

HPLC 法测定血压平喷雾剂中绿原酸、阿魏酸、芍药苷、肉桂酸

董宇¹, 狄留庆^{2*}, 赵晓莉², 张新庄², 邵璟², 汪晶²

1. 南京中医药大学 科技处, 江苏 南京 210046

2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046

摘要: 目的 建立 HPLC 双波长法同时测定血压平喷雾剂中绿原酸、阿魏酸、芍药苷、肉桂酸 4 种成分的方法。方法 采用 Agilent C₁₈ 柱, 以乙腈-0.3%磷酸水为流动相, 梯度洗脱, 双波长检测 ($\lambda_1=270\text{ nm}$ 、 $\lambda_2=300\text{ nm}$), 柱温 30 °C。结果 4 种成分均能达到基线分离, 各成分的平均回收率在 97.32%~100.85%。**结论** 本检测方法简便、准确、重现性好。

关键词: 血压平喷雾剂; 绿原酸; 阿魏酸; 芍药苷; 肉桂酸; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)02-0296-03

Determination of chlorogenic acid, ferulic acid, peoniflorin, and cinnamic acid in Xueyaping Spray by HPLC

DONG Yu¹, DI Liu-qing², ZHAO Xiao-li², ZHANG Xin-zhuang², SHAO Jing², WANG Jing²

1. Department of Science and Technology, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

Key words: Xueyaping Spray; chlorogenic acid; ferulic acid; peoniflorin; cinnamic acid; HPLC

血压平鼻腔喷雾剂是由赤芍、当归、川芎、肉桂等中药组成的复方制剂, 具有疏肝解郁、活血通络的功效, 临床用于治疗高血压。为了对血压平鼻腔喷雾剂治疗高血压的机制进行探讨, 阐明其有限的生药量即能发挥良好的治疗效果的作用机制, 并为了能更好地控制血压平鼻腔喷雾剂的质量, 通过对复方中与降压相关的成分的解析, 建立了用 HPLC 双波长^[1]梯度洗脱法一次进样同时检测血压平鼻腔喷雾剂中绿原酸、阿魏酸、芍药苷、肉桂酸 4 种成分的定量测定方法^[2-4]。

1 仪器与材料

Agilent 1100 液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); BP211D 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); KQ-250 型超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司)。

绿原酸 (批号 1107553-200413)、阿魏酸 (批号 0773-9910)、芍药苷 (批号 0736-200116)、肉桂酸 (批号 110786-200503) 对照品均购自中国药品

生物制品检定所。乙腈 (美国 Tedia 公司, 色谱纯); 重蒸去离子水 (实验室制备); 乙醇、磷酸、甲醇 (分析纯, 上海化学试剂有限公司)。

赤芍、当归、川芎、肉桂、菊花、牡丹皮均购于南京市药材公司, 经南京中医药大学药教研室吴德康教授鉴定, 均符合《中国药典》2010 年版要求。血压平鼻腔喷雾剂自制, 规格为 10 mL/瓶, 批号 20090220、20090328、20090413。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱为 Agilent C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 A (乙腈)-B (0.3%磷酸水溶液), 梯度洗脱程序见表 1, 驻留时间 5 min, 双波长检测: $\lambda_1=270\text{ nm}$ (检测芍药苷、肉桂酸), $\lambda_2=300\text{ nm}$ (检测绿原酸、阿魏酸); 柱温 30 °C, 进样量 20 μL , 4 种成分的分离度均大于 1.5。色谱图见图 1 和 2。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取绿原酸、阿魏酸、芍药苷、肉桂酸对

收稿日期: 2011-06-28

基金项目: 江苏省高新技术研究项目 (BG2007610); 江苏省“青蓝工程”科技创新团队支持计划; 江苏省普通高校研究生科研创新计划 (CX09S_039Z)

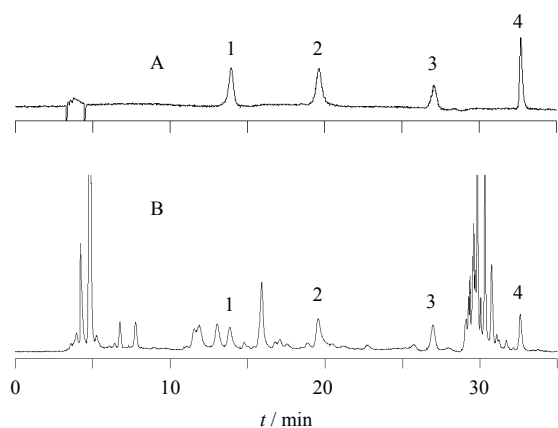
作者简介: 董宇 (1985—), 男, 南京中医药大学科技处学报编辑部。Tel: 13584034111 E-mail: njutcm@live.com

