

# 以转录因子 AP-1 为靶点的 decoy ODNs 对大鼠心肌成纤维细胞增殖及胶原合成的抑制作用

谢双伦, 王景峰, 聂如琼, 袁沃亮, 李飞, 林茂欢(中山大学附属第二医院心内科, 广东 广州 510120)

**摘要:**目的 探讨 AP-1 decoy ODNs 对大鼠心肌成纤维细胞(CFs)增殖及细胞胶原合成的抑制作用, 为高血压心肌纤维化的防治提供理论依据。方法 通过 2.5%胰酶分离培养新生 SD 大鼠心脏成纤维细胞, 采用四氮唑盐(MTT)比色法测定细胞数目, 羟脯氨酸比色法测定培养细胞上清胶原合成, 流式细胞分析技术(FCM)检测细胞周期, 分别观察不同浓度的 AP-1 decoy ODNs 对 Ang II 诱导的 CFs 增殖, 胶原的合成及细胞周期的影响。结果 CFs MTT 比色法显示  $10^{-7}$  mmol/L Ang II OD<sub>490</sub> 值明显高于空白对照组 ( $0.451 \pm 0.014$  和  $0.342 \pm 0.096$ ,  $n=9$ ,  $P<0.05$ ); 100 nmol/L 和 200 nmol/L 组的 OD<sub>490</sub> 值分别为  $0.329 \pm 0.04$  和  $0.214 \pm 0.25$ , 均较 Ang II OD<sub>490</sub> 值显著降低 ( $P<0.05$ ); Ang II 作用 24 h 后能够显著增加 CFs 胶原合成, decoy ODNs 可以抑制这种作用, 其中 100 nmol/L 和 200 nmol/L 均有显著性抑制作用。FCM 细胞周期分析表明, Ang II 作用 24 h 后能够明显增加 S 期细胞百分率 ( $21.93 \pm 0.71\%$  和  $10.93 \pm 0.2\%$ ,  $n=6$ ,  $P<0.01$ ), 随着 decoy ODNs 浓度增加, S 期细胞百分率明显降低, 其中 100 nmol/L 和 200 nmol/L 作用具有显著性意义 ( $P<0.01$ )。但突变的 decoy ODNs 对 CFs 的增殖及胶原合成均没有明显的影响。结论 AP-1 decoy ODNs 可以抑制 Ang II 诱导的 CFs 增殖和胶原的合成, 其作用机制可能与影响 CFs 细胞周期有关。

**关键词:** 心肌成纤维细胞; 激活蛋白 1; decoy ODNs; 血管紧张素 II; 胶原

中图分类号: R541.3 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2008)05-0811-04

## Effect of AP-1 decoy oligodeoxynucleotides on neonatal rat cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis

XIE Shuang-lun, WANG Jing-feng, NIE Ru-qiong, YUAN Wo-liang, LI Fei, LIN Mao-huan

Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the inhibitory effects of AP-1 decoy oligodeoxynucleotides (ODNs) on angiotensin II (AngII)-induced proliferation and collagen synthesis in neonatal rat cardiac fibroblasts (CFs). **Methods** The CFs of neonatal SD rats were cultured in serum-free medium for 24 h and stimulated with  $10^{-7}$  mol/L AngII in the presence of AP-1 decoy ODNs or mutational AP-1 decoy ODNs at varied concentrations. MTT assay was employed for quantitative evaluation of the CF proliferation. Collagen synthesis in the CFs was assessed with hydroxyproline, and the cell cycle distribution determined with flow cytometry (FCM). **Results** With the increase of the concentration of AP-1 decoy ODNs, the absorbance at 490 nm (OD<sub>490</sub>) of the CFs decreased gradually as shown by MTT assay. Treatment with 100 or 200 nmol/L AP-1 decoy ODNs resulted in significantly lowered OD<sub>490</sub> of the CFs as compared with that of AngII group. The concentration of hydroxyproline increased significantly after treatment with  $10^{-7}$  mol/L AngII in comparison with the control group ( $P<0.05$ ). Hydroxyproline concentration in cells treated with 100 or 200 nmol/L AP-1 decoy ODNs was significantly lower than that in the  $10^{-7}$  mol/L AngII-treated cells. AP-1 decoy ODNs decreased the cell percentage in S phase and increased hydroxyproline concentration, but increased the percentage of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase. AP-1 decoy ODNs at 100 and 200 nmol/L did not obviously affect AngII-induced CF proliferation and collagen synthesis ( $P<0.01$ ). **Conclusion** AP-1 decoy can inhibit AngII-induced rat CF proliferation and collagen synthesis possibly by affecting the cell cycle distribution.

