

瓜蒌薤白滴丸中总氨基酸的含量测定方法研究[△]

鄢海燕^{1*}, 邹妍², 张彬彬¹, 刘闪闪¹(1.皖南医学院药学院, 安徽 芜湖 241002; 2.郑州大学化学与分子工程学院 2012级, 郑州 450001)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)12-1691-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.12.37

摘要 目的:建立瓜蒌薤白滴丸中总氨基酸的含量测定方法。方法:以L-精氨酸为对照品,以茚三酮为显色剂,采用比色法测定瓜蒌薤白滴丸中总氨基酸的含量。结果:L-精氨酸的质量浓度在8.0~20.0 μg/ml范围内与吸光度值呈良好的线性关系($r=0.999\ 6$);精密密度、稳定性、重复性试验的RSD<3%;平均加样回收率为100.2%,RSD为1.73%($n=9$)。结论:该方法操作简单、结果准确,可作为瓜蒌薤白滴丸中总氨基酸的含量测定方法。

关键词 瓜蒌薤白滴丸;茚三酮比色法;总氨基酸;含量测定

Method Study of Content Determination of Total Amino Acids in Gualou Xiebai Dripping Pills

YAN Hai-yan¹, ZOU Yan², ZHANG Bin-bin¹, LIU Shan-shan¹(1.School of Pharmacy, Wannan Medical College, Anhui Wuhu 241002, China; 2.Grade 2012 in College of Chemistry and Molecular Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of the total amino acids in Gualou xiebai dripping pills. METHODS: The colorimetric method was used to determine the content of the total amino acids in Gualou xiebai dripping pills with L-arginine as reference substance and ninhydrin as color reagent. RESULTS: There was a good linear relationship between the L-arginine content and absorbance in the range of 8.0-20.0 μg/ml ($r=0.999\ 6$); RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 3%; the average recovery of the added sample was 100.2% (RSD=1.73%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and can be used for the content determination of total amino acids in Gualou xiebai dripping pills.

KEYWORDS Gualou xiebai dripping pills; Ninhydrin colorimetry; Total amino acids; Content determination

瓜蒌薤白白酒汤是治疗心血管疾病的著名方剂,疗效确切^[1],氨基酸为该方剂中较为重要的化学成分之一。为便于患者使用,本课题组在瓜蒌薤白白酒汤的基础上制备了瓜蒌薤白滴丸。笔者以L-精氨酸为对照品,采用茚三酮比色法对瓜蒌薤白滴丸中总氨基酸的含量进行测定,并考察不同提取、精制方法对其含量测定的影响,以期对瓜蒌薤白滴丸的制备工艺和质量控制提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

UV2550型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); AUV-220D型电子天平(日本岛津公司);GKC数显控温水浴锅(上海波络实验设备有限公司);KQ3200型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);pHS-3C型精密酸度计(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

瓜蒌、薤白药材(河北安国市御颜坊中药材有限公司,批号:20130301~20130305);瓜蒌薤白滴丸(皖南医学院药剂学教研室自制,批号:20130401~20130405);L-精氨酸(中国食品药品检定研究院,批号:140685-201305);2%茚三酮乙醇溶液(取茚三酮2.0 g,加95%乙醇溶解制成100 ml溶液,摇匀,即得);磷酸盐缓冲液(取磷酸氢二钾5.59 g和磷酸二氢钾0.41

g,加水溶解制成1 000 ml溶液,摇匀,即得pH8的磷酸盐缓冲液);其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果^[2-4]

2.1 瓜蒌薤白滴丸供试品溶液的制备

取瓜蒌薤白滴丸适量(相当于瓜蒌6 g、薤白4 g),精密称定,置于50 ml量瓶中,加水溶解并定容,即得。

2.2 对照品溶液的制备

取L-精氨酸250.0 mg,精密称定,置于50 ml量瓶中,加水溶解并定容,摇匀,制成质量浓度为5.00 mg/ml的对照品溶液。

2.3 检测波长的选择^[5-8]

分别精密量取对照品和供试品溶液各1.0 ml,置于50 ml量瓶中,加水定容。分别精密量取1.0 ml置于10 ml量瓶中,并设空白对照,分别加入磷酸盐缓冲液和2%茚三酮溶液各0.1 ml,加水定容,于水浴锅中煮沸15 min后,取出,冷却至室温,置于UV计中,在400~800 nm波长范围扫描吸收。结果,供试品和对照品在570 nm波长处均有最大吸收,故选择570 nm作为检测波长。

2.4 线性关系考察

精密量取L-精氨酸对照品溶液0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 ml,分别置于50 ml量瓶中,加水稀释至刻度,制成系列对照品溶液。分别精密吸取对照品溶液1 ml,按“2.4”项下方法显色,并于570 nm波长处测定吸光度值。以对照品的质量浓度($x, \mu\text{g/ml}$)为横坐标、吸光度值(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $y=0.059\ 2x-0.242\ 2$ ($r=0.999\ 6$)。结果表明,

[△]基金项目:安徽省科技计划项目(No.12010402089)

* 副教授。研究方向:药物制剂及其质量控制。电话:0553-3932185。E-mail:yhy0801@126.com

L-精氨酸的质量浓度在8.0~20.0 μg/ml范围内与吸光度值呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

精密量取对照品溶液1.5 ml,置于50 ml量瓶中,加水定容。精密量取1 ml,按“2.4”项下方法显色并测定吸光度值,重复5次。结果,RSD=2.23%(n=5),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密量取瓜蒌薤白滴丸供试品溶液1.0 ml,置于50 ml量瓶中,加水定容。精密量取1.0 ml,分别于配制后0、15、30、60、90、120 min时按“2.4”项下方法显色并测定吸光度值。结果,RSD=2.14%(n=6),表明供试品溶液稳定性较好。

