

高效毛细管电泳法测定妇安口服液中阿魏酸的含量

李亦蕾, 郑萍, 晏媛, 杨芳 (南方医科大学南方医院药学部, 广东 广州 510515)

摘要: 目的 建立妇安口服液的质量标准。方法 高效毛细管电泳法对方中主要药材蒲公英中的阿魏酸进行含量测定, 并采用薄层色谱鉴别法鉴别蒲公英和柴胡。高效毛细管电泳条件: 石英毛细管柱 (70 $\mu\text{m} \times 60 \text{ cm}$), 运行缓冲液为 20 mmol/L 硼砂溶液 (pH=9.18), 分离电压 12 kV, 真空进样时间 5 s, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 紫外检测波长 313 nm。结果 薄层色谱法结果可见清晰的斑点, 重复性好, 阴性样品无干扰。高效毛细管电泳结果显示: 阿魏酸在 8~40 $\mu\text{g/ml}$ 范围内呈良好线性关系, $Y=360.5X-207.4$ ($r=0.9997, n=5$)。平均回收率均大于 98%; RSD 均小于 3% ($n=3$)。结论 本方法简便可靠, 专属性、重现性好, 为妇安口服液质量控制提供了可靠的指标。

关键词: 妇安口服液; 阿魏酸; 高效毛细管电泳法; 薄层色谱法

中图分类号: R927 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2009)03-0551-03

Determination of ferulic acid in Fuan oral liquid by high-performance capillary electrophoresis

LI Yi-lei, ZHENG Ping, YAN Yuan, YANG Fang

Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515 China

Abstract: **Objective** To establish a quality control method of Fuan oral liquid. **Methods** High-performance capillary electrophoresis (HPCE) was used to determine the content of ferulic acid in *Herba taraxaci*, and thin-layer chromatography (TLC) was performed to identify *Herba taraxaci* and *Bupleurum chinense*. The condition of HPCE was optimized with a fused silica capillary tube (70 $\mu\text{m} \times 60 \text{ cm}$) and 20 mmol/L sodium tetraborate buffer (pH9.18) at a constant voltage of 12 kV and temperature at 25 $^{\circ}\text{C}$, with the detection wavelength at 313 nm. **Results** Clear spots were displayed on TLC. The calibration curve was linear in the range of 8-40 $\mu\text{g/ml}$ for ferulic acid ($Y=360.5X-207.4, r=0.9997, n=5$). The average recovery rate exceeded 95% with a RSD<3% ($n=3$). **Conclusion** This method is simple and specific with a good reproducibility for quality control of Fuan oral liquid.

Key words: Fuan oral liquid; ferulic acid; high-performance capillary electrophoresis; thin-layer chromatography

妇安口服液是由南方医院自行开发研制的中药口服液制剂(粤药制 Z07022806), 由蒲公英、柴胡、益母草、当归等主要中药材组成, 临床上具有清热解毒、活血化瘀、抑菌消毒、调经止痛的功效, 主治慢性盆腔炎、异位妊娠、月经不调、闭经、痛经等妇科疾病。由于该方药味多, 成分复杂, 鉴别难度较大, 为了更好地控制药品质量, 保证用药的安全和有效, 我们对处方中的主要药味蒲公英和柴胡进行了薄层色谱鉴别, 并利用硼砂作为缓冲液, 对主要成分蒲公英中的阿魏酸进行了毛细管电泳迁移行为的研究, 考察了酸度、缓冲溶液的浓度、十二烷基硫酸钠(SDS)的浓度、电压等多方面的因素对其含量测定的影响^[1-2], 建立了妇安口服液中阿魏酸含量测定的新方法。本方法操作简便、快捷、结果准确, 可用于对妇安口服液的质量控制。

1 仪器和试剂

Waters 公司高效毛细管电泳仪, Millennium 32

收稿日期: 2008-12-09

作者简介: 李亦蕾 (1975-), 女, 博士, 副主任药师, 研究方向: 免疫药理学, 电话: 020-62787215, E-mail: lei@fimmu.com