*通讯作者 狄留庆 Tel: (025)85811071 E-mail: diliuqing928@163.com

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

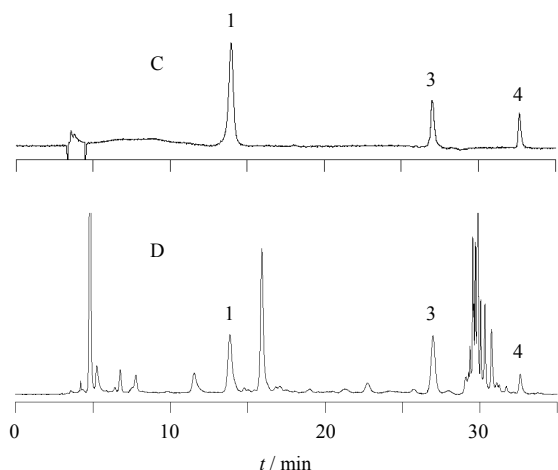
t / min	A	B	体积流量 / (mL·min ⁻¹)
0.00	10.0%	90.0%	0.800
8.00	10.0%	90.0%	0.800
10.00	15.0%	85.0%	0.800
25.00	15.0%	85.0%	0.800
27.00	35.0%	65.0%	1.300
35.00	35.0%	65.0%	1.300



1-绿原酸 2-阿魏酸 3-芍药苷 4-肉桂酸
1-chlorogenic acid 2-ferulic acid 3-paeoniflorin 4-cinnamic acid

图 1 270 nm 处混合对照品溶液 (A) 和血压平喷雾剂 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and Xueyaping Spray (B) at 270 nm



1-绿原酸 3-阿魏酸 4-肉桂酸
1-chlorogenic acid 3-ferulic acid 4-cinnamic acid

图 2 300 nm 处混合对照品溶液 (C) 和血压平喷雾剂 (D) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of mixed reference substances (C) and Xueyaping Spray (D) at 300 nm

照品各适量, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得含绿原酸 84.84 μg/mL、阿魏酸 34.20 μg/mL、芍药苷 755.60 μg/mL、肉桂酸 9.08 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密吸取血压平喷雾剂 3 mL, 置 25 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 阴性供试品溶液的制备

绿原酸来源于菊花, 阿魏酸来源于川芎、当归, 芍药苷来源于赤芍、牡丹皮, 肉桂酸来源于肉桂, 按血压平喷雾剂的生产工艺制备缺菊花、川芎和当归、赤芍和牡丹皮、肉桂的阴性制剂, 并按照供试品溶液的制备方法制备各阴性供试品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 空白干扰试验 取阴性供试品溶液进样 20 μL, 测定, 结果表明阴性制剂对所测组分无干扰。

2.5.2 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 4.0、6.0、7.0、8.0、10.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。分别吸取 20 μL 进样, 测定峰面积值。以质量浓度对峰面积平均值作图, 结果经回归分析, 得 4 种成分的回归方程, 结果见表 2。

表 2 各成分回归方程与线性范围

Table 2 Regression equation and linear range of each component

成分	回归方程	r	线性范围 / (μg·mL ⁻¹)
绿原酸	$Y=32.53X-239.02$	0.999 1	33.93~84.84
阿魏酸	$Y=48.59X-126.53$	0.999 2	13.68~34.20
芍药苷	$Y=1.546X-23.84$	0.999 2	302.24~755.60
肉桂酸	$Y=111.81X-82.395$	0.999 8	3.63~9.08

2.5.3 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 6 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。取 20 μL 进样, 测定各成分的峰面积, 重复 6 次, 结果绿原酸、阿魏酸、芍药苷、肉桂酸峰面积的 RSD 分别为 1.12%、1.98%、2.31%、1.28%。

2.5.4 稳定性试验 取血压平喷雾剂 (批号 20090328), 按供试品溶液制备方法制备, 分别于 0、3、6、9、12、18 h 各取 20 μL 进样测定各成分的峰面积, 分别计算峰面积的 RSD, 结果绿原酸 0.82%、阿魏酸 1.62%、芍药苷 2.81%、肉桂酸 2.02%。表明供试品溶液在室温条件下 18 h 内稳定。

