

表3 方差分析

Table 3 Variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F值	P值
A	12.22	2	6.11	3.99	
B	827.12	2	413.56	270.30	$P < 0.01$
误差 e	6.1	4	1.53		

$$F_{0.05}(2,4)=6.94 \quad F_{0.01}(2,4)=18$$

2.6 验证试验:按最佳工艺搭配 A_3B_1 , 即 PEG 4000 为基质, 基质与药物配比 2:1, 90℃滴制, 冷却剂温度为 5℃进行试验, 结果丸重平均值为 0.056 2, 丸重变异系数为 3.59%, 溶散时限为 4.50 min ($n=3$)。

3 讨论

滴丸的成丸情况和质量受多种因素的影响, 本实验采用具量化指标的丸重变异系数、溶散时限以

及包括滴丸圆整度、硬度在内的外观质量评分 3 项指标评定工艺条件优劣, 使结果更可靠、合理。

本工艺制备简便, 显著提高难溶性黄芩苷和其他药物的溶出, 提高其生物利用度、减少服药剂量, 又可消除注射剂的不良反应。

References:

- [1] He F H, K Y. Advances of Shuanghuanglian in clinical application [J]. *Sichuan J Physiol Sci* (四川生理学杂志), 2001, 23 (1): 9-12.
- [2] Zhang W H. The present situation and its future of solid dispersion technique [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1989, 24 (3): 135-138.
- [3] Hou S X, Liao G T, Chen Y H. Study on optimal preparation techniques of Sinitang Dropping Pill with orthogonal design [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1993, 18 (5): 284-285.

HPLC 法测定山茛菪麝香膏中祖师麻甲素的含量

陈娟, 师彦平*

(中国科学院兰州化学物理研究所 甘肃省天然药物重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

山茛菪麝香膏收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》中药成方制剂第 2 册, 是由唐古特瑞香、山茛菪、麝香、干姜、乳香、没药等 9 味药加工制成的中药橡胶膏剂, 具有活血镇痛、祛风除湿的功能, 用于风湿痹痛, 关节炎、类风湿关节炎, 跌打损伤等症的疼痛。原标准只在检查项下规定了含膏量限度。唐古特瑞香为本方主药, 其主要成分祖师麻甲素具有镇痛、消炎、抑菌、抗血栓、抗凝、抑制中枢神经、降压、抗缺氧等多种药理作用, 其中镇痛、抗炎作用等均与本品功能主治相吻合, 因此, 选择祖师麻甲素作为控制本品内在质量的指标成分。祖师麻甲素的测定有薄层-紫外分光光度法^[1]、薄层扫描法^[2]和高效液相色谱法^[3,4]。本实验建立 HPLC 法测定本品中祖师麻甲素的方法, 具有分离效果好、灵敏、准确等优点, 可以为进一步控制该产品的质量提供方法, 也为中药橡胶膏剂中有效成分的测定提供一定的参考。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪, 包括 $\delta-600E$ 四元梯度泵、2996 二极管阵列检测器、Millieum²³ 色谱工作

站。祖师麻甲素对照品(中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 批号 900-200102)。山茛菪麝香膏(奇正制药有限公司, 批号为 20040201、20040202、20040203, 规格为 10 cm×7 cm/片), 不含唐古特瑞香山茛菪麝香膏阴性对照(奇正制药有限公司), 甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) (中国科学院大连化学物理研究所); 流动相: 甲醇-0.5%磷酸溶液 (30:70); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 室温; 检测波长: 325 nm; 进样量: 10 μ L。在上述条件下, 祖师麻甲素和样品中其他组分色谱峰达到基线分离, 祖师麻甲素与其相邻色谱峰的分度度大于 1.5; 以祖师麻甲素峰计算理论塔板数为 13 200, 拖尾因子为 1.08。同时取阴性对照溶液进样, 结果阴性对照在祖师麻甲素位置处无相应峰出现, 见图 1。

2.2 线性范围的考察: 精密称取祖师麻甲素对照品 4.90mg, 置 25mL 量瓶中, 加 85% 甲醇溶液溶解并

收稿日期: 2004-06-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20475057); 中国科学院“百人计划”基金资助项目

