

RP-HPLC法同时测定半夏糖浆中乙酸和琥珀酸的含量^Δ

何 丹^{1*},杨晓梅²,傅 亚³,秦少容⁴,张景勋^{1#}(1.重庆医科大学药物高校工程研究中心/重庆医科大学药学院,重庆 400016;2.重庆市食品药品检验检测研究院,重庆 401121;3.重庆科技学院化学化工学院,重庆 401331;4.太极集团重庆涪陵制药厂有限公司,重庆 408000)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4264-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.28

摘 要 目的:建立同时测定半夏糖浆中乙酸和琥珀酸含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为GL InterSustain-C₁₈,流动相为0.03 mol/L 磷酸二氢铵缓冲液(pH2.0)-甲醇(梯度洗脱),流速为0.8 ml/min,检测波长为210 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:乙酸和琥珀酸检测质量浓度线性范围分别为0.020 98~0.209 8($r=0.999\ 9$)、12.04~120.4 μg/ml($r=0.999\ 9$);定量限分别为0.15、18.24 ng,检测限分别为0.045、5.53 ng;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率分别为97.45%~101.68%(RSD=1.39%, $n=9$)、98.31%~101.08%(RSD=1.01%, $n=9$)。结论:该方法准确、快速,适用于同时测定半夏糖浆中乙酸和琥珀酸的含量。
关键词 反相高效液相色谱法;半夏糖浆;乙酸;琥珀酸

Simultaneous Determination of Acetic Acid and Succinic Acid in Banxia Syrup by RP-HPLC

HE Dan¹, YANG Xiaomei², FU Ya³, QIN Shaorong⁴, ZHANG Jingqing¹(1.Medicine Engineering Research Center of Chongqing Medical University/College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;2.Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China;3.College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University of Science and Technology, Chongqing 401331, China;4.Taiji Chongqing Fuling Pharmaceutical Group Co., Ltd., Chongqing 408000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of acetic acid and succinic acid in Banxia syrup. METHODS: RP-HPLC was performed on the column of GL InterSustain-C₁₈ with mobile phase of 0.03 mol/L ammonium dihydrogen phosphate buffer solution (pH2.0)-methanol (gradient elution) at a flow rate of 0.8 ml/min, the detection wavelength was 210 nm, column temperature was 30 ℃, injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 0.020 98-0.209 8 μg/ml for acetic acid ($r=0.999\ 9$) and 12.04-120.4 μg/ml for succinic acid ($r=0.999\ 9$); limits of quantification were 0.15, 18.24 ng, limits of detection were 0.045, 5.53 ng; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 97.45%-101.68% (RSD=1.39%, $n=9$) and 98.31%-101.08% (RSD=1.01%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is accurate and rapid, and suitable for the simultaneous determination of acetic acid and succinic acid in Banxia syrup.

KEYWORDS RP-HPLC; Banxia syrup; Acetic acid; Succinic acid

Drugs, 2009(40):128.

[4] 阎便杰,李彤晖,刘珍.HPLC法测定精制冠心颗粒中原儿茶醛的含量[J].陕西中医,2005,26(4):376.

[5] 黄海欣.HPLC法测定精制冠心颗粒中丹酚酸B的含量[J].中国药师,2009,12(11):1 665.

[6] 王俊杰,刘弘,于天杰,等.HPLC法同时测定精制冠心颗粒中芍药苷与丹酚酸B含量[J].中国药师,2013,16(8):1 175.

[7] 王新立,张越华.HPLC法测定精制冠心颗粒中芍药苷的含量[J].陕西中医,2007,28(5):601.

[8] 姜晖,张丽英,王绍志,等.HPLC法测定消渴平片中5种成分[J].中草药,2015,46(4):530.

[9] 姜晖,王绍志,张熙洁,等.HPLC法同时测定利脑心胶囊中6种成分的含量[J].中国药房,2015,26(3):374.

[10] 付连浩,张熙洁,王绍志,等.多波长RP-HPLC法同时测定参芍口服液液中5种成分的含量[J].中国药房,2015,26(24):3 423.

[11] 冀兰鑫,黄浩,姜民,等.HPLC测定血必净注射液内11种主要成分[J].中国中药杂志,2010,35(18):2 395.

[12] 马彬峡,陈恒冲,吴春高,等.RP-HPLC法同时测定乐脉颗粒中丹参素、原儿茶醛、芍药苷和阿魏酸的含量[J].药物分析杂志,2009,29(7):1 122.

[13] 陈斌,叶隽,纪峰,等.高效液相色谱法同时测定脑血栓片中丹参素、原儿茶醛、芍药苷、阿魏酸和丹酚酸B的含量[J].药物分析杂志,2007,27(12):1 891.

