

丹参酮 A 原料药中有机溶剂残留量气相色谱法测定

舒金富, 罗红梅

衢州市食品药品检验所, 浙江 衢州 324000

[摘要] 目的: 采用气相色谱法测定丹参酮 A 原料药中乙醇、乙酸乙酯和二氯甲烷的残留量。方法: 采用 Agilent DB-624 毛细管色谱柱, 以 DMF 作为溶剂, 程序升温测定 3 种有机溶剂的残留量。结果: 乙醇、乙酸乙酯和二氯甲烷的检测浓度线性范围分别 2.0~400.0 $\mu\text{g/mL}$ ($\gamma=0.9998$), 2.0~390.0 $\mu\text{g/mL}$ ($\gamma=0.9993$), 2.0~50.0 $\mu\text{g/mL}$ ($\gamma=0.9992$); 平均回收率分别为 100.1%, 98.1%, 97.7%; 检测限分别为 0.3 $\mu\text{g/mL}$ 、0.32 $\mu\text{g/mL}$ 、0.56 $\mu\text{g/mL}$, 定量限为 0.64 $\mu\text{g/mL}$ 、0.656 $\mu\text{g/mL}$ 、1.67 $\mu\text{g/mL}$ 。结论: 气相色谱法简便、专属性强, 能准确可靠地检测出丹参酮 A 原料药中乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷三种有机溶剂的残留量, 适合用于丹参酮 A 原料药中溶剂残留量的测定。

[关键词] 丹参酮 A; 残留溶剂; 气相色谱法

[中图分类号] R284.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 03-0239-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.03.115

丹参酮 A 为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge 的干燥根及根茎, 具有扩张冠状动脉、增加冠脉血流量、改善心肌收缩力、促进心肌再生、抑制内源性胆固醇的合成等作用, 临床常用于治疗冠心病、心绞痛、心律过速等^[1]。药物生产过程中往往会使用有机溶剂, 其残留量对人体均具有不同程度的毒性且会影响药物的稳定性^[2]。丹参酮 A 原料药在生产时往往会使用乙醇、乙酸乙酯及二氯甲烷等有机溶剂, 在《中华人民共和国药典》2010 年版中这些有机溶剂均为需检查种类。为了保证用药安全, 控制产品的质量, 本研究采用气相色谱对上述 3 种有机溶剂的残留量进行了检测, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 实验仪器为 Agilent 7890A 气相色谱仪、氢火焰离子化检测器(FID); Mettler XP205 型电子天平。丹参酮 A(Tan A, 自制); N, N- 二甲基甲酰胺(DMF)为色谱纯; 其余试剂为分析纯。

1.2 色谱条件 色谱柱: Agilent DB- 624 毛细管柱(30 m \times 0.324 mm \times 1.80 μm); 柱温: 初始温度为 40 $^{\circ}\text{C}$, 以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升至 80 $^{\circ}\text{C}$, 保持 1 min 后, 再以 50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升温至 220 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min; 进样口温度: 200 $^{\circ}\text{C}$; 检测器温度: 250 $^{\circ}\text{C}$; 载气: 氮气; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 2 mL; 分流比: 12:1。

1.3 溶液的制备 对照品溶液: 精密称取异丙醇适量, 加入 DMF 溶解并稀释成为浓度为 2000 $\mu\text{g/mL}$ 的内标溶液; 精密称取乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷适量, 加入 DMF 分别制成

4000 $\mu\text{g/mL}$ 、4000 $\mu\text{g/mL}$ 、2000 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品贮备液。精密移取贮备液适量于 20 mL 量瓶中, 加入内标溶液 1 mL, 以 DMF 将乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷浓度分别稀释成为 250 $\mu\text{g/mL}$ 、250 $\mu\text{g/mL}$ 、30 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品样品溶液; 精密称取丹参酮 A 0.5 g, 置于 10 mL 量瓶中, 加内标溶液 1 mL, 再用 DMF 稀释至刻度, 放至室温, 加 DMF 进行定容, 得到 50000 $\mu\text{g/mL}$ 的混悬液, 过滤取上清即为样品溶液。