2.5.5 重现性试验 取血压平鼻腔喷雾剂(批号 20090328),按供试品溶液制备方法制备样品溶液,平行 6 份。分别取上述样品液 20 μL ,进样,测定峰面积,计算各成分质量浓度的 RSD,结果绿原酸 0.86%、阿魏酸 2.41%、芍药苷 3.82%、肉桂酸 1.45%。

2.5.6 加样回收率试验 精密量取血压平鼻腔喷雾剂(批号 20090328) 3 mL,置 25 mL 量瓶中,加入含绿原酸 84.84 $\mu\text{g/mL}$ 、阿魏酸 34.2 $\mu\text{g/mL}$ 、芍药苷 755.6 $\mu\text{g/mL}$ 、肉桂酸 9.08 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品

溶液 2 mL,制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液 20 μL ,进样,测定,计算回收率,平行 6 份。结果得各成分的平均回收率和 RSD,绿原酸 98.83%、3.61%;阿魏酸 97.32%、2.07%;芍药苷 100.85%、2.49%;肉桂酸 97.36%、3.04%。

2.5.7 样品的测定 分别取 3 批血压平喷雾剂,按照供试品溶液制备方法制备,每批平行 3 份,每份进样 2 次,以回归方程计算各成分的质量浓度,结果见表 3。

表 3 血压平喷雾剂中绿原酸、阿魏酸、芍药苷、肉桂酸测定结果

Table 3 Determination of chlorogenic acid, ferulic acid, peoniflorin, and cinnamic acid in Xueyaping Spray

批号	绿原酸		阿魏酸		芍药苷		肉桂酸	
	质量浓度 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD / %	质量浓度 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD / %	质量浓度 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD / %	质量浓度 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD / %
20090220	46.1	1.01	28.7	2.91	547.5	1.54	5.86	2.18
20090328	49.1	2.79	30.1	2.01	550.4	2.68	5.94	1.39
20090413	48.6	1.78	29.3	1.57	549.9	2.09	5.89	1.07

3 讨论

本实验所建立的 HPLC 双波长法同时测定血压平喷雾剂中绿原酸、阿魏酸、芍药苷、肉桂酸 4 种成分的测定方法简便、可行,可用于本制剂的质量控制。

中药复方制剂血压平鼻腔喷雾剂成分复杂,本研究通过选用不同溶剂系统作为流动相进行试验,如乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.3%磷酸水等进行等度洗脱,最终选择了分离趋势较好的乙腈-0.3%磷酸水,但是采用等度洗脱并不能将阿魏酸和肉桂酸很好的分离,所以在此基础上改用梯度洗脱,不仅解决了阿魏酸与肉桂酸的分离问题,同时也大大缩短了分析时间。经多次调整梯度洗脱程序,最终以本研究中的梯度洗脱程序能够使所检测的 4 种成分的色谱峰达到基线分离。

分别对本研究中的 4 种对照品溶液的紫外扫描图谱分析,得到绿原酸、阿魏酸、芍药苷、肉桂酸的最大吸收波长分别为 328、316、230、290 nm。本研究最初采用单波长进行测定,但并不能兼顾 4 种成分的检测,尤其是芍药苷和其余 3 种成分不能

同时检测,故选用双波长检测。在芍药苷和肉桂酸的波长选择中,由于芍药苷的量远大于肉桂酸,故最终确定检测波长为 270 nm,在此波长下芍药苷和肉桂酸均可检测。在绿原酸和阿魏酸的波长选择中,没有选择他们的最大吸收波长 320 nm,是因为在此波长下,制剂的成分有干扰,不能达到很好的分离效果,经多次试验,选择波长 300 nm 可较好地解决上述问题。

参考文献

- [1] 谢普,毕开顺,俞悦,等. 泽泻的双波长 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1712-1715.
- [2] 池玉梅,崔小兵,陈维,等. HPLC 双波长梯度洗脱同时测定通塞脉微丸中绿原酸、阿魏酸、甘草苷的含量 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(17): 1348-1350.
- [3] 黄薇薇,徐进,谭家风. HPLC 法测定利咽泡腾颗粒剂中绿原酸的含量 [J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25(2): 148-149.
- [4] 李向阳,屠万倩,张留记. RP-HPLC 法测定不同产地的牡丹皮中芍药苷和丹皮酚的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(5): 563-565.