

· 化学与分析 ·

HPLC 法快速测定通脉颗粒中葛根素和阿魏酸

刘春旭^{1,2}, 张颖^{1*}, 刘东春², 刘建勋¹

(1. 中国中医科学院西苑医院实验研究中心, 北京 100091; 2. 沈阳药科大学, 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 建立同时测定通脉颗粒中葛根素和阿魏酸含量的快速分析方法。方法: 采用 HPLC-UV 法, 选择 Kinetex C₁₈ 柱(3 mm × 50 mm, 2.6 μm) 为分析柱, 以 10% 乙腈-1% 醋酸(54:46) 为流动相, 流速 0.6 mL·min⁻¹, 313 nm 检测波长下同时检测葛根素和阿魏酸。结果: 在此分析条件下, 葛根素和阿魏酸的保留时间分别为 5.7, 7.6 min, 与阴性样品对照具有特异性, 一次分析可在 10 min 内完成。葛根素线性范围在 10 ~ 100 mg·L⁻¹, $r = 0.9997$; 阿魏酸线性范围在 0.05 ~ 0.5 mg·L⁻¹, $r = 0.9993$; 葛根素和阿魏酸的平均加样回收率分别达到 (98.1 ± 1.4)% , (103.7 ± 1.7)%。结论: 该方法快速、灵敏、准确、精密, 可以为通脉颗粒剂的质量控制提供快速的含量测定方法。

[关键词] 通脉颗粒; 葛根素; 阿魏酸; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0044-03

Simultaneous and Rapid Determination of Puerarin and Ferulic Acid in Tongmai Granule by HPLC

LIU Chun-xu^{1,2}, ZHANG Ying^{1*}, LIU Dong-chun², LIU Jian-xun¹

(1. Research Center Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To achieve rapid quantitation of active components in Tongmai granule. **Method:** By choosing Kinetex C₁₈ (3 mm × 50 mm, 2.6 μm) as analysis column, an HPLC-UV method was established to detect puerarin and ferulic acid in Tongmai Granule under detection wavelength of 313 nm. The mobile phrase was optimized as 10% acetonitrile-1% acetic acid (54:46) at flow rate of 0.6 mL·min⁻¹. **Result:** Under this analytic condition, the quantitation could be accomplished within 10 minutes profiling good separation and specificity of puerarin and ferulic acid which presented retention time at 5.7, 7.6 min. The average recovery was (98.1 ± 1.40) % , (103.7 ± 1.68) % for puerarin and ferulic acid respectively. Calibration curves ranged from 10 to 100 mg·L⁻¹ for puerarin and from 0.05 to 0.5 mg·L⁻¹ for ferulic acid with correlation coefficients of 0.9997 and 0.9993. **Conclusion:** The method is rapid, sensitive, accurate and precise. It could be used to provide a rapid determination in quality control of Tongmai granule.

[Key words] Tongmai granule; puerarin; ferulic acid; HPLC

[收稿日期] 20101109(006)

[基金项目] 国家科技部重大专项课题(2009ZX09502-006)

[第一作者] 刘春旭, 生药学, 硕士研究生, Tel: 010-62835641, E-mail: liuchunxu00000@126.com

[通讯作者] * 张颖, 副研究员, 中药学和药代动力学研究方向, Tel: 010-62835641, E-mail: zhyingde@sina.com

通脉颗粒收载于《卫生部药品标准》中成药方剂(第4册), 是由丹参、川芎、葛根按 1:1:1 的比例制成的复方制剂^[1], 具有活血通脉的功效。临床上对于缺血性心脑血管疾病、动脉硬化、脑血栓、冠心病、心绞痛等有较好疗效。通脉颗粒中的阿魏酸和葛根素具有抑制血小板聚集和释放^[2], 降低心肌缺血和耗氧量^[3], 改善缺血区域供血, 有效减慢心率降

低血压等药理作用,是制剂中的主要有效成分,可以作为制剂的质量控制成分。有文献报道了采用HPLC-UV方法建立的质量控制方法,但是在 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速下,分析时间都在 20 min 以上^[4-5]。本文尝试采用比常规 $5\text{ }\mu\text{m}$ 填料更为高效的小粒径 $2.6\text{ }\mu\text{m}$ 固定相分析柱,在较低的流速下,达到理想的分离效果。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱系统(美国Agilent公司),由G1322A DEGASSER脱气机,G1311A QUAT PUMP四元低压泵,G1329A ALS自动进样器,G1316A TCC柱温箱,G1314B VWD紫外检测器,CHEMSTATION工作站构成。METTLER AE240型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);BRANSON超声清洗器(上海必能信超声有限公司)。