作者简介: 陈娟 (1975—), 女, 湖南邵阳人, 中国科学院兰州化学物理研究所博士研究生, 研究方向为天然药物分析化学。

* 通讯作者 Tel: (0931) 4968208 E-mail: shiyp@lzb.ac.cn

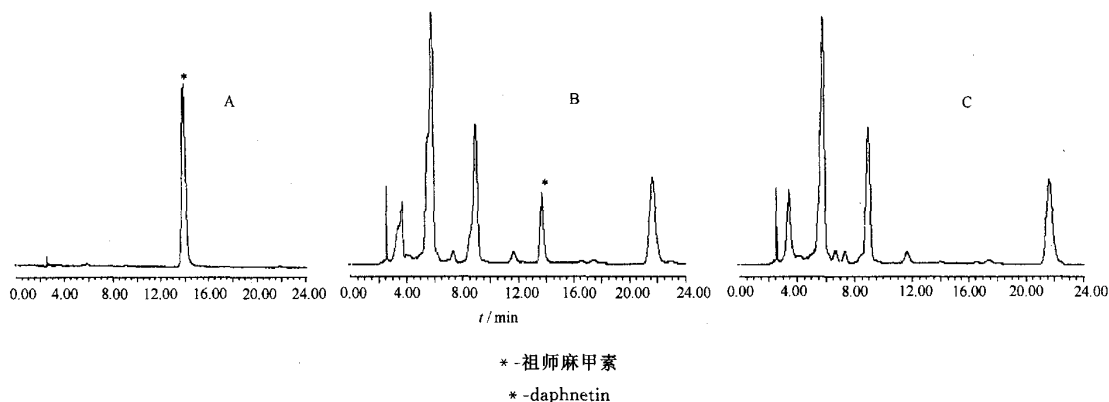


图 1 祖师麻甲素对照品(A)、山莴苣麝香膏(B)和阴性对照(C)的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC chromatograms of daphnetin reference substance (A), Shanlangdang Shexiang Adhesive Plaster (B), and negative sample (C)

稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液。精密吸取 5 mL,用 85%甲醇溶液作等倍梯度稀释,得 98.49、24.5、12.25、6.125、3.062 5、1.531 25 $\mu\text{g/mL}$ 的稀释液。分别精密吸取对照品贮备液和稀释液各 10 μL 注入高效液相色谱仪,测定祖师麻甲素峰面积值。以峰面积值(A)为纵坐标,进样量(C)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程: $A = 3.662 \times 10^7 C + 4.770 \times 10^4$, $r = 0.9998$ 。结果表明,祖师麻甲素在 0.015~1.96 μg 时峰面积值与进样量有良好的线性关系。按信噪比 $S/N=3$,最低检出限为 0.002 μg 。

2.3 供试品溶液及阴性对照溶液的制备:取本品 4 片,每片剪成 8 小块,除去盖衬,置 250 mL 圆底烧瓶中,用 85%乙醇溶液水浴回流 2 次,每次 1 h,合并提取液,水浴蒸干,残渣置 50 mL 量瓶中,用 85%乙醇溶液溶解并加至刻度,摇匀,置冰箱(0~4 $^{\circ}\text{C}$)中冷藏过夜,滤过,弃去初滤液。精密吸取续滤液 25 mL,水浴蒸干,残渣先用 30 mL 85%甲醇溶液分次溶解,溶解液移入分液漏斗中,不溶部分再用 30 mL 环己烷微热使溶解,并入同一分液漏斗中,振摇萃取,分取下层醇液,环己烷层用 10 mL 85%甲醇溶液洗涤,合并下层醇液,水浴蒸干,残渣置 25 mL 量瓶中,用 85%甲醇溶解并加至刻度,摇匀,滤过,弃去初滤液,取续滤液作为供试品溶液。取不含唐古特瑞香的山莴苣麝香膏,同法制成阴性对照溶液。

2.4 精密度试验:精密吸取祖师麻甲素对照品溶液(24.5 $\mu\text{g/mL}$) 10 μL ,重复进样 5 次,测定祖师麻甲素峰面积值,计算,得其 RSD 为 1.2%。

2.5 稳定性试验:取供试品溶液(批号 20040201),分别于 0、4、8 h,分别进样 10 μL ,测定祖师麻甲素峰面积值,计算,得其 RSD 为 1.4%。表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.6 重现性试验:同一批样品(批号 20040201),分别制备 5 份供试品溶液,进样 10 μL ,测定峰面积值并计算祖师麻甲素的含量为 0.31 $\text{mg}/100 \text{ cm}^2$, RSD 为 3.6%。

2.7 加样回收率试验:取批号为 20040201 的样品,分别加入祖师麻甲素对照品适量,按供试品溶液的制备和上述色谱条件测定,计算回收率。结果见表 1。

表 1 加样回收率试验

Table 1 Result of recovery test

取样量/片	样品中祖师麻甲素的量/mg	加入祖师麻甲素量/mg	测得祖师麻甲素量/mg	回收率/%	均值/%	RSD/%
2	0.43	0.60	0.58	96.7		
2	0.43	0.53	0.50	94.3	96.9	2.5
4	0.87	0.74	0.71	95.9		
4	0.87	0.51	0.49	96.1		
4	0.87	1.02	1.04	102.0		
4	0.87	1.09	1.06	97.2		
4	0.87	0.97	0.93	95.9		

2.8 样品测定:分别精密吸取祖师麻甲素对照品溶液和供试品溶液各 10 μL ,注入高效液相色谱仪,记录色谱图,按峰面积值用外标法计算含量,结果见表 2。

表 2 山莴苣麝香膏中祖师麻甲素的测定结果 ($n=2$)

Table 2 Daphnetin in Shanlangdang Shexiang Adhesive Plaster ($n=2$)

批号	祖师麻甲素/ $[\text{mg} \cdot (100 \text{ cm}^2)^{-1}]$
20040201	0.31
20040202	0.36
20040203	0.38

