

ARPD 精制液中 4 个指标成分的定量测定

陈不尤¹, 欧瑶¹, 李曙光¹, 肖明兵¹, 江枫¹, 周士忠¹, 钱霞¹, 顾红梅¹, 陆亚鹏^{2*}

(1. 南通大学附属医院, 江苏 南通 226001; 2. 南通大学航海医学研究所, 江苏 南通 226001)

[摘要] **目的:**建立抗放射性肺炎方(anti-radiation pneumonia decoction, ARPD)精制液中 4 个指标成分的定量分析方法。**方法:**以芍药苷、阿魏酸、咖啡酸、甘草酸为考察指标,采用岛津 LC-20AD 系列高效液相色谱仪和 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸,进行梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃。**结果:**ARPD 精制液中芍药苷、阿魏酸、咖啡酸和甘草酸的质量浓度分别为 522, 13, 12, 143 mg·L⁻¹。**结论:**各指标成分检测方法的稳定性、准确度和回收率良好,可用于 ARPD 精制液的质量控制。

[关键词] 抗放射性肺炎方; 高效液相色谱; 指标成分

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0141-04

[doi] 10.11653/syfy2013210141

Content Determination of Four Reference Ingredients in Refined Extract Solution of ARPD

CHEN Bu-you¹, OU Yao¹, LI Shu-guang¹, XIAO Ming-bing¹, JIANG Feng¹,
ZHOU Shi-zhong¹, QIAN Xia¹, GU Hong-mei¹, LU Ya-peng^{2*}

(1. Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China;

2. Institute of Nautical Medicine, Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the analytical method of quality control for the four reference ingredients in anti-radiation pneumonia decoction (ARPD). **Method:** Herbaceous peony glucoside, ferulic acid, coffee acid and glycyrrhizic acid were adopted as the reference substances. HPLC method was established using SHIMADZU LC-20AD HPLC system. Kromasil C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used at 30 ℃. Mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid was used for gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** The contents of herbaceous peony glucoside, ferulic acid, coffee acid and glycyrrhizic acid in ARPD refined extract were 522, 13, 12, 143 mg·L⁻¹, respectively. **Conclusion:** The stability, accuracy and recovery of the methods are good and can be used for the quality control of ARPD refined extract.

[Key words] anti-radiation pneumonia decoction; high performance liquid chromatography; reference ingredient

放射性肺炎是胸部恶性肿瘤放疗中不可避免的并发症,临床上常采用皮质激素加抗生素治疗,疗效

有限,易引起并发症,并会抑制肿瘤病人免疫功能^[1]。因此,开发高效、低毒、价廉的药物是防治放射性肺损伤的迫切需求。

放射性肺炎方(ARPD)是本课题组经临床多年、疗效确切的一组经验方^[2]。用药时采用汤剂,容积大,患者服用不便,限制了该方在临床上的推广。因此,笔者采用水提醇沉法对 ARPD 进行了初步精制,在等效性研究的基础上,应用高效液相色谱(HPLC)技术对精制液中 4 个指标成分进行初步定

[收稿日期] 20130427(004)

[基金项目] 江苏省南通市社会发展计划项目(S2008035)

[第一作者] 陈不尤,主任医师,硕士生导师,从事肿瘤放疗化疗及中西医结合治疗, E-mail: 15151365290@163.com

[通讯作者] * 陆亚鹏,博士,助理研究员,从事中药制剂研究, Tel:051385051797, E-mail: lyplab@163.com

量分析,为 ARPD 市场开发的质量控制提供依据。

1 仪器和试剂

LC-20AD 高效液相色谱仪 (SHIMADZU 公司), ARPD 精制液 (在 ARPD 水煎剂的基础上精制而成),乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂为分析纯,水为去离子水;含量 99% 阿魏酸、99% 咖啡酸、98% 芍药苷、95% 甘草酸的对照品购于南京泽朗医药公司;各中药材均购自南通大学附属医院中药房。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸、咖啡酸、芍药苷、甘草酸对照品各 5 mg,置 25 mL 量瓶中,50% 甲醇溶解,稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2 供试品溶液的制备 ARPD 处方由当归、赤芍、水蛭、黄芪、川芎、生地黄、丹参、香附、百部、瓜蒌、紫金牛、甘草原材料以 1:0.8:0.65:0.8:0.8:1:1:2:1:2:1:1 的比例组成,使用中药煎药机,按下列步骤进行汤剂制备:生药浸泡 2 h、加水量为生药总质量的 2 倍、煎药机工作压力 1.5 个大气压,温度 120 °C 煎煮 40 min,制成含生药 3.5 g·mL⁻¹ 的 ARPD 水煎剂。

