

## · 论 著 ·

## 反相高效液相梯度洗脱法测定脑通络口服液中阿魏酸的含量

任海祥, 陈 翠

**[摘要]** 目的 建立高效液相色谱梯度洗脱法测定脑通络口服液中阿魏酸的含量。方法 采用 Lichrospher C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相 A 为 0.1% 磷酸水溶液、流动相 B 为甲醇, pH 4.15±0.02, 检测波长为 316 nm, 流速为 1.0 ml/min, 柱温 25℃。结果 阿魏酸在 8.112~64.896 μg/ml 范围内具有良好的线性关系,  $r=0.9999$ , 平均回收率 98.15%, RSD=1.79% ( $n=9$ )。结论 反相高效液相梯度洗脱法简便, 准确, 重复性好, 适用于脑通络口服液中阿魏酸的含量测定。

**[关键词]** 阿魏酸; 脑通络口服液; 含量测定; 反相高效液相梯度洗脱法

中图分类号: R927.1; R917.7 文献标志码: A 文章编号: 1672-271X(2010)02-0125-03

### High performance liquid chromatography gradient elution determination of ferulic acid in Naotongluo oral liquid

REN Hai-xiang, CHEN Cui. Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China

**[Abstract]** **Objective** To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) gradient elution method for determination of ferulic acid in *naotongluo oral liquid*. **Methods** The HPLC system consisted of Lichrospher C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), methanol-0.1% phosphoric acid solution (adjusted pH to 4.15±0.02 with triethylamine) was used as mobile phase with gradient elution, the detector wavelength was set at 316 nm, the flow rate was 1.0 ml/min and the column temperature was 25℃. **Results** The linear range of ferulic acid was 8.112~64.896 μg/ml,  $r=0.9999$ . The average recovery was 98.15%, RSD was 1.79% ( $n=9$ ). **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for determination of ferulic acid in *Naotongluo oral liquid*.

**[Key words]** ferulic acid; *Naotongluo oral liquid*; content determination; RP-high performance liquid chromatography

脑通络口服液是医院自制制剂, 由川芎、地龙、鸡血藤等多味中药组成, 具有活血通络、豁痰开窍之功效<sup>[1-2]</sup>, 适用于脑梗死所致的偏瘫无力, 口眼歪斜, 语言不清等症, 我院临床使用多年, 疗效显著。为确保该制剂用药安全, 我们通过实验建立了质控标准, 采用高效液相梯度洗脱法测定其口服液中川芎的活性成分阿魏酸的含量, 取得预期结果, 现报告如下。

## 1 仪器与试剂

高效液相色谱仪, 包括 Waters 1525 二元泵、Waters 2996 二极管阵列检测器、Millennium 32 工作站(美国 Waters 公司), METTLER AE 240 电子天平

**作者简介:** 任海祥(1966-), 男, 江苏南京人, 硕士, 副主任医师, 从事医院药剂工作

**作者单位:** 210002 江苏南京, 南京军区南京总医院制剂科

(梅特勒-托利多仪器有限公司), KH-250B 型数控超声清洗器(昆山超声仪器有限公司)。阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 0773-9910), 脑通络口服液(本院自制, 批号: 080324、080410、080508; 规格为 10 ml), 所用试液甲醇为色谱纯, 其余均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱: Lichrospher C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 溶剂 A 为 0.1% 磷酸水溶液(三乙胺调 pH 为 4.15±0.02)、溶剂 B 为甲醇, 进行梯度洗脱, 梯度洗脱程序见表 1; 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 316 nm; 柱温: 25℃; 进样量: 20 μl。在该色谱条件下, 杂质峰对样品测定无干扰。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品储备溶液 精密称取阿魏酸对照品 10.14 mg, 置 50 ml 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 制成浓度为 202.8  $\mu\text{g/ml}$  对照品储备溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取脑通络口服溶液 50 ml 置烧杯中, 加稀盐酸调 pH 至 1~2, 用乙醚振摇提取 4 次, 每次 30 ml, 合并乙醚液, 乙醚液用水洗涤两次, 每次 30 ml, 乙醚液置 45℃ 水浴上蒸干, 残渣加甲醇溶解并定容至 5 ml 容量瓶中, 即得供试品溶液。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	溶剂 A (%)	溶剂 B (%)
0~5	63	37
6~10	68	32
11~16	30	70
17	63	37

