

复方川脊片中 3 种活性成分的含量测定

刘金梅, 翟学佳, 史芳, 陈东生, 吕永宁

(华中科技大学同济医学院附属协和医院药剂科, 武汉 430022)

摘要 目的 建立同时测定复方川脊片中原儿茶酸、原儿茶醛和芍药苷 3 种有效成分含量的高效液相色谱方法。方法 采用 Thermo ODS-2 HYPERSIL C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 10 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钾-0.02% 磷酸溶液(A)-甲醇(B), 线性梯度洗脱(0~12 min, 15% B; 12~32 min, 25% B), 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 38 °C; 检测波长分别为 210 nm(原儿茶酸)、280 nm(原儿茶醛)、232 nm(芍药苷)。结果 原儿茶酸、原儿茶醛和芍药苷的质量浓度分别在 5.27~105.50, 1.60~31.92, 86.04~1 721.00 μg·mL⁻¹ 范围内呈良好线性关系($r \geq 0.999 9$); 日内、日间精密度良好, RSD 均 < 1.93% ($n=6$); 各组分低、中、高浓度的平均加样回收率均在 98.39%~99.94% 之间, RSD 均 < 1.78% ($n=6$); 复方川脊片中原儿茶酸、原儿茶醛和芍药苷的质量浓度分别为(120.70±1.94), (24.28±0.57), (3 439.00±60.18) μg·g⁻¹。结论 该方法简便可靠, 重复性好, 可全面反映复方川脊片中各味药的质量, 适用于复方川脊片质量控制。

关键词 复方川脊片; 原儿茶酸; 原儿茶醛; 芍药苷; 色谱法, 高效液相

中图分类号 R286; R927.2 文献标识码 A 文章编号 1004-0781(2012)03-0355-03

Simultaneous Determination of Protocatechuic Acid, Protocatechuic Aldehyde and Paeoniflorin in Compound *Chuanji* Tablets

LIU Jin-mei, ZHAI Xue-jia, SHI Fang, CHEN Dong-sheng, LU Yong-ning (Department of Pharmacy, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

ABSTRACT Objective To develop a HPLC method for the simultaneous determination of protocatechuic acid, protocatechuic aldehyde and paeoniflorin in compound *chuanji* tablets. **Methods** A Thermo ODS-2 HYPERSIL C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of 10 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, 0.02% H₃PO₄ in water (A) and methanol (B) with linear gradient elution (0-12 min, 15% B; 12-32 min, 25% B). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. DAD detection was used and detection wavelength was set at 210 nm for protocatechuic acid, 280 nm for protocatechuic aldehyde and 232 nm for paeoniflorin, respectively. The temperature of column was 38 °C. **Results** Protocatechuic acid, protocatechuic aldehyde and paeoniflorin showed good linearity ($r \geq 0.999 9$) in the range of 5.27-105.50, 1.60-31.92 and 86.04-1 721.00 μg·mL⁻¹, respectively. The RSDs of intra-day and inter-day precision were no more than 1.93% ($n=6$). The average recovery rate of three tested compounds at low, medium and high concentration levels were in the range of 98.39%-99.94% for all with RSDs less than 1.78% ($n=6$). The contents of protocatechuic acid, protocatechuic aldehyde and paeoniflorin in compound *chuanji* tablets were (120.70±1.94), (24.28±0.57), (3 439.00±60.18) μg·g⁻¹, respectively. **Conclusion** The developed method is simple, accurate, reliable and can be used to control the quality of compound *chuanji* tablets.

KEY WORDS Compound *chuanji* tablets; Protocatechuic acid; Protocatechuic aldehyde; Paeoniflorin; High performance liquid chromatography

复方川脊片[制剂文号:鄂药制字(2001)第 AX02-037]是华中科技大学同济医学院附属协和医院自制的中药复方制剂,由地黄、白芍、狗脊、没药、乳香等多味中药加工制成,具有舒筋活血的功效,用于治疗颈椎病综合征,疗效显著^[1]。其中原儿茶酸和原儿茶醛为狗脊的活性成分,具有祛风湿,补肝肾,强腰膝的作用^[2-3];芍药苷为白芍的主要活性成分,具有养血柔肝、缓中镇痛之功效^[4-7]。以上 3 种成分均为复方川脊

片的有效成分,而目前文献报道的复方川脊片含量测定方法仅对其中芍药苷进行定量测定^[8],同时测定复方川脊片多种有效成分的方法笔者尚未见报道,故建立了高效液相色谱(HPLC)法同时测定复方川脊片中原儿茶酸、原儿茶醛和芍药苷的含量,为更全面控制复方川脊片质量提供了依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Shimadzu LC-20A 高效液相色谱仪,包括在线脱气机(DGU-20A3)、二元梯度泵(LC-20A)、自动进样器(SIL-20A)、DAD 检测器(SPD-M20A)和 LC solution 色谱工作站。BR-16 型高速冷冻离心机(河北北洋离心机厂)。