用旋转蒸发器将 ARPD 水煎剂继续浓缩至密度 1.2,冷却药液,边搅拌边缓缓加入无水乙醇,使体系中乙醇达到 70%,4 °C 密闭静置 24 h,过滤沉淀,得到上清液,再将上清液置于旋转蒸发器回收乙醇,最终得到 ARPD 的精制液。

取 ARPD 精制液 100 mL,减压浓缩至干,用 50% 甲醇溶解,稀释至 25 mL。进样前 0.45 μm 滤膜滤过。

2.3 色谱条件的确定 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) E27399。流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 20 μL。流动相乙腈-0.1% 磷酸,见表 1。

表 1 芍药苷、咖啡酸和阿魏酸及甘草酸流动相条件

芍药苷、咖啡酸和阿魏酸			甘草酸		
t/min	乙腈/%	0.1% 磷酸/%	t/min	乙腈/%	0.1% 磷酸/%
0 ~ 20	5 ~ 20	95 ~ 80	0 ~ 120	5 ~ 30	95 ~ 70
20 ~ 120	20 ~ 30	80 ~ 70			

分别精密吸取供试品溶液、供试品对照品混合溶液及对照品各 20 μL 注入高效液相色谱仪,记录色谱图。各测定峰与相邻色谱峰的分度均 > 1.5,峰对称性良好。

检测波长:芍药苷 230 nm,甘草酸 252 nm,咖啡

酸和阿魏酸 320 nm^[5-8]。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度的试验 分次吸取供试品溶液 20 μL,连续进样 5 次,结果样品共有峰保留时间 RSD 均 < 3%,相对峰面积 RSD 均 < 3%,表明仪器在操作过程中精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 分次取供试品溶液 20 μL,在 0,4,8,12,24,48 h 连续进样 6 次。结果样品共有峰相对保留时间 RSD 均 < 3%,相对峰面积 RSD 均 < 5%,说明 48 h 内该供试品溶液稳定性较好。

2.4.3 重复性试验 取供试品 5 份,制得供试品溶液,取供试品溶液 20 μL,依次进样分析,结果样品共有峰保留时间 RSD 均 < 3%,相对峰面积 RSD 均 < 5%,表明该方法重复性较好。

2.4.4 回收率试验 精密称取已知含量的 ARPD 精制液适量,按高、中、低剂量分别精密加入芍药苷、甘草酸、咖啡酸和阿魏酸对照品,按供试品液制备法处理后按相应测定方法检测,记录峰面积,计算回收率。

2.5 ARPD 精制液部分成分的定性定量分析

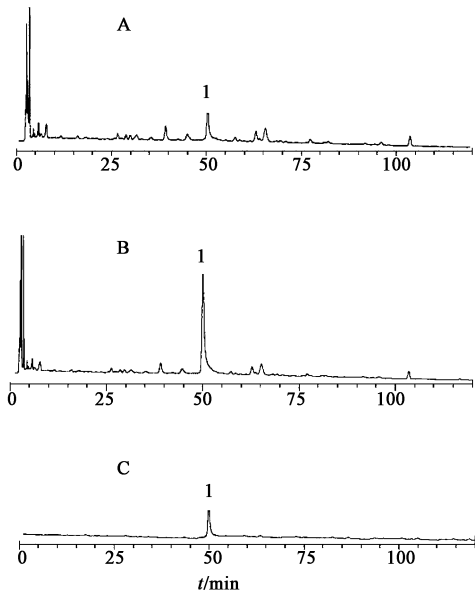
2.5.1 定性分析 通过比对供试样品、对照品及供试样品和对照品混合物的色谱图,确定其中物质成分。

2.5.2 定量分析 外标法研究 ARPD 精制液部分成分含量。取各对照品适量,精密称定,用 50% 甲醇分别制成 0.5 g·L⁻¹ 的对照品储备液;将储备液用 50% 甲醇稀释成系列浓度梯度溶液;分别精密吸取 20 μL 各对照品系列梯度溶液,注入高效液相色谱仪,记录色谱图,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,计算相关成分的含量。

3 结果

3.1 ARPD 精制液中芍药苷的定量分析 结果如图 1,在 230 nm 波长条件下,经乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱,芍药苷的保留时间约为 50 min,与相邻色谱峰的分度均 > 1.5,峰对称性良好。芍药苷的回归方程为 $Y = 1 \times 10^6 X + 48\ 401$ ($R^2 = 0.999\ 7$),线性范围 516 ~ 528 mg·L⁻¹,RSD 0.14%。芍药苷的回收率 98.3%,RSD 2.0%。根据芍药苷的回归方程计算可得,精制液 20 μL 中含芍药苷 10.43 μg,因此精制液中芍药苷的质量浓度为 522 mg·L⁻¹,RSD 1.1%。

