

复方当归微乳中桂皮醛和藁本内酯的含量测定*

孙阳阳^{1,2}, 李军昌³, 杨雪亮⁴, 李潇¹, 郭赟浩¹, 张蒙¹, 盖守昌¹, 梁佳龙¹

(1. 第四军医大学药学院药物化学与药物分析教研室, 西安 710032; 2. 解放军第一医院药剂科, 兰州 730030; 3. 第四军医大学西京医院中医科, 西安 710032; 4. 西安交通大学预防医学系, 710061)

摘要 目的 建立高效液相色谱(HPLC)法测定复方当归微乳中主成分藁本内酯和桂皮醛的含量,为其质量标准的建立提供依据。方法 色谱柱为 Inertsil ODS-3 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(55:45),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长:285 nm,柱温 30 ℃。结果 桂皮醛在 0.484 5~38.750 0 μg·mL⁻¹浓度范围内呈良好的线性关系,回归方程为 $Y=27.060X-1.586$ ($r=0.999\ 8$),加样回收率为 99.60%,日内和日间精密度 RSD 低于 1.25%;藁本内酯在 0.531 0~106.100 0 μg·mL⁻¹范围内线性关系良好,回归方程为 $Y=13.930X+1.344$ ($r=0.999\ 8$),加样回收率为 98.92%,日内和日间精密度 RSD 低于 1.25%。结论 建立的 HPLC 法专属性强、灵敏度高,可用于复方当归微乳的质量控制。

关键词 藁本内酯;桂皮醛;当归微乳,复方;色谱法,高效液相

中图分类号 R927.2 文献标识码 A 文章编号 1004-0781(2012)04-0480-03

Determination of Ligustilide and Cinnamylaldehyde in Compound Microemulsion of *Radix Angelicae Sinensis* (Danggui)

SUN Yang-yang^{1,2}, LI Jun-chang³, YANG Xue-liang⁴, LI Xiao¹, GUO Yun-hao¹, ZHANG Meng¹, GE Shou-chang¹, LIANG Jia-long¹ (1. Department of Medicinal Chemistry and Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Department of Pharmacy, No. 1 Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730030, China; 3. Department of Chinese Medicine, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 4. School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

ABSTRACT Objective To establish a method to determine content of ligustilide and cinnamylaldehyde in compound microemulsion of *Radix Angelicae Sinensis* (Danggui) (CMR). **Methods** High performance liquid chromatograph was used for detection. The column of Inertsil ODS-3 (4.6 mm×150 mm, 5 μm) was used and the detection wavelength was 286 nm. The mobile phase was Acetonitrile-water (55:45) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and the temperature of column was set at 30 ℃.

Results The calibration curve of Cinnamaldehyde was linear in the range of 0.484 5~38.75 μg·mL⁻¹. The regression equation was $Y=27.06X-1.586$ ($r=0.999\ 8$). The recovery rate was 99.60%. The intra-day and inter-day precision was good with the RSD of 1.251% or below. The calibration curve of ligustilide was liner in the range of 0.531 0~106.1 μg·mL⁻¹. The regression equation was $Y=13.93X+1.344$ ($r=0.999\ 8$). The recovery rate was 98.94%. The intra-day and inter-day precision was good with the RSD of 1.25% or below. **Conclusion** This method is convenient, rapid and accurate. It can be used for quality control of CRM.

KEY WORDS Ligustilide; Cinnamylaldehyde; Compound microemulsion of *Radix Angelicae Sinensis* (Danggui); HPLC

软组织损伤是临床常见病、多发病,现代医学主要采用包扎、局部封闭、理疗等治疗方法,但疗效欠佳,康复时间较长。中药治疗软组织损伤日益显示其优越性^[1],临床实践中运用活血养血、温经镇痛组方的中药通过离子导入法治疗各类软组织损伤,临床疗效显

著,但其应用受设备限制,患者顺应性差。为了提高疗效,便于患者使用,将以当归、肉桂等为主药的复方经过提取有效部位后制备成微乳,以期进一步制成喷雾剂。微乳作为透皮给药制剂的载体具有提高药物透皮速率^[2-3],是增加中药难溶性成分溶解度的有效途径^[4],而且可以增加药物的稳定性^[5],对皮肤刺激性小^[6]等优点。笔者采用高效液相色谱(HPLC)法对复方当归微乳[compound microemulsion of *Radix Angelicae Sinensis* (Danggui), CMR]中的主要活性成分桂皮醛和藁本内酯同时进行测定,为复方当归微乳的制备工艺优化和质量控制提供依据。

收稿日期 2011-08-29 修回日期 2011-11-15

基金项目 * 西京医院学科助推计划项目(XJZT100D3)

作者简介 孙阳阳(1988-),男,陕西扶风人,学士,从事医院药学工作。电话:(0)15117201323, E-mail:499573411@qq.com。

通讯作者 李军昌(1969-),男,陕西乾县人,副教授,副主任医师,博士,研究方向:方剂配伍。电话:029-84775351, E-mail:lijunch@fmmu.edu.cn。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1100 液相色谱仪 (Agilent 1100 泵, Agilent1100 DAD 检测器, Agilent 1100 色谱工作站); BP211D 电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); 数控超声波清洗器 (江苏昆山超声仪器有限公司)。

