

内在质量最不稳定,弱于S2和S3样品。以上结果综合表明,茵栀黄注射液虽然同为同一药厂的产品,但是生产时间、生产批次等因素对产品的抗菌作用和内在质量和稳定性存在一定的影响。为此,笔者建议,针对注射液的不良反应和事件频发的情况,药厂在生产产品应严格控制生产过程、生产环节及其相关因素,且产品在出厂时应严格检查,确保安全。

本实验采用微量量热法,以金黄色葡萄球菌为模式生物,细菌的生长代谢曲线和定量热力学参数为指标,结合统计学分析,比较7批茵栀黄注射液的抗菌作用和内在质量差异,为该注射液的质量一致性和稳定性评价提供了方法和模式参考,有望为中药注射剂的安全使用提供技术指导。

参考文献:

- [1] 任永申,张萍,杜晓曦,等. 基于HPLC指纹图谱的茵栀黄注射液质量一致性和稳定性研究[J]. 中草药, 2008, 39(6): 837-841.
- [2] 陈辉扬,陈军,温平康. 茵栀黄注射液的药理作用与临床应用评价[J]. 药品评价, 2005, 2(2): 122-124.
- [3] 陈辉扬,陈军,吴泰相,等. 茵栀黄注射液治疗黄疸型病毒性肝炎临床研究的方法学质量评价[J]. 中国药房, 2005, 16(13): 1031-1033.
- [4] Kong W J, Zhao Y L, Shan L M, et al. Investigation on the spectrum-effect relationships of EtOAc extract from *Radix Isatidis* based on HPLC fingerprints and microcalorimetry[J]. *J Chroma-*

togr B, 2008, 871: 109-114.

- [5] 武彦舒,张倩,金城,等. 清开灵注射液生物热活性指纹图谱的初步研究[J]. 中国药学杂志, 2009, 44(6): 471-474.
- [6] 张雅铭,鄢丹,张萍,等. 基于化学指纹图谱-生物热活性图谱关联检测的注射用双黄连冻干粉质量控制方法的初步研究[J]. 药学报, 2010, 45(1): 93-97.
- [7] Wadso I. Microcalorimetric techniques for characterization of living cellular systems-Will there be any important practical application[J]. *Thermochim Acta*, 1995, 269-270: 337-350.
- [8] Kong W J, Jin C, Xiao X H, et al. Comparative study of effects of two bile acid derivatives on *Staphylococcus aureus* by multiple analytical methods[J]. *J Hazard Mater*, 2010, 179(1-3): 742-747.
- [9] Xie C L, Tang H K, Song Z H, et al. Microcalorimetric study of bacterial growth[J]. *Thermochim Acta*, 1988, 123: 33-41.
- [10] 胡良平. Windows SAS 6. 12&8.0 实用统计分析教程[M]. 北京:军事医学科学出版社, 2001.
- [11] 王伽伯,马永刚,金城,等. 对应分析在大黄炮制减毒“量-毒”规律研究中的应用[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(19): 2498-2502.
- [12] Kong W J, Wang J B, Jin C, et al. Effect of emodin on *Candida albicans* growth investigated by microcalorimetry combined with chemometric analysis[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83: 1183-1190.
- [13] 任永申,鄢丹,张萍,等. 基于微量量热法测定的板蓝根红细胞凝集活性研究[J]. 药学报, 2010, 45(8): 1028-1034.
- [14] 任永申. 基于化学-生物指纹图谱分析的中药注射剂不良反应早期快速筛查方法研究[D]. 成都中医药大学, 2008.
- [15] 任永申,张萍,鄢丹,等. 茵栀黄注射液对体外CCl₄致肝细胞损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 115-121.

