

灵杞黄斑颗粒中阿魏酸含量测定*

周永其^{1,2}, 胡道德², 刘亮², 陈文娟²

(1. 江苏省太仓市第一人民医院药剂科, 215400; 2. 上海交通大学附属第一人民医院临床药学研究室, 200080)

摘要 目的 建立测定灵杞黄斑颗粒中阿魏酸的反相高效液相色谱法。方法 采用色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)进行梯度洗脱, 梯度洗脱程序为进样 0~3 min, 调节流动相 A : B (10 : 90); 3~20 min, 流动相 A : B (36 : 64); 20~22 min, 流动相 A : B (10 : 90); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 316 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μL。结果 阿魏酸在 0.058~0.579 mg · mL⁻¹ 浓度范围内与峰面积值呈良好的线性关系, 标准曲线的回归方程为: $Y = 4443.6\rho - 10.135$ ($r = 0.9996, n = 6$), 阿魏酸的加样回收率为 97.9%~101.5% ($n = 9$), 3 批样品中阿魏酸的平均含量均不低于 0.210 mg · g⁻¹。结论 该方法简便、快速、准确, 灵敏度高, 专属性强, 可用于灵杞黄斑颗粒中阿魏酸的含量测定。

关键词 灵杞黄斑颗粒; 阿魏酸; 含量测定; 色谱法; 高效液相

中图分类号 R286; R927.1

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2012)02-0224-03

灵杞黄斑颗粒为医院制剂(批准文号:沪药制字 Z05050795), 由当归、肉苁蓉、菟丝子等中药材组方而成, 具有补肾温阳、益气健脾、活血生精、通络明目之功效, 临床主要用于治疗年龄相关性黄斑变性疾病。阿魏酸为当归的主要有效成分之一^[1-2], 不仅能对抗氧自由基, 使超氧自由基、羟自由基和过氧化氢等生成减少, 而且还能与膜磷脂酰醇胺结合, 使膜磷脂不受氧自由基的侵袭, 从而发挥抗脂质过氧化作用^[3]。年龄相关性黄斑变性疾病可能与氧化应激有关^[4]。研究显示, 该颗粒剂可能是通过清除自由基抗氧化和抗凋亡而发挥作用^[5]。因此, 对方剂中阿魏酸进行定量, 对有效控制和提高灵杞黄斑颗粒的质量具有重要意义。笔者在本实验中参考相关文献^[6-7], 采用反相高效液相色谱法, 对制剂中阿魏酸进行含量测定, 拟建立一种简便、快速、准确、灵敏度高、专属性强的含量测定方法, 为灵杞黄斑颗粒剂质量标准提供有价值的参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 型高效液相色谱仪(四元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器、Chemstation 色谱工作站), Mettler Toledo AL-104 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司), 超声波清洗器(必能信超声有限公司), HP-01 真空过滤装置(天津市津腾实验设备有限公司), 5415D 高速离心机(德国

Eppendorf 公司), W2010 数控恒温水浴锅(上海申胜生物技术有限公司)。

1.2 试剂 灵杞黄斑颗粒(委托上海练塘中药厂生产, 批号: 20100901, 20100902, 20100903, 规格: 每袋 15 g), 阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110773-200611), 甲醇(美国天地公司, 色谱纯, 批号: 807902)。其他试剂均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)进行梯度洗脱, 梯度洗脱程序为进样 0~3 min, 调节流动相 A : B (10 : 90); 3~20 min, 流动相 A : B (36 : 64); 20~22 min, 流动相 A : B (10 : 90); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 316 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μL。理论板数按阿魏酸计算不低于 20 000。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取真空干燥至恒重的阿魏酸对照品适量, 加甲醇溶解, 制成 5.794 mg · mL⁻¹ 对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备 取本品 2 袋, 研成细粉, 精密称定 15 g, 置具塞锥形瓶, 精密加入 80% 甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 用 80% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 30 mL, 置烧瓶, 挥去溶剂, 精密加入纯化水 20 mL 溶解, 置分液漏斗, 用乙醚 50 mL 分 3 次提取(每次分别加 20, 20, 10 mL), 合并乙醚提取液, 置烧瓶中蒸干, 残渣用甲醇溶解, 移至 10 mL 量瓶, 并稀释至刻度, 摇匀, 用孔径 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 阴性对照溶液的制备 按处方比例及制法制备缺当归药材的阴性对照品, 按“2.3”项方法制得阴性