**Key words:** cardiac fibroblast; AP-1; decoy; angiotensin II; collagen

研究证实在高血压患者中,左室肥厚是心血管病死亡率及致残率的独立危险因素<sup>[1,2]</sup>。心肌细胞的肥大、心肌成纤维细胞(Cardiac fibroblasts, CFs)增殖及

心肌间质纤维化是左室肥厚形成的重要机制。血管紧张素 II (Ang II) 具有促进 CFs 的增殖活力和胶原合成作用<sup>[3]</sup>, 在心肌纤维化和心室重构中发挥着重要的作用。转录因子激活蛋白 1(AP-1)复合体是由 Jun 蛋白组成的同型二聚体或由 Jun 和 Fos 蛋白组成的异型二聚体, 调节多种基因的表达, 在生长、增殖、炎症及分化中发挥重要的作用<sup>[4,5]</sup>。Decoy 技术是通过人工合成含有转录因子结合序列的双链寡聚脱氧核苷酸(oligodeoxynucleotides, ODNs), 减少/抑制转录因

收稿日期: 2007-11-25

基金项目: 广东省自然科学基金(7117378)

Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (7117378)

作者简介: 谢双伦(1978-), 男, 博士研究生, 研究方向: 冠心病的发病机制及治疗, 电话: 020-81332475, E-mail: xieshuanglun@sina.com

通讯作者: 王景峰, E-mail: drwjf@hotmail.com

子与启动子结合,从而减少/抑制基因的表达<sup>[6,7]</sup>。近期研究提示 Ang II 促进 CFs 的增殖及胶原的合成中,转录因子 AP-1 水平明显上调,部分药物通过下调转录因子的水平,可以减少/抑制 Ang II 促进 CFs 的增殖及胶原的合成<sup>[8,9]</sup>。关于以转录因子 AP-1 为靶点的 decoy ODNs 能否减少抑制 CFs 的增殖及减少胶原的合成,目前不是很清楚。本研究通过脂质体对心肌成纤维细胞转染了人工合成的 decoy ODNs,探讨其对 Ang II 引起的 CFs 增殖及胶原合成的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物和材料

新生 1~3 d 的 SD 大鼠(清洁级),由中山大学实验动物中心提供。Ang II、胰蛋白酶、二甲亚砜(DMSO)四氮唑盐(MTT)均购于 Sigma 公司产品;DMEM 培养基购于 Gibco 公司,按说明书配制,4℃保存;特级胎牛血清购于杭州四季青生物制品公司,使用前 56℃水浴 30 min 灭活补体后分装,-20℃保存;脂质体 lipofectamine 2000 购于 Invitrogen 公司;CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo);3350 型自动酶联检测仪(Beckman);Profile II 型流式细胞分析仪(美国 Coulter)。

### 1.2 方法

1.2.1 CFs 培养及鉴定 无菌条件下开胸取出 1~3 d 的 SD 大鼠心室,用 4℃的 D-Hank's 液洗净残血,剪成 1 mm×1 mm×1 mm 大小的碎片,弃去 D-Hank's 液,加入 0.25%含 EDTA 的胰酶在 37℃下分散细胞,每隔 5~8 min 收集一次细胞,并加入含 10%胎牛血清高糖 DMEM 培养液终止消化。以 1000 r/min 离心 5 min,将所得的细胞置于含 10%胎牛血清高糖 DMEM 培养液中,在 5% CO<sub>2</sub>、37℃饱和湿度条件下培养 60~90 min,根据 CFs 贴壁速度较快的原理,采用差速贴壁法,弃去培养液,剩下的细胞即为 CFs,加入新的 10%胎牛血清高糖 DMEM 培养液继续培养。经免疫组化纤维连接蛋白染色阳性、波形蛋白阳性及平滑肌细胞肌动蛋白染色阴性鉴定为所需的 CFs,纯度达 98%以上,生长近融合时,按 1:3 传代,实验取 2~4 代细胞。