藏药八味秦皮丸中秦皮甲素、秦皮乙素和麝香酮的定量测定

张苏阳, 陈佳正, 李晓英, 韩泳平*

(西南民族大学少数民族药物研究所, 四川 成都 610041)

摘要:目的 建立八味秦皮丸(秦皮、针铁矿、草莓、多刺绿绒蒿、寒水石、美丽风毛菊、朱砂、麝香)质量标准中的定量测定项。方法 采用高效液相色谱法测定秦皮甲素和秦皮乙素,色谱柱为依利特C₁₈柱(4.6mm×250mm);流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(27:73);体积流量为1.0 mL/min;柱温为室温;检测波长为344.4 nm。采用气象色谱法测定麝香酮,色谱柱为HP-5毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);载气为氮气(99.99%);检测器温度为250℃;分流比为40:1;程序升温150℃开始以10℃/min速度升温至170℃保持4 min,然后以15℃/min速度升温至230℃保持5 min。结果 秦皮甲素、秦皮乙素进样量分别在0.200~2.502 μg、0.120~1.503 μg范围内线性关系良好($r=0.9999$),平均回收率分别为100.71%、100.38%,RSD分别为0.65%、0.87%($n=6$);麝香酮进样量在15.20~152.0 μg范围内线性关系良好($r=0.9999$),平均回收率为99.27%,RSD为0.74%($n=6$)。结论 该方法灵敏、准确、专属性强,可用于八味秦皮丸中秦皮甲素、秦皮乙素、麝香酮的定量测定。

收稿日期:2011-01-06

基金项目:国家外专局项目(Y-2010-12);四川省中医药管理局资助项目(2010-72)

作者简介:张苏阳(1984—),女,硕士生,主要从事天然药物化学研究。

* 通信作者:韩泳平,教授,硕士生导师。Tel:(028)85522315, E-mail:yphan65@tom.com

关键词:八味秦皮丸;秦皮甲素;秦皮乙素;麝香酮;HPLC;GC

中图分类号:R927.2

文献标志码:A

文章编号:1001-1528(2011)06-0984-05

Determination of aesculin , aesculetin and muscone in Bawei Qinpi Pill

ZHANG Su-yang , CHEN Jia-zheng , LI Xiao-ying , HAN Yong-ping*

(Ethnic Pharmaceutical Institute of Southwest University for Nationalities , Chengdu 610041 , China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the determination methods for aesculin , aesculetin and muscone in Bawei Qinpi Pill (*Fraxini Cortex* , *Goethite* , *Fragaria orientalis* Lozinsk , *Meconopsis horridula* Hook. f. ex Thoms. , *Gypsum Sausurea superba* Anthony f. *Pygmaea* Anthony , *Cinnabaris* , *Moschus*). **METHODS** Aesculin and aesculetin in Bawei Qinpi Pill were determined by HPLC. The sample was separated on Elite C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm) using methanol-0.1% phosphoric acid (27 : 73) as a mobile phase at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was room temperature and the detection wavelength was set at 344.4 nm. Muscone in Bawei Qinpi Pill was determined by GC on the column of HP-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm); carrier gas was nitrogen (99.99%); the detector temperature was at 250 °C; injector temperature was at 220 °C; split ratio was 40 : 1; the initial temperature was started at 150 °C and raised to 170 °C at the speed of 10 °C/min and maintained for 4 min , then the temperature was raised to 230 °C at the speed of 15 °C/min and maintained for 5 min. **RESULTS** The linear ranges of aesculin and aesculetin fell within 0.200-2.502 μg and 0.120-1.503 μg ($r=0.9999$); the average recoveries were 100.71% and 100.38% respectively (RSD was 0.65% , $n=6$). The linear range of muscone fell within 15.20-152.0 μg ($r=0.9999$) and the average recovery was 99.27% (RSD was 0.87% , $n=6$). **CONCLUSION** The method is sensitive , accurate and specific and can be used to determine aesculin , aesculetin and muscone in Bawei Qinpi Pill.

KEY WORDS: Bawei Qinpi Pill; aesculin; aesculetin; muscone; HPLC; GC

八味秦皮丸由秦皮、针铁矿、草莓、多刺绿绒蒿、寒水石(制)、美丽风毛菊、朱砂、麝香等组成,为藏药常用处方,具有接骨、消炎、止痛的功效,用于骨折、骨髓炎^[1]。其现行质量标准中仅有理化与薄层鉴别,缺乏指标性成分的定量测定,难以有效地综合评价其内在质量。秦皮为本方中主药,现代研究证明,秦皮中的主要有效成分秦皮甲素和秦皮乙素^[2-4]具有明显的抗炎镇痛作用^[5]。麝香对非特异性炎症亦具有显著抗炎效果^[6-8]。本实验以方中主药秦皮中的秦皮甲素和秦皮乙素以及麝香中的麝香酮为指标成分,分别建立基于 HPLC 和 GC 的定量测定法,以控制制剂质量,取得了较为满意的结果。

