

RP-HPLC 法测定钻山风糖浆中瓜馥木碱甲的含量^{*}钟瑞建, 李海燕, 官后嘉, 谢二磊, 周国平^{**}

(江西省食品药品检验所, 南昌 330046)

摘要 目的: 采用反相高效液相色谱法测定钻山风糖浆中瓜馥木碱甲的含量。方法: 使用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-三乙胺醋酸溶液(取三乙胺 8 mL, 冰醋酸 30 mL, 加水稀释至 1000 mL) (14: 86), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 300 nm。结果: 瓜馥木碱甲的进样量在 0.048 ~ 1.19 μg 范围内, 与峰面积呈良好线性关系; 瓜馥木碱甲的平均回收率($n=6$) 为 99.8%, RSD 为 1.7%。结论: 本法简便、准确, 重复性好, 可为钻山风糖浆的质量控制提供实验依据。

关键词: 钻山风; 瓜馥木; 糖浆; 瓜馥木碱甲; 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(2011)09-1794-03

RP-HPLC determination of fissistigine

A in Zuanshanfeng syrup^{*}ZHONG Rui-jian, LI Hai-yan, GUAN Qi-jia, XIE Er-lei, ZHOU Guo-ping^{**}

(Jiangxi Provincial Institute for Drug and Food Control, Nanchang 330046, China)

Abstract Objective: To develop RP-HPLC method for the determination of fissistigine A in Zuanshanfeng syrup.

Methods: The separation was performed on an Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with a mobile phase of acetonitrile-water containing 0.3% triethylamine and 3% acetic acid (14: 86). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the detecting wavelength was 300 nm. **Results:** The linear range of fissistigine A was 0.048 - 1.19 μg, and the average recovery ($n=6$) was 99.8% (RSD = 1.7%). **Conclusion:** The method is simple and accurate with good reproducibility. It can be used to control the quality of Zuanshanfeng syrup.

Key words: Zuanshanfeng; *Fissistigma oldhamii*; syrup; fissistigine A; HPLC

钻山风糖浆是由钻山风、勾儿茶、四块瓦、威灵仙、千斤拔、丰城鸡血藤、山姜 7 味药组成的中药复方制剂, 具有祛风除湿、散瘀镇痛、舒筋活络的功效, 可用于风寒湿痹引起的腰膝冷痛、肢体麻木、伸屈不利等症。钻山风为方中君药, 钻山风又名瓜馥木 *Fissistigma oldhamii* (Hemsl.) Merr., 为番荔枝科 (Annonaceae) 瓜馥木属 (*Fissistigma*) 植物, 分布于浙江、江西、福建、台湾、湖南、广东、海南、广西、云南等地, 根或藤茎入药, 性温味辛, 具有祛风除湿、镇痛消肿、活血化瘀等功效, 主要用于跌打损伤、关节炎及坐骨神经痛的治疗^[1]。据文献报道, 瓜馥木中含有生物碱类、有机酸类、黄酮类、马兜铃内酰胺类、黄烷醇类、丙烯酸胺类成分, 主要含有生物碱类成分^[2,3]; 药理实验表明, 其总生物碱有镇痛、心血管

生物活性, 对心律不齐与慢性心肌供血不足患者均有一定疗效, 并对 W₂₅₆、S₃₇、S₁₈₀ 等瘤株均有抑制作用^[4]。经试验研究瓜馥木碱甲是其生物碱类的主要成分, 因此本课题组从瓜馥木药材中分离得到瓜馥木碱甲对照品。曾晓瑜^[5]等报道了钻山风药材中牛耳枫碱(瓜馥木碱甲)、木番荔枝碱的含量测定方法, 钟瑞建等^[6]报道了钻山风药材中瓜馥木碱甲和 duguevanine 的含量测定方法, 但目前尚未有测定钻山风糖浆中瓜馥木碱甲含量的文献报道。本文采用反相高效液相色谱法测定钻山风糖浆中瓜馥木碱甲的含量, 并考察 10 批钻山风糖浆中瓜馥木碱甲含量的差异, 为钻山风糖浆的质量控制提供科学依据。

* 江西省科技厅科技支撑计划 2009BSA 14300

** 通讯作者 Tel: (0791) 6217386; E-mail: 13870868633@139.com

1 仪器与试药

岛津 LC-2010 高效液相色谱仪: 四元泵, 在线脱气, 柱温箱, 自动进样器, 紫外可变波长检测器, SHIMADZU Lcsolution 色谱工作站。电子天平: Sartorius BS110S 十万分之一天平。

乙腈为色谱纯, 水为娃哈哈饮用纯净水, 其他试剂均为分析纯。

对照品瓜馥木碱甲均为本课题组自制, 经 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、MS 鉴定结构, 纯度经 HPLC 和 TLC 检测均大于 98%。