2.7 重复性试验

取同一批瓜蒌薤白滴丸适量,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,共6份。精密量取供试品溶液1.0 ml,置于50 ml量瓶中,加水定容。精密量取1.0 ml,按“2.4”项下方法显色并测定吸光度值。结果,RSD=2.52%(n=6),表明该方法重复性较好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品适量,按“2.1”项下方法制备瓜蒌薤白滴丸供试品溶液,共9份,分别精密吸取0.35 ml,置于50 ml量瓶中,再精密加入高、中、低质量浓度的L-精氨酸对照品溶液各适量,加水定容。精密量取1.0 ml,按“2.4”项下方法显色并测定吸光度值,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery test(n=9)

| 序号 | 样品含量,mg | 加入量,mg | 测得量,mg | 加样回收率,% | 平均加样回收率,% | RSD,% |
|----|---------|--------|---------|---------|-----------|-------|
| 1 | 0.425 | 0.25 | 0.672 2 | 98.9 | | |
| 2 | 0.425 | 0.25 | 0.679 0 | 101.6 | | |
| 3 | 0.425 | 0.25 | 0.679 6 | 101.8 | | |
| 4 | 0.425 | 0.40 | 0.840 1 | 103.8 | | |
| 5 | 0.425 | 0.40 | 0.820 5 | 98.9 | 100.2 | 1.73 |
| 6 | 0.425 | 0.40 | 0.825 8 | 100.2 | | |
| 7 | 0.425 | 0.55 | 0.982 4 | 101.3 | | |
| 8 | 0.425 | 0.55 | 0.994 7 | 103.6 | | |
| 9 | 0.425 | 0.55 | 0.981 3 | 101.1 | | |

2.9 样品含量测定

取5批瓜蒌薤白滴丸各适量,分别按“2.1”项下加热回流提取方法制备供试品溶液,再按“2.5”项下方法显色并测定吸光度值,计算样品中总氨基酸的质量分数,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(%)

Tab 2 Results of content determination(%)

| 样品编号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 均值 |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 含量 | 0.049 | 0.050 | 0.044 | 0.044 | 0.041 | 0.046 |
| RSD | | | 8.29 | | | |

2.10 本品提取、精制方法的统计学分析

采用SPSS 11.5软件进行统计学分析,比较不同提取、精制方法的影响。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 讨论

3.1 供试品是否过阳离子交换树脂柱对总氨基酸含量的影响

对于总氨基酸的含量测定,现有文献一般均采用将样品过阳离子树脂柱,然后再用茚三酮显色测定。为此,笔者取供试品溶液2.0 ml过阳离子交换树脂柱,并对过程前、后的氨基酸含量变化进行了考察。结果,过柱前后测得的总氨基酸含量无显著性差异($P > 0.05$)。可见,本方法稳定性较好,不易受供试品中其他物质的干扰,但过柱时间长、处理步骤较烦琐。故无需过阳离子交换树脂柱,直接测定瓜蒌薤白滴丸中总氨基酸的含量即可。

3.2 不同浓度醇沉对总氨基酸含量的影响

若要将瓜蒌薤白提取液制备成滴丸,需对其进行精制,否则会导致每日或每次服用的滴丸粒数过多,患者依从性差。常用的精制方法为醇沉^[9-11]。本研究分别用95%、85%、75%的乙醇进行醇沉24 h,并对总氨基酸的含量进行考察。结果,不同体积分数醇沉会影响氨基酸的含量,与未醇沉组总氨基酸含量相比,用95%、85%醇沉组有显著性差异($P < 0.01$),而75%醇沉组无显著性差异($P > 0.05$)。因此,制备瓜蒌薤白滴丸时可用75%醇沉处理。

综上所述,该方法操作简单、结果准确,可用于测定瓜蒌薤白滴丸中总氨基酸的含量。

参考文献

- [1] 孙志强,郑翼,代龙.瓜蒌薤白药理作用研究进展[J].江西中医药,2010,11(11):76.
- [2] 鄢海燕,邹纯才.瓜蒌薤白颗粒中总黄酮的含量测定[J].皖南医学院学报,2012,31(6):444.
- [3] 鄢海燕,邹纯才,朱磊,等.瓜蒌薤白正丁醇部位腺苷含量及特征图谱[J].皖南医学院学报,2013,32(2):101.
- [4] 鄢海燕,邹纯才.瓜蒌薤白颗粒的高效液相色谱特征图谱及与组方药味的相关性[J].中国医院药学杂志,2013,33(4):276.
- [5] 洪燕龙,杜守颖,杨刚,等.瓜蒌皮药材及其注射液中总氨基酸的含量测定方法研究[J].中国实验方剂学杂志,2004,10(3):10.
- [6] 董玉,石任兵,陈朝军.石菖蒲中总氨基酸的含量测定[J].时珍国医国药,2008,19(10):2 500.
- [7] 王培培,鲁芹飞,李婧,等.铁皮石斛中总氨基酸的含量测定及提取工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(14):30.
- [8] 刘玉明,吴玉田,柴逸峰,等.蓝桉果实中氨基酸成分的含量测定[J].中国药房,2007,18(12):915.
- [9] 刘晓谦,仝燕,王锦玉,等.复方苦参注射液醇沉工艺优化及醇沉颗粒沉降过程研究[J].中国中药杂志,2011,36(22):3 108.
- [10] 姜玲艳,张小华,张宏武,等.正交试验法优选健胃清肠合剂的水提醇沉工艺[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(17):35.
- [11] 袁淑婧,范玲,周琴妹.清咽口含片醇沉工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(21):25.

(收稿日期:2014-03-27 修回日期:2014-09-12)

(编辑:孙 冰)