

HPLC 法测定温肺止咳软胶囊中甘草酸、 6-姜酚、和厚朴酚及厚朴酚

张芳向¹, 林朝霞²

(1. 深圳市龙岗区妇幼保健院, 广东 深圳 518100; 2. 深圳市龙岗区中心医院, 广东 深圳 518172)

[摘要] 目的: 建立温肺止咳软胶囊中甘草酸、6-姜酚、和厚朴酚、厚朴酚的含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, 用 C_{18} 色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm); 甲醇-0.05 mol · L⁻¹ 乙酸铵-冰乙酸 (65:35:0.5) 为流动相; 流速 1.000 mL · min⁻¹, 检测波长 250 nm, 柱温 30 °C。结果: 该法回收率甘草酸为 98.17%, 6-姜酚为 99.14%, 和厚朴酚为 98.31%, 厚朴酚为 99.49%。结论: 本方法可作为控制温肺止咳软胶囊质量的方法。

[关键词] 温肺止咳胶囊; 甘草酸; 6-姜酚; 和厚朴酚; 厚朴酚; HPLC

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0083-03

HPLC for quantification of glycyrrhizic acid, 6-gingerol, honokiol and magnolol in Wenfei Zhike Capsule

ZHANG Fang-xiang, LIN Zhao-xia

(Shenzhen Municipal Henggang People's Hospital, Shenzhen 518115, China)

[Abstract] Objective: To establish HPLC method for the Determination of glycyrrhizic acid, 6-gingerol, honokiol and magnolol in Wenfei Zhike Capsule. **Method:** LUNA ODS C_{18} BDS (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) was used with methanol-0.05 mol · L⁻¹ ammonium acetate-glacial acetic acid (65:35:0.5) as a mobile phase. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 250 nm. The column temperature was 30 °C. **Result:** The average recovery of was 98.17%, 99.14%, 98.31% and 99.49% for glycyrrhizic acid, 6-gingerol, honokiol and magnolol respectively. **Conclusion:** The method can be used for quality control of Wenfei Zhike Capsule.

[Key words] Wenfei Zhike Capsule; glycyrrhizic acid; 6-gingerol; honokiol; magnolol; HPLC

温肺止咳软胶囊是由甘草、干姜、厚朴等药材组成的中药复方制剂, 组方是在传统古方甘草干姜汤的基础上加减而来, 具有温肺化饮、润肺止咳、祛痰平喘的功效, 主要用于寒痰客肺, 肺痿引起的咳嗽、哮、喘、痰等病证的治疗。处方中甘草酸、6-姜酚、和厚朴酚、厚朴酚为其主要有效成分, 本文参考相关文献^[1-4]建立了同时对这 4 种有效成分含量的 HPLC 测定方法, 作为该制剂质量控制标准。

1 仪器与试药

1.1 仪器 岛津 LC-10ATvp 高效液相色谱仪、SPD-10ATvp 检测器、CBM-10A 系统控制器; Class-LC-10 型色谱工作站; 超纯水器 (Milipore); DL-360A 超声

波清洗器 (上海之信仪器有限公司); 1/10 万电子天平 (德国 Sartorius)。

1.2 试药 甘草酸、和厚朴酚、厚朴酚对照品均由中国药品生物制品检定所提供; 6-姜酚 (含量 > 98.5%), 由百灵威化学技术有限公司提供; 温肺止咳软胶囊 (批号 20080512, 20080514, 20080516, 20080518, 20080520) 自制, 甲醇为色谱纯, 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 色谱柱为 DiamonsilTM 十八烷基键合硅胶柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm); 柱温为 30 °C; 流动相为甲醇-0.05 mol · L⁻¹ 乙酸铵-冰乙酸 (65:35:0.5), 流速 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长为 250 nm; 进样量为 10 μL。理论塔板数以甘草酸计不得小于 5 000, 待测组分与其他峰的分度良好。

[收稿日期] 20100604(009)

[作者简介] 张芳向, 从事医院药学和临床药学工作, Tel: 13502801880

2.2 溶液的制备

2.2.1 混标对照溶液的制备 精密称取甘草酸对照品 23.74 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得浓度为 $1.187 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照液。记为 A。

精密称取 6-姜酚对照品 24.88 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得浓度为 $1.244 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照液。记为 B。

精密称取和厚朴酚对照品 12.15 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得浓度为 $0.6075 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照液。记为 C。

精密称取厚朴酚对照品 15.34 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得浓度为 $1.534 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照液。记为 D。

取 10 mL 量瓶, 依次精密加入 A, B, C, D 各 2, 2, 1, 1 mL, 加甲醇定容, 摇匀, 即得混标对照溶液(甘

草酸 $237.4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、6-姜酚 $248.8 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、和厚朴酚 $60.75 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、厚朴酚 $153.4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品内容物约 100 mg, 精密称定, 置 20 mL 量瓶中, 加入甲醇适量, 超声处理 30 min, 放冷, 用甲醇补足至刻度, 摇匀, 用 $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按处方比例分别配制缺甘草、干姜、厚朴的阴性空白样品, 按 2.2.2 项下处理成阴性对照溶液。

