

RP-HPLC法测定湿毒清片中7种活性成分

褚文静, 张雪, 黄喜茹*

(河北医科大学药学院 分析化学教研室, 河北 石家庄 050017)

摘要:目的 建立反相高效液相色谱法同时测定湿毒清片中丹参素、阿魏酸、木犀草苷、迷迭香酸、丹酚酸 B、黄芩苷和隐丹参酮。方法 采用 Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-1%冰醋酸为流动相进行梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测波长为 250 nm。结果 丹参素、阿魏酸、木犀草苷、迷迭香酸、丹酚酸 B、黄芩苷和隐丹参酮的线性范围分别为 0.164 2~2.464, 0.007 600~0.114 0, 0.036 16~0.542 4, 0.051 84~0.777 6, 0.287 0~4.305, 0.240 0~3.600, 0.020 85~0.312 8 μg, r 值分别为 0.999 9, 0.999 7, 1.000 0, 0.999 8, 0.999 9, 0.999 8, 1.000 0。丹参素、阿魏酸、木犀草苷、迷迭香酸、丹酚酸 B、黄芩苷和隐丹参酮的平均回收率分别为 97.1%、96.7%、99.2%、96.4%、98.2%、99.6%、100.2%, RSD 分别为 1.5%、1.4%、1.3%、1.7%、1.3%、0.68%、0.53%。结论 该方法专属性好、准确度高, 可用于综合评价湿毒清片的质量。

关键词:湿毒清片; 丹参素; 阿魏酸; 木犀草苷; 迷迭香酸; 丹酚酸 B; 黄芩苷; 隐丹参酮; 高效液相色谱
中图分类号: R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)11-1809-03

湿毒清片是由地黄、当归、丹参、苦参、蝉蜕、黄芩、白鲜皮、土茯苓、甘草组成的复方制剂, 具有养血润燥、化湿解毒、祛风止痒的功效, 用于皮肤瘙痒症属血虚湿蕴皮肤症者。湿毒清片的质量控制方法未见报道, 而组方类同作用相近的湿毒清胶囊^[1]以其中一至两种成分作为质量控制指标的 HPLC 法已有报道^[2-3]。本实验建立了高效液相色谱法同时测定湿毒清片中组成药味当归的有效成分阿魏酸和木犀草苷^[4], 丹参的有效成分丹参素、迷迭香酸、丹酚酸 B 和隐丹参酮以及黄芩的有效成分黄芩苷共 7 种成分。该法专属性好、准确度高, 可用于全面评价湿毒清片的质量。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 全自动高效液相色谱仪(二极管阵列检测器、四元泵、柱温箱、自动控温进样器), Agilent 化学工作站。

丹参素钠(批号 110855-200405)、阿魏酸(批号 111581-200302)、木犀草苷(批号 111720-200603)、丹酚酸 B(批号 111562-200504)、黄芩苷(批号 110715-200514)、隐丹参酮(批号 110852-200305)对照品均购自中国药品生物制品检定所; 迷迭香酸(质量分数 98% 以上)购自四川成都曼思特生物科技有限公司。甲醇为进口色谱纯, 冰醋酸为分析纯, 水为重蒸水。湿毒清片(广州诺金制药有限公司, 批号 251151、251200、251204, 规格: 每片 0.5 g)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)-1%冰醋酸(B), 梯度洗脱程序: 0~10 min, 20% A; 10~11 min, 线性改变至 45% A, 11~20 min, 45% A, 20~26 min, 线性改变至 78% A, 26~50 min, 78% A; 停止时间 50 min, 后运行 10 min。体积流量 1.0 mL/min; 自动进样 10 μL; 柱温 30 ℃; 检测波长 250 nm。理论塔板数按丹参素计算不低于 8 000, 7 种组分与相邻色谱峰的分离度均大于 1.5, 且各组分的色谱峰对称, 色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取对照品丹参素 5.48 mg、阿魏酸 3.80 mg、木犀草苷 1.81 mg、迷迭香酸 3.24 mg、丹酚酸 B 7.18 mg、黄芩苷 4.0 mg 和隐丹参酮 10.42 mg, 分别置 25 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 配成质量浓度分别为 219.2、152.0、72.32、129.6、287.0、160.0、417.0 μg/mL 的对照品储备液。分别精密吸取上述丹参素、阿魏酸、木犀草苷、迷迭香酸、丹酚酸 B、黄芩苷、隐丹参酮储备液 3.75、0.25、2.5、2.0、5.0、7.5、0.25 mL 置 25 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配成质量浓度分别为 32.85、1.52、7.23、10.37、57.448、0.417 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 取湿毒清片 10 片, 去除薄膜衣, 精密称定, 研细, 混匀, 取细粉 0.5 g(约相当于