Δ 基金项目:重庆市教委科学技术研究项目(No.KJ1500225)
* 副教授,硕士。研究方向:药物分析。电话:023-68589782。
E-mail:ildocor@163.com
通信作者:教授,博士生导师。研究方向:药物新剂型。E-mail: zjqrac01@163.com

半夏糖浆是由生半夏、紫苑、麻黄、桔梗等9味中药材组成的复方口服制剂,具有止咳化痰的功效,临床上常用于治疗风寒咳嗽、支气管炎和咳嗽痰多等症^[1]。本品收载于《卫生部药品标准中药成方制剂》第9册,但尚未被2015年版《中国药典》收载。现有标准仅采用理化鉴别对半夏糖浆中的甘草酸和橙皮苷进行鉴别^[1],尚无有效成分含量测定项内容。目前,对半夏糖浆有效成分的报道有采用薄层色谱法进行定性鉴别^[2],有采用高效液相色谱法(HPLC)测定半夏糖浆中甘草酸和橙皮苷的含量^[3-5]或者测定麻黄碱和盐酸麻黄碱的含量^[6-10],也有采用气相色谱法(GC)测定半夏糖浆中薄荷脑含量^[11]的报道。半夏为天南星科植物半夏的干燥块茎,具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结的功效^[12],半夏块茎中主要含有有机酸和多糖类成分^[13-14],其中有机酸有镇咳祛痰的药理作用^[15],为半夏糖浆止咳功效的主要有效成分。目前尚未见对半夏糖浆中有机酸——乙酸和琥珀酸进行含量测定的报道,因此本课题组采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)同时测定半夏糖浆中乙酸和琥珀酸的含量,以期对半夏糖浆的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-20型HPLC仪(日本Shimadzu公司);AG135型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

半夏糖浆(李时珍医药集团有限公司,批号:201404003、201404001、201401002,规格:100 ml/瓶);琥珀酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110896-200001,纯度≥99.0%);乙酸对照品(重庆川东化工有限公司,批号:20130801,纯度≥99.0%);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:GL InterSustain-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.03 mol/L 磷酸二氢铵缓冲液(pH2.0)(A)-甲醇(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:0.8 ml/min;检测波长:210 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间,min	A,%	B,%
0.01	99	1
13	97	3
20	30	70

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密量取乙酸对照品0.1 ml,精密称取琥珀酸对照品60.18 mg,置于同一50 ml量瓶中,加水溶解并定容,得乙酸和琥珀酸的混合对照品贮备液;精密量取上述贮备液2.5 ml,置于25 ml量瓶中,加水溶解并定容,摇匀,得乙酸和琥珀酸质量浓度分别为0.209 8、120.4 μg/ml的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密吸取样品1 ml,置于10 ml量瓶中,加水溶解并定容,经0.45 μm混合纤维树脂膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的制备工艺和处方比例制备缺乙酸和琥珀酸的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性

对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,乙酸和琥珀酸均能达到基线分离,分离度>2,拖尾因子均<2.0;理论板数按乙酸峰计≥3 000,保留时间为8.9 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

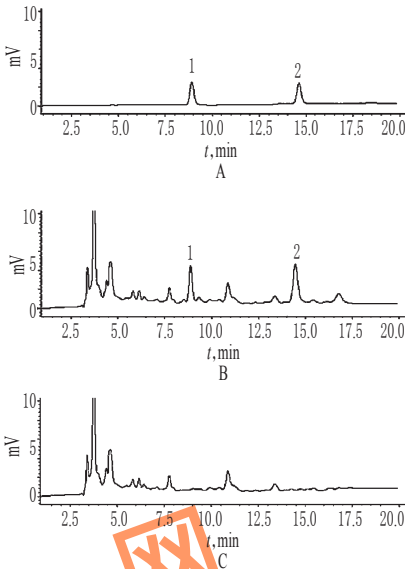


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.乙酸;2.琥珀酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance; B.test sample; C. negative control; 1.acetic acid; 2.succinic acid

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液1、2、4、6、8、10 ml,分别置于10 ml量瓶中,加水溶解并定容,即得系列线性溶液,取上述溶液适量,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(x, μg/ml)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得乙酸的回归方程为y=47 926x-973.96(r=0.999 9)、琥珀酸的回归方程为y=55.466x-478.5(r=0.999 9)。结果表明,乙酸和琥珀酸检测质量浓度线性范围分别为0.020 98~0.209 8、12.04~120.4 μg/ml。

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,等倍逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得乙酸和琥珀酸的定量限分别为0.15、18.24 ng;当信噪比为3:1时,得乙酸和琥珀酸的检测限分别为0.045、5.53 ng。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,乙酸和琥珀酸峰面积的RSD分别为1.29%、0.81%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:201404003)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、10 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,乙酸和琥珀酸峰面积的RSD分别为0.95%、1.31%(n=6),表明供试品溶液在室温下10 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:201404003)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,

记录峰面积。结果,乙酸和琥珀酸峰面积的RSD分别为0.86%、1.22%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已测知含量的样品(批号:201404003)适量,共9份,每份0.5 ml,分别置于10 ml量瓶中,分别加入一定质量的乙酸和琥珀酸对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果($n=9$)
Tab 2 Results of recovery tests($n=9$)