1 仪器与试剂

Waters 2695 型高效液相色谱仪,2996 PDA 检测器;Agilent 7890A 气相色谱仪,氢火焰离子化检测器(FID);METTLER TOLEDO AE240 电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

八味秦皮丸(自制,0.25 g 每丸),秦皮甲素对照品(购于中国药品生物制品检定所 批号 0740-

200104,供定量测定用),秦皮乙素对照品(购于中国药品生物制品检定所 批号 110741-200506,供定量测定用),麝香酮对照品(购于中国药品生物制品检定所 批号 110719-200511,供定量测定用)。甲醇和乙醇为色谱纯,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

HPLC 条件:色谱柱为依利特 C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm);流动相 甲醇-0.1% 磷酸溶液(27 : 73);体积流量 1.0 mL/min;柱温 室温;检测波长 344.4 nm。

GC 条件:采用 HP-5 毛细管柱(5%-二苯基聚硅氧烷共聚物色谱柱)30 m × 0.25 mm × 0.25 μm;载气为氮气(99.99%);检测器温度为 250 °C;进样口温度为 220 °C;分流比为 40 : 1;程序升温 150 °C 开始以 10 °C/min 速度升温至 170 °C 保持 4 min,然后以 15 °C/min 速度升温至 230 °C 保持 5 min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取秦皮甲素对

照品 10.01 mg、秦皮乙素对照品 10.02 mg, 置 50 mL 量瓶中, 分别加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取秦皮甲素 5 mL、秦皮乙素 3 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得秦皮甲素和秦皮乙素的混合对照品溶液^[9] (含秦皮甲素 0.100 1 mg/mL, 秦皮乙素 60.1 μ g/mL)。精密称取麝香酮对照品 15.20 mg 置于 100 mL 量瓶中, 加无水乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得麝香酮对照品溶液 (0.152 0 mg/mL)。

2.2.2 样品溶液的制备 精密称取本品 1.25 g, 置 50 mL 蒸馏瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 水浴上加热回流 0.5 h, 放冷, 称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为 HPLC 测定样品溶液。精密称取本品 5.04 g, 加入无水乙醇 15 mL, 密塞, 振摇, 放置 1 h, 滤过, 取续滤液作为

GC 测定样品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 取缺秦皮阴性样品 1.25 g, 按照 HPLC 测定样品溶液的制备方法制备缺秦皮的阴性溶液。取缺麝香阴性样品 5.23 g, 按照 GC 测定样品溶液的制备方法制备缺麝香的阴性溶液。

2.3 系统适应性实验

按 2.2 项下操作, 分别取秦皮甲素和秦皮乙素混合对照品溶液、样品溶液及阴性对照溶液各 10 μ L, 注入液相色谱仪, 按色谱条件进行分析, 结果在与对照品峰保留时间一致的位置上, 样品溶液的秦皮甲素和秦皮乙素峰峰形良好, 理论板数按秦皮乙素计算不低于 5 000, 秦皮甲素和秦皮乙素与相邻峰的分度均大于 1.5, 阴性对照无干扰峰。色谱图见图 1。

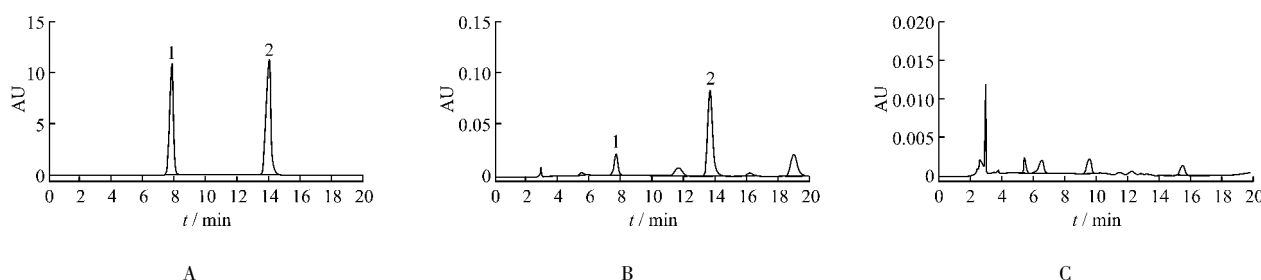


图1 HPLC 色谱图

A. 秦皮甲素和秦皮乙素混合对照品 B. 样品 C. 缺秦皮阴性样品 1. 秦皮甲素 2. 秦皮乙素

Fig.1 HPLC chromatograms

A. reference substances of aesculin and aesculetin B. sample C. negative sample without *Fraxini Cortex* 1. aesculin 2. aesculetin

