

高效液相色谱法测定灯盏生脉胶囊中咖啡酸的含量

福建省福州市药品检验所 (福州 350007) 林 芝

【摘要】 目的 建立高效液相色谱法测定灯盏生脉胶囊中咖啡酸的含量。方法 选用 C₁₈ 柱 (Elite ODS2 4.6 mm × 260 mm, 5 μm), 甲醇 四氢呋喃 0.2% 磷酸溶液 (14 14 72) 为流动相, 流速 1.0 ml · min⁻¹, 检测波长 335 nm, 柱温 30 , 进样量为 20 μl。结果 咖啡酸在 20.64 ~ 206.4 μg · ml⁻¹ 浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系, 回归方程 $A = 1.704 \times 10^5 C + 1.080 \times 10^5$, $r = 0.9999$, 平均回收率为 97.8%, RSD 为 1.15% (n=6)。结论 高效液相色谱法可用于灯盏生脉胶囊中咖啡酸的含量测定。

【关键词】 高效液相色谱法; 咖啡酸; 灯盏生脉胶囊

【中图分类号】 O657.7+2; Q946.82+8.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2010)03-0072-02

灯盏生脉胶囊由灯盏细辛、人参、五味子、麦冬等中药材及其他辅料经加工制成, 具有益气养阴、活血健脑的功效, 用于气阴两虚, 淤阻脑络引起的胸痹心痛、中风后遗症。灯盏细辛中的咖啡酸具有广泛的抑菌和抗病毒活性及止血、防治白细胞减少等功效。国家食品药品监督管理局的中成药标准^[1]中无测定咖啡酸含量的方法。本文参考该标准鉴别项下的色谱条件^[1], 应用高效液相色谱 (HPLC) 法建立灯盏生脉胶囊中咖啡酸含量的测定方法, 以更好地控制产品质量。

1 仪器与试剂

Agilent1100 高效液相色谱系统; 甲醇为色谱纯; 水为重蒸馏水; 其余试剂均为分析纯; 咖啡酸对照品由中国药品生物制品检定所提供, 批号 10885-200102; 灯盏生脉胶囊批号 20090708、20090201、20090406。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 C₁₈ 柱 (Elite ODS2 4.6 mm × 260 mm, 5 μm); 流动相为甲醇 四氢呋喃 0.2% 磷酸溶液 (14 14 72), 流速 1.0 ml · min⁻¹, 检测波长 335 nm,

柱温 30 , 进样量 20 μl。

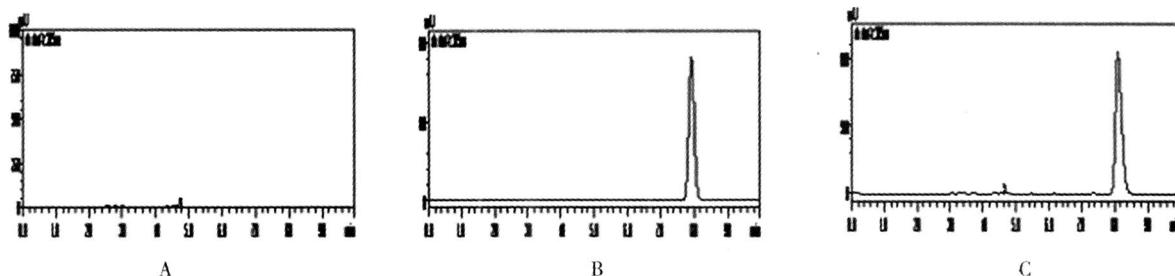
2.2 溶液的制备:

2.2.1 对照品溶液的制备: 精密称取咖啡酸对照品适量, 加甲醇制成每 1 ml 约含 1 mg 溶质的溶液, 精密量取 5 ml 溶液至 50 ml 量瓶中, 加 0.01 mol/L 碳酸氢钠溶液至刻度, 摇匀即得。

