

HPLC法测定甘草附子汤中甘草酸和桂皮酸的含量

高秋涛, 毕开顺*

(沈阳药科大学 药物分析教研室, 辽宁 沈阳 110016)

甘草附子汤出自《伤寒论·辨太阳病脉证并治》,由甘草 4 g,附子 4 g,白术 4 g,桂枝 8 g组成。主要用于风湿及类风湿性关节炎等症。甘草为方中君药,具有抗炎、镇咳等作用^[1],甘草酸为甘草的代表性成分之一。桂枝为方中使药,具有镇痛、镇静等作用^[2],桂皮酸是桂枝中的主要活性成分之一。本实验采用 HPLC法对甘草附子汤中的甘草酸和桂皮酸进行了测定,以期为甘草附子汤的质量控制提供依据。

1 仪器与药品

岛津 LC-10A 高效液相色谱仪, SPD-10A 紫外检测器, CK Chrom™ 色谱工作站。

甘草、附子、白术、桂枝药材购于沈阳市天益堂药店,经沈阳药科大学孙启时教授鉴定为正品。甘草酸对照品购于 Sigma 公司;桂皮酸对照品购于中国药品生物制品检定所;甲醇、乙腈为色谱纯,水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

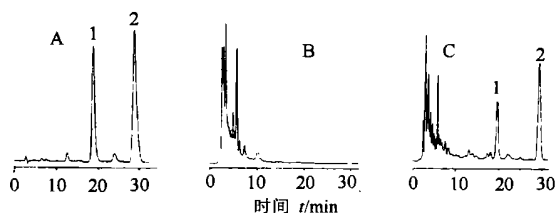
2 色谱条件

色谱柱: Hypersil C₁₈柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm) (大连依利特公司);测定甘草酸时采用流动相 I: 甲醇-乙腈-水-冰醋酸 (19: 30: 51: 1);测定桂皮酸时采用流动相 II: 甲醇-乙腈-水-冰醋酸 (37: 1: 63: 0.3);流速为 0.8 mL/min;紫外检测波长为 254 nm;柱温为室温。在上述色谱条件下,主色谱峰与相邻其他色谱峰的分度均大于 1.5,理论塔板数均不低于 3 000。色谱图分别见图 1和 2。

3 方法与结果

3.1 对照品溶液及内标物溶液的制备: 精密称取甘草酸对照品 27.4 mg, 甲醇定容于 10 mL 量瓶中, 得到甘草酸对照品溶液。精密称取桂皮酸对照品 10.0 mg, 甲醇定容于 100 mL 量瓶中, 得到桂皮酸对照品溶液。分别精密称取内标物联苯 15.5 mg 和甲萘酚 19.9 mg, 以甲醇分别定容于 25 mL 量瓶中, 得到内标溶液。

3.2 供试品溶液的制备: 精密称取甘草 0.5 g, 附子

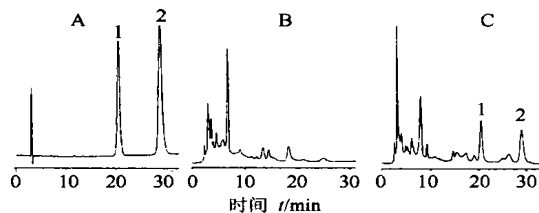


1-甘草酸 2-联苯

1-glycyrrhizic acid 2- α -naphthol

图 1 甘草酸对照品 (A), 阴性液 (B) 和甘草附子汤 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of glycyrrhizic acid (A), negative sample (B) and Gancao Fuzi Decoction (C)



1-桂皮酸 2-甲萘酚

1-cinnamic acid 2- α -naphthol

图 2 桂皮酸对照品 (A), 阴性液 (B) 和甘草附子汤 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of cinnamic acid (A), negative sample (B) and Gancao Fuzi Decoction (C)

0.5 g, 白术 0.5 g, 桂枝 1 g, 以 10 倍量 50% 乙醇 25 mL 提取 2 次, 每次 1 h。合并提取液, 滤过, 回收溶剂, 用甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中。精密量取 1 mL 溶液置 5 mL 量瓶中, 分别精密加入 0.5 mL 联苯内标溶液和 1 mL 甲萘酚溶液, 甲醇定容至刻度, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

3.3 线性关系的考察: 分别精密量取甘草酸对照溶液 0.1, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mL 置于 5 mL 量瓶中, 再量取 0.5 mL 联苯内标溶液, 加甲醇稀释至刻度。分别精密量取桂皮酸对照品溶液 0.1, 0.3, 0.6,

* 收稿日期: 2003-01-10

作者简介: 高秋涛 (1981-), 男, 河北省石家庄人, 沈阳药科大学在读博士研究生, 主要从事中药药效物质基础及指纹图谱研究工作。Tel (024) 23843711-3363 E-mail gaoqiutao@sina.com