按 2.2 项下操作, 分别取麝香酮对照品溶液、样品溶液及阴性对照溶液各 1 μ L, 注入气相色谱仪, 按色谱条件进行分析, 结果在与对照品峰保留时间

一致的位置上, 样品溶液的麝香酮峰峰形良好, 理论板数以麝香酮峰计不低于 3 000, 与相邻组分能够达到完全分离, 阴性对照无干扰峰。色谱图见图 2。

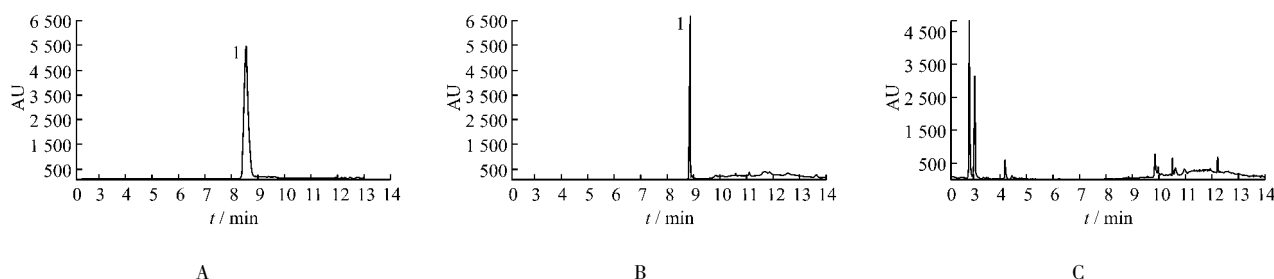


图2 GC 色谱图

A. 麝香酮对照品 B. 样品 C. 缺麝香酮阴性样品 1. 麝香酮

Fig.2 GC chromatograms

A. reference substance of muscone B. sample C. negative sample without moschus 1. muscone

2.4 线性关系考察

按 2.2.1 项下操作, 精密量取秦皮甲素和秦皮乙素的混合对照品溶液 2、4、6、8、15、25 μ L 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图。

按 2.2.1 项下操作, 精密量取麝香酮对照品溶液 1、2、4、6、10 mL 分别置于 10 mL 量瓶中, 加无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 分别取 1 μ L 注入气相色谱仪, 记录色谱图。

分别以峰面积为纵坐标,进样体积为横坐标,将峰面积与进样体积进行线性回归,得各组分的回归方程,见表1。结果表明该方法在较大范围内线性关系良好。

表1 线性关系考察
Tab. 1 Linear correlation

组分	线性方程	相关系数(r)	线性范围/ μg
秦皮甲素	$Y = 190\ 936X - 45\ 671$	$r = 0.999\ 9$	0.200 ~ 2.502
秦皮乙素	$Y = 231\ 085X - 18\ 991$	$r = 0.999\ 9$	0.120 ~ 1.503
麝香酮	$Y = 1\ 000\ 000X - 210\ 914$	$r = 0.999\ 9$	15.20 ~ 152.0

2.5 精密度试验

按2.2.1项下操作,精密量取秦皮甲素和秦皮乙素混合对照品溶液10 μL ,重复进样5次,测得秦皮甲素峰面积的RSD为0.80%,秦皮乙素峰面积的RSD为0.47%。结果表明精密度良好。

按2.2.1项下操作,精密量取麝香酮对照品溶液1 μL ,重复进样5次,测得麝香酮峰面积的RSD为0.68%。结果表明精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一批样品,精密称取5份,按2.2.2项下方法制备样品溶液,分别在高效液相色谱仪上进样10 μL ,记录峰面积,计算质量分数。结果秦皮甲素的平均质量分数为0.399 3 mg/g, RSD为0.86%;秦皮乙素的平均质量分数为0.972 1 mg/g, RSD为1.21%,表明重现性良好。

