RP- HPLC 内标法测定牡丹皮中丹皮酚的含量

张 琪 蔡德富

【摘要】 目的 建立一种测定牡丹皮原药材中主要成分丹皮酚含量的新方法,在新方法中以醋酸地塞米松为内标准确测定了牡丹皮药材中的丹皮酚。方法 采用 Welchrom- C18 柱(250 mm× 4.6 mm,5μm),甲醇- 1% 冰醋酸(45∶ 55)为流动相,检测波长 254 nm,流速 1 ml/min,柱温为室温。结果 当丹皮酚的浓度在 25.40~ 250.40μg/ml 范围时,其峰面积与浓度的线性关系良好(r= 0.9999);平均回收率 100.2%,RSD= 2.5%。结论 该方法准确、可靠,可作为牡丹皮药材或含有牡丹皮的中成药建立对丹皮酚含量测定方法时应用。

【关键词】 反相高效液相色谱法 内标法 牡丹皮 丹皮酚

牡丹皮为毛茛科植物牡丹(Paeonia suffruticosa Andr)的干燥根皮,具有清热凉血、活血化瘀的作用,是一种常用的传统中药[1]。丹皮酚(paeonol)是牡丹皮中的最主要有效成分,现代药理研究表明具有抗动脉粥样硬化,加强对缺血组织的保护,促进微循环,增强免疫力,抗肿瘤,抗菌以及抑制皮肤色素生成等多种药理作用,现已被广泛应用于心绞痛、冠心病以及湿疹、荨麻疹、牛皮癣、银屑病等多种常见的皮肤疾病的治疗,疗效确切[2]。为了提高中药牡丹皮及其制剂质量控制的技术和水平,本文首次以醋酸地塞米松为内标测定了牡丹皮药材中的丹皮酚含量。

1 材料与方法

1.1 仪器与试药 Shimadzu 高效液相色谱仪(LC- 10AT VP 液相泵、SPD- 10A VP 紫外检测器),N20 10 色谱工作站。丹皮酚、醋酸地塞米松对照品由中国药品生物制品检定所提供,牡丹皮药材为市售,流动相所用甲醇为色谱纯,其它试剂均为分析纯,实验用水为二次重蒸水。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱: Welchrom- C18(4.6 mm× 250 mm,5μm)由上海月旭公司提供;流动相:甲醇- 1% 冰醋酸(45∶ 55);检测波长: 254 nm;流速: 1 ml/min;柱温:室温;进样量: 10 μl。

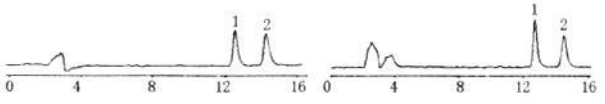
1.2.2 溶液配制

1.2.2.1 内标溶液 精密称取醋酸地塞米松适量,加流动相配制成 0.988 mg/ml 的溶液,作为内标储备液。

1.2.2.2 对照品溶液 精密称取丹皮酚对照品适量,加流动相配制成 0.508 mg/ml 的溶液,作为对照品储备液。精密吸取 1 ml 置 10 ml 量瓶中,加内标溶液 1 ml,用流动相定容,即得对照溶液。

1.2.2.3 牡丹皮供试品溶液 取牡丹皮粗粉 1.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 ml,密塞,摇匀,称定重量,超声处理 1.5 h,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 1 ml,置 10 ml 容量瓶中,加内标溶液 1 ml,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

1.2.3 系统适应性试验 取上述对照品、牡丹皮药材溶液,照 1.2.1 项下的色谱条件注入高效液相色谱仪,记录色谱图,见图 1。从图中可见,牡丹皮药材中无特殊干扰成分存在,主峰位置与对照品的色谱图基本一致。



A. 对照品; B. 牡丹皮药材; 1. 丹皮酚; 2. 醋酸地塞米松

图 1 高效液相色谱图

1.2.4 校正因子测定 取 1.2.2.2 项下的对照品溶液注入高效液相色谱仪,平行测定 5 次,按校正因子计算公式计算校正因子为 0.5451, RSD 为 0.2%。

1.2.5 线性试验 分别取 2.2.2 项下对照品储备液 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 ml 于 10 ml 量瓶,各加内标溶液 1 ml,加入流动相稀释成浓度分别为 25.40, 50.80, 100.16, 150.24, 200.32, 250.40 μg/ml 的系列溶液,进样。以丹皮酚峰面积与醋酸地塞米松峰面积的比值作为纵坐标(A),以丹皮酚浓度(μg/ml)为横坐标(C)绘制标准曲线,进行回归计算,得回归方程: A= 0.01860C- 0.0051, r= 0.9999,结果表明丹皮酚在 25.40~ 250.40 μg/ml 浓度范围内线性关系良好。

1.2.6 回收率试验 取已知含量的同批样品 6 份,分别加入对照品适量,按样品溶液制备项下制备,测定含量,计算回收率和 RSD,结果见表 1。从表中可以看出,各组平均回收率为 100.2%,RSD 为 2.5% (n = 6),表明本方法有良好的回收率。

表 1 回收率试验结果 (n = 6)

样品	药材丹皮酚含量/mg	丹皮酚加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	8.1	8.0	16.3	102.50		
2	8.3	8.0	16.1	97.50		
3	8.4	8.0	16.3	98.75	100.2	2.5
4	8.5	8.0	16.4	98.75		
5	8.0	8.0	16.3	103.75		
6	8.3	8.0	16.3	100.00		

1.2.7 精密度试验 取 1.2.2.2 项下对照品溶液 10 μl 注入高效液相色谱仪,连续测定 6 次,计算 RSD 为 0.4%,表明本法精密度较好。

1.2.8 重复性试验 照 2.2.3 项下方法制备牡丹皮样品溶液 5 份,各取 10 μl 注入高效液相色谱仪,计算 RSD 为 1.5%,表明本法重复性较好。

