

极差值和方差分析结果表明,3种因素对番泻苷A提取率的影响程度依次为 $B>A>C$ 。由于提取次数对提取率的影响不明显,且多次提取增长了提取的时间,增加了溶剂的用量,故提取次数确定为2次。3种因素的优化组合为 $A_2B_2C_1$,即每次10倍原料量的50%乙醇为溶剂,室温浸提24h,提取2次。

2.2.5 验证试验:按上述确定的提取工艺条件,取10g药材中粉,精密称定,用10mL 50%乙醇室温浸提24h,提取2次,提取液合并,定容至25mL,测定番泻苷A的质量浓度为1.35mg/mL,计算得提取率为91.2% ($n=4$)。

3 讨论

3.1 番泻苷包括番泻苷A、B、C、D等^[2],由于番泻苷类对照品不易得到,而此类物质物理、化学性质相近,所以暂以番泻苷A为考察指标,建立测定方法,优选番泻苷类化合物的提取工艺。

3.2 《中国药典》2000年版一部,采用比色法测定番泻叶中总蒽酮,方法需多次回流、萃取,操作复杂。通过多种流动相:水-甲醇、水-乙腈、水-乙腈-磷酸盐缓冲液等的优化,本研究建立了HPLC测定番泻叶中番泻苷A的方法,此方法简单、准确、快速。可作为番泻叶中番泻苷A测定的方法。

3.3 通过提取温度的选择试验可以明显看出番泻苷类物质在较高温度下不稳定。因此建议在进行HPLC测定时,番泻苷A对照品不宜过久放置,样品保存时温度不应超过60℃。

References:

- [1] Stuppner H, Sturm S. LC-MS and CZE of dianthrone from *Cassia angustifolia* and *C. acutifolia* [J]. *Chromatographia*, 1996, 42 (11-12): 697.
- [2] Tanaka H, Murata R, Yoshida A, et al. Analytical studies on the active constituents in crude drugs V. The structure of sennoside G, a new glucoside from *Senna* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30 (5): 1550-1556.

HPLC法测定丹苓滴丸中黄芩苷、隐丹参酮和丹参酮Ⅱ_A

刘刚,王杰松,姜初,薛克昌,徐冰心,谭生建

(中国人民解放军第306医院药剂科,北京 100101)

丹苓滴丸由丹参和黄芩等经提取加工制备而成,具有抗菌、抗炎和镇痛等作用,临床用于耐青霉素、红霉素、金霉素的金黄色葡萄球菌、乙类链球菌和绿脓杆菌等感染所致的外耳道炎、外耳道疖肿、中耳炎等。黄芩苷、隐丹参酮和丹参酮Ⅱ_A为丹苓滴丸中抗菌、抗炎的活性成分。因此本实验建立了高效液相色谱法同时测定丹苓滴丸中黄芩苷、隐丹参酮和丹参酮Ⅱ_A的方法。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪:含2800液相色谱泵,7215型手动进样器,BIO-DIMENSION紫外可见分光光度检测器(美国BIO-RAD公司);TL 9900色谱数据工作站(北京泰乐公司)。

黄芩苷对照品(批号:0715-9708)、隐丹参酮对照品(批号:0852-9902)和丹参酮Ⅱ_A对照品(批号:0766-200010)购自中国药品生物制品检定所。丹苓滴丸由本院制剂室制备(批号:20030208、20030209、20030211)。乙腈为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备:分别精密称取黄芩苷、隐丹参酮和丹参酮Ⅱ_A对照品24、10、12mg,置100mL棕色量瓶中,加乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取5mL,置10mL棕色量瓶中,加乙醇稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液,分别含黄芩苷120μg/mL、隐丹参酮50μg/mL和丹参酮Ⅱ_A60μg/mL。

2.2 供试品溶液的制备:取丹苓滴丸20粒,研匀,精密称定125mg,置50mL锥形瓶中,精密加入乙醇25mL,称定,超声5min使溶解,擦干瓶壁,补足减失的乙醇,摇匀,即得。

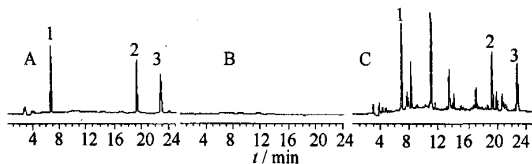
2.3 色谱条件和系统适用性试验:MZ C₁₈分析色谱柱(250mm×4.6mm, 5μm),C₁₈保护柱(北京分析仪器厂,5.0mm×4.6mm, 5μm);流动相A为85%乙腈水溶液(含0.5%三乙胺,磷酸调pH 3.0),流动相B为10%乙腈水溶液(含0.5%三乙胺,磷酸调pH 3.0),梯度洗脱,程序为0~15min, A 20%~

收稿日期:2004-11-22

作者简介:刘刚(1961—),男,北京人,副主任药师,解放军306医院药剂科副主任,主要从事药物分析研究。

Tel: (010) 66356187 66356172

100%, B 80%~0%; 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 270 nm。在此色谱条件下, 测得黄芩苷、隐丹参酮、丹参酮 I_A 对照品、阴性样品 (PEG 6000、PEG 1000、丙二醇质量比按 7: 63: 10 加热熔化混合而成) 和丹苓滴丸色谱图见图 1。可见黄芩苷、隐丹参酮和丹参酮 I_A 保留时间分别为 6.7、19.3、22.8 min, 与各自相邻峰的分度度均大于 1.5, 理论板数分析为 3 600、7 500 和 6 300。