取同一批样品,精密称取5份,按2.2.2项下方法制备样品溶液,分别在气相色谱仪上进样1 μL ,记录峰面积,计算质量分数。结果麝香酮的平均质量分数为95.837 4 $\mu\text{g/g}$, RSD为0.93%,表明重复性良好。

2.7 稳定性试验

取样品溶液,室温放置,分别在0、2、4、8、12 h取样10 μL 在高效液相色谱仪上进样,记录色谱图中秦皮甲素和秦皮乙素峰面积,计算其RSD分别为0.55%、0.30%。结果表明样品溶液在12 h内稳定,满足测定要求。

取样品溶液,室温放置,分别在0、2、4、8、12 h取样1 μL 在气相色谱仪上进样,记录色谱图中麝香酮峰面积,计算其RSD为0.84%。结果表明样品溶液在12 h内稳定,满足测定要求。

2.8 加样回收试验

精密称取已测定秦皮甲素和秦皮乙素量的样品约0.5 g,6份,分为3组分别精密加入对照品溶液秦皮甲素(0.201 6 mg/mL) + 秦皮乙素(0.204 8

mg/mL)0.8 mL + 2 mL、1 mL + 1.5 mL、1.2 mL + 3 mL,按上述样品制备方法和色谱条件,制备加样回收样品溶液并注入高效液相色谱仪进行测定分析,计算回收率。结果见表2。

精密称取已测定麝香酮量的样品约2 g,6份,每两份各分别精密加入麝香酮对照品溶液(0.152 0 mg/mL)1 mL、1.3 mL、1.5 mL,按上述样品制备方法和色谱条件,制备加样回收样品溶液并注入气相色谱仪进行测定分析,计算回收率。结果见表2。

表2 加样回收试验结果 ($n = 6$)
Tab. 2 Result of recovery tests ($n = 6$)

成分	原有量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
秦皮甲素	0.214 7	0.161 3	0.376 6	100.36	100.71	0.65
	0.215 0	0.161 3	0.375 9	99.79		
	0.212 3	0.201 6	0.415 8	100.99		
	0.212 6	0.201 6	0.415 7	100.75		
	0.212 9	0.241 9	0.459 5	101.93		
	0.212 8	0.241 9	0.455 8	100.47		
秦皮乙素	0.494 2	0.409 6	0.906 4	100.65	100.38	0.87
	0.494 8	0.241 9	0.906 8	100.59		
	0.488 5	0.512 0	0.994 3	98.79		
	0.489 3	0.512 0	1.004 0	100.52		
	0.490 1	0.614 4	1.104 6	100.01		
	0.489 7	0.614 4	1.114 6	101.71		
麝香酮	0.191 5	0.152 0	0.342 7	99.47	99.27	0.74
	0.192 4	0.152 0	0.345 3	100.53		
	0.189 7	0.197 6	0.383 7	98.18		
	0.190 6	0.197 6	0.386 8	99.29		
	0.192 3	0.228 0	0.417 3	98.68		
	0.192 1	0.228 0	0.415 9	99.47		

2.9 样品测定

取3批次样品,按上述制备和测定方法进行进样测定,每份平行测定3次,按标准曲线法分别计算秦皮甲素、秦皮乙素以及麝香酮的质量分数,结果见表3。

表3 样品测定结果 ($n = 3$)

Tab. 3 Determination result of samples ($n = 3$)

批号	秦皮甲 素/(mg/g)	RSD /%	秦皮乙 素/(mg/g)	RSD /%	麝香酮 /($\mu\text{g/g}$)	RSD /%
090901	0.407 6	0.67	0.965 2	1.14	92.834 2	0.97
090902	0.401 3	0.79	0.978 3	0.94	94.210 9	0.93
090903	0.406 4	0.62	0.954 8	1.17	95.038 6	0.85

3 讨论

曾参照文献[10]选用甲醇-水作为秦皮甲素和秦皮乙素 HPLC 测定法流动相,但秦皮甲素有杂质峰干扰且秦皮乙素有拖尾现象,故选用文中流动相,能得到较理想的分离效果。对秦皮甲素和秦皮乙素对照品溶液进行光谱扫描,秦皮甲素的最高吸收波

长在 334 nm 处,秦皮乙素在 344.4 nm 处。综合考虑发现在 344.4 nm 处秦皮甲素和秦皮乙素的峰形均较好且无干扰,故选取 344.4 nm 作为检测波长。

