

通脉颗粒的定性定量分析

郭宇洁, 孟 硕, 徐 辉, 刘建勋*

(中国中医科学院西苑医院实验中心, 北京 100091)

[摘要] 目的: 建立通脉颗粒的定性定量分析方法。方法: 采用薄层色谱法对制剂中川芎、山楂、葛根等进行定性鉴别; 采用 HPLC 法对通脉颗粒中阿魏酸进行含量测定, 流动相为甲醇-水-冰醋酸(22: 78: 1), 检测波长为 323 nm。结果: 薄层图谱斑点清晰, 阴性对照无干扰; 阿魏酸线性范围为(0.027~ 0.489) μg , $r = 0.999\ 8$ ($n = 7$), 平均回收率为 96.8%, RSD= 1.3%。结论: 本实验所建立的分析方法简便, 灵敏, 可靠, 可作为通脉颗粒的定性定量分析方法。

[关键词] 通脉颗粒; 阿魏酸; 高效液相色谱法; 定性定量分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)11-0013-03

[收稿日期] 2008-03-25

[通讯作者] * 刘建勋, Tel: (010) 62875599-6177; E-mail: jianxun@ht.rol.cn.net

通脉颗粒为中药复方制剂,由川芎、山楂、葛根等组成。具有益气活血通络功效,应用于缺血性中风恢复期和后遗症期。本文采用 TLC 法和 HPLC 法对制剂的质量进行了研究。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Waters 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Waters515 泵及 996 二极管阵列检测器; Waters717 自动进样器; Millennium³² Login 工作站; BRANSON 超声清洗器(上海必能信超声有限公司); METTLER AE240 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 试药 阿魏酸对照品(批号: 0773-9910), 熊果酸(批号: 110742-200415), 葛根素(批号: 110752-200410), 川芎对照药材(批号: 918-9202, 均购自中国药品生物制品检定所); 通脉颗粒(本院制剂, 批号: 060301, 060901, 060902, 060903); 阴性对照样品自制; 甲醇、冰醋酸为色谱纯; 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

2 定性分析

2.1 川芎薄层鉴别 取本品 2 g 研细, 加乙醚 30 mL, 加热回流 40 min, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加醋酸乙酯 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取川芎对照药材 1 g, 同法制成对照药材溶液。配制不含川芎的制剂, 同法制成阴性样品溶液。吸取上述对照药材溶液 10 μ L, 供试品溶液和阴性样品溶液各 6 μ L, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-醋酸乙酯(9: 1)为展开剂, 展距 16 cm。取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。阴性无干扰。见图 1。



图 1 通脉颗粒川芎 TLC 图谱

1. 川芎; 2, 3, 4. 供试品溶液; 5. 川芎阴性对照

2.2 山楂薄层鉴别 取本品 1 g 研细, 加醋酸乙酯 5 mL, 超声处理 20 min, 滤过, 滤液作为供试品溶液。另取熊果酸对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。配制不含山楂的制剂, 同法制成阴性样品溶液。吸取上述对照品溶液 8 μ L, 供试品溶液和阴性样品溶液各 15 μ L, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-醋酸乙酯-甲酸(20: 4: 0.5)为展开剂, 展距 18 cm, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 80 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品在与对照品色谱相应的位置上, 荧光灯(365 nm)下显相同的橙黄色荧光斑点。阴性无干扰。见图 2。

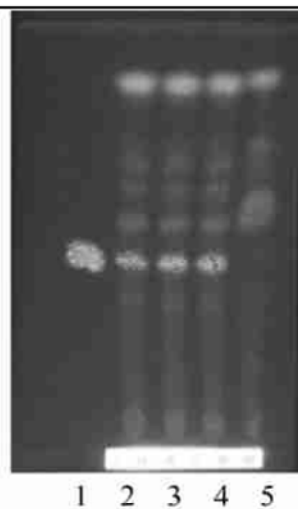


图 2 通脉颗粒山楂 TLC 图谱

1. 熊果酸; 2, 3, 4. 供试品;
5. 山楂阴性对照

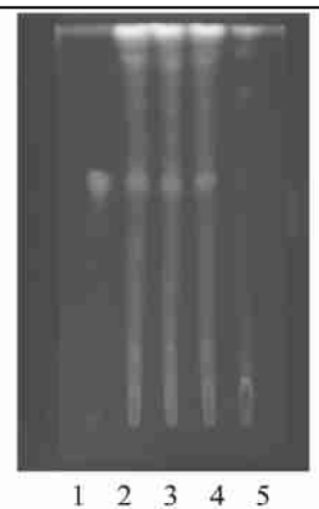


图 3 通脉颗粒葛根 TLC 图谱

1. 葛根素对照品; 2, 3, 4. 供试品;
5. 葛根阴性对照

2.3 葛根薄层鉴别 取本品 10 g 研细, 加醋酸乙酯 30 mL, 超声处理 40 min, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 2 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取葛根素对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。配制不含葛根的制剂, 照供试品溶液的制备方法制成阴性样品溶液。吸取上述溶液各 8 μ L, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-甲醇-水(7: 2.5: 0.25)为展开剂, 展距 18 cm, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。阴性无干扰。见图 3。

3 定量分析

3.1 色谱条件 Symmetry-C₁₈ 色谱柱(3.9 mm \times 150 mm, 5 μ m), 流动相: 甲醇-水-冰醋酸(22: 78: 1), 检测波长: 323 nm, 流速: 0.6 mL \cdot min⁻¹, 柱温: 室温。在此条件下, 阿魏酸与其他组分均能达到基线分离, 色谱