1-黄芩苷 2-隐丹参酮 3-丹参酮 I_A
1-baicalin 2-cryptotanshinone 3-tanshinone I_A

图 1 混合对照品(A)、缺丹参和黄芩的阴性样品(B)和丹苓滴丸(C)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), negative sample (B), and Danqing Dropping Pill (C)

2.4 线性关系与最低检出限: 取黄芩苷对照品 12 mg, 置 100 mg 量瓶中, 用乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 为黄芩苷对照品储备液 (含黄芩苷 120.0 μg/mL); 分别取隐丹参酮对照品 8 mg 和丹参酮 I_A 对照品 8 mg, 置同一 100 mL 量瓶中, 用乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 为隐丹参酮对照品和丹参酮 I_A 对照品混合储备液含隐丹参酮 80.00 μg/mL, 含丹参酮 I_A 78.00 μg/mL。

将对照品储备液稀释 1 倍, 摇匀, 分别取 4、8、12、16、20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱峰面积。以峰面积对进样量线性回归: 黄芩苷回归方程 $Y = 1.100 \times 10^6 + 8.189 \times 10^7 X$, $r = 0.9999$, 线性范围: 0.240 2~1.201 0 μg; 隐丹参酮回归方程 $Y = 6.954 \times 10^5 + 1.472 \times 10^8 X$, $r = 0.9999$, 线性范围: 0.160 0~0.800 0 μg; 丹参酮 I_A 回归方程 $Y = 6.579 \times 10^5 + 1.371 \times 10^8 X$, $r = 0.9996$, 线性范围: 0.156 0~0.780 0 μg。

将对照品储备液适当稀释后进样, 以峰高为基线噪音 3 倍计算, 黄芩苷、隐丹参酮和丹参酮 I_A 最低检出限分别为 0.005 1、0.004 5、0.006 4 μg。

2.5 精密度试验: 取混合对照品溶液, 重复进样 5 次, 每次 10 μL, 记录色谱峰面积, 计算, 结果黄芩苷峰面积 RSD 为 1.2%, 隐丹参酮峰面积 RSD 为 1.4%, 丹参酮 I_A 峰面积 RSD 为 1.6%。取丹苓滴丸供试品溶液, 重复进样 5 次, 每次 10 μL, 记录色谱峰面积, 计算, 结果黄芩苷峰面积 RSD 为 1.5%,

隐丹参酮峰面积 RSD 为 1.8%, 丹参酮 I_A 峰面积 RSD 为 2.0%。

2.6 重现性试验: 取同一批丹苓滴丸, 平行 5 次取样, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算质量分数, 结果黄芩苷的 RSD 为 1.6%, 隐丹参酮的 RSD 为 2.9%, 丹参酮 I_A 的 RSD 为 2.6%。

2.7 稳定性试验: 取丹苓滴丸供试品溶液, 每隔 1 h 测定 1 次, 测定 5 次, 计算质量分数, 结果黄芩苷的 RSD 为 1.7% ($n=5$), 隐丹参酮的 RSD 为 1.9% ($n=5$), 丹参酮 I_A 的 RSD 为 2.3% ($n=5$)。

2.8 加样回收率试验: 精密量取丹苓滴丸 (批号: 20030211) 供试品溶液 3 mL 置 10 mL 棕色量瓶中, 用乙醇稀释至刻度, 作为回收率测定用空白样品; 精密量取同一供试品溶液 3 mL 置 10 mL 棕色量瓶中, 精密加入黄芩苷对照品储备液 4 mL (相当于黄芩苷 480.4 μg)、隐丹参酮和丹参酮 I_A 对照品混合储备液 3 mL (相当于隐丹参酮 240 μg 和丹参酮 I_A 234 μg), 作为回收率测定用加样样品。同法重复制备 5 个加样样品, 测定, 计算回收率, 结果黄芩苷、隐丹参酮、丹参酮 I_A 的加样回收率分别为 97.4% (RSD 为 2.4%)、97.3% (RSD 为 2.1%)、101.6% (RSD 为 1.1%)。

2.9 样品的测定: 分别精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 分别记录黄芩苷、隐丹参酮和丹参酮 I_A 色谱峰面积, 采用外标法计算, 测定结果见表 1。

表 1 丹苓滴丸中黄芩苷、隐丹参酮和丹参酮 I_A 的测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of baicalin, cryptotanshinone, and tanshinone I_A in Danqing Dropping Pill ($n=3$)

批 号	黄芩苷 /(mg · g ⁻¹)	隐丹参酮 /(mg · g ⁻¹)	丹参酮 I _A /(mg · g ⁻¹)
20030208	24.60	10.06	12.09
20030209	24.02	9.470	11.54
20030211	23.24	9.176	11.81

3 讨论

经对混合对照品溶液在线光谱扫描发现, 270 nm 处黄芩苷、隐丹参酮和丹参酮 I_A 均有较强吸收, 故选 270 nm 作为测定波长。

在等梯度洗脱条件下, 当黄芩苷在 7 min 左右出峰时, 丹参酮 I_A 在 30 min 以后出峰。本实验采用梯度洗脱, 使丹参酮 I_A 在 23 min 之前出峰, 提高检测效率。

本法操作简便, 测定结果准确可靠, 可用于丹苓滴丸中黄芩苷、隐丹参酮和丹参酮 I_A 的测定。