2 结果

2.1 系统适用性试验 见图 1。移取对照品溶液按上述色谱条件进行测定, 记录色谱图。结果表明, 各相邻色谱峰的分离度均大于 2, 理论板数均不低于 11000, 系统适用性较好。

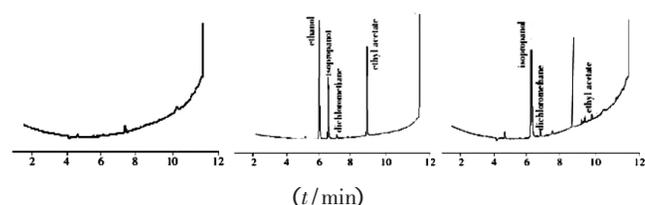


图 1 空白溶剂、对照品及样品色谱图

2.2 线性关系试验 见表 1。精密移取乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷对照品混合溶液各 2 mL 进样, 测得峰面积, 以对照品峰面积 / 内标峰面积(y)对对照品溶液浓度(x)进行线性回归。结果显示, 乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷在相应的线性范围内线性关系良好。

[收稿日期] 2014-10-05

[作者简介] 舒金富 (1969-), 男, 主管药师, 主要从事药品检验工作。

表1 各溶剂线性关系结果($n=6$)

溶剂	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	回归方程	γ
乙醇	2.0~400.0	$Y=7.1 \times 0.001 X + 0.00069$	0.9998
乙酸乙酯	2.0~390.0	$Y=6.3 \times 0.001 X + 0.00042$	0.9993
二氯甲烷	2.0~50.0	$Y=2.1 \times 0.001 X + 0.0004$	0.9992

2.3 精密性试验 取混合对照品溶液 2 mL, 重复检测 6 次, 计算可得出乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 1.5%、2.2%及 2.6%, 各溶剂峰面积的 RSD 均小于 5%($n=6$), 表明精密性较好。

2.4 检测限和定量限试验 分别取乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷对照品贮备液, 用 DMF 稀释溶解后进样, 以 $S/N=3$ 计算检测限, 以 $S/N=10$ 计算定量限。结果乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷的检测限分别为 0.3 $\mu\text{g/mL}$ 、0.32 $\mu\text{g/mL}$ 、0.56 $\mu\text{g/mL}$, 定量限分别为 0.64 $\mu\text{g/mL}$ 、0.656 $\mu\text{g/mL}$ 、1.67 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5 回收率试验 见表 2。称取已知溶剂残留量的样品 0.25 g, 置于 10 mL 量瓶中, 精密移取对照品贮备液, 分别加入高、中、低 3 种浓度的对照品贮备液(相当于各溶剂限度 80%、100%、120%)各 3 份, 加入 1 mL 内标液, 用 DMF 稀释, 根据峰面积计算回收率及 RSD。测得 3 种溶剂的平均回收率为 97.7%~100.1%; RSD 为 0.67%~1.29%, 均小于 5%($n=3$)。

表2 回收率试验

溶剂	回收率(%)			平均回收率(%)	RSD(%)
	低	中	高		
乙醇	100.2	101.0	99.2	100.1	0.78
乙酸乙酯	94.9	97.2	102.3	98.1	1.29
二氯甲烷	97.3	96.2	99.6	97.7	0.67

2.6 稳定性试验 取对照品溶液, 室温下放置 0、2、4、8、12 h 后分别进样检测, 测得乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷在 12 h 的峰面积 RSD 分别为 3.4%、2.1%、3.2%($n=3$), 表明本溶液在室温放置 12 h 内稳定性良好。

2.7 样品的测定 精密量取混合对照品溶液和样品溶液各 2 mL, 记录色谱图, 以峰面积计算样品中残留溶剂的含量, 样品中未检出乙醇, 乙酸乙酯的残留量分别为 0.020%、0.022%、0.021%, 二氯甲烷的残留量分别为 0.011%、0.008%、0.012%, 残留量均 $<0.03\%$ 。

3 讨论

3.1 溶剂的选择 气相色谱的常用溶剂有水、DMF、乙醇、DMSO(二甲基亚砜)等, 丹参酮 A 易溶于氯仿, 在其他常见的有机溶剂中溶解度较差^[3]。但选用氯仿作为溶剂, 其溶剂峰会对二氯甲烷的检出造成干扰; 以 DMF 作用溶剂, 大部分样品均可溶解, 且不干扰其他组分的检出, 同时采用超声的方式释放出残留溶剂, 过滤后取滤液作为检测液^[4]。对滤渣进行二