钻山风糖浆由江西省南昌桑海制药厂(批号: 100508, 090708, 090303, 080919, 080513) 和江西省天施康药业提供(批号: 100401, 100202, 100402, 101002, 100301), 阴性样品(批号: 100410) 由江西省天施康药业提供。

2 溶液制备

2.1 对照品溶液 精密称取瓜馥木碱甲 5.96 mg 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品母液。精密量取上述母液 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 供试品溶液 精密量取钻山风糖浆 20 mL, 置分液漏斗中, 用氨试液调节 pH 至 11~12, 加氯仿振摇提取 4 次, 每次 20 mL, 合并氯仿液, 蒸干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 阴性样品溶液 精密量取阴性样品 20 mL, 同供试品溶液的制备方法制得阴性样品溶液。

3 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-三乙胺醋酸溶液(取三乙胺 8 mL, 冰醋酸 30 mL, 加水稀释至 1000 mL) (14:86); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 300 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。在上述色谱条件下, 阴性样品溶液在与瓜馥木碱甲相应的位置没有色谱峰的干扰, 表明该方法有很强的专属性, 经计算得相邻峰的分离度大于 1.5, 理论塔板数为 9000。色谱图见图 1。

4 方法学考察

4.1 线性关系考察 精密吸取“2.1”项下的对照品溶液 2, 5, 10, 20 μL 及对照品母液 10 μL, 按上述色谱条件进行分析。结果表明: 瓜馥木碱甲进样量在 0.048~1.19 μg 范围内, 与峰面积呈良好线性关系, 回归方程分别为:

$$Y = 2.269 \times 10^6 X - 4.906 \times 10^3 \quad r = 0.9999$$

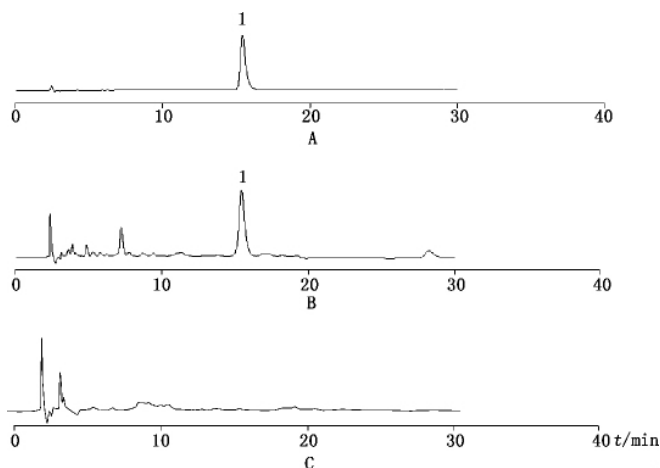


图1 瓜馥木碱甲对照品(A)、样品 090708(B) 色谱图、阴性样品(C) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substance(A), sample 090708(B) and negative sample without *Fissistigma oldhamii* (Hemsl.) Merr. (C)

1. 瓜馥木碱甲(fissistigine A)

4.2 检测限及定量限测定 将瓜馥木碱甲色谱峰的信号与基线信号进行比较, 以信噪比约为 3:1 时的进样量确定为检测限, 以信噪比约为 10:1 时的进样量确定为定量限, 结果瓜馥木碱甲的检测限为 9.59 ng, 定量限为 21.04 ng。

4.3 精密度试验 精密吸取按“2.1”项下方法制备的对照品溶液 10 μL, 在上述色谱条件下连续进样 6 次, 测定峰面积。结果瓜馥木碱甲峰面积的 RSD($n=6$) 为 0.3%。

4.4 稳定性试验 取样品 090708 的供试品溶液分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样测定。结果瓜馥木碱甲峰面积的 RSD($n=6$) 为 1.6%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

4.5 重复性试验 精密吸取样品 090708 共 6 份, 每份 20 mL, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进行分析测定。结果瓜馥木碱甲含量的平均值($n=6$) 为 9.56 μg·mL⁻¹, RSD 为 1.2%。

4.6 回收率试验 精密吸取已知含量(瓜馥木碱甲的含量为 9.56 μg·mL⁻¹) 的钻山风糖浆 6 份, 每份 10 mL, 每份精密加入含瓜馥木碱甲对照品 9.59 μg·mL⁻¹ 的水溶液 10 mL, 按“2.2”项下方法制备供试溶液, 在上述色谱条件下进行分析测定, 计算回收率。结果瓜馥木碱甲的平均回收率($n=6$) 为 99.8%, RSD 为 1.7%。

