

HPLC同时测定养阴清肺颗粒中芍药苷、甘草苷和肉桂酸含量

张咪咪, 齐广才*, 张越诚, 刘阿静, 刘珍叶
(延安大学化学与化工学院, 陕西 延安 716000)

[摘要] 目的: 建立以高效液相色谱法同时测定养阴清肺颗粒中芍药苷、甘草苷和肉桂酸含量的方法。方法: 采用双波长切换-高效液相色谱法对养阴清肺颗粒中芍药苷、甘草苷和肉桂酸进行定量分析。Agilent ZORBAX SB-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相0.2%磷酸水-乙腈梯度洗脱, 检测波长276, 230 nm, 柱温28℃, 流速1.0 mL·min⁻¹。结果: 芍药苷、甘草苷和肉桂酸分别在0.236 8~4.736 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 0.170 8~3.416 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 0.035 2~0.704 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$)线性关系良好; 平均回收率分别为99.74%, 98.82%, 98.40%。RSD分别为0.78%, 0.97%, 1.04%。结论: 该方法简便、快速、准确, 可用于养阴清肺颗粒的质量控制。

[关键词] 养阴清肺颗粒; 芍药苷; 甘草苷; 肉桂酸; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0088-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170088

Simultaneous Determination of Paeoniflorin, Liquiritin and Cinnamic Acid in Yangyin Qingfei Granules by RP-HPLC

ZHANG Mi-mi, QI Guang-cai*, ZHANG Yue-cheng, LIU A-jing, LIU Zhen-ye
(College of Chemistry and Chemical Engineering, Yan'an University, Yan'an 716000, China)

[Abstract] **Objective:** The study was performed to establish a HPLC method for simultaneous determination of paeoniflorin, liquiritin and cinnamic acid in Yangyin Qingfei granules. **Method:** Paeoniflorin, liquiritin and cinnamic acid were determined simultaneously by HPLC on a ZORBAX SB-C₁₈ column with the mobile phase composed of acetonitrile and 0.2% phosphoric acid in gradient elution. Detection wavelength were set at 276 nm and 230 nm. The column temperature was maintained at 28℃. The flow rate was fixed at 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** The calibration curves of paeoniflorin, liquiritin and cinnamic acid showed good linearity within 0.2368-4.736 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 0.170 8-3.416 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 0.035 2-0.704 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$), respectively. The average recoveries of those were 99.74%, 98.82% and 98.40%, respectively. RSDs were 0.78%, 0.97% and 1.04%, respectively. **Conclusion:** The developed HPLC method is fast, simple and accurate and can be used for quality control of Granules of Yangyin Qingfei.

[Key words] Yangyin Qingfei granules; paeoniflorin; liquiritin; cinnamic acid; HPLC

养阴清肺颗粒是由地黄、玄参、川贝母、白芍、甘草等8味中草药组成的咳嗽类中药制剂, 具有养阴润肺、清热利咽等功效, 用于治疗阴虚肺燥、咽喉干燥疼痛、干咳、少痰或无痰、久嗽音哑、口干舌燥、咽喉肿痛、乳蛾喉痹等。玄参中含肉桂酸, 具有抗菌、升白细胞、利胆等药理作用^[1]; 白芍中含芍药苷, 具

有扩张血管、镇痛镇静、抗炎抗溃疡、解热解痉、利尿等作用^[2]; 甘草中含甘草苷, 具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、调和诸药等功效。建立多种活性成分定量分析方法, 有助于更全面准确地反映该复方制剂的质量。目前文献已报道了各类养阴清肺制剂^[3-8]中单个成分如芍药苷、丹皮酚和哈巴俄苷等

[收稿日期] 20131130(003)

[第一作者] 张咪咪, 硕士, 从事分析化学研究, Tel: 15191176194, E-mail: haoyunmimi@163.com

[通讯作者] * 齐广才, 从事分析化学研究, Tel: 0911-2332300, E-mail: qigc@163.com

的含量测定方法^[9-10],但同时测定养阴清肺颗粒中芍药苷、甘草苷和肉桂酸等多种成分含量的方法尚未见报道。为更好地控制该制剂的质量,本文建立了HPLC波长切换技术同时测定养阴清肺颗粒中芍药苷、甘草苷和肉桂酸3种有效成分的方法,多指标综合评价其质量,旨在为该制剂的内在质量控制提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器 1200系列高效液相色谱仪(Agilent Technologies),Vmini-1240型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),AUY220型电子分析天平(日本岛津公司)。

1.2 试药 芍药苷(批号110736-201337)、甘草苷(批号111610-201106)、肉桂酸(批号110786-200503)对照品均购自中国食品药品检定研究院;养阴清肺颗粒分别由山西黄河中药有限公司(批号20130201)、药圣堂(湖南)制药有限公司(批号121206034)、云南希陶绿色药业股份有限公司(批号130101)生产;甲醇、乙腈均为色谱纯,其他为分析纯,水为双重蒸馏水。