1.2 试剂 对照品:原儿茶酸(批号:110809-200604)、原儿茶醛(批号:110810-201007)和芍药苷

收稿日期 2011-09-02 修回日期 2011-10-19

作者简介 刘金梅(1986-),女,湖北荆门人,在读硕士,专业方向:临床药学。电话:027-85726073;E-mail:liujinmei0817@163.com。

通讯作者 吕永宁,男,副主任药师,硕士,从事医院药学工作。电话:027-85726073;E-mail:lyyongning67@hotmail.com。

(批号:110736-200933)购自中国药品生物制品检定所;复方川脊片:华中科技大学同济医学院附属协和医院药剂科自制(批号:110328,110510,110708;每片0.3 g,每瓶100片;甲醇(色谱纯,TEDIA),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Thermo ODS-2 HYPERSIL C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:10 mmol·L⁻¹磷酸二氯钾-0.02%磷酸溶液(A),甲醇(B),线性梯度洗脱(0~12 min,15% B;12~32 min,25% B),流速1.0 mL·min⁻¹;原儿茶酸的检测波长为210 nm,原儿茶醛的检测波长为280 nm,芍药苷的检测波长为232 nm;柱温38℃;进样量:20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 系列浓度混合对照品 分别精密称取原儿茶酸、原儿茶醛和芍药苷对照品适量,以甲醇溶解并定容,制成质量浓度分别为1.406,1.064,2.868 mg·mL⁻¹的对照品储备液,分别精密量取一系列体积的各对照品储备液适量,以甲醇稀释,制成7个浓度的混合对照品溶液,避光保存。

2.2.2 供试品溶液 取复方川脊片数片,剥去包衣,研细。取细粉约2.5 g,精密称定,置25 mL量瓶中,加80%甲醇10 mL,超声提取15 min(功率250 W,频率40 kHz),冷却,于12 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液作为供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液 取按复方川脊片工艺方法制备缺狗脊、缺白芍的复方川脊片适量,分别照“2.2.2”项下方法操作,即得。

2.3 专属性实验 精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液各20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样分析,结果在原儿茶酸、原儿茶醛、芍药苷相对应的位置上未见色谱峰,复方川脊片中其他组分不干扰该3组分的测定,方法专属性良好。

2.4 线性与范围 在“2.1”项色谱条件下,分别精密量取系列浓度的混合对照品溶液20 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。以峰面积为纵坐标(Y),对照品质量浓度(X,μg·mL⁻¹)为横坐标,进行线性回归,原儿茶酸、原儿茶醛、芍药苷线性回归方程及相关系数见表1。结果表明:各组分线性关系良好。

2.5 精密度实验

2.5.1 仪器精密度 取混合对照品溶液,在“2.1”项色谱条件下,连续进样6次,分别计算各组分峰面积的RSD值。结果为:原儿茶酸RSD为0.21%,原儿茶醛RSD为0.22%,芍药苷RSD为0.19%。

表1 3种组分标准曲线及相关系数

Tab.1 Calibration curves and correlation coefficients of three constituents

组分	回归方程	r	线性范围/ (μg·mL ⁻¹)
原儿茶酸	$Y=1.623 \times 10^5 X - 4.897 \times 10^4$	0.999 9	5.27 ~ 105.50
原儿茶醛	$Y=9.764 \times 10^4 X - 1.344 \times 10^4$	0.999 9	1.60 ~ 31.92
芍药苷	$Y=3.002 \times 10^4 X - 5.311 \times 10^4$	0.999 9	86.04 ~ 1 721.00

2.5.2 日间精密度 取批号为110328的复方川脊片,按“2.2.2”项下方法连续6 d制备供试品溶液并进样分析,计算原儿茶酸、原儿茶醛和芍药苷平均含量(n=6)分别为121.2,24.88,3426 μg·g⁻¹;RSD值分别为1.93%,1.74%,1.22%。

2.6 重复性和稳定性 取批号为110328的复方川脊片,按“2.2.2”项下方法制备6份供试品溶液,进样分析。计算原儿茶酸、原儿茶醛和芍药苷平均含量(n=6)分别为121.80,24.14,3 421.00 μg·g⁻¹;RSD值分别为1.02%,1.87%,1.05%。表明重复性良好。

精密吸取同一供试品溶液,分别于0,3,6,9,12,18,24 h注入液相色谱仪,测定各组分含量。结果表明,供试品溶液在24 h内稳定,各组分峰面积的RSD均<1.50%。

2.7 加样回收率实验 精密称取批号为110328的已知含量复方川脊片18份,每份1.25 g,6份为一组,分别加入相当于含量80%,100%,120%的原儿茶酸、原儿茶醛和芍药苷对照品溶液,按照“2.2.2”项下方法制备所需溶液,测定含量,计算加样回收率。原儿茶酸、原儿茶醛和芍药苷的低、中、高浓度的平均加样回收率结果见表2。