①收稿日期: 2010-03-03

基金项目: 河北省中医药局资助项目(05057); 河北省科技厅科技项目(062761372)

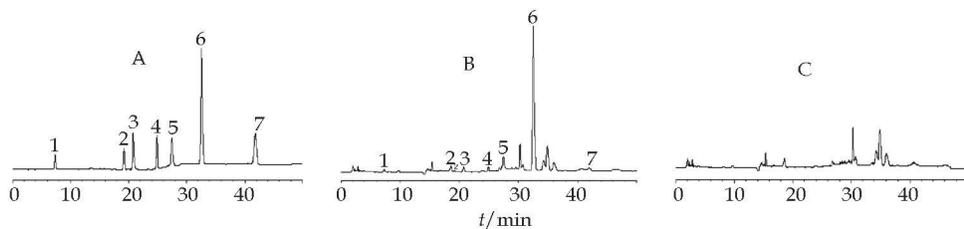
作者简介: 褚文静(1981-), 女, 河北赞皇人, 硕士研究生, 从事药物分析研究。电话: (0311) 86265623 E-mail: wenjingchu@163.com

* 通讯作者 黄喜茹 Tel: (0311) 86265623 E-mail: hxiru@163.com

1 片), 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 甲醇 20 mL, 称定质量, 回流提取 3 h, 放冷, 称定质量, 用 75% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液

用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

按湿毒清片的生产工艺制备缺当归、丹参、黄芩的阴性制剂, 同法制备阴性供试品溶液。



1-丹参素 2-阿魏酸 3-木犀草苷 4-迷迭香酸 5-丹酚酸 B 6-黄芩苷 7-隐丹参酮
1-danshensu 2-ferulic acid 3-luteoloside 4-rosmarinic acid 5-salvianolic acid B 6-baicalin 7-cryptotanshinone

图 1 混合对照品(A)、湿毒清片(B)和阴性对照(C)HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixture reference substance (A), Shiduqing Tablet (B), and negative sample (C)

2.4 线性关系考察: 取混合对照品溶液过 0.45 μm 滤膜后, 按上述色谱条件分别进样 5、15、25、35、45、55、65、75 μL, 记录色谱峰面积。以峰面积对进样质量进行线性回归, 各组分的回归方程、相关系数及线性范围见表 1。

表 1 7 个成分的回归方程和相关系数

Table 1 Regression equation and correlation coefficients of seven components

| 化合物 | 线性回归方程 | r | 线性范围/μg |
|-------|------------------------|---------|-------------------|
| 丹参素 | $A = 90.396C - 0.681$ | 0.999 9 | 0.164 2~2.464 |
| 阿魏酸 | $A = 272.59C + 0.6417$ | 0.999 7 | 0.007 600~0.114 0 |
| 木犀草苷 | $A = 378.6C + 0.531$ | 1.000 0 | 0.036 16~0.542 4 |
| 迷迭香酸 | $A = 177.72C - 0.3131$ | 0.999 8 | 0.051 84~0.777 6 |
| 丹酚酸 B | $A = 189.47C - 0.8268$ | 0.999 9 | 0.287 0~4.305 |
| 黄芩苷 | $A = 161.53C - 1.8679$ | 0.999 8 | 0.240 0~3.600 |
| 隐丹参酮 | $A = 386.19C - 1.9196$ | 1.000 0 | 0.020 85~0.312 8 |

2.5 专属性试验: 取阴性供试品溶液过 0.45 μm 滤膜后, 按上述色谱条件进样 10 μL, 结果表明阴性样品对所测组分无干扰。

2.6 检测限: 取混合对照品溶液逐步稀释后, 注入高效液相色谱仪, 以峰高为基线噪音 3 倍计, 丹参素、阿魏酸、木犀草苷、迷迭香酸、丹酚酸 B、黄芩苷和隐丹参酮的最低检测限分别为 4.6、0.18、0.35、0.74、6.8、6.3、0.52 ng。