色谱工作站, 石英毛细管柱 (75 $\mu\text{m} \times 60 \text{ cm}$, 有效长度 53 cm, Waters 公司), UV-1 三用紫外分析仪 (上海顾村光电仪器厂); 瑞士卡玛薄层色谱扫描仪及数码成像系统; 蒲公英对照药材 (中国药品生物制品检定所, 批号: 121195-200602); 阿魏酸对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 110773-200611); 柴胡对照药材 (中国药品生物制品检定所, 批号: 120992-200605); 妇安口服液 (10 ml/支, 南方医院药学部, 批号: 051009; 051113; 051226); 硅胶 G 预制薄层板 (青岛海洋化工分厂)。硼砂、氢氧化钠、甲醇、乙酸乙酯均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 阿魏酸的鉴别 取本品 20 ml, 过滤, 滤液用乙酸乙酯振摇提取 2 次, 每次 10 ml, 合并乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣加 1 ml 甲醇溶解作为供试品溶液。取蒲公英对照药材粉末 1 g, 加甲醇 20 ml, 加热回流 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 10 ml 使溶解, 滤过, 滤液用醋酸乙酯振摇提取 2 次, 每次 10 ml, 合并醋

酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇 1 ml 使溶解,作为对照药材溶液。取阿魏酸对照品 2 mg,加甲醇 5 ml 使溶解,作为对照品溶液。取上述 3 种溶液各 10 μ l,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸丁酯-甲酸-水(7:2.5:2.5)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,分别在对照药材及对照品色谱相应位置上,显相同颜色的斑点(图 1A)。

2.1.2 柴胡的鉴别 取本品 10 ml,置分液漏斗中,用乙酸乙酯振摇提取 2 次,每次 25 ml,合并乙酸乙酯液,蒸干,残渣加 1 ml 甲醇溶解作为供试品溶液。另取柴胡对照药材粉末 0.5 g,加甲醇 20 ml,超声处理 10 min,滤过,滤液浓缩至约 5 ml,作为对照药材溶液。同薄层色谱法试验,吸取上述两种溶液各 5 μ l,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-乙醇-水(8:2:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 2%对二甲氨基苯甲醛的 40%硫酸溶液,在 60 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰,置日光及紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色斑点(图 1B)。

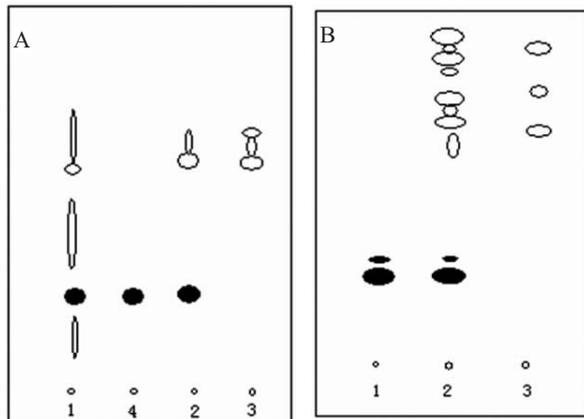


图 1 蒲公英(A)和柴胡(B)的薄层色谱图

Fig.1 TLC chromatograms of Taraxacum (A) and Bupleurum chinense (B)

1: Control; 2: Sample; 3: Negative sample; 4: Ferulic acid standard sample

2.2 高效毛细管电泳法含量测定

2.2.1 缓冲液的配制 精密称取四苯硼钠 1.907 g 溶于 250 ml 超纯水,配制成 20 mmol/L 的硼砂缓冲液,25 $^{\circ}$ C 时用 0.1 mol/L 盐酸调 pH 至 9.18。

2.2.2 对照品溶液的配制 阿魏酸对照品溶液:精密称取阿魏酸对照品 2 mg 于 25 ml 量瓶中,用甲醇溶解并定容至 25 ml,然后精密量取 1、2、3、4、5 ml 分别置 10 ml 量瓶中,得 8、16、24、32、40 μ g/ml 对照品溶液,用 0.45 μ m 的脂溶性滤膜过滤,滤液至样品小瓶