2.2.2 供试品溶液的制备: 取供试品装量差异项下的内容物, 精密称取约 0.5 g 置 10 ml 量瓶中, 加水适量, 超声溶解, 加水至刻度, 摇匀。滤过, 滤液用氯仿洗涤 3 次, 每次 5 ml。合并水溶液, 用氢氧化钠试液调 pH 至 9.0, 再用水饱和的正丁醇提取 2 次, 每次 5 ml。合并水溶液, 置 50 水浴中加热 5 min。滤过, 取续滤液 1 ml 置 10 ml 量瓶中, 加 0.01 mol/L 碳酸氢钠溶液稀释至刻度, 即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备: 按处方比例制备不含咖啡酸的阴性样品, 照样品制备方法配制阴性样品溶液。

2.3 选择性试验: 取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液, 按上述色谱条件进样, 色谱图见图 1。



注: A 阴性样品溶液, B 对照品溶液, C 供试品溶液

图 1 液相色谱图

2.4 线性范围: 精密量取咖啡酸甲醇溶液 (浓度为 1.032 mg · ml⁻¹) 1.0、2.5、5.0、7.5、10 ml 分置于 50 ml 量瓶中, 加 0.01 mol/L 碳酸氢钠溶液稀释至刻度, 摇匀, 照色谱条件测定。以峰面积 A 对浓度 C (μg · ml⁻¹) 进行回归分析, 得回归方程 $A = 1.704 \times 10^5 C + 1.080 \times 10^5$, $r = 0.9999$ 。结果表明, 在上述色谱条件下, 咖啡酸在 20.64 ~ 206.4 μg · ml⁻¹ 浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验: 取对照品溶液, 重复进样 5 次, 记录峰

面积, RSD = 1.75%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验: 取 2.2 项下的供试品溶液 (批号为 20090708) 分别于放置 0、1、2、4、8 h 后按上述色谱条件测定, 峰面积的 RSD = 1.19%, 供试品溶液中的咖啡酸放置 8 h 内稳定。

2.7 重复性试验: 取同一批灯盏生脉胶囊样品 (批号 20090708), 按 2.2 项下的方法制备 6 份供试品溶液, 照上

(下转第 138 页)

发病率高, 临床表现以感觉障碍为主, 早期电生理检查可提高其检出率。其发病机制十分复杂。目前认为是血管功能障碍、代谢紊乱、氧化应激、神经营养因子缺乏等因素共同作用最终造成神经滋养血管管壁增厚、管腔狭窄、血小板聚集, 造成血栓形成; 此外, 糖尿病患者前列腺素 E_1 合成减少, 会导致血栓素 A_2 升高、血液粘滞度增加, 也易形成血栓, 进而造成缺血性病变。微循环或神经内膜的缺血、缺氧可导致磷酸肌酶降低, 乳酸含量增加, 致使血流减慢, 加重广泛低氧或缺氧, 最终造成神经营养失常。

维生素 B_{12} 和甲钴胺均为神经营养药。尤其甲钴胺是维生素 B_{12} 的衍生物, 其甲基化的功能可参与身体中生化甲基转移作用, 可促进神经组织内核酸、蛋白质和脂质代谢, 并直接转入神经细胞, 刺激轴浆内蛋白质合成, 促使神经髓鞘卵磷脂的合成, 改善神经元和施万细胞的代谢合成, 促进神经元轴突的生长, 使轴突分叉增多, 加快修复损伤的神经组织, 改善神经传导速度^[4-5]。灯盏细辛注射液的主要成分是野黄芩苷和总咖啡酸酯, 有活血化瘀的作用。前列地尔注射液的主要成分是前列腺素 E_1 , 可减少血栓素 A_2 释放, 抑制血小板聚集、降低血液粘滞度、减轻高凝状态、扩张血管, 改善微循环缺血、缺氧, 同时前列腺素 E_1 还可通过增加神

经细胞内环磷酸腺苷 (cAMP) 含量, 调节 Na^+-K^+-ATP 酶活性, 协同改善神经病变, 故在治疗糖尿病周围神经病变方面, 对神经传导速度 (NCV) 及症状、体征的改善均有良好作用, 且无明显毒副作用。本文中对照组的治疗效果明显不如治疗组。因此, 笔者认为, 治疗糖尿病周围神经病变时可优先考虑前列地尔注射液。