2.7 精密度试验: 取对照品溶液, 按上述色谱条件各取 10 μL 注入高效液相色谱仪, 连续进样 6 次, 丹参素、阿魏酸、木犀草苷、迷迭香酸、丹酚酸 B、黄芩苷和隐丹参酮的峰面积 RSD 分别为 0.76%、

0.65%、0.28%、0.79%、1.2%、1.0%、0.39%。

2.8 重现性试验: 取批号为 251151 样品, 制备 5 份供试品溶液, 各进样 10 μL, 测得丹参素、阿魏酸、木犀草苷、迷迭香酸、丹酚酸 B、黄芩苷和隐丹参酮的平均质量分数分别为 1.010 mg/片 (RSD= 0.32%)、0.014 72 mg/片 (RSD= 1.2%)、0.082 69 mg/片 (RSD= 0.67%)、0.146 2 mg/片 (RSD= 0.75%)、1.022 mg/片 (RSD= 1.1%)、7.573 mg/片 (RSD= 0.37%)、0.034 52 mg/片 (RSD= 0.86%)。

2.9 稳定性试验: 取批号为 251151 的供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、16、24 h 进样 10 μL, 丹参素、阿魏酸、木犀草苷、迷迭香酸、丹酚酸 B、黄芩苷和隐丹参酮峰面积的 RSD 分别为 1.7%、1.3%、0.86%、1.4%、1.8%、1.1%、1.6%。表明供试品溶液 24 h 内稳定。

2.10 回收率试验: 取批号 251151 样品细粉 0.1 g, 精密称定, 平行 3 份, 分别加入混合对照品溶液 9.6、8.8、8.0 mL, 制备供试品溶液, 测定, 计算加样回收率, 结果丹参素、阿魏酸、木犀草苷、迷迭香酸、丹酚酸 B、黄芩苷和隐丹参酮的回收率分别为 97.1%、96.7%、99.2%、96.4%、98.2%、99.6%、100.2%, RSD 分别为 1.5%、1.4%、1.3%、1.7%、1.3%、0.68%、0.53%。

2.11 样品测定: 按供试品溶液制备方法制备湿毒清片样品溶液, 按上述色谱条件进样, 用工作曲线法计算质量分数, 结果见表 2。

表 2 湿毒清片中 7 种有效成分的测定结果 (n= 4)

Table 2 Determination of seven components in Shiduqing Tablets (n= 4)

| 批号 | 丹参素/ | | 阿魏酸/ | | 木犀草苷/ | | 迷迭香酸/ | | 丹酚酸 B/ | | 黄芩苷/ | | 隐丹参酮/ | |
|--------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|
| | (mg·片 ⁻¹) | RSD/ % |
| 251151 | 1.015 | 0.32 | 0.014 77 | 1.2 | 0.082 96 | 0.67 | 0.145 5 | 0.75 | 1.023 | 1.10 | 7.609 | 0.37 | 0.034 04 | 0.86 |
| 251200 | 1.004 | 1.30 | 0.015 21 | 1.0 | 0.083 56 | 0.83 | 0.141 7 | 1.20 | 1.016 | 0.79 | 7.195 | 0.90 | 0.033 95 | 1.40 |
| 251204 | 1.008 | 0.85 | 0.015 15 | 1.1 | 0.083 29 | 1.00 | 0.142 3 | 0.54 | 1.019 | 1.40 | 7.026 | 0.72 | 0.034 26 | 1.10 |

3 讨论

3.1 检测波长的选择: 经二极管阵列检测器分别对7种成分进行全波长扫描得知, 丹参素的特征吸收波长为226、280 nm, 阿魏酸的特征吸收波长为236、322 nm, 木犀草苷的特征吸收波长为255、350 nm, 迷迭香酸的特征吸收波长为230、330 nm, 丹酚酸B的特征吸收波长为255、286 nm, 黄芩苷的特征吸收波长为278 nm, 隐丹参酮的特征吸收波长为264 nm, 而丹参素的截止波长为300 nm, 为兼顾各组分的检测信号强度和检测灵敏度, 本试验选择250 nm作为检测波长。