1.2.2 以 AP-1 为靶点的 Decoy-ODNs 合成<sup>[10]</sup> 从转录因子数据库 Transfac 及基因调控数据库中选取 AP-1 的结合序列 TGAGTCA,并结合计算机辅助设计 AP-1 Decoy-ODNs:5'-AAAGCTTGTGAGTCAGAAGCTAA-3',3'-AATCGAAGTCTCAGTCTTCGAA-5';突变的 AP-1 Decoy-ODNs 序列:5'-AAAGCTTGAACTCTCAGAAGCTAA-3';3'-AATCGAAGTCTCAGTCTTCGAAA-5',上述线性双链 DNA 均由 TaKaRa 公司合成。将所有的碱基硫代修饰。

1.2.3 MTT 比色法检测细胞增殖<sup>[11]</sup> 将 CFs 以 2000 个细胞/孔接种在 96 孔板中,在 37℃、5%的 CO<sub>2</sub> 及饱和湿度下培养;在 30%融合时,CFs 在无血清培养基静置 24 h,根据实验目的及分组,加入 Lipofectamine 2000 按照质量/体积 1:3 混合好的 decoy ODNs、Ang II,干预 24 h 后,终止培养,每孔加入 MMT 20 μl,继续培养 4 h;吸弃孔内培养基上清液,每孔加入 150 μl 二甲亚砜,振荡混匀 10 min 使结晶充分溶解,在酶联免疫检测仪上 490 nm 波长处测定吸光值(OD<sub>490</sub>),用只加培养液不加细胞的孔调零。

1.2.4 CFs 培养上清羟脯氨酸含量的测定和胶原计算

采用比色法测定细胞培养上清羟脯氨酸的含量,以反应 CFs 培养上清的胶原含量。取对数生长期 CFs,以 2.5%的胰酶消化,用含 10%胎牛血清的无酚红的 DMEM 培养基调整细胞浓度为 2.5×10<sup>4</sup> 个/ml,加入无血清的培养基培养 24 h 后,根据实验分组,加入不同处理因素。据试剂盒(南京建成生物工程研究所)提供的方法步骤操作,分别测 CFs 培养上清在 550 nm 处的 OD 值。羟脯氨酸(μg/ml)=(测定管吸光度-空白管吸光度/标准管吸光度-空白管吸光度)×标准管浓度×稀释倍数;胶原蛋白(μg)=羟脯氨酸/13.4%。

1.2.5 细胞周期的测定<sup>[12]</sup> CFs 以 1×10<sup>5</sup>/ml 接种于 6 孔板中,无血清培养 DMEM 培养 24 h 后,加入 AP-1 decoy ODNs,收集培养的细胞,悬浮于 5 ml 4℃预冷的 PBS 中,缓慢加入-20℃预冷的 95%的乙醇 15 ml,使其终浓度为 70%,冰浴 30 min 离心,重悬于 PBS,调整细胞密度为 1×10<sup>5</sup>~1×10<sup>7</sup> 个/ml。取适量细胞悬液加入 RNA 酶 37℃冰浴 30 min,除去 RNA,加入碘化丙啶染液,终浓度为 20 mg/l,暗处冰浴 30 min,上机前用 300 目尼龙网过滤,根据碘化丙啶所标记的 DNA 含量确定细胞所处的周期。

1.2.6 实验分组及处理 实验分 4 组:①对照组:无血清 DMEM 培养基。②10<sup>-7</sup> mol/L Ang II 组。③10<sup>-7</sup> mol/L Ang II +decoy ODNs 组:将脂质体-decoy ODNs 混合物加入含 10<sup>-7</sup> mol/L Ang II 无血清培养基中稀释,使其终浓度分别为 10、100、200 nmol/L,6 h 后更换为仅含 10<sup>-7</sup> mol/L Ang II 无血清培养基。④10<sup>-7</sup> mol/L Ang II +200 nmol/L 突变的 decoy ODNs 组(M-decoy ODNs)。

### 1.3 统计学处理

数据均采用均数±标准差表示,采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,组间比较采用多样本均数比较的 ANOVA 分析,两两比较采用 SNK 法,P<0.05 具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 Ang II 及 AP-1 decoy ODNs 对 CFs 增殖的影响