中备用。

2.2.3 HPCE 操作电泳条件 毛细管柱用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液冲洗 2 min,用超纯水冲洗 2 min,最后用电泳缓冲液冲洗 3 min 后再上样品。所有溶液均需要用 0.45 μ m 纤维树脂膜过滤。分离电压为 12 kV,极性为正极到负极;进样量为 50 kPa/s;真空进样时间为 5 s;紫外检测波长 313 nm。

2.2.4 供试品溶液的制备 精密量取妇安口服液 20 ml 置分液漏斗中,用氯仿萃取 3 次,每次 20 ml,弃去氯仿液,再用乙酸乙酯萃取 3 次,每次 20 ml,合并乙酸乙酯液,挥干乙酸乙酯,残渣用甲醇溶解并定容至 10 ml,用 0.45 μ m 滤膜过滤至样品小瓶中备用。

2.2.5 线性关系考察 分别精密吸取浓度为 8、16、24、32、40 μ g/ml 阿魏酸,按上述分离条件分别进样,以对照品浓度(μ g/ml)为横坐标 X、峰面积为纵坐标 Y 作图,以 X 对 Y 进行直线回归。阿魏酸的回归方程是: $Y=360.5X-207.4$ ($r=0.9997, n=5$),阿魏酸在 8~40 μ g/ml 浓度范围内线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 精密吸取 40 μ g/ml 阿魏酸对照品溶液,在上述分离条件下重复进样 6 次,分别计算阿魏酸的峰面积, RSD 为 2.2%,仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 将阿魏酸对照品溶液在相同色谱条件下,分别于 0、4、8、12、16、24 h,测得阿魏酸的含量, RSD=1.20%,表明阿魏酸在 24 h 内测定结果稳定。

2.2.8 重复性试验 精密吸取批号为 051226 的供试品溶液,平行测定 5 次,求得阿魏酸的平均含量, RSD 为 2.3%,表明用此方法处理样品重复性较好。

2.2.9 加样回收率试验 取已知阿魏酸含量的妇安口服液样品,分别加入阿魏酸对照品 8、16、24 μ g/ml,按照供试品制备方法得所需溶液,测定其回收率 ($n=3$)。阿魏酸的回收率为 98.78%、96.82%、96.62%, RSD 分别为 1.62%、2.76%、2.78%。

2.2.10 样品的测定 分别取供试品溶液和对照品溶液进行测定并记录色谱图。以外表法按峰面积计算出 3 批供试品(批号:051009;051113;051226)的阿魏酸含量分别为 78.00、79.89、76.94 μ g/ml, RSD 分别为 1.20%、1.82%、1.51%。

3 讨论

在实验过程中先后在磷酸盐、硼酸盐、Tris 等缓冲溶液体系中进行电泳分离,发现硼酸盐缓冲体系的分离和重现性都较其他体系好,因而确定选用硼酸盐溶液缓冲溶液。经过实验优化选择,确定缓冲溶液离子浓度 20 mmol/L 的四苯硼酸钠电泳缓冲液。

中药复方制剂中所含成分复杂,采用高效液相色谱

(下转 555 页)

过程中先侵及前庭窗,环韧带及镫骨底板至传声系统增加,听骨链的共振频率发生改变。在本组病例当中从表2中可以看出 Carhart 切迹在单纯传导性耳聋中出现比率明显较高,经 χ^2 检验,有显著性差异($P<0.05$)。单纯传导性耳聋中以镫骨性耳硬化症为主,Carhart 切迹的出现这也说明镫骨足板的固定使迷路内的淋巴液不受外界声波刺激而振动,感音功能逐渐下降致听骨链的共振频率消失。