3.2 ARPD 精制液中咖啡酸和阿魏酸的定量分析 结果如图 2,在 320 nm 波长条件下,经乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱,咖啡酸和阿魏酸的保留时间约为 34,51 min,与相邻色谱峰的分度均 > 1.5,峰对



A. 供试品;B. 供试品和芍药苷对照品混合;
C. 芍药苷对照品;1. 芍药苷

图1 ARPD精制液中芍药苷的定量分析

称性良好。

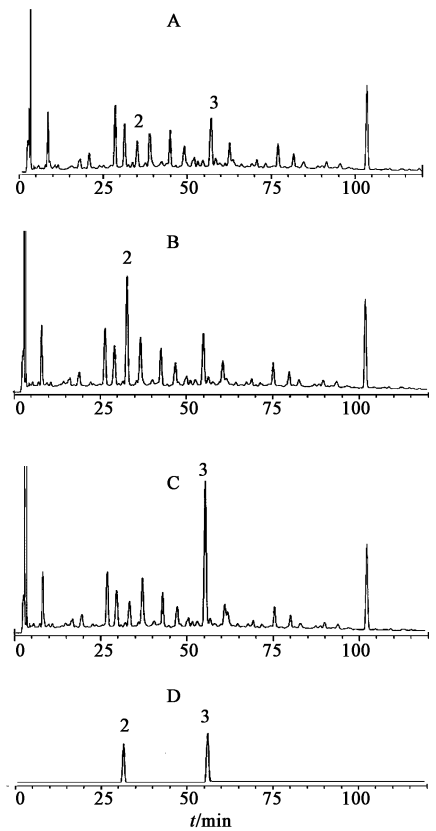
咖啡酸的回归方程为 $Y = 6 \times 10^6 X - 6.6 \times 10^5$ ($R^2 = 0.9993$), 线性范围 $11.75 \sim 12.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, RSD 0.15%。咖啡酸的回收率为 98.5%, RSD 2.2%。根据咖啡酸的回归方程计算可得,精制液 $20 \mu\text{L}$ 中含芍药苷 $0.24 \mu\text{g}$, 因此精制液中咖啡酸的质量浓度为 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, RSD 2.1%。

阿魏酸的回归方程为 $Y = 9 \times 10^6 X - 8.6 \times 10^5$ ($R^2 = 0.9993$), 线性范围 $12.75 \sim 3.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, RSD 0.16%。阿魏酸的回收率为 98.3%, RSD 2.1%。根据阿魏酸的回归方程计算可得,精制液 $20 \mu\text{L}$ 中含阿魏酸 $0.26 \mu\text{g}$, 因此精制液中阿魏酸的质量浓度为 $13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, RSD 1.9%。

3.3 ARPD精制液中甘草酸的定量分析 结果如图3,在252 nm 波长条件下,经乙腈-0.1%磷酸梯度洗脱,甘草酸的保留时间约为 8.4 min,与相邻色谱峰的分度均 >1.5 ,峰对称性良好。甘草酸的回归方程为 $Y = 5.3 \times 10^5 X - 1.1 \times 10^5$ ($R^2 = 0.9994$), 线性范围 $140 \sim 146 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, RSD 0.17%。甘草酸的回收率为 98.2%, RSD 2.3%。根据回归方程计算可得,精制液 $20 \mu\text{L}$ 中含甘草酸 $2.86 \mu\text{g}$, 因此精制液中甘草酸的质量浓度为 $143 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, RSD 2.1%。