用 MTT 法测定示对照组 OD<sub>490</sub> 值为 0.342 ± 0.096, Ang II 作用 24 h 后, 其 OD<sub>490</sub> 值 0.451 ± 0.014, 具有统计学意义 (n=9, P<0.05)。而在 10 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L decoy ODNs 的作用下, 用 MTT 法测的 OD<sub>490</sub> 值分别为 0.382 ± 0.052、0.329 ± 0.04 和 0.214 ± 0.25; 随着 decoy ODNs 浓度加大, OD<sub>490</sub> 值逐渐减少, 100 nmol/L、200 nmol/L decoy ODNs 组的 OD<sub>490</sub> 值均明显低于 Ang II 组, 而突变的 200 nmol/L decoy ODNs 组与 Ang II 组之间没有显著性差异 (0.451 ± 0.014 和 0.439 ± 0.013, n=9, P>0.05)。

2.2 Ang II 及 AP-1 decoy ODNs 对 CFs 对胶原合成的影响

10<sup>-7</sup> mol/L Ang II 作用 24 h 后, 其培养液上清的羟脯氨酸的量为 (2.35 ± 0.06) μg/ml, 明显高于对照组 (1.45 ± 0.05) μg/ml (n=9, P<0.05), 在 10 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L decoy ODNs 的作用下, 测得细胞培养液上清的羟脯氨酸的含量分别为 (2.27 ± 0.17) μg/ml、(1.38 ± 0.17) μg/ml 和 (1.26 ± 0.05) μg/ml, 随浓度增高呈递减趋势, 其中 100 nmol/L、200 nmol/L 分别能显著性抑制 Ang II 引起的胶原增殖, 而突变 decoy ODNs 没用显著性作用 (2.30 ± 0.12 μg/ml, n=9, P>0.05)。

2.3 AP-1 decoy ODNs 对 Ang II 诱导 CFs 细胞周期的影响

10<sup>-7</sup> mmol/L Ang II 诱导 CFs 的 S 期百分率较对照组明显增高 (21.93 ± 0.71 和 10.93 ± 0.20, n=6, P<0.01), 而 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞明显减少; 100 nmol/L、200 nmol/L decoy ODNs 干预组 S 期百分数均明显比 Ang II 组低, 而 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞明显增加 (P<0.01), 而突变 200 nmol/L decoy ODNs 无此作用 (21.32 ± 1.54, n=6, P>0.05) (表 1)。

表 1 不同浓度 decoy ODNs 对 CFs 细胞周期的影响

Tab.1 Effect of AP-1 decoy ODNs on the cell cycle distribution of CFs (n=6)

Group	Cell cycle distribution (%)		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Control	76.03 ± 0.71	10.93 ± 0.20	13.05 ± 0.72
10 <sup>-7</sup> mmol/L Ang II	55.47 ± 1.42 <sup>a</sup>	21.93 ± 0.71 <sup>a</sup>	22.6 ± 1.5
10 <sup>-7</sup> mmol/L + 10 nmol/L	60.7 ± 0.64	18.14 ± 0.26	21.18 ± 0.59
10 <sup>-7</sup> mmol/L + 100 nmol/L	65.11 ± 1.02 <sup>b</sup>	15.26 ± 0.69 <sup>b</sup>	19.62 ± 0.69
10 <sup>-7</sup> mmol/L + 200 nmol/L	74.33 ± 0.84 <sup>c</sup>	11.53 ± 1.55 <sup>c</sup>	14.14 ± 0.85
10 <sup>-7</sup> mmol/L + M-200 nmol/L	55.12 ± 0.69	21.32 ± 1.54	23.57 ± 1.12

a: P<0.01 vs control group; b,c: P<0.01 vs Ang II group

3 讨论

在高血压和心肌缺血患者, 肾素血管紧张素激活, Ang II 的合成及释放增加, 导致心肌细胞肥厚和心肌成纤维细胞的增殖等心室重构<sup>[8,9]</sup>。MTT 吸光度值可以准确的反应培养的活细胞数目, 而细胞周期分