次处理, 试验结果显示经二次处理后, 有机溶剂残留量均低于检出限, 说明采用 DMF 作为溶剂测定效果良好。

3.2 内标物的选择 采用内标法有机溶剂的含量进行测定, 可有效减少各种误差(包括仪器误差及操作误差)的出现^[5]。内标物应满足以下要求: 试样中不含有该物质; 与被测组分性质比较接近; 不会与试样发生化学反应; 出峰位置位于被没组分附近, 且无组分峰影响^[6-7]。本实验中选择异丙醇作为内标物, 可以和 3 种待测溶剂进行有效分离, 且在分析中无峰出现, 不造成干扰, 经验证效果满意。

3.3 色谱柱的选择 由于乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷三种溶剂的极性存在不同程度的差异, 在最初采用 DB-5MS 气相色谱柱时, 分离度较低, 峰型并不理想; 在尝试用中等极性的色谱柱 Agilent DB-624 时, 3 种有机溶剂和内标液间分离度均大于 2, 且峰型较好, 表明采用该色谱柱能将 3 种有机溶剂进行有效分离。

3.4 温度的选择 由于乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷三种溶剂和 DMF 之间沸点存在较大差异, 对于宽沸程样品应采用程序升温^[8]。使柱温按照一定的程序进行升温, 低沸点的组分在较低温度下分离, 高沸点组分在较高温度下分离, 能较快地去除溶剂 DMF, 缩短分析时间, 峰形理想, 达到最佳的分离效果。

3.5 进样方式的选择 本研究采用顶空进样法测定 3 种有机溶剂的残留量。顶空气相色谱法(HS-GC)又称液上气相色谱分析, 是一种联合操作技术。顶空色谱进样器可与国内外各种气相色谱仪相连接, 它将液体或固体样品中的挥发性组分直接导入气相色谱仪进行分离和检测^[9]。相比于经典气相色谱法, 顶空进样法可以有效避免样品对色谱柱的污染以及样品基质对检测结果的干扰^[10]。

丹参酮 A 原料药是一种广泛应用于治疗心血管病的中成药制剂, 但关于其残留溶剂的实验研究, 国内外则少有报道。本研究根据人用药品注册技术规范国际协调会(ICH)的要求以及 2010 年版《中华人民共和国药典》中的相关规定, 选用 DMF 作为试验的溶解介质, 对样品有很好的溶解性, 且对待测组分无干扰; 采用气相色谱法对丹参酮 A 原料药中的乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷三种有机溶剂的残留量进行了测定。经验证, 此实验方法在线性、定量限、检测限、精密性、稳定性、回收率等系统适用性方面均表现良好, 且具有方法简便、专属性强等优点。因此顶空气相色谱法能够准确可靠地检测出丹参酮 A 原料药中乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷三种有机溶剂的残留量, 为修订药品质量标准提供依据, 对于用药安全和药品质量保障都具有重要意义。

[参考文献]

- [1] 张兆颖, 储婷, 马伟从, 等. 丹参酮 A 脂质体的制备及对 HepG2/ADR 细胞增殖的抑制作用[J]. 华西药学杂志, 2014, 2(1): 33-35.

