

HPLC法同时测定速效心痛气雾剂中阿魏酸和丹皮酚含量*

张韵慧, 蔡德富, 张丹, 王妍, 肖莉, 晋兴华, 赵振宇

(天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

摘要 目的: 建立了同时测定速效心痛气雾剂中丹皮酚和阿魏酸含量的方法。方法: 采用 RP-HPLC法, Welchum C₁₈柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-1%醋酸水溶液 (45:55), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 317 nm, 柱温为室温。结果: 阿魏酸和丹皮酚浓度分别在 2.55~51.00 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$, $n=6$) 和 25.03~500.50 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$, $n=6$) 内与峰面积呈良好线性关系, 最低检测限分别为 1.2 ng 与 9.4 ng 平均回收率 ($n=9$) 分别为 100.5% 和 99.9%。结论: 本方法准确, 重现性好, 为速效心痛气雾剂质量评价提供可靠分析方法。

关键词: 速效心痛气雾剂; 阿魏酸; 丹皮酚; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2009)03-0378-03

HPLC simultaneous determination of ferulic acid and paeonol in Suxiaoxintong aerosol*

ZHANG Yun-hui, CAI De-fu, ZHANG Dan, WANG Yan, XIAO Li, JIN Xing-hua, ZHAO Zhen-yu

(School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for the simultaneous determination of paeonol and ferulic acid in Suxiaoxintong aerosol. **Methods** Welchum C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used, the mobile phase was methanol-1% acetic acid solution (45:55) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The UV detection wavelength was 317 nm, and the column temperature was room temperature. **Results** The calibration curves of ferulic acid and paeonol were linear in the range of 2.55-51.00 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$, $n=6$) and 25.03-500.50 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$, $n=6$) respectively. The minimum limit of detection of them were 1.2 ng and 9.4 ng. The mean recoveries ($n=9$) of them were 100.5% and 99.9% respectively. **Conclusion:** This is an accurate and credible quality control method for Suxiaoxintong aerosol.

Key words Suxiaoxintong aerosol; ferulic acid; paeonol; RP-HPLC

速效心痛气雾剂是由牡丹皮、川芎、冰片 3 味中药经提取而制备的纯中药复方制剂。主要用于偏热型轻、中度胸痹心痛、痛兼烦热、舌苔色黄, 疗效确切。处方中的川芎与牡丹皮的主要药效成分分别为阿魏酸^[1]与丹皮酚^[2], 目前关于阿魏酸与丹皮酚的含量测定方法报道较多^[3-6]。但同时测定 2 种成分的方法未见文献报道。本文建立了反相高效液相色谱法同时测定速效心痛气雾剂中阿魏酸和丹皮酚含量, 方法简便灵敏, 重现性好, 为该制剂的质量控制提供科学依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪, 紫外检测

器 (G1322ADEGASSER), N2010 色谱工作站。对照品阿魏酸 (批号 0773-9809)、丹皮酚 (批号 0708-9704) 购自中国药品生物制品检定所。速效心痛气雾剂系按卫生部药品标准中药成方制剂 (第 11 册, 1996 年版) 制备, 批号: 20070907, 20070917, 20070930。所用试剂甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 实验用水使用二次蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 混合对照品溶液 分别称取对照品阿魏酸、丹皮酚适量, 精密称定, 置于同一 100 mL 量瓶中, 用

* 科技创新基金资助项目, 编号 05ZHCXGX11700

第一作者 张韵慧 Tel: 13920111590 E-mail: yunhui@eyou.com

45%乙醇-冰醋酸(20:1)溶解并稀释至刻度,摇匀,配制成 $0.102\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 阿魏酸和 $1.001\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丹皮酚的混合对照品储备液。精密吸取 1 mL 置 10 mL 量瓶中,用45%乙醇-冰醋酸(20:1)稀释至刻度,即得 $10.2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 阿魏酸和 $100.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丹皮酚的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 取速效心痛气雾剂1瓶,置冰箱冷冻2 h以上后取出,在盖上钻一小孔,待抛射剂挥发完全后,放至室温。精密移取药液 0.5 mL ,置 50 mL 分液漏斗中,加水 10 mL 混匀,用20%盐酸调pH值为2再用氯仿萃取4次(15 15 10 10 mL),精确分取氯仿层,低温回收氯仿,残渣用45%乙醇-冰醋酸(20:1)溶解,定量转移至 10 mL 量瓶中,用45%乙醇-冰醋酸(20:1)稀释至刻度,摇匀,经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,取续滤液,备用。