2.2.3 阴性对照溶液 按处方比例称取除川芎外的其余药材, 按 2.2.2 供试品溶液制备方法制成空白对照溶液。

2.3 线性关系的考察 精密量取 2.2.1 项下对照品储备液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 ml 分别置 25 ml 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密吸取 20  $\mu\text{l}$  注入液相色谱仪, 记录结果见表 2, 以峰面积 (A) 为纵坐标, 浓度 (C) 为横坐标, 进行线性回归, 回归方程为:  $A = 95966.8C - 99492.4$ ,  $r = 0.9999$ 。实验结果表明阿魏酸在 8.112~64.896  $\mu\text{g/ml}$  浓度范围内有良好的线性关系。用阿魏酸对照品储备液加甲醇逐步稀释, 以信噪比为 3:1 相应的阿魏酸的量确定最低检测限, 测得最低检测限为 4.1 ng。

表 2 阿魏酸标准曲线测定值

浓度 C ( $\mu\text{g/ml}$ )	峰面积 A
8.112	673676
16.224	1440915
32.448	3038772
48.672	4591011
64.896	6106301

2.4 精密度试验 精密量取阿魏酸对照品储备液 1.0 ml 置 25 ml 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密吸取 20  $\mu\text{l}$  注入液相色谱仪, 连续进样 5 次, 测定峰面积值, 计算相对标准偏差 (RSD) 为 0.96%, 表明精密度良好, 结果见表 3。

表 3 精密度测定结果

供试品	峰面积 A	RSD (%)
1	689387	0.96
2	692835	
3	694328	
4	697671	
5	706871	

2.5 回收率试验 精密量取已知含量的样品 9 份, 每份 50 ml, 分别精密加入阿魏酸对照品溶液 (16.224  $\mu\text{g/ml}$ 、32.448  $\mu\text{g/ml}$ 、48.672  $\mu\text{g/ml}$ ) 5 ml, 混匀。按 2.2.2 项下制备方法制备所需溶液, 在上述色谱条件下测定含量, 计算回收率, 结果见表 4。

表 4 回收率测定结果

样品编号	样品含量 ( $\mu\text{g}$ )	加入量 ( $\mu\text{g}$ )	测得值 ( $\mu\text{g}$ )	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	161.65	81.12	241.255	98.13	98.15	1.79
2	161.65	81.12	239.500	95.97		
3	161.65	81.12	240.740	97.50		
4	161.65	162.24	323.255	99.61		
5	161.65	162.24	320.695	98.03		
6	161.65	162.24	324.700	100.50		
7	161.65	243.36	393.060	95.09		
8	161.65	243.36	402.555	98.99		
9	161.65	243.36	403.840	99.52		

2.6 稳定性试验 本实验条件下同一供试品溶液, 分别于 1、2、4、8、12 h 测定阿魏酸的峰面积, 结果峰面积测定值基本不变, RSD 为 1.83%, 证明供试品溶液的稳定性良好。

2.7 重现性试验 精密量取同一供试品溶液, 按 2.2.2 项下制备方法平行制备 5 份供试品溶液, 依法测定峰面积, 结果样品中阿魏酸的平均含量为 3.217  $\mu\text{g/ml}$ , RSD 为 2.51%。

2.8 样品含量的测定 取 3 批样品 (080324、080410、080508) 按 2.2.2 项下制备方法制备供试品溶液, 精密吸取 20  $\mu\text{l}$  注入液相色谱仪, 记录峰面积。另取阿魏酸对照品溶液 (16.224  $\mu\text{g/ml}$ ), 同法测定, 以外标法计算, 结果脑通络样品中阿魏酸的含量分别为 5.207、3.233、5.590  $\mu\text{g/ml}$ 。

### 3 讨论

本文参照有关文献<sup>[3-5]</sup>采用高效液相法测定阿魏酸含量, 但杂质峰干扰较大, 检测周期超过 50 分钟, 改用梯度洗脱方法, 20 分钟可完成检测; 即先用 37% 的甲醇洗脱杂质, 6 分钟后浓度调整为 32%, 阿魏酸组分可以分离完全, 且杂质不干扰测定, 11 分钟后增加甲醇的百分比量, 促使杂质组分快速出峰, 缩短洗脱时间, 待基线平稳后, 将流动相恢复至初始浓度, 缩短了检测周期, 提高了检测准确度。

流动相的 pH 对阿魏酸的保留时间影响非常明显<sup>[6]</sup>, pH 降低, 阿魏酸的保留时间会增加, 在流动相中加入三乙胺提高 pH 可缩短组分的保留时间, 使峰形更加对称, 减少峰的拖尾。经实验比较, 最终