1.2 试药 葛根素(批号110752-200912)、阿魏酸(批号0773-9910)中国药品生物制品检定所购;通脉颗粒剂(市售,河北神威药业批号09061663,09072460,09111452);乙腈、冰醋酸(色谱纯);娃哈哈纯净水;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kinetex C_{18} 柱($3\text{ mm}\times 50\text{ mm}$, $2.6\text{ }\mu\text{m}$),流动相 10% 乙腈- 1% 醋酸($54:46$),流速 $0.6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$,检测波长 313 nm ,进样体积 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.2 对照品储备液的制备 取阿魏酸对照品 5.19 mg 置于 5 mL 量瓶中,加入甲醇溶解,定容至刻度,用 1% 醋酸稀释 10 倍作为阿魏酸对照品储备液;取葛根素对照品 25.23 mg 置于 5 mL 量瓶中,加入甲醇溶解,定容至刻度,用 1% 醋酸稀释 10 倍作为葛根素对照品储备液。

2.3 线性关系的考察 取阿魏酸对照品溶液适量,以 1% 醋酸稀释为 $0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准溶液系列,测定阿魏酸峰面积。以测得的峰面积为纵坐标,阿魏酸的进样浓度为横坐标,得回归方程 $Y=87.90X-0.97(r=0.9993)$;取葛根素对照品溶液适量,以 1% 醋酸稀释为 $10, 20, 30, 40, 50, 100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准溶液系列,测定葛根素峰面积。以测得的峰面积为纵坐标,葛根素的进样浓度为横坐标,得回归方程 $Y=22.21X-2.94(r=0.9997)$ 。

2.4 供试品溶液的制备 取本品 0.5 g ,精密称定,置于 50 mL 匀浆管中,精密加入甲醇 4 mL ,密封,称定质量,超声处理 30 min ,放冷,用甲醇补足损失的质量,摇匀,离心 $10\text{ min}(3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}, 20\text{ }^{\circ}\text{C})$ 取上清液用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤,弃去初滤液,收集续滤液,用 1% 醋酸稀释 10 倍作为供试品溶液。

2.5 空白对照溶液的制备 按处方药的比例,分别配制不含葛根和川芎的模拟制剂,按2.4项下制备空白对照溶液,按文中色谱条件进行测定,结果空白对照溶液在与葛根素和阿魏酸相对应的保留时间处未显色谱峰,阴性无干扰。

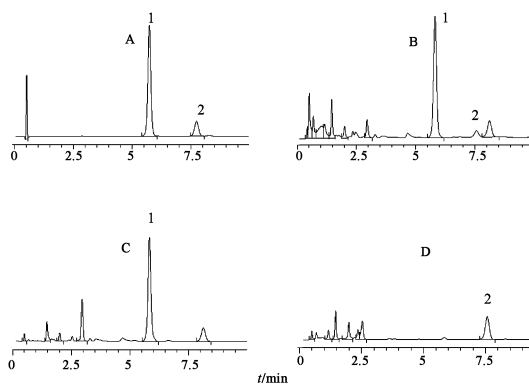


图1 通脉颗粒中葛根素和阿魏酸色谱

A. 混合对照品;B. 通脉颗粒样品;C. 川芎阴性对照;D. 葛根阴性对照
1. 葛根素;2. 阿魏酸

2.6 精密度试验 取同一份对照品溶液,重复进样 6 次测定葛根素和阿魏酸峰面积。结果葛根素的RSD 0.07% ;阿魏酸的RSD 0.31% 。表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取批号为09072462的通脉颗粒样品 0.4 g ,精密称定,按照样品含量测定项下制备供试品溶液,平行 6 份,测定峰面积,葛根素RSD 2.47% ;阿魏酸RSD 0.72% 。

2.8 稳定性试验 取批号为09072462的通脉颗粒样品 0.4 g ,精密称定,按照样品含量测定项下制备供试品溶液,以 $0, 1, 2, 4, 6\text{ h}$ 进样测定峰面积,葛根素RSD 0.57% ;阿魏酸RSD 1.88% 。