析中 S 期百分率能够清楚地表明细胞群体的增殖状态。本研究发现在 Ang II 刺激下, 处于 S 期的细胞百分比明显增加, 而处于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 减少, 说明 CFs 在 Ang II 作用下进入增殖状态。进一步研究发现 AP-1 decoy ODNs 能够减少 Angv 诱导的 CFs S 期, 增加 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, 提示 AP-1 decoy ODNs 可以抑制 Ang II 诱导的增殖作用。本研究亦证实, Ang II 可以刺激大鼠的心肌成纤维细胞胶原的合成, 与先前的研究一致, 并再次证实 Ang II 对 CFs 的作用。更重要的是, 本研究发现 AP-1 decoy ODNs 能够明显抑制 Ang II 诱导的 CFs 的胶原的合成, 并呈剂量效应。由此可见 AP-1 decoy ODNs 能够抑制 Ang II 诱导的 CFs 的增殖和胶原的合成, 提示 AP-1 decoy ODNs 可能具有抑制心肌纤维化的作用, 为防治高血压 / 心肌梗死后左室重塑具有重要的意义。

转录因子 AP-1 是由基因 c-fos、c-jun 编码的蛋白产物分别形成 Fos 家族 (c-Fos、FosB、FosL、FosX) 蛋白和 Jun 家族 (c-Jun、JunB、JunD) 蛋白。它们通过亮氨酸拉链结构形成同源 (Jun 与 Jun) 或者异源 (Jun 与 Fos) 二聚体, 构成转录因子 AP-1。AP-1 在细胞增殖转录时调控细胞多种基因的表达。近期研究证实 Ang II 可以通过激活转录因子 AP-1 促进 CFs 增殖<sup>[9]</sup>。在本研究中发现通过转染 AP-1 decoy ODNs, 竞争性的抑制内源性转录因子 AP-1 和核内基因启动子结合, 抑制基因转录, 从而能够有效的减少 Ang II 诱导的 CFs 增殖和合成胶原, 而突变的 AP-1 decoy ODNs 没有作用, 进一步证实 AP-1 在 CFs 病理性增殖和胶原堆积中发挥着重要的作用。

总之, 本研究证实 Ang II 可以促进 CFs 增殖和胶原的合成, AP-1 作为一个关键的转录因子在其中发挥重要的作用, 通过 decoy ODNs 技术, 能够减少 CFs 增殖和胶原的合成。这些研究发现有更好的了解心脏纤维化的病理生理机制, 为将来治疗提供理论基础。

参考文献:

- [1] Levy D, Garrison RJ, Savage DD, et al. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study[J]. N Engl J Med, 1990, 322(22): 1561-6.
- [2] Rodriguez CJ, Lin F, Sacco RL, et al. Prognostic implications of left ventricular mass among Hispanics: the Northern Manhattan Study [J]. Hypertension, 2006, 48(1): 87-92.
- [3] Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, et al. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone[J]. J Mol Cell Cardiol, 1994, 26(7): 809-20.
- [4] Wilmer WA, Cosio FG. DNA binding of activator protein-1 is increased in human mesangial cells cultured in high glucose concentrations[J]. Kidney Int, 1998, 53(5): 1172-81.
- [5] Kudoh S, Komuro I, Mizuno T, et al. Angiotensin II stimulates c-Jun NH2-terminal kinase in cultured cardiac myocytes of neonatal rats

- [J]. Circ Res, 1997, 80(1): 139-46.
- [6] Bielinska A, Shivdasani RA, Zhang LQ, et al. Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides [J]. Science, 1990, 250(4983): 997-1000.
- [7] Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, et al. *In vivo* transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction [J]. Nat Med, 1997, 3(8): 894-9.
- [8] Chen J, Mehta JL. Angiotensin II-mediated oxidative stress and procollagen-1 expression in cardiac fibroblasts: blockade by pravastatin and pioglitazone [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291(4): H1738-45.
- [9] Hattori Y, Hattori S, Akimoto K, et al. Globular adiponectin activates nuclear factor-kappaB and activating protein-1 and enhances angiotensin II-induced proliferation in cardiac fibroblasts [J]. Diabetes, 2007, 56(3): 804-8.
- [10] Ahn JD, Morishita R, Kaneda Y, et al. Transcription factor decoy for AP-1 reduces mesangial cell proliferation and extracellular matrix production *in vitro* and *in vivo* [J]. Gene Ther, 2004, 11(11): 916-23.
- [11] He Q, Yuan B. Dopamine inhibits proliferation, induces differentiation and apoptosis of K562 leukaemia cells [J]. Chin Med J, 2007, 120(11): 970-4.
- [12] Detmer K, Garner RE. Cell surface marker and cell cycle analysis, hedgehog signaling, and flow cytometry [J]. Methods Mol Biol, 2007, 397: 79-90.