麝香酮是麝香的主要活性成分之一,在参考文献[11-13]方法的基础上,选用文中 GC 条件对麝香酮进行测定,结果较为理想。《中国药典》一部“麝香”项下药材所指为天然麝香且规定含麝香酮不能低于 2.0%。本制剂中所用麝香为人工麝香,经测定,其质量分数均值为 2.3%,符合药典要求。

实验结果表明,HPLC 法同时测定八味秦皮丸中秦皮甲素和秦皮乙素以及 GC 法测定八味秦皮丸中麝香酮的方法简便、准确、重现性良好,能够为本品的质量控制提供方法学基础。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准[S]. 藏药第一册. 1995: 241.
- [2] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京:化学工业出版社, 2002:633-642.
- [3] 刘丽梅,陈琳,王瑞海,等. 秦皮化学成分的研究[J]. 中草药

2001,32(12):1073-1074.

- [4] 刘丽梅,王瑞海,陈琳,等. 秦皮化学成分的研究[J]. 中草药, 2003,34(10):889-890.
- [5] 方莲花,吕扬,杜冠华. 秦皮的药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2008,33(23):2732-2736.
- [6] 朱秀媛,徐桂芳,程雨时,等. 麝香的药理研究 II. 麝香及其有效成分的抗炎作用[J]. 药理学, 1988,23(6):406-410.
- [7] 孙荣,王任卿,于晓,等. 麝香的化学与药理研究进展[J]. 齐鲁药事, 2005,24(5):296-297.
- [8] 柳雪枚,李虹奇,肖宣,等. 天然麝香抗炎蛋白质的研究 I. Mu-a-1 的分离纯化及其部分性质的鉴定[J]. 动物学报, 1992,38(3):302-308.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2010 年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:254.
- [10] 季申,王柯. HPLC 法测定秦皮中秦皮甲素、秦皮乙素的含量[J]. 中成药, 1997,19(10):40-41.
- [11] 冉萍,喻强,罗佳. 气相色谱法测定小儿醒脑片中麝香酮的含量[J]. 儿科药科学杂志, 2005,11(2):52-53.
- [12] 唐洪梅,黄樱华,李得堂,等. 气相色谱法测定人工麝香中麝香酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007,13(9):4-5.
- [13] 周锐,王辉. 气相色谱法测定麝香祛痛搽剂中麝香酮的研究[J]. 时珍国医国药, 2010,21(7):1813-1814.

HPLC 法测定癌痛巴布剂中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱

李智勇¹, 邓亚利², 孙冬梅¹

(1. 广东省中医研究所 广东 广州 510095; 2. 华南农业大学制药工程系 广东 广州 510642)

摘要:目的 建立癌痛巴布剂(草乌、生天南星、赤芍、乳香、生姜,等)中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的定量测定方法。方法 色谱柱 Elipse CDB-C₁₈ (4.6mm×150mm 5μm)键合硅胶柱;流动相 乙腈-0.2%冰乙酸(加三乙胺调节 pH 值为 6.25) (29:71);体积流量 1.0 mL/min;柱温 30℃;检测波长 235 nm。采用 HPLC 法测定癌痛巴布剂中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱。结果 乌头碱、次乌头碱、新乌头碱分别在进样量 53.6~321.6 ng、145.2~871.2 ng、326.4~1598.4 ng 范围内线性关系良好, r 均为 1,在 8 h 内稳定性良好。平均加样回收率分别为 99.26% (RSD 为 1.83%)、99.71% (RSD 为 1.52%)、97.82% (RSD 为 1.15%) ($n=6$)。结论 该方法准确、简便、快速,可以用于定量测定癌痛巴布剂中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱。

关键词:癌痛巴布剂; HPLC; 乌头碱; 次乌头碱; 新乌头碱

中图分类号:R927.2

文献标志码:A

文章编号:1001-1528(2011)06-0988-04

Determination of aconitine, mesaconitine and hypaconitine in Aitong Cataplasms by HPLC

LI Zhi-yong¹, DENG Ya-li², SUN Dong-mei¹

收稿日期:2010-12-44

基金项目:广东省中医药局建设中医药强省科研经费资助项目(2008220)

作者简介:李智勇(1977—),男,主管中药师,医学博士,主要从事中药制剂及质量标准研究工作。Tel: (020) 83501292, E-mail: aalyz@

163.com