2.2.4 测定法 分别吸取混标对照溶液和供试品溶液、阴性样品溶液各 10 μL , 按 2.1 所述色谱条件进行分析, 从图 1 结果可以看出, 各被测组分与其他组分均达到基线分离, 分离度 $R > 1.5$, 甘草酸、6-姜酚、和厚朴酚、厚朴酚阴性对照均无干扰。结果见图 1。

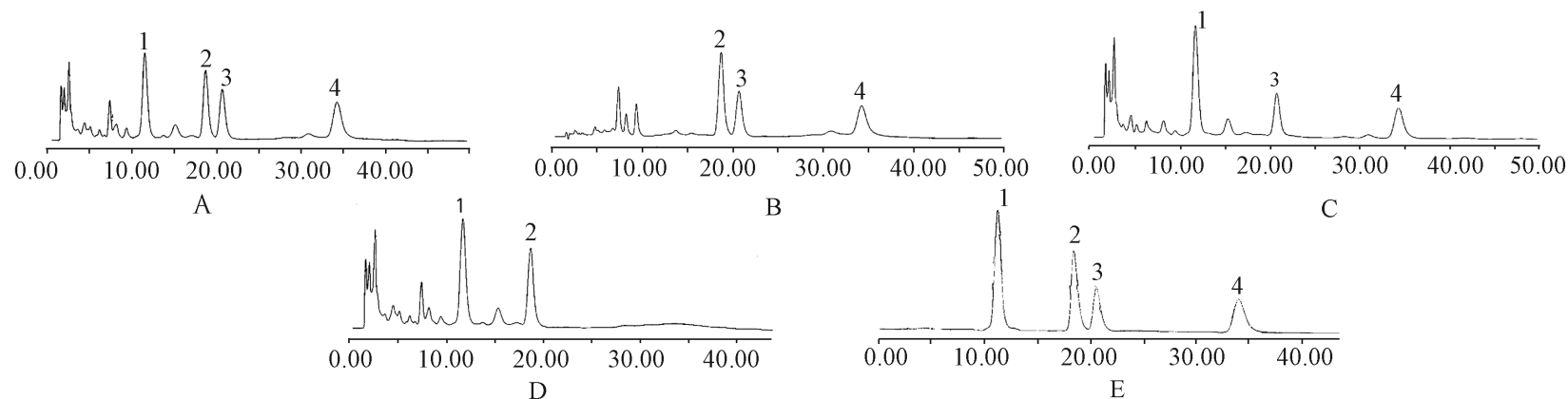


图 1 高效液相色谱图

A. 样品; B. 缺甘草阴性样品; C. 缺干姜阴性样品; D. 缺厚朴阴性样品; E. 混标对照品

1. 甘草酸; 2. 6-姜酚; 3. 和厚朴酚; 4. 厚朴酚

2.3 线性关系考察 精密量取混合对照品溶液 2, 6, 10, 12, 16, 20 μL , 注入液相色谱仪, 以峰面积积分为纵坐标, 对照品量 (μg) 为横坐标进行回归, 得甘草酸 $Y = 1.7 \times 10^6 X - 22645$, $r = 0.9998$, 6-姜酚 $Y = 1.3 \times 10^5 X + 3824$, $r = 0.9997$, 和厚朴酚 $Y = 4.3 \times 10^6 X - 1752$, $r = 0.9996$, 厚朴酚 $Y = 1.8 \times 10^6 X + 41423$, $r = 0.9996$ 。结果表明, 甘草酸在 $0.475 \sim 4.75 \text{ } \mu\text{g}$ 、6-姜酚在 $0.498 \sim 4.98 \text{ } \mu\text{g}$ 、和厚朴酚在 $0.122 \sim 1.22 \text{ } \mu\text{g}$ 、厚朴酚在 $0.307 \sim 3.07 \text{ } \mu\text{g}$ 均呈良好的线性关系。

2.4 精密度实验 精密吸取混合对照液 10 μL , 重复进样 6 次, 测得甘草酸 RSD 为 0.86%, 6-姜酚 RSD 为 0.92%, 和厚朴酚 RSD 为 0.64%, 厚朴酚 RSD 为 0.52%, 结果表明精密度良好。

2.5 稳定性实验 精密吸取 20080512 供试品溶液 10 μL , 每间隔 2 h 进样 1 次, 共进样 6 次, 结果表明

供试品溶液在 10 h 内稳定, 甘草酸 RSD 为 1.42%, 6-姜酚 RSD 为 1.61%, 和厚朴酚 RSD 为 1.27%, 厚朴酚 RSD 为 1.86%。

2.6 重复性实验 取 20080152 批号样品, 精密称取 6 份, 按 2.2.2 项下处理, 依法测定, 测得甘草酸的含量平均值为 4.513%, RSD 为 2.04%; 6-姜酚的含量平均值为 4.142%, RSD 为 1.83%; 和厚朴酚的含量平均值为 1.325%, RSD 为 1.78%; 厚朴酚的含量平均值为 3.114%, RSD 为 1.54%。