0.9, 1.2, 1.5 mL置于 5 mL量瓶中,再量取 1 mL甲萘酚内标溶液,加甲醇稀释至刻度。分别进样 10 μ L,以对照品溶液浓度为横坐标,对照品与内标物的峰面积比值为纵坐标进行线性回归,绘制标准曲线,得到回归方程为 $Y=1.540X-0.01151$, $r=0.9999$; $Y=51.73X-0.006294$, $r=0.9998$ 。结果表明:甘草酸在 0.055~1.10 mg/mL,桂皮酸在 2.0~30.1 μ g/mL呈现良好线性关系。

3.4 精密度试验:取同一浓度的样品重复进样 6 次,以甘草酸和桂皮酸峰面积分别与内标物联苯和甲萘酚峰面积的比值计算,测得 RSD分别为 1.6%和 1.0%。

3.5 重现性试验:按“供品溶液的制备”方法制备 6 份供品,分别进样,以甘草酸和桂皮酸峰面积分别与内标物联苯和甲萘酚峰面积的比值计算,得 RSD分别为 2.0%和 1.4%。

3.6 回收率试验:精密称取甘草 0.5 g,附子 0.5 g,白术 0.5 g,桂枝 1 g,共 9 份,分为低、中、高 3 组,分别加入甘草酸对照品 2.00, 4.00, 6.00 mg 和桂皮酸 0.226, 0.452, 0.678 mg,每剂量 3 份,处理并测定,计算回收率。结果甘草酸平均回收率为 95.9%, RSD为 2.6%;桂皮酸回收率为 94.8%, RSD为 2.0%。

3.7 供试品测定:精密称取甘草 0.5 g,附子 0.5 g,白术 0.5 g,桂枝 1 g,按照“供试品溶液的制备”方法进行处理并测定,测得甘草附子汤中含甘草酸 3.8 mg/g,桂皮酸 0.33 mg/g ($n=6$)。

4 讨论

4.1 曾以正交试验设计法对甘草附子汤的提取工艺进行优化,以甘草酸、桂皮酸的含量和浸膏得率为指标,考察了溶剂量、提取时间和提取次数对提取结果的影响。经过直观分析和方差分析,结果显示以 10 倍量 50%乙醇,提取 2 次,每次 1 h 能获得最好的提取效果。

4.2 在流动相中加入冰醋酸可以有效抑制甘草酸的解离,改善了甘草酸的峰形。经过对流动相的进一步优化,在此色谱条件下待测物质的色谱峰与相邻峰分离较好,重现性佳。本法简便、准确,可作为甘草附子汤质量控制的手段之一。

References

[1] Zheng H Z, Dong Z H, Yu J. *Modern Study of Traditional Chinese Medicine* (中药现代研究与应用) [M]. Vol II. Beijing: Xueyuan Press, 1999.

[2] Zheng H Z, Dong Z H, Yu J. *Modern Study of Traditional Chinese Medicine* (中药现代研究与应用) [M]. Vol IV. Beijing: Xueyuan Press, 1999.

[3] Zhu L, Kong D Y, Wu X M. Determination of glycyrrhizic acid in Weiwanshu Granula by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(5): 339-340.

[4] Zuo W, Song M S, Kong S L, et al. Separation and determination of β -glycyrrhetic acid in *Glycyrrhiza* and its preparation and Chinese proprietary medicine by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 1995, 13(1): 43-44.

[5] Huang X H, Song Z H, Bi K S. Study on alcohol extraction process of Linggui Zhugan Decoction with orthogonal design [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2002, 13(4): 199-201.

HPLC法测定风湿关节炎片中土的宁和马钱子碱的含量

李晓妮,胡 爽,葛 新,丁红*
(山西医科大学药学院,山西 太原 030001)

风湿关节炎片主要由马钱子、麻黄、当归、苍术、续断、桃仁等 17 味中药组成,用于风湿痹痛、腰腿疼痛、风湿性关节炎等症的治疗,具有良好疗效。马钱子为本处方中的君药。为保证用药安全有效,本实验采用 HPLC 法同时测定制剂中土的宁和马钱子碱两种有效成分的含量,方法简便、快速、准确,为提高和完善该制剂的质量标准提供了依据。

1 仪器和试剂

岛津高效液相色谱仪 (LG-10A 泵, SPD-10A 紫外可见检测器, C-R6A 数据处理机)。

甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯;土的宁对照品和马钱子碱对照品 (中国药品生物制品检定所,批号分别为: 0635-9903, 0725-9806);风湿关节炎片 (山西华康药业股份有限公司)。

* 收稿日期: 2003-01-14
作者简介: 李晓妮 (1957-),女,山西省阳城县人,副教授,毕业于北京医学院药化专业,主要从事药物质量标准制定方面的工作。
Tel (0351) 4690071