参考文献

- 1 杨青. 糖尿病神经病变的发病机制探讨及治疗 [J]. 实用糖尿病杂志, 2005, 12 (1): 58-59.
- 2 朱宪彝. 临床内分泌学 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1993: 435-436.
- 3 马学毅. 糖尿病神经病变的诊断与治疗 [J]. 中国糖尿病杂志, 2002, 10 (5): 300-302.
- 4 徐静, 孙艳波. 弥可保治疗糖尿病周围神经病 56 例疗效观察 [J]. 中国临床康复, 2002, 6 (7): 1031.
- 5 吴佰超, 张长侠, 李婷. 前列腺素 E_1 联合弥可保治疗糖尿病周围神经病 64 例临床观察 [J]. 实用诊断与治疗杂志, 2006, 20 (8): 597.

(上接第 72 页)

述色谱条件进行测定, 咖啡酸的平均含量为 0.987 2 mg, RSD = 1.79%。表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收试验: 精密称取已知含量的供试品 (批号 20090708) 约 0.25 g 置 10 ml 量瓶中, 分别加入咖啡酸甲醇溶液 (浓度为 1.032 mg·ml⁻¹) 0.5 ml, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 照色谱条件测定。结果见表 1。

表 1 加样回收试验 (n=6)

No.	样品 取用量 g	样品中含 咖啡酸的量 mg	加入量 mg	测得量 mg	回收率 %	平均回收率 %	RSD %
1	0.254 1	0.503 5	0.516 0	1.003 0	96.8		
2	0.259 3	0.513 8	0.516 0	1.014 8	97.1		
3	0.263 7	0.522 5	0.516 0	1.020 4	96.5	97.8	1.15
4	0.261 1	0.517 4	0.516 0	1.024 6	98.3		
5	0.255 9	0.507 1	0.516 0	1.018 4	99.1		
6	0.251 4	0.498 1	0.516 0	1.008 4	98.9		

2.9 样品测定: 按 2.2 项下的供试品溶液制备方法制备样品 3 批 (批号分别为 20090708、20090201、20090406), 按上述色谱条件分别进样测定, 计算含量, 结果 3 个批号样品中咖啡酸含量分别为 0.987 2 mg/粒, 0.832 1 mg/粒, 0.751 8 mg/粒。

3 讨论

咖啡酸对老年性痴呆模型大鼠脑损伤有保护作用^[2], 同

时可提高大鼠中枢兴奋性, 具有广谱抑菌和抗病毒作用, 对放疗、化疗等所致的白细胞减少症有防治功效。本实验应用高效液相色谱法建立咖啡酸含量的测定方法, 结果表明, 高效液相色谱法定量准确, 可用于灯盏生脉胶囊中咖啡酸的含量测定。至于流动相的选择, 我们比较了 3 种不同的流动相, 即甲醇-磷酸盐缓冲液 (取磷酸二氢钠 1.56 g, 加水使溶解成 1 000 ml, 再加 1% 磷酸溶液调节 pH 值至 3.8~4.0) (23 77)^[3]、甲醇-0.1% 磷酸溶液 (26 74)^[4]、甲醇-四氢呋喃-0.2% 磷酸溶液 (14 14 72)^[1], 发现应用第 3 种流动相, 咖啡酸的出峰时间合理, 峰形对称。因此, 本文选择甲醇-四氢呋喃-0.2% 磷酸溶液 (14 14 72) 为流动相。

参考文献

- 1 国家药品监督管理局. 国家中成药标准汇编-中成药地方标准上升国家标准部分: 经络肢体脑系分册 [G]. 北京: [出版者不详], 2002: 274-277.
- 2 冯敏, 张鹏, 郑朝晖. 咖啡酸对老年性痴呆模型大鼠脑损伤的保护作用 [J]. 四川医学, 2009, 30 (10): 1518-1520.
- 3 国家药典委员会. 中国药典: 一部 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 244-245.
- 4 李美容, 罗国琼, 黄斌, 等. HPLC 法测定银蒲解毒片中咖啡酸的含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16 (7): 44-45.