1.2 试药 藁本内酯对照品 (天津马克生物技术有限公司, 含量: 98%, 批号: 201102281); 桂皮醛对照品 (中国食品药品检定研究院, 含量: 98.8%, 批号: 110710-200915); 复方当归微乳 (第四军医大学药学院药物化学教研室提供, 批号: 20110122, 20110228, 20110407); 甲醇 (色谱纯, 江苏汉邦科技有限公司), 色谱用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 桂皮醛对照品溶液的制备 精密称量桂皮醛对照品 15.50 mg 置 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成对照品储备液, 低温避光保存备用。

2.1.2 藁本内酯对照品溶液的制备 精密称量藁本内酯对照品 21.22 mg 置 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成对照品储备液, 低温避光保存备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称量复方当归微乳 100 mg, 加甲醇 20 mL, 超声 10 min 破乳, 转移至 50 mL 量瓶中, 甲醇定容, 备用。

2.2 色谱条件 色谱柱: Inertsil ODS-3 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); C₁₈ 保护柱 (10 mm × 4.6 mm, 江苏汉邦科技有限公司); 流动相: 乙腈 - 水 (55 : 45); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 285 nm, 进样量: 20 μL; 柱温: 30 °C。

2.3 色谱专属性 分别取适当浓度的藁本内酯对照品、桂皮醛对照品、复方当归微乳样品溶液, 于上述色谱条件下分别进样, 记录色谱图。结果表明藁本内酯与桂皮醛色谱峰基线分离完全, 桂皮醛保留时间为 4.5 min, 藁本内酯的保留时间为 11.9 min, 微乳中其他成分不干扰藁本内酯和桂皮醛的测定。

2.4 标准曲线的绘制 分别量取藁本内酯和桂皮醛对照品贮备液, 用甲醇逐步稀释成系列浓度的溶液, 桂皮醛的浓度分别为 0.484 5, 2.430 0, 4.845 0, 9.690 0, 19.380 0, 38.750 0 μg · mL⁻¹, 藁本内酯的浓度分别为 0.531 0, 5.310 0, 10.610 0, 21.220 0, 35.370 0, 70.730 0, 106.100 0 μg · mL⁻¹。各取对照品溶液 20 μL, 进样, 测定峰面积。以峰面积 (Y) 对进样浓度 (X) 进行线性回归。桂皮醛在

0.484 5 ~ 38.750 0 μg · mL⁻¹ 浓度范围内呈良好的线性关系, 回归方程为 $Y = 27.060X - 1.586$ ($r = 0.9998$); 藁本内酯在 0.531 0 ~ 106.100 0 μg · mL⁻¹ 范围内呈良好线性关系良好, 回归方程为 $Y = 13.930X + 1.344$ ($r = 0.9999$)。

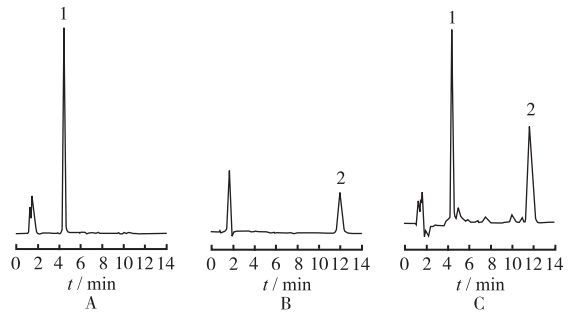


图 1 桂皮醛对照品 (A)、藁本内酯对照品 (B)、复方当归微乳 (C) HPLC 色谱图

1. 桂皮醛; 2. 藁本内酯

Fig. 1 The HPLC chromatogram of cinnamylaldehyde standard (A), ligustilide standard (B) and CMR (C)

1. cinnamylaldehyde; 2. ligustilide

2.5 精密度实验 取低、中、高 3 个浓度的桂皮醛对照品溶液 (0.484 5, 9.690 0, 38.750 0 μg · mL⁻¹), 藁本内酯对照品溶液 (0.531 0, 21.220 0, 106.100 0 μg · mL⁻¹), 同 1 天连续进样 3 次, 记录峰面积, 计算桂皮醛的日内相对标准误差 (RSD)。连续 3 d 进样 3 次, 记录峰面积, 计算桂皮醛的日间 RSD。结果见表 1。

表 1 桂皮醛和藁本内酯测定方法精密度

Tab. 1 The precision of cinnamylaldehyde and ligustilide

对照品/ (μg · mL ⁻¹)	RSD/%	
	日内	日间
桂皮醛		
0.484 5	1.13	1.25
9.690 0	1.05	1.01
38.750 0	0.36	0.92
藁本内酯		
0.531 0	1.14	1.21
21.220 0	0.50	0.90
106.100 0	0.52	0.87

2.6 稳定性实验 取复方当归微乳溶液, 在配制后 1, 4, 6, 8, 12 h 进样分析, 测定桂皮醛峰面积的 RSD = 0.95%, 藁本内酯峰面积的 RSD = 1.03%, 表明桂皮醛和藁本内酯在该色谱条件下 12 h 内比较稳定。