收稿日期 2011-08-18 修回日期 2011-09-20

基金项目 * 上海中医药科研基金项目(2006Y004A)

作者简介 周永其(1965-), 男, 江苏太仓人, 主管药师, 学士, 主要从事临床药理和医院药学工作。电话: 0512-53658106, E-mail: tcyyyjk@sina.com。

通讯作者 胡道德, 电话: 021-63240090-4801, E-mail: shanghaiyao@sina.com。

对照溶液。

2.5 方法专属性考察 在本实验色谱条件下,分别吸取阴性对照溶液、对照品溶液和供试品溶液各 10 μL ,注入高效液相色谱仪,测定。结果对照品、供试品溶液色谱中阿魏酸峰均达到基线分离,阴性对照溶液色谱中无相应吸收峰,表明处方中其他成分对测定阿魏酸无干扰。

2.6 线性关系考察 精密吸取阿魏酸对照品储备液,用甲醇分别制成 0.058,0.116,0.232,0.348,0.464,0.579 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液,按上述色谱条件各进样 10 μL ,测定峰面积。以阿魏酸质量浓度(ρ , $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,得阿魏酸标准曲线的回归方程: $Y=4443.6\rho-10.135$ ($r=0.9996$, $n=6$)。表明阿魏酸在 0.058~0.579 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积值呈良好的线性关系。

2.7 检出限 按上述色谱条件测定,得阿魏酸的检出限浓度为 1.53 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N=3$),定量限浓度为 4.67 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N=10$)。

2.8 精密度实验 精密吸取同一阿魏酸对照品溶液,连续进样 5 次,每次进样 10 μL 。记录阿魏酸色谱峰面积值,RSD 为 0.27% ($n=5$),表明精密度良好。

2.9 稳定性实验 精密吸取同一供试品溶液,分别于 0,2,4,8,12,24 h 进样 10 μL ,记录色谱峰面积值,RSD 为 1.08% ($n=6$),结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.10 重复性实验 取同一批样品(批号:20100901)5 份,按供试品溶液制备方法平行制备样品溶液,进样,记录色谱峰面积值,代入线性回归方程得样品中阿魏酸的平均含量为 0.212 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 为 1.76% ($n=5$),实验结果表明,该方法重复性较好。

2.11 加样回收率实验 精密称取 9 份已知含量的样品(批号:20100901)各 15 g,分别精密加入一定量的阿魏酸对照品,按供试品溶液制备方法分别制得高、中、低浓度供试品溶液,进样,记录色谱峰面积值。代入线性回归方程,外标法定量,得阿魏酸加样回收率为 97.9%~101.5%,结果见表 1。

2.12 样品含量测定 取灵杞黄斑颗粒样品 3 批(批号:20100901,20100902,20100903),每批平行测定 3 份,按供试品溶液制备方法制备样品溶液,进样 10 μL ,记录色谱峰面积值,代入线性回归方程,测得 3 批样品中阿魏酸平均含量分别为 0.210,0.216,0.211 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

3 讨论

灵杞黄斑颗粒由多味中药材组成,成分多,相互干

扰较大,笔者分别比较了甲醇、甲醇水溶液和水等不同溶剂直接超声提取样品,发现杂质峰较多,经过多次实验发现经 80% 甲醇溶液超声处理 30 min 后,用乙醚进一步萃取样品中阿魏酸提取效果最佳。