从表3中可以看出早期的耳硬化症中 Carhart 切迹出现率明显高于中晚期,经 χ^2 检验,有显著性差异($P<0.05$)。早期时大部分病例为病灶局部侵犯,引起镫骨底板固定,共振频率改变最为明显,因此 Carhart 切迹率出现最高。如果病灶进一步向内耳道发展,压迫听神经及其血管导致神经及感受结构病理性退变,或是病灶向耳蜗基底周发展,使鼓阶狭窄或基底膜振动受限,阻碍声波的传导和感受,甚至病灶骨进入迷路产生毒性或刺激性的代谢产物,直接损害感音神经功能^[6]导致中晚期耳聋,高频听力也明显下降,Carhart 切迹消失。因而在临床上我们可以根据 Carhart 切迹来判断患者的病程发展程度。有的作者认为 Cahart 切迹可作为耳硬化症程度的一个重要指标,它的出现多说明病变尚局限在镫骨周围,耳蜗功能基本正常^[7]。

Cureoglu^[8]指出镫骨固定从连接卵圆窗的环状韧带开始钙化,环状韧带并且连接镫骨底板,因而镫骨随着病变的发展被固定。

参考文献:

- [1] 孔维佳.耳鼻咽喉头颈外科学[M].北京:人民卫生出版社.2005:505.
- [2] 殷国华,陈文文.晚期耳硬化症的治疗效果[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2005,40(9):684-6.
- [3] Genc A, Sennaroglu L. Is it possible to predict diffuse obliterative otosclerosis preoperatively by audiologic examination [J]. Int J Audiol, 2007, 46(5): 203-7.
- [4] Moscillo L, Imperiali M, Carra P, et al. Bone conduction variation poststapedotomy[J]. Am J Otolaryngol, 2006, 27(5): 330-3.
- [5] Cherukupally SR, Merchant SN, Rosowski JJ. Correlations between pathologic changes in the stapes and conductive hearing loss in otosclerosis[J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1998, 107(4): 319-26.
- [6] 何永照,姜泗长.耳科学下册[M].上海:上海科学技术出版社出版,1987:143-55.
- [7] 钱惠根,陈文文,倪关森.125例耳硬化症纯音气骨导听力分析[J].听力学及言语疾病杂志,2002,10(3):190.
- [8] Cureoglu S, Schachern PA, Ferlito A, et al. Otosclerosis: etiopathogenesis and histopathology[J]. Am J Otolaryngol, 2006, 27(5): 334-40.

(上接 552 页)

谱法法进行测定时,往往因为杂质太多而容易污染色谱柱,使得柱效降低,干扰实验结果。而采用 HPCE 法进行分析时,高效毛细管电泳是一种先进的新型分离分析技术,是根据组分在外加电场电泳淌度的差异而进行分离的一种新型分析技术,因而在药物分析应用日益广泛^[3]。它具有分析效率高、速度快、样品用量小、溶剂消耗小、对环境几乎无污染等突出的优点。毛细管电泳柱容易冲洗再生,保持高效,使得各个成分的分析效果较佳,对中药中有效成分的分析十分有效^[4]。妇安口服液由 10 多味药材配伍而成,所含成分复杂,鉴别难度较大。处方中蒲公英的主要成分为阿魏酸,多

采用薄层扫描法或高效液相色谱法测定其含量^[5,6]。

参考文献:

- [1] 国家药监局.中药注射剂指纹图谱研究的技术要求《暂行》的通知[J].中成药,2000,22(10):71-5.
- [2] 陈军,李章万,祁伟,等.高效毛细管电泳分析法检测中药红曲的桔霉素含量[J].中国中药杂志,2007,32(14):1412-5.
- [3] 徐玉田,张状年.中药色谱指纹图谱的研究概况[J].河南中医,2007,27(6):81-3.
- [4] Suntomsuk L. Capillary electrophoresis of phytochemical substances [J]. Pharm Biomed Anal, 2002, 27: 679-98.
- [5] 郑恒,魏日胞,陈香美.中药质量标准与中药指纹图谱[J].中国医院药学杂志,2003,23(2):112-3.
- [6] 洪筱坤,王智华.色谱指纹谱在中药质量标准研究中的应用[J].中成药,2001,23(3):157-9.