作者单位: 齐齐哈尔医学院:
邮 编 161006 收稿日期 2008- 12- 19

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Journal of Qiqihar Medical College, 2009, Vol. 30, No. 3

· 预防医学 ·

2002~ 2006 年烧伤感染创面菌群分布及其药物敏感性分析

钟书强　朴宏鹰　于景臣

【摘要】 分析烧伤感染创面菌群分布及细菌耐药性变迁,针对我院烧伤病人创面分泌物作细菌培养与鉴定,同时进行体外药物敏感试验,本文对我院 2002~ 2006 年间收住的 250 例住院病人烧伤创面进行了细菌学检验及抗菌药物敏感性分析。

【关键词】 烧伤　感染　耐药　敏感性

烧伤后创面及全身感染是病人致死的主要原因,控制感染是烧伤治疗过程中极其重要的环节。近年来,由于新型抗菌药物的广泛使用,耐药菌株不断增加,创面菌种分布及细菌对抗菌药物的敏感性亦发生了很大变化。

1　材料与方法

1.1　临床资料　2002~ 2006 年间Ⅱ、Ⅲ烧伤 30% 以上住院病人 250 例,其中男 150 例,女 100 例;年龄最大 67 岁,最小 1 岁,平均 32.1 岁;烧伤面积平均 52.5%,Ⅲ烧伤面积平均 25.2%。

1.2　检测方法　所有病人均分别于住院不同阶段用无菌棉拭子在创面采集标本,应用美国 BD 公司 BACTE C912 细菌培养仪做细菌培养,同时用该公司 auto secptor 全自动细菌鉴定仪及相配套的反应板做细菌鉴定和药敏试验,共选用抗生素 22 种。

2　结果

2.1　烧伤创面感染菌的菌种分布及变化

2.1.1　菌群检出情况　送检标本 700 份,阳性生长 572 株(81.7%),共计 21 种菌种,菌群分布见表 1。

2.1.2　主要分离菌种构成变化　1998~ 2002 年间,我院烧伤住院病人创面主要分离菌种包括金黄色葡萄球菌、铜绿假单孢菌、大肠埃氏菌、粪链球菌、克雷伯氏菌及念株菌等,五年来上述分离菌种的构成比发生了明显的变化。

2.2　药敏情况　在进行创面细菌培养和菌种鉴定的同时,先后选用 22 种抗菌药物作体外药敏试验及耐药菌株筛查。结果发现,病原菌对临床常用药物的敏感性发生了显著变化,耐药菌株亦不断增加,其中 MRSA 占 94.7%,大肠埃希氏菌及肺炎克雷伯菌 ESBLs 阳性菌株出现率分别为 18.95% 及 27.4%。革兰阳性球菌和革兰阴性杆菌主要分离菌种对临床常用药物的敏感性见表 2~ 3。

表 1　572 株烧伤创面分离菌的菌群分布

菌种	菌株	构成比(%)
金黄色葡萄球菌	193	33.74
粪链球菌	33	5.77
表皮葡萄球菌	19	3.32
铜绿假单孢菌	107	18.71
大肠埃希氏菌	43	7.52
克雷伯氏菌	33	5.77
阴沟肠杆菌	32	5.59
变形杆菌	22	3.85
硝酸盐阴性杆菌	12	2.10
白色念株菌	20	3.50
曲霉菌	8	1.40
其他	50	8.47
总计	572	100

3　讨论

3.1　菌种分布变化　近五年来,烧伤创面感染的类型和感染细菌的均有明显的变化。本文资料显示的烧伤创面感染菌共 21 菌种 572 株中,革兰阳性球菌 245 株,占 42.8%;革兰阴性杆菌 249 株,占 43.5%,两者大致持平,与此前曹国洲等[1]报道的革兰阳性球菌占 31.7% 的结果相比,革兰阳性球菌在烧伤创面分离菌种中的构成比有了明显上升。金黄色葡萄球菌为各分离菌之首,占 33.7%,已经超过了铜绿假单孢菌,且有逐年上升的趋势;铜绿假单孢菌居第二位,占 18.7%。造成上述结果的原因可能与近年来广泛使用对铜绿单孢等革兰阴性杆菌相对敏感的第三代头孢及碳青霉烯类抗生素有关,同时,也反映出临床对烧伤后期残余创面处理的重视,此时创面

作者单位:黑龙江省大庆市油田总医院烧伤整形科
邮　编　163000　收稿日期　2008- 11- 12

1.2.9　稳定性试验　照 1.2.2.3 项下方法制备牡丹皮样品溶液 1 份,在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 h 进样,计算 RSD 为 2.0%,表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2　样品测定

精密量取按"1.2.2.3"项下制备的三批供试品溶液和"1.2.2.2"项下制备的对照品溶液各 10.0 μl,注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定,内标法计算三批牡丹皮样品中丹皮酚含量,依次为 1.51%, 1.42%, 1.42%。

3　讨论

3.1　以上 RP- HPLC 法应用醋酸地塞米松为内标对丹皮酚进行含量测定,准确度较高、重现性好。本研究在国内尚属首次,未见其他文献报道。

3.2　通过扫描丹皮酚和醋酸地塞米松的紫外吸收光谱,二者最大吸收波长分别为 274 nm 和 240 nm,经过反复试验,最后确定以 254 nm 作为本法的检测波长。

参　考　文　献

[1]　中国药典[M].05 版.北京:化学工业出版社,2005:119
[2]　孙言才,沈玉先,孙国平.丹皮酚的主要药理活性研究进展[J].中成药,2004,26(7):579- 582

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net