3.2 流动相的选择: 湿毒清片是由九味中药组成的复方制剂, 化学成分复杂, 且各味中药的活性成分的极性差异较大。本试验曾分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%磷酸、乙腈-0.4%磷酸等溶剂系

统, 分离结果均不理想。而采用甲醇-1%冰醋酸作流动相, 进行梯度洗脱可将7个组分完全分离, 且基线稳定, 峰形好, 实验结果满意。

3.3 提取条件的考察: 为了从湿毒清片中最大限度地提取出各种有效成分, 实验对比了不同提取方法(超声、回流和索氏提取)、不同提取溶剂(甲醇、50%甲醇、75%甲醇、75%乙醇、水)对湿毒清片的提取效果, 结果表明, 用75%甲醇回流提取的有效成分多、效率高, 回流3 h即能提取完全。

参考文献:

- [1] 李思明, 何俊兵, 王辉, 等. 湿毒清胶囊化学成分与药理作用研究进展[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(4): 220-224
- [2] 乐仁昌. 湿毒清胶囊中阿魏酸的含量测定[J]. 海峡药学, 2008, 20(5): 30-32
- [3] 黄诗远, 陈凤, 姚红霞. RP-HPLC法测定湿毒清胶囊中丹酚酸B和黄芩苷的含量[J]. 中国药师, 2008, 11(6): 663-664
- [4] 陈慧珍. 当归的研究进展[J]. 海峡药学, 2008, 20(8): 83-84

正交试验优选全蝎盐制工艺的研究

徐连明, 邵杰, 付小环, 杨妍妍, 杨璐*

(江苏康缘药业股份有限公司, 江苏连云港 222001)

摘要: 目的 研究不同炮制条件对全蝎乙醇提取物中总氮的影响, 为确定合理的加工方法提供依据。方法 以氯化钠水溶液用量、氯化钠水溶液浓度、煮沸时间为因素, 采用正交试验法对全蝎炮制方法进行考察, 以醇浸出物、总氮为指标对炮制方法进行优选。结果 最佳工艺为加4倍量15%氯化钠水溶液, 煮沸5 min。结论 所炮制之全蝎有效成分破坏少, 保证了药材的质量。

关键词: 全蝎; 炮制; 总氮; 正交试验

中图分类号: R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)11-1811-02

全蝎为钳蝎科动物东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch 的干燥全体, 性味辛、平, 有毒, 具有息风镇痉、攻毒散结、通络止痛等功效。全蝎的炮制方法按《中国药典》2010版一部规定为“春末至秋初捕捉, 除去泥沙, 置沸水或沸盐水中, 煮至全身僵硬, 捞出, 置通风处, 阴干”^[1]。此法对用盐比例、氯化钠水溶液用量及加工时间长短, 都未作具体规定, 导致市场上全蝎质量参差不齐。市场上全蝎的含盐量为30.14%~38.75%, 含水量为29.78%~40.16%, 使得全蝎用量不准确, 有效成分受到损失而影响临床疗效^[2-4]。为提高全蝎品质, 本实验采用正交试验法, 以氯化钠水溶液用量、氯化钠水溶液浓度、煮沸

时间为因素, 以醇浸出物、总氮为指标对全蝎炮制方法进行考察, 以确定最佳的炮制工艺。

1 材料与仪器

全蝎收购自山东省淄博全蝎养殖场, 经连云港市药品检验所王统康主任药师鉴定为钳蝎科动物东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch。YHG-50远红外快速恒温干燥箱。试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 样品制备: 将活全蝎去除泥土沙石等杂质, 投入清水中浸泡2 h, 使其吐出腹内容物, 然后洗净为生品, 备用。

2.2 正交试验设计: 以氯化钠溶液炮制全蝎, 影响

①收稿日期: 2010-04-29

基金项目: 国家科技部重大新药创制项目(2009ZX09313-032)

作者简介: 徐连明(1966-), 男, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向: 中药制剂的工艺与质量标准。

Tel: (0518)85521955 E-mail: lygxlm2006@163.com