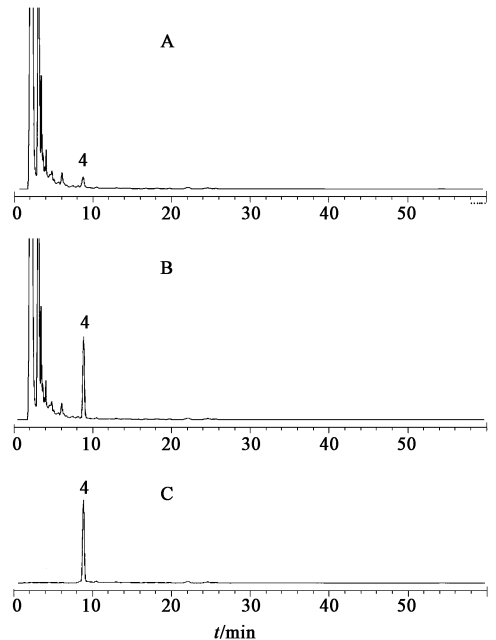
4 讨论

陈不尤^[2]将32例放射性肺炎患者分为对照组和治疗组,分别采用糖皮质激素和 ARPD 汤剂治疗,对比分析两组的抗放射性肺炎的有效率和肿瘤的转



A. 供试品;B. 供试品和咖啡酸对照品混合;
C. 供试品和阿魏酸对照品混合;
D. 咖啡酸和阿魏酸混合;2. 咖啡酸;3. 阿魏酸

图2 ARPD精制液中咖啡酸和阿魏酸的定量分析



A. 供试品;B. 供试品和甘草酸对照品的混合;
C. 甘草酸对照品;4. 甘草酸

图3 ARPD精制液中甘草酸的定量分析

移、复发率,结果显示 ARPD 组的治疗效果显著优于糖皮质激素组,作用机制可能与抗氧化和抗炎有关。随后,本课题组利用水提醇沉法对 ARPD 汤剂进行了初步精制,并通过前期动物实验,证实 ARPD 水提醇沉精制液与汤剂具有生物等效性,为该方的深入开发建立了初步基础。

探索 ARPD 的质量控制方法对于其市场开发和临床推广具有重要意义。选取中药的主要有效成分进行定量测定,可以间接的考察中药的质量^[7]。现代中药化学成分研究显示^[8],赤芍中含有芍药苷;当归和川芎中含有阿魏酸;川芎和生小蓟中含有咖啡酸;甘草中含有甘草酸。芍药苷、阿魏酸、咖啡酸、甘草酸是 ARPD 组方药材中具有代表性的抗氧化和抗炎活性成分^[9-13],可能与药效密切相关,可以作为 ARPD 质量控制的潜在指标成分。

[参考文献]

[1] 肖春,杨旭辉,刘毅,等. 凉血活血颗粒对放射性肺损伤大鼠凝血功能及全血黏度指标的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(5):103.

[2] 陈不尤. 活血化痰抗纤维化治疗放射性肺炎的临床研究[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2001,8(5):30.

[3] 张孝法. HPLC 法测定逍遥软胶囊中芍药苷的含量[J]. 医学教育探索, 2004,35(10):1137

[4] 杨梓,樊晖,张慧,等. HPLC 法同时测定火绒草中木犀草苷和咖啡酸的含量[J]. 中国民族民间医药杂

志, 2012(12):54.

[5] 杜志茂,黄安军,白娟. HPLC 法同时测定消栓通络胶囊中阿魏酸、芦丁和丹酚酸 B 的含量[J]. 中国药事, 2010,24(7):693.

[6] 何兵,冯文宇,田吉,等. 高效液相色谱法测定黄金咽喉片中甘草酸的含量[J]. 时珍国医国药, 2007,18(4):818.

[7] 叶建晨. 复方金银花颗粒高效液相色谱特征图谱研究及指标性成分的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(16):105.

[8] 周家驹,谢桂荣,严新建. 中药原植物化学成分手册[M]. 北京:化学工业出版社, 2004.

[9] 王辰允,洪倩,马增春,等. 芍药苷对辐射内皮细胞起保护作用的机制[J]. 解放军药学报, 2010,26(3):198.

[10] 赵春贵,李海鹏,张立伟,等. 中草药有效成分绿原酸和咖啡酸抗氧化活性研究[C]. 太原:第八届全国发光分析暨动力学分析学术研讨会论文集, 2005.

[11] 贺建荣,张琰,程建峰,等. 黄芪总黄酮、黄芪多糖、甘草次酸及阿魏酸清除氧自由基作用的研究[J]. 中国美容医学, 2001,10(3):191.

[12] 穆茂,程德云,陈应强. 阿魏酸钠对大鼠肺纤维化的预防作用[J]. 贵阳医学院学报, 2010. 35(3):251.

[13] Abe M, Akbar F, Hasebe A, et al. Glycyrrhizin enhances interleukin-10 production by liver dendritic cells in mice with hepatitis[J]. J Gastroenterol, 2003,38(10):962.

[责任编辑 邹晓翠]

《中国中药杂志》2014 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1955 年 7 月,是创刊最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平,主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、研究院所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊,128 页,2014 年定价每期 30 元,全年 24 期定价为 720 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公,如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 www.ejcm.com.cn 或 www.中国中药杂志.com。

联系电话:稿件查询 010-64045830 转 602;主任电话 010-64058556;资源与栽培栏编辑:010-64048925;制剂栏编辑:010-64040392;化学栏编辑:010-64040113;药理栏编辑:010-84022522;临床栏编辑:010-64059766;电子杂志制作发行及网上维护:010-64030625。