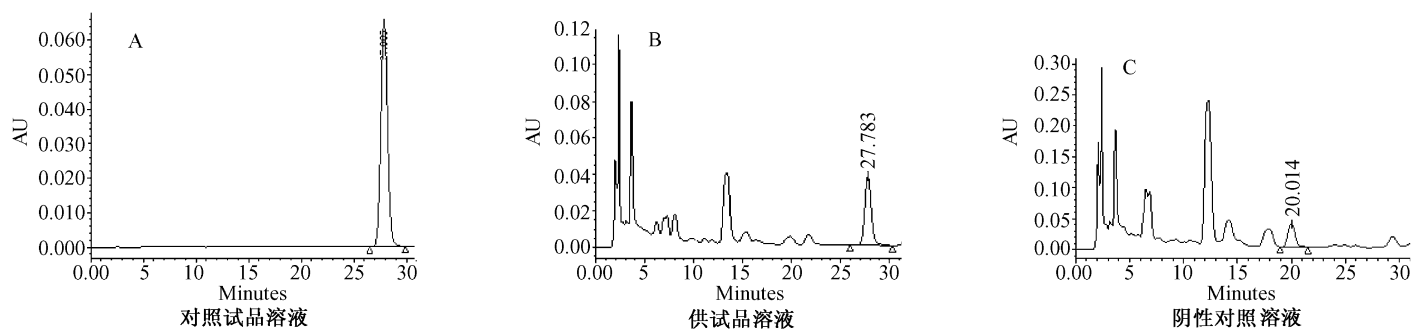


图 4 通脉颗粒阿魏酸色谱图

图见图 4。

3.2 对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸对照品适量,加酸性甲醇(甲醇:冰醋酸=19:1)制成每 1 mL 含 0.02 mg 的溶液,即得(需避光保存)。

3.3 线性关系考察 精密称取阿魏酸对照品适量,加酸性甲醇(甲醇:冰醋酸=19:1)制成每 1 mL 含 0.027 15 mg 的标准品溶液。分别精密吸取上述标准品溶液 1, 2, 4, 8, 10, 14, 18 μ L, 注入高效液相仪,测定峰面积。以阿魏酸的峰面积(Y)对进样量(X)进行回归,回归方程: $Y=1.08 \times 10^7 X+8.26 \times 10^3$, $r=0.9998$ ($n=7$)。结果显示阿魏酸在(0.027~0.489) μ g 范围内呈良好线性。

3.4 供试品溶液的制备 取本品 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 20 mL,称定重量,超声处理(220 V, 50k Hz) 30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μ m)滤过,取续滤液,即得。

3.5 空白对照溶液的制备 按处方药味的比例,配制不含川芎的模拟制剂,按 3.4 项方法制备空白对照溶液,按文中色谱条件进行测定,结果空白对照溶液在与阿魏酸相对应的保留时间处未显色谱峰,故阴性无干扰。

3.6 精密度试验 取供试品溶液,上述色谱条件下连续进样 5 次,测定阿魏酸峰面积, RSD 为 1.9%,说明精密度较好。

3.7 重复性试验 取同一批(批号:060301)样品 5 份,精密称定,测定含量,平均含量为 0.251 2 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 1.95%,结果表明重复性好。

3.8 稳定性试验 取样品(批号:060301)溶液,上述色谱条件下,于 0, 2, 6, 8, 10, 18, 20 h 分别进样,依法测定, RSD 为 1.98%,结果表明,阿魏酸在 20 h 内基本稳定。

3.9 加样回收率试验 采用加样回收率测定法,精密称取已知含量的样品(批号:060301,含量 0.251 2

$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 样品 6 份,前 3 份约 0.5 g,分别精密加入阿魏酸甲醇溶液(每 1 mL 含阿魏酸 0.027 15 mg) 各 7 mL,再分别精密加入甲醇 13 mL,摇匀,备用;后 3 份约 0.7 g,分别加入阿魏酸甲醇溶液(每 1 mL 含阿魏酸 0.027 15 mg) 各 5 mL,再分别精密加入甲醇 15 mL,摇匀,备用。按 3.4 项方法制备及上述色谱条件测定,平均回收率为 96.81%, RSD 为 1.29%。

3.10 样品含量测定 3 批样品溶液(批号:060901, 060902, 060903),按上述色谱条件进样测定,计算 3 批样品中阿魏酸的含量,结果见表 1。本品每 1 g 含川芎以阿魏酸($\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$)计,不得少于 0.18 mg。

表 1 样品测定结果

样品批号	阿魏酸含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
060901	0.229 7
060902	0.220 2
060903	0.215 2

阿魏酸含量计算:

$$\frac{\text{样品峰面积} \times \text{标准品浓度} \times \text{标准品进样体积} \times 1000}{\text{标准品峰面积} \times \text{样品进样体积} \times \text{样品称样量}}$$

4 讨论

在比较过甲醇-水-冰醋酸(45:55:1)、甲醇-水-冰醋酸(30:70:1)、甲醇-水-冰醋酸(22:78:1)以及甲醇-水不同比例的流动相,发现适当加入一定的冰醋酸,阿魏酸的峰形对称。调节不同的甲醇和水的比例,结果以甲醇-水-冰醋酸(22:78:1)为流动相时,基线平稳,保留时间合适,故选择以甲醇-水-冰醋酸(22:78:1)为流动相。

提取溶剂对比了甲醇、95%乙醇和水的提取效果,发现甲醇提取含量(0.256 1 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)高于 95%乙醇和水提取时的含量(分别为 0.202 2 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 0.185 0 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),故选择以甲醇为提取溶剂。提取方法对比了超声处理、加热回流和冷浸法,结果表明超声处理方法(0.258 5 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)优于加热回流和冷浸法(分别为 0.257 6 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 0.244 4 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),故选择超声处理。