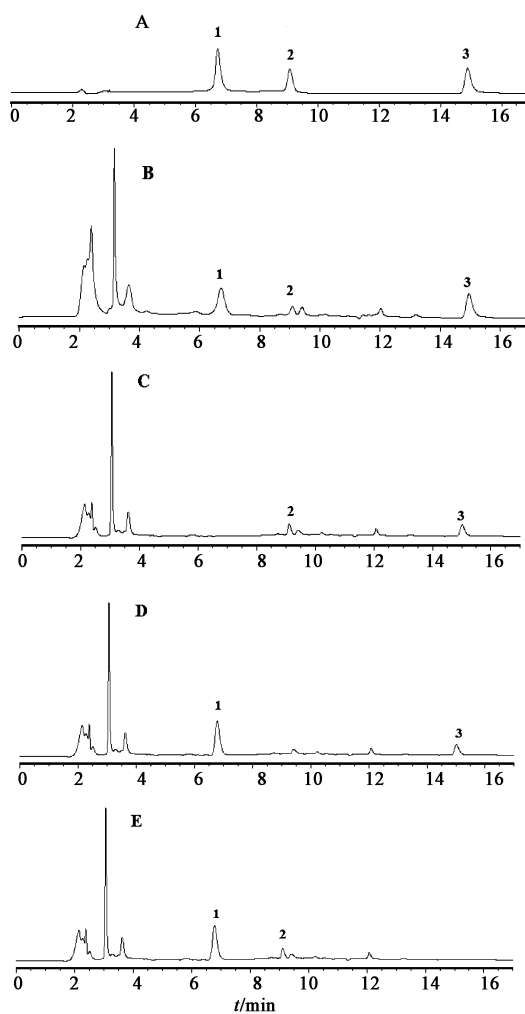
2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.2%磷酸水(B)梯度洗脱(对照品储备液),流速1.0 mL·min⁻¹,波长切换(0~6.3 min, 276 nm, 6.3~7.3 min, 230 nm, 7.3~16 min, 276 nm),柱温28℃,进样量20 μL。见图1。

2.2 对照品溶液的制备 准确称取对照品芍药苷、甘草苷和肉桂酸适量,分别置于25 mL量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制得质量浓度分别为296, 427, 220 mg·L⁻¹的单一成分对照品储备液。分别精密量取芍药苷对照品储备液1.0 mL、甘草苷对照品储备液0.5 mL、肉桂酸对照品储备液0.2 mL置于同一25 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品储备液I(芍药苷11.84 mg·L⁻¹,甘草苷8.540 mg·L⁻¹,肉桂酸1.760 mg·L⁻¹)。

2.3 供试品溶液的制备 取养阴清肺颗粒细粉约0.25 g,精密称定,置100 mL具塞锥形瓶中,精确加入50%甲醇25 mL,超声提取60 min,放冷,补足减失的质量,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性对照溶液 按处方比例,分别取缺白芍、缺甘草和缺玄参外的其他药味,按照养阴清肺颗粒制备工艺,分别制得其阴性样品,按2.2.2项方法分



A. 对照品; B. 样品; C. 缺白芍阴性对照;
D. 缺甘草阴性对照; E. 缺玄参阴性对照;
1. 芍药苷; 2. 甘草苷; 3. 肉桂酸

图1 养阴清肺颗粒HPLC

别制成阴性对照溶液。

2.5 线性关系考察 按照2.1项色谱条件,分别精密吸取混合对照品储备液(I) 0.50, 1.00, 2.00, 5.00, 10.00 mL置于25 mL量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列混合对照品溶液。进样20 μL,以面积Y对进样浓度X(mg·L⁻¹)进行线性拟合。得芍药苷、甘草苷和肉桂酸回归方程分别为 $Y = 82.21X - 1.24$ ($r = 0.9999$), $Y = 24.92X + 0.28$ ($r = 0.9999$), $Y = 376.09X - 1.55$ ($r = 0.9999$)。结果表明,芍药苷在0.2368~4.736 mg·L⁻¹,甘草苷在0.1708~3.416 mg·L⁻¹,肉桂酸在0.0352~0.704 mg·L⁻¹线性关系良好。

2.6 精密度试验 按照2.1项色谱条件,精密吸取供试品溶液20 μL,重复进样6次,得芍药苷、甘草苷、肉桂酸峰面积的RSD分别为0.32%, 0.35%,

0.41%。结果表明,仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 按照 2.1 项色谱条件,精密吸取同一供试品溶液 20 μL ,分别在 0,2,4,6,8,10 h 进样,测得芍药苷、甘草苷和肉桂酸峰面积的 RSD 分别为 1.03%,1.46%,1.72%。结果表明,供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.8 重复性试验 取同一批号(批号 121206034)样品,按 2.3 项方法平行制备供试品溶液 6 份,在上述色谱条件下分别进样 20 μL 。得芍药苷、甘草苷和肉桂酸峰面积的峰面积 RSD 分别为 0.96%,RSD 1.17%,RSD 1.38%,结果表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验 称取已测知含量的样品(批号 121206034)6 份,每份约 0.25 g,分别精密加入芍药苷对照品溶液($296 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)0.27 mL,甘草苷对照品溶液($427 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)0.11 mL,肉桂酸对照品溶液($220 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)24.60 μL ,按 2.2.2 项方法制备供试品溶液,测定含量并计算回收率,结果见表 1。