2.7 加样回收率实验 取 20080512 批号样品 6 份, 每份约 50 mg, 置 20 mL 量瓶中, 精密称定, 分别加入对照液 A, B, C, D 各 2 mL, 2 mL, 1 mL, 1 mL 及适量甲醇, 与 2.2.2 项同法操作, 测定含量, 并计算回收率。结果见表 1~4。

实验结果表明, 待测组分的平均加样回收率均在 95%~105%, 加样回收率良好。

表 1 甘草酸回收率实验结果 (n=6)

No.	称样量 /mg	样品含量 /g	对照品加 入量/g	实测量 /g	回收率 /%	平均回收 率/%	RSD /%
1	50.15	2 263.3	2 374.0	4 504.2	97.13		
2	52.47	2 368.0	2 374.0	4 682.2	98.74		
3	49.36	2 227.6	2 374.0	4 526.6	98.37	98.17	0.79
4	53.20	2 400.9	2 374.0	4 681.3	98.04		
5	51.04	2 303.4	2 374.0	4 561.0	97.51		
6	48.84	2 204.1	2 374.0	4 542.4	99.22		

表 2 6-姜酚回收率实验结果 (n=6)

No.	称样量 /mg	样品含量 /g	对照品加 入量/g	实测量 /g	回收率 /%	平均回收 率/%	RSD /%
1	50.15	2 077.2	2 488.0	4 475.7	98.04		
2	52.47	2 173.3	2 488.0	4 592.3	98.52		
3	49.36	2 044.5	2 488.0	4 470.4	98.63	99.14	1.10
4	53.20	2 203.5	2 488.0	4 652.1	99.16		
5	51.04	2 114.1	2 488.0	4 654.5	101.14		
6	48.84	2 023.0	2 488.0	4 481.6	99.35		

表 3 和厚朴酚回收率实验结果 (n=6)

No.	称样量 /mg	样品含量 /g	对照品加 入量/g	实测量 /g	回收率 /%	平均回收 率/%	RSD /%
1	50.15	664.5	607.5	1260.0	99.06		
2	52.47	695.2	607.5	1275.9	97.94		
3	49.36	654.0	607.5	1241.6	98.42	98.31	0.66
4	53.20	704.9	607.5	1293.2	98.54		
5	51.04	676.3	607.5	1248.0	97.21		
6	48.84	647.1	607.5	1237.9	98.67		

表 4 厚朴酚回收率实验结果 (n=6)

No.	称样量 /mg	样品含量 /g	对照品加 入量/g	实测量 /g	回收率 /%	平均回收 率/%	RSD /%
1	50.15	1561.7	1534.0	3109.6	1.0045		
2	52.47	1633.9	1534.0	3111.5	0.9822		
3	49.36	1537.1	1534.0	3032.4	0.9874	99.49	1.14
4	53.20	1656.6	1534.0	3160.7	0.9906		
5	51.04	1589.4	1534.0	3162.7	1.0126		
6	48.84	1520.9	1534.0	3031.4	0.9923		

表 5 样品含量测定 (n=3)

批号	甘草酸	6-姜酚	和厚朴酚	厚朴酚
20080512	45.52	41.69	13.26	30.74
20080514	44.88	43.04	11.89	31.06
20080516	45.30	41.57	12.19	31.52
20080518	44.16	42.53	12.84	30.96
20080520	45.63	42.19	13.08	31.85

3 讨论

根据相关文献报道及 4 种待测成分紫外吸收情况,选择在 250 nm 波长处检测。在此波长下样品中 4 种待测组分吸收强度相差较小,阴性干扰小,符合方法学的要求。

实验过程中先后采用了甲醇-水(60:40)、乙腈-水(50:50)、甲醇-0.05 mol·L⁻¹乙酸铵-冰乙酸(60:40:0.5)等流动相系统,综合考虑峰形、分离度、有无干扰、分析时间等因素,最终确定以甲醇-0.05 mol·L⁻¹乙酸铵-冰乙酸(65:35:0.5)为流动相测定。

本研究选择制剂处方中各味药材的主要有效成分作为待测成分,建立了可靠、准确、专属性强的多组分同时测量方法,为该制剂的质量控制提供了依据。

[参考文献]

- [1] 李应芬,李照宏,朱正华. HPLC 法测定沉香露白露片中甘草酸的含量[J]. 药物分析杂志. 2008, 28(2): 304.
- [2] 冯堃,阎东海. 生姜超临界提取物中 6-姜酚含量测定方法研究[J]. 中成药. 2007, 29(7): 1041.
- [3] 夏立武,赵杰,陆宇,等. HPLC 法测定暑湿清胶囊中厚朴酚及和厚朴酚的含量[J]. 中国新药杂志. 2007, 16(6): 1291.
- [4] 卢建秋,孙明谦,刘颖,等. 高效液相色谱法同时测定藿香正气水中甘草酸、欧前胡素、异欧前胡素、厚朴酚、和厚朴酚的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(5): 742.

[责任编辑 顾雪竹]

2.8 5 批样品含量测定结果 取不同批号本品,按 2.2.2 项下处理,精密量取续滤液和混合对照品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,即得。结果见表 5。