2.1.3 阴性样品溶液 按速效心痛气雾剂的组成处方及生产工艺,分别制备不加川芎的阴性样品及不加牡丹皮的阴性样品,照“2.1.2”项方法分别制得不加川芎和不加牡丹皮的阴性样品溶液。

2.2 色谱条件与系统适应性试验

色谱柱: Welchrom™-C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)由上海月旭公司提供;流动相: 甲醇-1%醋酸水溶液(45:55);流速: $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;检测波长 317 nm;柱温: 室温;进样量: $10.0\text{ }\mu\text{L}$ 。理论塔板数按阿魏酸计算不低于6000,按丹皮酚计算不低于10000,丹皮酚、阿魏酸与相邻峰的分度均大于1.5,拖尾因子均符合要求。分别测定速效心痛气雾剂样品、对照品和阴性样品色谱图,见图1。结果表明在此色谱条件下样品中其他成分对阿魏酸及对丹皮酚的测定无干扰。

2.3 线性关系考察 精密量取“2.1.1”项下的对照品储备液 $0.25\text{ }0.5\text{ }1.0\text{ }2.0\text{ }4.0\text{ }5.0\text{ mL}$ 分别置 10 mL 量瓶中,用45%乙醇-冰醋酸(20:1)稀释至刻度,摇匀,作为系列对照品混合溶液。在上述色谱条件下分别进样 $10.0\text{ }\mu\text{L}$,记录各色谱图。以对照品浓度 $X(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$ 为横坐标,色谱峰面积 A 为纵坐标绘制标准曲线。计算阿魏酸和丹皮酚的回归方程($n=6$)分别为:

$$A = 1.530 \times 10^7 X + 2.301 \times 10^3; r = 0.9999 \text{ 与 } A = 6.910 \times 10^6 X + 1.018 \times 10^4; r = 0.9999$$

结果表明,阿魏酸和丹皮酚分别在 $2.55\sim 51.00\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $25.03\sim 500.50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性良好。

