疮疡。赤芍中化学成分以萜类为主, 《中国药典》2010 版一部对其中最主要成分芍药苷建立了含量测定方法^[6]。因此, 选用阿魏酸和芍药苷作为接骨片 HPLC 含量测定的质控指标较为适宜。乳香和没药主要含有树脂类、树胶和挥发油类成分, 不适宜采用高效液相色谱法测定, 挥发油成分采用气相色谱 (GC) 法较为合适, 因此笔者将会继续采用 GC 法来控制此两味药的质量。

3.2 供试品溶液制备条件优选

分别采用甲醇、70%甲醇、乙醇作为提取溶剂制备供试品溶液, 以上述色谱条件测定, 以外标法计算样品中芍药苷的质量分数, 结果表明, 用 70% 甲醇作为提取溶剂时提取效率最高, 故采用 70% 甲醇作为提取溶剂。

考察了加热回流和超声法两种方法对于提取效率的影响。结果表明, 使用超声法处理比加热回流法阿魏酸的质量分数高 2 倍, 这两提取方法芍药苷质量分数差异无显著性。加热回流和超声法两种方

法提取阿魏酸质量分数差异较大, 可能为其在高温加热回流的环境下不稳定造成。因此选用超声提取方法作为样品提取的方法, 且超声法操作具有较为快速简便之特点。

对比超声处理 20、40、60 min 后样品中有效成分的质量分数, 超声 40、60 min 后芍药苷质量分数差异无显著性, 但比超声 20 min 质量分数有较大提高。以阿魏酸质量分数为指标超声 40 min 大于 60 min, 也是由于阿魏酸不稳定, 长时间超声处理易造成分解。因此, 选用超声处理时间为 40 min。

3.3 流动相的选择

《中国药典》2010 年版一部“赤芍”项下的测定方法采用甲醇-水系统的流动相。实验对甲醇-水系统考察后发现, 在此流动相系统下色谱峰较杂, 分离度不好, 且阿魏酸出现保留时间较短的现象。分析原因是阿魏酸为酸性物质, 在酸性流动相条件下游离完全, 分离度较高, 因此在流动相体系中加入一定比例的酸。由于磷酸的酸性强度适宜, 且紫外透明波长较低 (190 nm), 不容易引起基线波动, 所以选用磷酸。对乙腈体系和磷酸的比例等条件进行摸索, 对比各项系统参数, 最后确定乙腈-0.1% 磷酸 (12:88) 为流动相, 此条件下能达到两物质基线分离, 峰形对称, 理论塔板数较高, 且不受其他杂质干扰。

参考文献

- [1] 王中华. 当归中阿魏酸含量测定及质量标准的研究 [J]. 河北中医, 2012, 34(7): 1058-1063.
- [2] 李雪晴, 王 超, 文爱东. HPLC 法测定益胃颗粒中芍药苷的含量 [J]. 陕西中医, 2010, 31(6): 737-738.
- [3] 雷黎明. 活络健骨胶囊中芍药苷成分的测定方法研究 [J]. 湖南环境生物职业技术学院学报, 2010, 16(2): 25-27.
- [4] 余星云, 吴伟东. HPLC 测定乳核内消液中芍药苷的含量 [J]. 今日药学, 2010, 20(6): 49-50.
- [5] 陈江弘, 杨崇仁. 当归属植物的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(4): 359-365.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 124.