3 讨论

3.1 流动相的选择:选用了甲醇-水,甲醇-水-冰醋酸,甲醇-水-磷酸体系,并以不同配比进行试验,结果体系中醋酸、磷酸的存在均可抑制祖师麻甲素结

构中酚羟基的解离,使峰形得以改善,但磷酸效果更好,峰形尖锐对称,并且随着甲醇体积分数的降低(60%→20%),祖师麻甲素的保留时间增加,并与杂质峰的分度度增大。当甲醇体积分数降低到30%时,祖师麻甲素与杂质峰达到基线分离。为获得好的分离效果和短的分度时间,最终选定流动相为甲醇-0.5%磷酸溶液(30:70)。

3.2 检测波长的选择:采用二极管阵列检测器对进样后的祖师麻甲素对照品进行扫描,结果祖师麻甲素在260、325 nm处有最大吸收波长,而365 nm处的吸光度远大于260 nm处的吸光度。为获得更高的灵敏度,选择325 nm作为检测波长。

3.3 基质去除方法的考察:中药橡胶膏剂,基质难于去除,因此,在采用HPLC法测定时,样品溶液的处理是关键。采用85%乙醇加热回流提取的方法,虽可使待测成分与橡胶基质分离,但在加热条件下,有一些辅料成分会被提取出来而混入提取液。因此,采用乙醇提取液经冰箱静置,使部分基质在低温下凝固析出,但仍残留有部分基质,需进一步除去。进一步采用85%甲醇-环己烷进行液液萃取,即可有

效除去基质,使溶液澄清,满足液相分析的要求。

3.4 提取条件的确定:文献报道的提取溶剂多为乙醇和85%甲醇,本实验考察了甲醇、85%甲醇、50%甲醇、乙醇、85%乙醇和50%乙醇的提取效果,结果85%乙醇对祖师麻甲素的提取率最高。同时,进行了提取次数的考察,样品分别加热回流提取1、2、3、4次(每次1 h),结果加热回流2次后,祖师麻甲素的含量不再增加。因此,提取采用85%乙醇加热回流提取2次,每次1 h。

References:

- [1] *Standards for New Drugs in Due Forms, Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Health, P. R. China* (中华人民共和国卫生部药品标准·新药转正标准) [S]. Vol 8. 1996.
- [2] Wang L X, Feng X R, Zhang B C. Determination of daphnetin in *Daphne tangutica* by TLC scanning [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1986, 17 (6): 13-14.
- [3] Wang X Y, Di L J, Liu J R. HPLC determination of daphnetin in Zushima Tablets [J]. *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2003, 17 (4): 232-233.
- [4] Egan D A, Duff C, Jordan L, et al. High performance liquid chromatographic determination of esculetin and daphnetin in urine and plasma [J]. *Chromatographia*, 2003, 58 (9/10): 649-652.

HPLC 法测定银杏叶片中银杏内酯的含量

张雪琴^{1,2}, 周欣^{1*}, 袁牧¹, 王道平¹, 彭炳先^{1,2}

(1. 贵州省、中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵州大学 精细化工中心, 贵州 贵阳 550025)

银杏萜类内酯是银杏叶中除黄酮类化合物外的另一组具有较强生物活性的化合物,即银杏萜内酯A、B、C、M、J和白果内酯。现代药理研究表明,银杏内酯成分除具有扩张冠状动脉血管、增加脑血流量、改善脑营养及抗菌作用外,还有较强的血小板活化因子抑制作用^[1,2],因此具有较高的研究开发价值。文献报道测定银杏叶提取物中的银杏内酯成分有HPLC-UV法^[3]、HPLC-ELSD法^[4]、HPLC-RID法^[5]、GC-MS法^[6]及HPLC-MS法^[7]等,但对银杏叶片中银杏内酯的测定未见报道,故本实验采用HPLC-RID法对不同厂家生产的银杏叶片中银杏内酯含量进行测定,同时考察了银杏内酯的提取方法,给银杏叶片生产厂家提供了质量控制依据。

1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪,甲醇为色谱纯,水为乐百氏纯净水,试剂均为分析纯,银杏叶片从各大药店购买;银杏内酯A、B、C及白果内酯对照品购自中国药品生物制品检定所,批号分别为0862-200004、0863-9902、0864-9902和0865-9601。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为Hypersil ODS2 (250 mm×4.0 mm, 5 μm);流动相:23% CH₃OH水溶液;体积流量:1.0 mL/min;柱温:25℃;进样量:10 μL;示差折光检测器(RID)。理论塔板数以银杏内酯B计算不低于5 000。色谱图见图1。

2.2 对照品溶液的制备:分别称取经减压干燥过夜

收稿日期:2004-06-05

基金项目:贵阳市科学技术计划项目(2002-24);贵州省优秀青年科技人才培养项目(2003-0311)

作者简介:张雪琴(1978—),女,江苏泰兴人,硕士研究生,从事药物分析研究。E-mail: zqx_7812@163.com

* 通讯作者 Tel: (0851) 3806327 E-mail: alice9800@sina.com.cn