- [2] 刘付建, 沈宏林, 李衍春, 等. 气相色谱法测定溶剂型木器涂料中 13 种有机溶剂含量[J]. 中南林业科技大学学报, 2014, 8(8): 94-96, 119.
- [3] 祁彩霞, 杨发胜. 气相色谱法测定盐酸左氧氟沙星原料药中有机溶剂三氯甲烷残留[J]. 中国药业, 2014, 31(12): 73-74.
- [4] 王英瑛, 李俊. 毛细管气相色谱法测定舒必利中有机溶剂残留量[J]. 中国药师, 2014, 14(6): 934-936.
- [5] 张焯, 杜祯, 孙少平, 等. 喷雾冷冻干燥法制备丹参酮 A 固体分散体及其理化性质评价[J]. 中国药理学杂志, 2012, 13(3): 204-208.
- [6] 杨玉琴, 李俊. 顶空毛细管气相色谱法测定醋酸可的松中 6 种有机溶剂残留量[J]. 中国药师, 2014, 12(6): 937-939.
- [7] 孙晋瑞, 伊星璐, 张昊然, 等. 气相色谱法测定左西孟旦原料药中 6 种有机溶剂残留量[J]. 中国药房, 2014, 41(21): 1995-1997.
- [8] 谢颖, 戴丹, 谢春燕. 气相色谱法测定丹参酮 A 原料药中有机溶剂残留量[J]. 华西药学杂志, 2014, 3(1): 84-86.
- [9] 刘蝉. 气相色谱法测定维生素 E 软胶囊中 8 种有机溶剂残留量[J]. 安徽医药, 2014, 8(4): 624-626.
- [10] 刘薇芝, 胡汉昆, 郑保根, 等. 气相色谱法测定磷酸二甲啡烷中有机溶剂残留[J]. 中国药师, 2014, 8(4): 563-565.

(责任编辑: 骆欢欢)

加味升降散对瘦素诱导肝星状细胞信号通路的影响

邵敏明, 江漪, 刘妮, 张奉学

广州中医药大学热带医学研究所, 广东 广州 510405

[摘要] 目的: 研究加味升降散对瘦素诱导肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 信号通路相关因子表达的影响。方法: 以重组大鼠瘦素作用于 HSC-T6 细胞, 各干预组在瘦素作用前分别加入加味升降散、N-乙酰-L 半胱氨酸 (NAC)、氯化二亚苯基碘喹 (DPI) 及 JAK 抑制剂 AG490 干预, 再加入瘦素。瘦素组直接加入瘦素, 正常组不加任何药物。另设只加入加味升降散含药血清的加味升降散自身对照组。各组处理不同时间后, 检测细胞内基质金属蛋白酶抑制因子-1 (TIMP-1) mRNA、磷酸化 Janus 激酶 2 (JAK2) 及磷酸化信号转导和转录激活 3 (STAT3) 蛋白表达水平。结果: 加味升降散干预 12 h、24 h 后与瘦素组比较, TIMP-1 mRNA 表达明显下调 ($P < 0.05$)。免疫细胞化学检测显示, 瘦素刺激 HSC-T6 细胞 2 h 后细胞质 p-JAK2 及细胞核内 p-STAT 蛋白表达与正常组明显增加 ($P < 0.01$), 加味升降散干预后 p-JAK2 及 p-STAT3 蛋白表达明显低于瘦素组 ($P < 0.01$)。结论: 加味升降散能阻断瘦素在肝星状细胞信号内信号转导, 抑制 TIMP-1 的基因表达。

[关键词] 加味升降散; 瘦素; 肝星状细胞; 信号转导

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 03-0241-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.03.116

肝纤维化是一切慢性肝病共同的病理学基础, 近年来, 瘦素作为一种新的致纤维化细胞因子逐渐受到重视^[1], 其主要机制是通过结合瘦素激活磷酸化 Janus 激酶 2-磷酸化信号转导和转录激活 3 (JAK2-STAT3) 引起肝星状细胞增殖、抑制其凋亡, 上调基质金属蛋白酶抑制因子-1 (TIMP-1), 抑制基质金属蛋白酶 1 (MMP-1) 的表达, 能直接抑制活化的 HSC 凋亡从而引起肝纤维化^[2-3]。加味升降散具有升清降浊、活血护肝之

功, 本实验观察中药复方加味升降散对瘦素刺激肝星状细胞信号通路的影响, 探讨该方抗肝纤维化机制。

1 材料与方法

1.1 材料 重组大鼠瘦素 (Leptin) 购自 Peprtech 公司; 氯化二亚苯基碘喹 (DPI) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; N-乙酰-L 半胱氨酸 (NAC) 购自北京索莱宝科技有限公司; α -氰基-(3, 4-羟基)N-苄基乙烯胺 (AG490) 购自 Invitrogen 公司;

[收稿日期] 2014-10-11

[作者简介] 邵敏明 (1986-), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 中西医结合基础。

[通讯作者] 张奉学, E-mail: zhangfengxue@gzucm.edu.cn.