## 正交设计法优选益发酊的制备工艺

马平勃<sup>1</sup>, 李青<sup>1</sup>, 马锐<sup>2</sup>, 谭剑华<sup>3</sup>, 朱全红<sup>4</sup> (南方医科大学<sup>1</sup> 南方医院药学部, <sup>2</sup>2003级学生, <sup>4</sup>中医药学院, 广东 广州 510515; <sup>2</sup>白求恩国际和平医院 256 临床部, 河北 正定 050800)

**摘要:** 目的 筛选益发酊浸渍提取的最佳工艺条件。方法 以提取液中阿魏酸的含量为考察指标, 以高效液相色谱法(HPLC)为分析检测方法, 采用正交设计法对影响提取过程的因素乙醇浓度(A)、乙醇用量(倍数)(B)、提取时间(C)进行考察。结果 影响益发酊中阿魏酸提取的最重要因素是提取时间, 阿魏酸的最优提取工艺为 C<sub>3</sub>B<sub>2</sub>A<sub>2</sub>, 即当提取条件为浸渍时间 120 h、溶剂量为药材 8 倍量、乙醇浓度为 75%, 该工艺提取益发酊中阿魏酸的含量最高, 且提取量稳定。结论 采用优化方案工艺能保证益发酊产品质量。

**关键词:** 益发酊; 阿魏酸; 高效液相色谱法; 正交设计

**中图分类号:** R9-39 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4254(2008)05-0814-02

益发酊是南方医院研制的一种纯中药复方外用制剂, 由当归、红花、首乌等中药精制而成, 具活血化瘀、促进头皮血液循环等功效<sup>[1]</sup>。益发酊中的主要有效成分为阿魏酸。正交实验设计是一种利用正交表进行多因素多水平研究的实验并用统计分析考察结果, 得出最佳工艺条件的科学方法, 近年已在我国中成药制备研究中广泛应用。为深入研究益发酊的治疗价值, 改进其提取工艺的科学性和合理性, 本实验以益发酊中阿魏酸的含量为指标, 采用正交实验优选其最佳提取工艺, 为制剂生产提供科学依据。

### 1 仪器和试剂

美国 Waters 公司高效液相色谱仪, Hypersil BDS C18 分析柱(5 μm, 4.6 mm×250 mm, 大连依利特科学仪器有限公司), Waters515 型泵, 996 二极管阵列检

测器, Millennium32 工作站, 超纯水器(Mill-Qplus USA); SK5200LH 型超声波仪(上海科导超声仪器有限公司, 200 W, 59 Hz), R2000 型电子天平(常熟双杰测绘仪器厂)。益发酊研制药材(购自广州市药材公司), 阿魏酸对照品(购自中国药品生物制品检验所, 批号: 0773-9910), 浸渍用乙醇为医用乙醇, 水为纯化水或超纯水, 流动相甲醇(广州化学试剂厂)为色谱纯, 其他化学试剂均为分析纯。

### 2 阿魏酸的含量测定

#### 2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil BDS C18 分析柱, 流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为 1% 冰醋酸溶液。梯度洗脱条件: 流动相 A 从 20% 到 80%, 分析时间 18 min, 时间为 0、15、18 min。流动相 A(%) 为 20、80、80, 流速: 1 ml/min; 检测波长: 313 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μl。

#### 2.2 标准品溶液的制备

精密称取阿魏酸对照品 2.00 mg 于 50 ml 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至 50 ml, 精密量取 0.5、1、2、4、

收稿日期: 2007-12-02

作者简介: 马平勃(1964-), 男, 在职硕士, 副主任药师

通讯作者: 朱全红(1970-), 女, 副教授, 硕士生导师, 电话: 020-61648261, E-mail: zqhyar@163.com