表 1 阿魏酸加样回收率实验结果

编号	原有量	加入量	测得量	回收率/%
1	0.078	0.068	0.147	101.5
2	0.078	0.073	0.150	98.6
3	0.078	0.081	0.158	98.8
4	0.156	0.148	0.303	99.3
5	0.156	0.151	0.308	100.7
6	0.156	0.158	0.315	100.6
7	0.236	0.229	0.464	99.6
8	0.236	0.233	0.466	98.7
9	0.236	0.242	0.473	97.9

在流动相的选择中,由于阿魏酸是弱酸,用弱酸性流动相可抑制其电离,使色谱峰峰形稳定,分离度好。笔者分别考察了甲醇-磷酸溶液、乙腈-磷酸溶液等各种比例的流动相,发现甲醇-0.1% 磷酸水溶液(20:80)洗脱时,阿魏酸能与其他组分较好分离,但阿魏酸的出峰时间很长,且样品溶液中水溶性杂质出峰时间冗长。为了缩短阿魏酸的出峰时间和避免水溶性杂质峰的干扰,本实验采用高效液相梯度洗脱程序对阿魏酸进行定量,通过选择在进样前 3 min,保持甲醇在流动相中的比例为 10%,达到促使水溶性杂质较快出峰的目的。

本研究参考相关文献^[6-7],采用甲醇-0.1% 磷酸水溶液二元梯度洗脱程序对样品中有效成分进行分离、定量,并对洗脱条件进行了优化,获得了满意的结果。同文献^[8-9]比较,缩短了分析周期,提高了分离效果,改善了峰形拖尾,增加了检测器灵敏度,同时还减少了程序进样时基线波动。样品含量测定结果表明,3 批样品中阿魏酸的含量差异不大。

该测定方法专属性强,精密度和准确度高,稳定可靠,可用于灵杞黄斑颗粒中阿魏酸的含量测定,为建立灵杞黄斑颗粒质量标准的提供了参考。

参考文献

- [1] 刘雪东,李伟东,蔡宝昌. 当归化学成分及对心脑血管系统作用研究进展[J]. 南京中医药大学学报,2010,26(2):155-157.
- [2] 夏明,董晓焯. 当归养血丸中阿魏酸的含量测定[J]. 医药导报,2010,29(1):103-104.
- [3] 宋敏,黎七雄. 当归提取物对急性心肌梗死大鼠保护作用[J]. 医药导报,2009,28(10):1251-1253.

[4] MANDAL M N, PATLOLLA J M, ZHENG L, et al. Curcumin protects retinal cells from light and oxidant stress-induced cell death [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46 (5): 672-679.

[5] 宫媛媛, 宋毅, 张红梅, 等. 中药黄斑颗粒灌胃对大鼠视网膜光损伤细胞凋亡的影响 [J]. *国际眼科杂志*, 2009, 9 (5): 856-858.

[6] 孔铭, 朱玲英, 王佩娟, 等. HPLC 测定补肾活血颗粒中芍药苷、阿魏酸、淫羊藿苷的含量 [J]. *中成药*, 2010, 32 (4): 600-603.

[7] 周军, 孙艳, 张晶, 等. HPLC 法测定十全大补糖浆中芍药苷、阿魏酸、肉桂酸及甘草酸的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2009, 29 (9): 1501-1503.

[8] 康博欣, 王冬梅, 王强, 等. RP-HPLC 法同时测定心宁片中芍药苷、阿魏酸和芦丁的含量 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2008, 25 (8): 656-659.

[9] 叶会呈, 叶其馨, 王带媚, 等. HPLC 法测定血府逐瘀汤中阿魏酸的含量 [J]. *中药新药与临床药理*, 2009, 20 (4): 356-358.