2.9 加样回收率试验 按照含量测定项下制备供试品溶液 2 份,取对照品溶液以甲醇稀释至葛根素 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,阿魏酸 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。向已经称量好(约 0.4 g)的通脉颗粒样品(批号09061662)和空白样品中分别加入 $800, 1000, 1200\text{ }\mu\text{L}$ 葛根素; $100, 120, 140\text{ }\mu\text{L}$ 阿魏酸和 $2300, 2080, 1860\text{ }\mu\text{L}$ 甲醇,按照

含量测定项下制备供试品溶液,进样测定峰面积计算回收率。以加入对照品后总峰面积与原样品峰面积之差和对应标准品峰面积之比作为回收率,见表 1,2。

表 1 葛根素加样回收率

No.	加入对照品 /mg	总含量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.82	1.75	97.56		
2	0.82	1.75	97.56		
3	1.04	1.97	98.08		
4	1.04	1.98	99.04	98.71	1.27
5	1.23	2.17	99.19		
6	1.23	2.19	100.81		

注:样品中含 0.95 mg。

表 2 阿魏酸加样回收率

序号	加入对照品 /μg	总含量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	9.23	21.42	104.24		
2	9.23	21.43	104.40		
3	11.90	24.29	104.96		
4	11.90	24.23	104.46	103.71	1.66
5	13.99	25.82	100.26		
6	13.99	26.34	103.96		

注:样品中含 11.80 μg。

2.10 样品含量测定 取 3 批供试品溶液 10 μL,注入高效液相色谱仪分别测定葛根素和阿魏酸的峰面积,带入标准曲线计算含量。结果见表 3。

表 3 通脉颗粒中葛根素和阿魏酸的含量测定

批号	葛根素/ g·L ⁻¹	RSD/%	阿魏酸 /mg·L ⁻¹	RSD/%
09072460	2.07	0.47	13.10	0.24
09111452	2.24	0.88	8.32	3.72
09061663	2.52	0.75	31.58	2.48

3 讨论

我们对葛根素和阿魏酸的标准溶液进行全波长扫描,葛根素和阿魏酸的最大吸收波长分别为 250 nm 和 313 nm,与文献报道一致^[6-7],由于阿魏酸在制剂中含量较低,因此选择阿魏酸的最大吸收波长

313 nm 作为检测波长。由于葛根素和阿魏酸都有酚羟基,加入少量的冰醋酸可以减少拖尾有助于改善峰形,提高分离度。在考察不同比例的流动相之后,确定在流动相比例为 10% 乙腈-1% 醋酸 (54:46) 时佳,能在 10 min 的分析时间内获得待测成分与其他干扰成分良好分离的要求。

考察了不同超声提取时间 (20, 30, 40 min),不同溶剂量 (4, 8 倍量) 对提取效率的影响,发现在 8 倍量超声 30 min 条件下得到的提取效率最高,最终确定本文的提取方法。

目前在中药制剂的质量标准中多采用常规的 5 μm 填料分析柱,由于中药成分复杂,在同时分析多成分或为了去除其他成分干扰时,往往需要较长的分析时间才能达到满意分离度。随着色谱填料技术的发展,目前市场出现了更小粒径填料的分析柱,大幅度地提高了柱分离效率。但是随着填料粒径变小,柱压也会升高。在普通高效液相系统下选择高效色谱柱,需要综合考率分析柱的柱效以及柱压。本实验尝试选用 Kinetex C₁₈ 柱 (3 mm × 50 mm, 2.6 μm),在常规高效液相系统下,建立了多成分的快速含量测定方法,而且较低的流速和分析时间能够大幅减低溶剂的消耗。采用小粒径高效色谱柱在中药制剂的质量标准研究中值得尝试和推广。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准 [S]. 中药成方制剂 (第四册). 1991:169.
- [2] 黄丰阳,徐秋萍. 中药有效成分的抗血小板作用研究进展 [J]. 北京中医药大学学报, 1999, 22(2): 28.
- [3] 张明发,沈雅琴. 咖啡酸和阿魏酸的抗缺氧作用 [J]. 西北药学杂志, 1994, 9(3): 18.
- [4] 杨跃龙. 通脉口服液中阿魏酸和葛根素的含量测定 [J]. 中南药学, 2007, 01: 31.
- [5] 郭宇洁,孟硕,刘建勋,等. 通脉颗粒的定性定量分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(11): 13.
- [6] 郝建莉,孔维涵,胡静,等. 葛根异黄酮胶囊葛根素含量测定 [J]. 天津药学, 2007, 19(4).
- [7] 王宝琴. 中成药质量标准与标准物质研究 [M]. 北京: 中国医药出版社, 1994: 519.

[责任编辑 蔡仲德]