表 1 养阴清肺颗粒中各成分加样试验

成分	称样量 /g	样品中 量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
芍药苷	0.250 1	78.86	79.92	158.30	99.40	99.74	0.78
	0.250 3	78.92	79.92	159.50	100.83		
	0.250 3	78.92	79.92	158.80	99.95		
	0.250 2	78.89	79.92	157.90	98.86		
	0.250 4	78.95	79.92	158.10	99.04		
	0.250 5	78.98	79.92	159.20	100.38		
甘草苷	0.250 1	46.62	46.97	92.63	97.96	98.82	0.97
	0.250 3	46.66	46.97	93.21	99.11		
	0.250 3	46.66	46.97	93.88	100.53		
	0.250 2	46.64	46.97	92.68	98.02		
	0.250 4	46.67	46.97	92.89	98.40		
	0.250 5	46.69	46.97	93.13	98.87		
肉桂酸	0.250 1	5.40	5.41	10.66	97.15	98.40	1.04
	0.250 3	5.41	5.41	10.74	98.56		
	0.250 3	5.41	5.41	10.69	97.63		
	0.250 2	5.40	5.41	10.82	100.07		
	0.250 4	5.41	5.41	10.72	98.13		
	0.250 5	5.41	5.41	10.76	98.84		

2.10 样品测定 取三厂家样品,按 2.2.2 项方法分别制备供试品溶液,精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL ,按 2.1 项色谱条件测定,按外标法定量计算。结果见表 2。

3 讨论

以乙腈-水为流动相对 3 种有效成分进行梯度洗脱,初始流动相中有机相比例超过 40%,芍药苷出峰太快,易受杂质干扰,而当有机相比例低于 15%时,肉桂酸出峰较迟,并出现肩峰。通过优化流

表 2 养阴清肺颗粒样品中 3 种成分测定 ($n=6$) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

批号	芍药苷	甘草苷	肉桂酸
20130201	0.166 0	0.042 9	0.008 0
121206034	0.315 3	0.186 4	0.021 6
130101	0.240 8	0.117 1	0.004 9

动相比例,最终 3 种成分得到有效分离,且峰形较好。

应用紫外-可见分光光度计分别对芍药苷、甘草苷及肉桂酸单一成分在 200 ~ 400 nm 扫描,结果发现芍药苷在 230 nm 处有最大吸收峰,肉桂酸在 273 nm 处有最大吸收峰,215, 276 nm 处有较大吸收,甘草苷在 276 nm 处有最大吸收峰,由于甘草苷峰面积响应值相对较低,为提高甘草苷灵敏度,避免杂质峰干扰,选取 276 nm 为甘草苷、肉桂酸最大响应波长。

样品制备对提取溶剂,超声时间以及料液比的对比研究,确定以 1:60 为料液比,50%的甲醇超声提取 60 min 提取效果最佳。

[参考文献]

- [1] 罗晋萍,张中苏,田晨. 高效液相色谱法测定桂龙咳喘宁胶囊中肉桂酸的含量[J]. 药物分析杂志,2000,20(3):200.
- [2] 王晓燕,朱宝珠,李顺吉,等. RP-HPLC 法测定逍遥丸中芍药苷的含量[J]. 中医研究,2008,21(5):14.
- [3] 王志君,张润祥,隋晓晶. HPLC 法测定养阴清肺口服液中药药苷的含量[J]. 中国药品标准,2011,12(1):40.
- [4] 马丽杰,李兰城,王玉华. RP-HPLC 测定养阴清肺丸中芍药苷的含量[J]. 中国现代中药,2006,8(10):14.
- [5] 冯丽君,姜娜,曹飒丽,等. HPLC 法同时测定 11 个厂家养阴清肺糖浆中 4 种成分[J]. 中成药,2013,35(3):512.
- [6] 沈艺,陈妍,李镜友,等. HPLC 法测定养阴清肺膏中芍药苷的含量[J]. 中医药导报,2006,12(3):58.
- [7] 康强,孔令峰. HPLC 法测定养阴清肺丸中 5-羟甲基糠醛的含量[J]. 中国药师,2013,16(6):856.
- [8] 方文清. TLC 法和 HPLC 法对养阴清肺合剂的质量控制[J]. 海峡药学,2012,24(11):16.
- [9] 李玉兰,初正云. 高效液相色谱法测定养阴清肺颗粒中芍药甙含量[J]. 辽宁中医学院学报,2000,6(2):143.
- [10] 李健,陈妍,徐金波. 液相色谱法测定养阴清肺颗粒中丹皮酚的含量[J]. 天津中医药,2004,21(1):72.

[责任编辑 顾雪竹]