DOI 10.3870/yydb.2012.02.036

不同产地山楂无机元素质量差异分析

张锦, 包永睿, 孟宪生

(辽宁中医药大学药学院, 大连 116600)

摘要 目的 研究多产地山楂中微量元素的含量及分布特征。方法 利用电感耦合等离子体质谱法对 12 个产地山楂中微量元素及重金属元素的含量进行测定, 并对山楂中微量元素含量的测定结果进行主成分分析和聚类分析。结果 山楂中铁、锌、铝、锰元素含量较高, 有害元素砷、铬、铜、镉、铅的含量均符合《中华人民共和国药典》2010 年版规定。结论 不同产地山楂中微量元素含量有较大相似度, 质量差异不大, 河北省山楂质量最佳。

关键词 山楂; 微量元素; 质谱; 等离子体, 电感耦合; 主成分分析; 聚类分析

中图分类号 R286; R927.1 文献标识码 A 文章编号 1004-0781(2012)02-0226-04

山楂为蔷薇科植物山里红 (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. major.) 或山楂 (*Crataegus pinnatifida* Bge.) 的干燥成熟果实^[1], 是一种老少皆宜的食品。以山楂为原料, 可以制作山楂饼、山楂糕、山楂片等, 我国民间还有饮用山楂茶的习惯和爱好。同时, 山楂还作为药材使用。目前对山楂的研究主要侧重于化学成分^[2-3]和药理作用^[4-5], 对多产地山楂中微量元素含量的研究较少。为此, 笔者在本实验采用电感耦合等离子体质谱法, 对 12 个产地山楂中微量元素的含量进行测定, 并对测定结果进行主成分分析和聚类分析^[6-8]。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 美国 Agilent 7500 型电感耦合等离子体质谱仪 (Agilent 7500, Agilent U. S. A), 温压双控微波消解仪 (上海新仪微波化学科技有限公司, MDS-6 型), 电子分析天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司, 京制 00000249 号), Milli-Q 超纯水处理装置 (美国

Millipore 公司, YQ-A3-SS-001)。
1.2 试剂 浓硝酸 (HNO₃, 优级纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司), 环境混标液 锌 (Zn)、锰 (Mn)、铬 (Cr)、砷 (As)、镍 (Ni)、铜 (Cu)、硒 (Se) (5183-4688, Agilent U. S. A); 钾 (K)、钙 (Ca)、钠 (Na)、镁 (Mg)、铁 (Fe) (5183-4688, Agilent U. S. A), 根据测试需要稀释后使用; 调谐液 锂 (Li)、钇 (Y)、铈 (Ce)、钛 (Ti)、钴 (Co) (5185-3566, Agilent U. S. A); 内标液 钪 (Sc)、锗 (Ge)、Y、铟 (In)、铽 (Tb)、铋 (Bi) (5183-4680, Agilent U. S. A); 高纯氩气 (氩体积分数 > 99.99%) ; 各产地山楂药材来自市售。

2 方法与结果

2.1 电感耦合等离子体质谱主要工作参数 以 Li、Sc、Ge、Y、In、Tb、Bi 为内标, 调谐仪器, 对仪器的工作参数进行优化, 各元素均采用全定量模式进行测定。

RF 功率: 1 300 W; 采样锥孔径: 1.0 mm/0.4 mm; 等离子体流速: 15.0 L · min⁻¹; 雾室温度: 2 ℃; 载气流速: 1.13 L · min⁻¹; 分析时间/质量: 0.3; 采样深度: 8.2 mm; 重复次数: 3。

2.2 标准溶液的配制 吸取适量混合标准溶液, 用 5% HNO₃ 溶液逐级稀释, 配制成适合浓度的标准溶液, 在优化的实验条件下, 采集空白及标准溶液系列, 仪器

收稿日期 2011-06-09 修回日期 2011-07-08

作者简介 张锦 (1986-), 女, 辽宁锦州人, 在读硕士, 研究方向: 生药学、药物分析。E-mail: dragonfossil@163.com。

通讯作者 孟宪生 (1964-), 男, 教授, 博士, 主要研究方向: 中药组分配伍、代谢组学及药品质量分析。电话: 0411-87406496, E-mail: mxsvvv@126.com。