2.8 定量限与检测限 按信噪比为10:1,测得原儿茶酸、原儿茶醛和芍药苷的定量限分别为5.27,1.60,86.04 μg·mL⁻¹;按信噪比为3:1测得上述组分最低检测限分别为2.64,0.80,43.02 μg·mL⁻¹。

2.9 样品含量测定 分别精密称取3个批次的复方川脊片各2.5 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进样分析,以外标法计算含量。结果见表3。

3 讨论

3.1 检测波长的选择 将原儿茶酸、原儿茶醛和芍药苷的对照品溶液于200~400 nm波长处进行扫描,结果显示,原儿茶酸在210 nm波长处有最大吸收,原儿茶醛在280 nm波长处有最大吸收,芍药苷在232 nm波长处有最大吸收,故选择各组分的最大吸收波长为各自的检测波长。

表 2 加样回收率测定结果

Tab. 2 Result of recovery test n=6

组别	原有量	加入量	测得量	平均回收率	RSD
	μg			%	
原儿茶酸	151.50	121.20	271.60	99.09	1.12
	151.50	151.50	302.20	99.47	0.98
	151.50	181.80	332.00	99.28	0.96
原儿茶醛	31.10	24.88	55.58	98.39	1.78
	31.10	31.10	61.90	99.04	1.43
	31.10	37.33	68.30	99.65	1.32
芍药苷	4 283.00	3 425.00	7 690.00	99.47	1.31
	4 283.00	4 283.00	8 558.00	99.81	0.68
	4 283.00	5 140.00	9 420.00	99.94	0.53

表 3 样品含量测定结果

Tab. 3 Result of content determination for samples

批号	μg · g ⁻¹		
	原儿茶酸	原儿茶醛	芍药苷
110328	121.20	24.88	3 426.00
110510	118.60	23.75	3 504.00
110708	122.40	24.22	3 386.00
均值	120.70	24.28	3 439.00
RSD/%	1.61	2.34	1.75

3.2 流动相的选择 由于分析的组分结构中均有羟基和羧基活性基团,为了保证较好的峰形,在流动相中加入适量的酸以减少拖尾现象。笔者考察了不同的酸(甲酸、醋酸和磷酸)和缓冲液作为流动相,结果表明:在线性梯度洗脱条件下,只有采用含有缓冲液的流动相才能保证较长保留时间的组分峰形良好,故选用磷酸盐缓冲液作为流动相。

3.3 柱温的选择 不同的柱温对于各组分的分离也有一定的影响。本实验分别考察了 30, 32, 35, 38 和 40 °C 柱温对色谱分离的影响。结果显示:柱温升高,组分洗脱速度加快,色谱分离时间短,但是分离度降低;柱温降低,各组分分离度升高,但色谱分析时间长。

综合考虑组分分离度和样本分析时间,选择 38 °C 作为本实验的柱温。

3.4 提取溶剂和提取时间 本实验比较了用纯甲醇和 80% 甲醇作为提取溶剂,结果表明以 80% 甲醇作为提取溶剂,各色谱峰峰形更好。超声提取时间在超过 15min 后被测成分含量没有显著增加,于是选择超声提取时间为 15 min。

笔者采用 HPLC 法同时测定狗脊中的原儿茶酸、原儿茶醛、白芍中芍药苷的含量,用于表征复方川脊片的质量,可全面反映制剂中多组分药材的制剂质量,方法简单,结果准确可靠,可用于复方川脊片的质量控制。

参考文献

- [1] 周丕琪,沈霖,杨艳萍,等. 复方川脊片治疗椎动脉型颈椎病患者的临床观察[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2004, 12 (2): 12-14.
- [2] 张志斌,吴佩颖,祁庆,等. HPLC 测定复方四季青片中原儿茶酸、原儿茶醛的含量[J]. 中成药, 2004, 26(9): 719-721.
- [3] 李志浩,李鹏,朱军,等. 高效液相色谱法测定滋肾养血片中原儿茶酸的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29 (10): 860-861.
- [4] 李捷玮,金柔男,李翔,等. 多种中成药中芍药苷的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(9): 1440-1443.
- [5] 赵建学,郭海燕,陆玮,等. 芍药苷对肝纤维化模型大鼠血清 TNF-α、IL-6 与 IL-10 的影响[J]. 医药导报, 2010, 29 (2): 168-170.
- [6] 明少兰. 高效液相色谱法测定柴芍柔肝颗粒中芍药苷含量[J]. 医药导报, 2011, 30 (5): 655-656.
- [7] 汪艳,陈晓燕. 椎痛安胶囊质量标准的研究[J]. 医药导报, 2009, 28(1): 100-102.
- [8] 吕翼,高申蓉,陈华庭,等. 高效液相色谱法测定复方川脊片中芍药苷的含量[J]. 医药导报, 2007, 26(6): 665-666.

DOI 10.3870/yydb.2012.03.030