2.7 加样回收率实验 取桂皮醛和藁本内酯含量已知的复方当归微乳溶液(桂皮醛含量为 $38.48 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 藁本内酯含量为 $78.18 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,) 1.0 mL 平行 9 份, 分成 3 组, 每组 3 份, 分别加入 $19.3800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 桂皮醛对照品溶液 0.1, 1.0, 2.0 mL, 分别加入 $21.2200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 藁本内酯对照品溶液 0.1, 1.0, 2.0 mL。甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 色谱条件下分析, 记录色谱图, 计算桂皮醛和藁本内酯的加样回收率。低、中、高 3 种浓度的加样回收率及 RSD。桂皮醛平均回收率 99.60%, RSD = 1.05%; 藁本内酯平均回收率 98.92%, RSD = 1.19%。结果见表 2, 3。

表 2 桂皮醛的加样回收率

Tab. 2 The recoveries of cinnamylaldehyde

样品含量	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
38.48	1.938	40.42	100.10		
38.48	1.938	40.40	99.07	99.93	0.79
38.48	1.9380	40.43	100.62		
38.48	19.380	57.80	99.69		
38.48	19.380	57.71	99.23	98.81	1.16
38.48	19.380	57.38	97.52		
38.48	38.760	77.21	99.92		
38.48	38.760	76.89	99.10	100.06	1.04
38.48	38.760	77.69	101.16		

表 3 藁本内酯的加样回收率

Tab. 3 The recovery of ligustilide

样品含量	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
78.18	2.122	80.27	98.49		
78.18	2.122	80.31	100.38	99.59	0.99
78.18	2.122	80.30	99.91		
78.18	21.220	99.21	99.10		
78.18	21.220	98.73	96.84	97.85	1.18
78.18	21.220	98.89	97.60		
78.18	42.440	120.10	98.77		
78.18	42.440	120.70	100.19	99.32	0.77
78.18	42.440	120.20	99.01		

2.8 复方当归微乳中藁本内酯和桂皮醛的含量测定

分别称取不同批次的复方当归微乳 500 mg, 加甲醇 20 mL, 超声 10 min 破乳, 甲醇定容至 25 mL 量瓶中, 精密吸取 2.0 mL, 用甲醇稀释至 10 mL, $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 色谱条件下进样分析, 依据工作曲线计算桂皮醛和藁本内酯含量。结果见表 4。

表 4 复方当归微乳中桂皮醛和藁本内酯含量测定结果 (n=3)

Tab. 4 The result of contents of cinnamylaldehyde and ligustilide in CMR

批号	含量/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)		RSD/%	
	桂皮醛	藁本内酯	桂皮醛	藁本内酯
20110122	7.696	15.630		
20110228	7.728	15.320	1.247	1.399
20110407	7.549	15.740		

3 讨论

桂皮醛和藁本内酯分别是肉桂和当归脂溶性部位的主要成分, 两者在微乳制剂中性质稳定, 可以较准确地反映复方当归微乳的内在质量, 因此笔者选择桂皮醛和藁本内酯为含量测定指标成分。

当归、肉桂等中药治疗软组织损伤的有效部位主要是脂溶性部位, 以聚氧乙烯氢化蓖麻油为表面活性剂制备成 O/W 微乳后, 脂溶性部位包封于微乳的油相, 所以制备样品溶液时, 应选择适当的试剂进行破乳, 以便于准确的含量测定。根据辅料和有效部位的性质, 实验过程中考察了破乳剂和超声时间, 最终确定以甲醇为破乳剂, 超声 10 min。

复方当归微乳是将当归、肉桂等中药的脂溶性部位制备成的 O/W 型乳剂, 成分比较复杂, 在 285 nm 波长处, 主要成分桂皮醛和藁本内酯与制剂中内源性物质分离良好, 微乳辅料、溶剂甲醇及其他药物成分均不影响测定, 结果表明本研究建立的方法可用于复方当归微乳的质量控制。

参考文献

[1] 张志强, 秘淑坤, 潘丽娟, 等. 伤科散治疗急性闭合性软组织损伤 50 例[J]. 医药导报, 2008, 27 (6): 655-658.

[2] 张婷婷, 杨蒙蒙, 刘梅, 等. 微乳在中药制剂中的应用[J]. 医药导报, 2010, 29 (12): 1617-1619.

[3] 石宗丰, 王利胜. 微乳在中药制剂中的应用研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(5): 414-416.

[4] 王新春, 侯世祥, 阳长明, 等. 大黄复方液体喷雾剂中挥发油微乳与相图的应用[J]. 中成药, 2004, 26 (3): 178-181.

[5] 张柯萍, 蔺胜照, 陈国广, 等. 鸦胆子油微乳的制备及稳定性研究[J]. 华西药学杂志, 2005, 20(3): 199-201.

[6] 王刚, 傅经国, 王玉东, 等. O/W 型微乳的制备及其对皮肤刺激性的检测[J]. 日用化学工业, 2006, 36 (5): 287-290.