2.4 检测限 取“2.1.1”项下对照品贮备液,逐步稀释,进样,直至信噪比 $S/N=3$ 此时进样量即为最

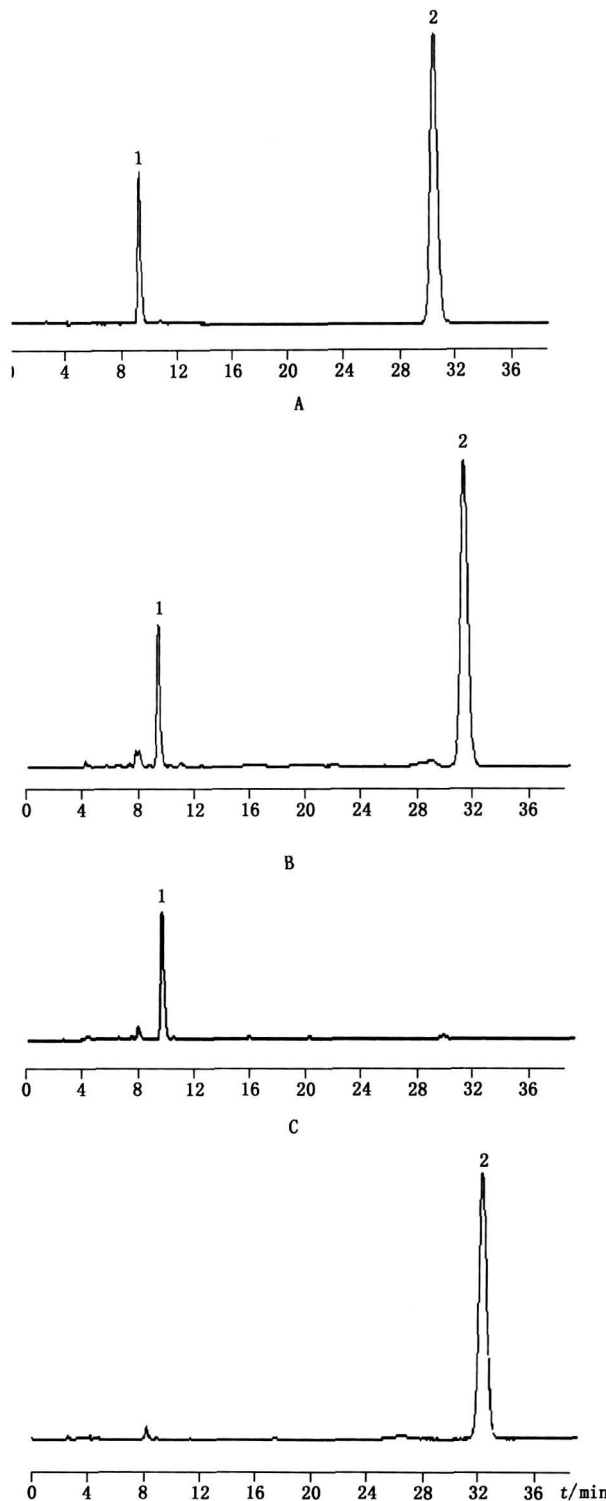


图1 高效液相色谱图
Fig 1 HPLC chromatograms
A 对照品 (reference substance) B 速效心痛气雾剂样品 (Suxiaoxintong aerosol) C 不加牡丹皮的阴性样品 (negative sample without Moutan Cortex) D 不加川芎的阴性样品 (negative sample without Chuanxiong)

1. 阿魏酸 (ferulic acid) 2. 丹皮酚 (paeonol)

低检测限。结果,阿魏酸的最低检测限为 1.2 ng ,丹皮酚的最低检测限为 9.4 ng 。

2.5 精密度试验 取“2.1.1”项下制备的 $10.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 阿魏酸和 $100.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 丹皮酚的混合对照品溶液照“2.2”项下条件测定,连续进样6次,记录阿魏酸和丹皮酚的峰面积,计算RSD分别为1.1%和1.2%。

2.6 重复性试验 精密移取同一批号样品(批号20070907)溶液6份,每份0.5 mL,按“2.1.2”项下方法操作,在上述色谱条件下进行测定,计算阿魏酸和丹皮酚的含量平均值分别为 $0.183 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1.88 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD分别为1.8%和1.5%。

2.7 回收率试验 精密量取同一批号(批号20070917)已知含量的气雾剂0.25 mL共9份,3份为一组,每组分别精密加入阿魏酸($10.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和丹皮酚($100.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的混合对照品溶液0.4、0.5、0.6 mL,制备低、中、高3种浓度溶液。依“2.1.2”项下的方法操作,进样测定。结果阿魏酸低、中、高浓度回收率($n=3$)分别为101.8%、100.7%、99.04%,平均值100.5%;RSD分别为2.7%、1.0%、1.9%。丹皮酚低、中、高浓度回收率($n=3$)分别为101.7%、98.6%、99.5%,平均值99.9%;RSD分别为1.2%、1.9%、2.0%。实验结果表明本方法有良好的回收率。

2.8 稳定性试验 取同一份室温下放置的供试品溶液,在0、2、4、6、8、12、24 h分别进样10.0 μL ,记录阿魏酸和丹皮酚的峰面积,计算RSD。结果,阿魏酸和丹皮酚峰面积的RSD分别为1.5%和1.8%。表明供试品溶液中阿魏酸和丹皮酚均在24 h内稳定。