4.7 耐用性试验 精密量取样品 090708 20 mL,

按“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别采用 Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters Symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 3种品牌的色谱柱按文中的色谱条件对其进行测定,结果瓜馥木碱甲与相邻峰的分度度均大于1.5,理论塔板数均大于4000,瓜馥木碱甲含量的平均值($n=3$)为9.43 μg·mL⁻¹,RSD为1.6%。

5 样品测定

分别取2个厂提供的10批钻山风糖浆,每个样品取2份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液10 μL,在上述色谱条件下进样分析,测定峰面积,用外标法计算出瓜馥木碱甲含量,测定结果见表1。

表1 钻山风糖浆中瓜馥木碱甲的含量(%, $n=2$)

Tab 1 The contents of fissistigine A in Zuanshanfeng syrup

样品批号 (sample No.)	含量平均值 (average value) / μg·mL ⁻¹	相对平均偏差 (relative average deviation) / %
100508	15.9	0.09
090708	9.56	1.14
090303	6.86	0.90
080919	5.96	0.35
080513	17.1	0.56
100401	20.0	0.31
100202	8.28	0.43
100402	8.20	0.54
101002	6.43	1.32
100301	17.7	0.45

6 讨论

6.1 提取方式的选择 提取溶剂考察了乙酸乙酯和氯仿,由于萃取时乙酸乙酯在上层,每次萃取样品须从分液漏斗中放出,样品易损失,故采取氯仿作为提取溶剂;提取次数考察了用氯仿萃取1次、2次、3次、4次、5次,每次20 mL,实验证明氯仿萃取4次已能萃取完全。

6.2 检测波长的选择 瓜馥木碱甲在218.5 nm、277.5 nm和300 nm波长处有最大吸收,考虑到在短波长处样品中其他组分的干扰较大,故选择300 nm作为检测波长。

6.3 流动相的选择 考察了乙腈-0.05%磷酸二氢钾水溶液、乙腈-醋酸铵醋酸溶液(取醋酸铵5 g,冰醋酸1 mL,加水稀释至1000 mL)、乙腈-三乙胺醋酸溶液(取三乙胺8 mL,冰醋酸30 mL,加水稀释至1000 mL)3个溶剂系统。结果表明,以乙腈-三乙胺醋酸溶液为流动相,所得色谱峰峰形较好,分离效果最佳。

6.4 柱温的考察 考察了柱温20℃、30℃、40℃时色谱峰的分离情况,结果表明,三者均能使瓜馥木碱甲与相邻峰的分度度大于1.5,表明柱温对该方法影响不大。

6.5 小结 本文测定了10批钻山风糖浆中瓜馥木碱甲的含量,结果含量最大值是20.02 μg·mL⁻¹,最小值是5.96 μg·mL⁻¹,平均值是11.60 μg·mL⁻¹,为制定含量限度提供了依据。

参考文献

- Jingsu New Medical College(江苏新医学院). Dictionary of Chinese Materia Medica(S-Z) [中药大辞典(下)]. Shanghai(上海): Shanghai Science and Technology Publishers(上海科学技术出版社),1986. 758
- PENG Xin-sheng(彭新生), GAO You-heng(高幼衡), DIAO Yuan-ming(刁远明). Advances in studies on chemical constituents and pharmacology of Zuanshanfeng Tangjiang(瓜馥木成分与药理研究进展). J Jiangxi Univ Tradit Chin Med(江西中医学院学报), 2004, 16(5): 79
- ZHENG Zong-ping(郑宗平), LIANG Jing-yu(梁敬钰), HU Li-hong(胡立宏). Study on the active ingredient of Zuanshanfeng Tangjiang(瓜馥木活性成分研究). Chin J Nat Med(中国天然药物), 2005, 3(3): 151
- XU Chang-rui(徐昌瑞), XIE Ping(谢平), ZHU Ying(朱英), et al. Study on the chemical constituents of Zuanshanfeng Tangjiang (I) [瓜馥木化学成分研究(I)]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 1983, 14(4): 4
- ZENG Xiao-yu(曾晓瑜), XU Chun-ling(徐春玲). HPLC determination of total alkaloids in *Fissistigma oldhamii* (Hemsl.) Merr. (HPLC测定钻山风总生物碱的含量). Chin J Mod Anal Pharm(中国现代应用药学), 2009, 26(13): 1171
- ZHONG Rui-jian(钟瑞建), LI Hai-yan(李海燕), XIE Er-lei(谢二磊), et al. HPLC simultaneous determination of fissistigine A and duguevanine in *Fissistigma oldhamii* (Hemsl.) Merr. (HPLC法同时测定瓜馥木药材中瓜馥木碱甲和duguevanine的含量). Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2011, 31(1): 27

(本文于2011年1月12日收到)