待测成分	取样量, ml	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
乙酸	0.50	2.21	1.77	3.98	99.95	99.13	1.39
	0.50	2.21	1.77	3.97	99.39		
	0.50	2.21	1.77	4.01	101.68		
	0.50	2.21	2.20	4.42	100.27		
	0.50	2.21	2.20	4.39	99.09		
	0.50	2.21	2.20	4.35	97.45		
	0.50	2.21	2.65	4.81	98.01		
	0.50	2.21	2.65	4.79	97.51		
	0.50	2.21	2.65	4.83	98.78		
琥珀酸	0.50	21.86	17.49	39.27	99.53	99.31	1.01
	0.50	21.86	17.49	39.09	98.53		
	0.50	21.86	17.49	39.22	99.28		
	0.50	21.86	21.86	43.81	100.40		
	0.50	21.86	21.86	43.35	98.31		
	0.50	21.86	21.86	43.44	98.71		
	0.50	21.86	26.23	48.37	101.08		
	0.50	21.86	26.23	47.96	99.50		
	0.50	21.86	26.23	47.68	98.43		

2.10 样品含量测定

取3批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算乙酸和琥珀酸的含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 3 Results of contents determination of samples($n=3$)

样品批号	乙酸, $\mu\text{g/ml}$	RSD, %	琥珀酸, mg/ml	RSD, %
201404003	4.42	1.53	43.75	1.67
201404001	4.29		42.88	
201401002	4.38		42.33	

3 讨论

3.1 流动相pH的选择

本课题组考察了流动相pH分别为2.8、2.6、2.4、2.2、2.0时对样品中乙酸和琥珀酸分离情况的影响。结果表明,当流动相pH为2.8时,乙酸和琥珀酸与相邻组分之间的分离度不够理想,峰形较差,影响测定的准确度;当调节流动相的pH为2.0时,乙酸和琥珀酸峰形较好,且与相邻组分能够得到较好的分离。因此,本试验选择流动相的pH为2.0。

3.2 缓冲液种类的选择

本课题组分别选择磷酸二氢铵、磷酸二氢钾作为流动相中的缓冲液,考察不同缓冲液对乙酸和琥珀酸分离度的影响。结果,当选择磷酸二氢钾作为缓冲液时,乙酸和琥珀酸色谱峰均出现拖尾峰,峰形较宽;当选择磷酸二氢铵作为缓冲液时,乙酸和琥珀酸的峰形较好,分离度较好。因此,选择磷酸二氢铵为本试验的缓冲液。

综上所述,本方法准确、快速,适用于同时测定半夏糖浆中乙酸和琥珀酸的含量。

参考文献

[1] 卫生部药典委员会. 卫生部药品标准中药成方制剂: 第9册[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 186-186.

[2] 朱山寅. 半夏糖浆的薄层鉴别研究[J]. 江西中医学院学报, 2002, 14(1): 43.

[3] 张旭君. 半夏糖浆含量测定研究[J]. 现代医院, 2012, 12(2): 69.

[4] 阳文武, 张德伟, 肖琦, 等. 半夏止咳糖浆质量标准研究[J]. 中国民族民间医药, 2013, 10(30): 14.

[5] 肖光清, 黄文平, 黄琴, 等. 半夏止咳糖浆质量标准研究[J]. 江西中医药, 2014, 45(9): 61.

[6] 周锐, 王辉. 半夏糖浆质量标准的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1542.

[7] 钟名诚, 黄海燕, 李永平. 半夏糖浆质量标准研究[J]. 中国药业, 2008, 17(10): 28.

[8] 徐艳丽, 郎秋咏. HPLC法测定半夏止咳糖浆中盐酸麻黄碱的含量[J]. 中成药, 2009, 31(10): 1648.

[9] 陈纪海, 林琳, 阮治纲. HPLC法测定半夏糖浆中麻黄碱的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2010, 15(1): 59.

[10] 付静, 朱月月, 聂诗明. 高效液相色谱法测定半夏糖浆中麻黄碱和伪麻黄碱含量[J]. 中国药业, 2015, 24(22): 114.

[11] 李楠, 杨燕飞. 气相色谱法测定半夏糖浆中薄荷脑含量[J]. 中国药业, 2010, 19(18): 49.

[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 118.

[13] 张之昊, 戴忠, 胡晓茹, 等. 半夏化学成分的分离与鉴定[J]. 中药材, 2013, 36(10): 1620.

[14] 徐剑锟, 张天龙, 易国卿, 等. 半夏化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(6): 429.

[15] 曾颂, 李书渊, 吴志坚, 等. 半夏镇咳祛痰的成分效应关系研究[J]. 中国现代中药, 2013, 15(6): 452.

(收稿日期: 2015-11-01 修回日期: 2016-07-16)

(编辑: 刘 柳)