确定用三乙胺调节流动相的 pH 在 4.13 ~ 4.17 范围内。

阿魏酸为酸性化合物,在弱碱性环境中极不稳定,本实验先用稀盐酸调节溶液 pH 至 1~2,再用乙醚提取,以确保阿魏酸的稳定性。温度对阿魏酸受热也有一定的影响,温度过高,会造成阿魏酸的损失,结合乙醚的沸程,选择 45℃ 水浴挥干。另外由于阿魏酸分子含有一个酚羟基和一个与苯环共轭的双键,对光不稳定,所以配制时应该避光操作,临用前新鲜配制<sup>[7-8]</sup>。

由于中药原药材成分复杂,含量差异较大,本实验测定的 3 批样品中阿魏酸的含量有较大差异。作为复方制剂的主要成分,应制定质量标准,控制其制剂质量,以保证制剂的质量稳定,保证临床疗效。

#### 【参考文献】

[1] 木海鸥,苏孝共.地龙的药理研究概要[J].中国药业,2007,16

(1):60-62.

- [2] 周江.川芎有效成分及其药理作用研究概况[J].浙江中医杂志,2007,12(10):615-616.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[S].北京:化学工业出版社,2005:89.
- [4] 季芳,吕雪芳,阮琴,等.川芎中阿魏酸的 HPLC 测定[J].中国现代应用药学杂志,2003,20(2):149-151.
- [5] 李金恒,刘存刚,姚旋,等.HPLC 梯度洗脱法测定血浆中柳氮磺吡啶及其代谢物[J].医学研究生学报,2008,21(7):682-684.
- [6] 王芳,匡维华.反相高效液相色谱法对不同产地川芎中阿魏酸的测定[J].中国现代应用药学杂志,2002,19(4):310-311.
- [7] 丁原全,万绍晖,许启泰,等.肝宁颗粒剂中川芎的提取和干燥工艺研究[J].中国中药杂志,2007,32(21):2244-2246.
- [8] 宋金春,王杨杨,杨鹤,等.高效液相色谱法同时测定古方生肌汤中阿魏酸和川芎嗪的含量[J].中国医院药学杂志,2004,24(7):419-420.

(收稿日期:2010-01-22;修回日期:2010-03-18)

(本文编辑:潘雪飞;英文编辑:王建东)

(上接第 121 页)

- [10] 李梅,康桂荣,庞常珠.CT 增强扫描造影剂不良反应 26 例分析[J].南京医科大学学报,2008,28(6):818-821.
- [11] 王新华,孙民峰,刘艳,等.离子型与非离子型造影剂在高危因素 CT 增强检查中的副反应比较[J].潍坊医学院学报,2001,23(3):206.
- [12] Katayama H, Aim K, Kozuka T, et al. Adverse reactions to ionic and nonionic contrast media: A report from the Japanese Committee on the Safety of Contrast Media[J].Radiology,1990,175(3):621-628.
- [13] Aoki Takemura J. Allergies correlated to adverse reactions induced by non-ionic monomeric and ionic dimeric contrast media for contrast enhanced CT examination[J].Nippon Hoshason Gijutsu Gakkai Zasshi,2002,58(9):1245-1251.
- [14] Lassev EC, Lyon SG, Berry CC. Reports on contrast media reactions: analysis of data from reports to the U. S. Food and Drug Administration[J].Radiology,1997,203(3):601-605.
- [15] Caro JJ, Tromdade E, McGregor M. The risks of death and of severe nonfatal reactions with high-versus low-osmolality contrast media;

ameta-analysis[J].AJR,1991,156(4):825-832.

- [16] Spring DB, Bettmann MA, Barban HE. Deaths related to iodinated contrast media reported spontaneously to the U. S. Food and Drug Administration, 1978-1994; effect of the availability of low-osmolality contrast media[J].Radiology,1997,204(2):333-337.
- [17] 吴敏,蒋茵.碘普罗胺注射液 300 引起严重过敏反应[J].药物不良反应杂志,2007,9(3):210-211.
- [18] 陈泽莲,黄娟,管玫,等.碘海醇注射液致呼吸抑制心跳骤停死亡 1 例[J].中国新药与临床杂志,2007,26(2):157-158.
- [19] 马素文,李坤成.地塞米松预防碘普罗胺过敏反应的调查研究[J].药物不良反应杂志,2007,9(3):169-171.
- [20] 梁国民,孙巧黎,宋立军,等.离子型造影剂在 CT 增强中预防毒副反应的研究[J].实用放射学杂志,2004,20(7):654-655.
- [21] 孙剑宁,李佐华,史利华,等.离子型造影剂中加地塞米松预防 CT 增强扫描副反应的对比研究[J].中国医师杂志,2001,3(9):664-665.

(收稿日期:2009-10-08;修回日期:2009-11-18)

(本文编辑:潘雪飞;英文编辑:王建东)