2.9 样品测定 精密量取按“2.1.2”项下方法制备的3批样品的供试品溶液和按“2.1.1”项下方法制备的对照品溶液各10.0 μL ,注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定,外标法计算样品中阿魏酸和丹皮酚的含量,测定结果见表1。

表1 样品的测定结果($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $n=3$)

Tab 1 The determination results of samples

批号(Lot No.)	阿魏酸(fenolic acid)	丹皮酚(paeonol)
20070907	0.188	1.92
20070917	0.201	2.11
20070930	0.217	2.33

3 讨论

3.1 气雾剂的前处理 在实验中我们发现气雾剂的抛射剂在室温下均为气体,在气雾剂内由于高压而成为液体,压力降低则迅速汽化操作稍有失误药物即迅速喷出,往往造成较大误差。所以,我们选择了冷冻的方法使抛射剂冷冻后慢慢挥掉,以使药液得以保

留,实现试验的可操作性和提高实验结果的准确性。

3.2 供试品溶液制备方法和提取条件的确定 在本测定方法研究过程中曾尝试采用直接溶解样品的方法,但试验结果显示在阿魏酸的出峰位置有杂质峰干扰,而选择应用液—液萃取法,可去除干扰峰。在萃取过程中也曾经尝试过使用石油醚、乙酸乙酯、氯仿等有机溶剂,经试验最后确定了以氯仿作为萃取剂,其对指标成分阿魏酸和丹皮酚萃取完全,杂质干扰少,阿魏酸和丹皮酚都与杂质实现了基线分离。经反复试验后,确定了“2.1.2”项下所述提取方法。

3.3 检测波长的选择 丹皮酚的最大吸收波长为275 nm,阿魏酸的最大吸收波长为317 nm,考虑到阿魏酸的峰面积较小,为提高对其的检测灵敏度,选择317 nm作为检测波长。

3.4 流动相的选择 试验中分别以不同比例的甲醇—1%醋酸水溶液以及不同比例的甲醇—乙腈—1%醋酸水溶液等作为流动相进行了试验,结果表明,以甲醇—1%醋酸(45:55)作为流动相,各组分的峰形和分离度均很好,且出峰时间合适。

参考文献

- SHU Bing(舒冰), ZHOU Chong-jian(周重建), MA Ying-hui(马迎辉), et al. Research progress on pharmacological activities of the available compositions in Chinese medicinal herb *Ligusticum chuanxiong* (中药川芎中有效成分的药理作用研究进展). *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2006, 22(9): 1043
- XING Guo-sheng(邢国胜), FANG De-min(房德敏), ZHOU Yong-mei(周咏梅), et al. Research progress on pharmacologic action in paeonol and its preparation (丹皮酚的制备及药理作用研究进展). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37(11): 163
- LIQiu-yi(李秋怡), GAN Guo-ping(干国平), WANG Guang-zhong(王光忠), et al. Determination of Ferulic Acid in *Ligusticum chuanxiong* Hort oil by GC (气相色谱法测定川芎油中阿魏酸的含量). *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2007, 18(7): 1687
- MENG Ling-dan(孟令丹), CHEN Xiao-hui(陈晓辉), YAO Yan(姚燕), et al. RP-HPLCs in ultimate determination of contents of paeoniflorin and ferulic acid in Siwu compound preparation (RP-HPLC法同时测定四物合剂中芍药苷和阿魏酸的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2006, 26(10): 1398
- CHEN Wen-fang(陈文芳). HPLC determination of paeonol in compound paeonol cream (HPLC测定丹皮酚软膏(丹皮酚霜)中丹皮酚的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2007, 27(5): 769
- FU Guang-hua(伏光华), SUN Zhao-xiang(孙兆祥). RP-HPLC determination of paeonol in Shanggan oral solution (RP-HPLC测定上感口服液中丹皮酚含量). *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2003, 17(4): 236

(本文于2008年11月12日修改回)