

定坤丸质量标准研究

郭巧技¹, 刘吉金¹, 黄从玮²

(1. 深圳市药品检验所 广东 深圳 518057; 2. 广东药学院 广东 广州 510006)

关键词: HPLC; 人参皂苷 Re; TLC; 定坤丸

摘要: 目的: 建立定坤丸质量控制方法。方法: 采用薄层色谱法对制剂中的当归、川芎、佛手、白芍、黄芪、西洋参和延胡索进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法测定制剂中人参皂苷 Re 的含量。结果: 薄层色谱显色清晰且阴性对照无干扰。人参皂苷 Re 在 20.56~1 028 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内呈良好的线性关系, 平均回收率为 100.5%, RSD=1.1%。结论: 本法操作简便, 结果准确、重现性好, 可用于定坤丸的质量控制。

中图分类号: R927.2

文献标识码: B

文章编号: 1001-1528(2010)04-0689-04

定坤丸为西洋参、白术、茯苓等二十七味药材组成的复方制剂, 具有补气养血、舒郁调经的功效, 用于冲任虚损、气血两亏、身体瘦弱、月经不调、经期紊乱、行经腹痛、崩漏不止、腰酸腿软。原标准仅载丸剂的通则检查, 为了提高中成药的检测标准, 增加了当归、川芎、佛手、白芍、黄芪、西洋参和延胡索的薄层鉴别, 增加西洋参的含量测定。

1 仪器与材料

仪器: 戴安 P680A 高效液相色谱仪, PDA-100 检测器; 赛多利斯 CP224S 电子天平; 梅特勒-托利多 XS205 电子天平; AS20500A 天津奥特恩斯超声波清洗仪 (功率 500 W, 40 kHz)。

样品与试剂: 人参皂苷 Re (批号 110754-200421)、人参皂苷 Rb₁ (批号 110704-200420)、人参皂苷 Rg₁ (批号 110703-200424)、拟人参皂苷 F₁₁ (批号 110841-200404)、芍药苷 (批号 110736-200731)、黄芪甲苷 (批号 110781-200631)、延胡索乙素 (批号 110726-200409) 对照品, 当归 (批号 120927-200613)、川芎 (批号 129018-200406)、白芍 (批号 120905-200508)、佛手 (批号 120933-200303)、延胡索 (批号 120928-200604) 对照药材均由中国药品生物制品检定所提供; 硅胶 G 预制板为 MACHERKEY-NAGEL 生产 (批号: 704/356); 定坤丸及处方中的二十七味中药材均由吉林鹿王制药有限公司提供。水为超纯水, 乙腈为色谱纯, 实验中所用的其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 当归、川芎、佛手的薄层色谱鉴别

2.1.1.1 供试品溶液制备 取本品 36 g, 剪碎, 加硅藻土 30 g 研匀, 加乙醚 60 mL 超声处理 30 min, 滤过, 滤液挥干 (药渣备用), 残渣加乙酸乙酯 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。

2.1.1.2 对照药材溶液制备 分别取当归、川芎、佛手对照药材各 0.5 g, 分别加乙醚 20 mL, 与同法制备对照药材溶

液。

2.1.1.3 阴性对照溶液制备 按处方及制法, 分别制成缺当归、川芎、佛手的阴性对照样品, 取相当于供试品的量, 按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

2.1.1.4 当归、川芎的薄层色谱测定 吸取上述相应溶液各 5 μL , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以环己烷-乙酸乙酯 (3:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视 (见图 1)。

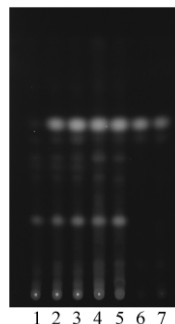


图1 川芎、当归 TLC 图

1. 当归、川芎双阴性对照溶液
2. 当归阴性对照溶液
3. 川芎阴性对照溶液
4. 供试品溶液
5. 供试品溶液
6. 当归对照药材溶液
7. 川芎对照药材溶液

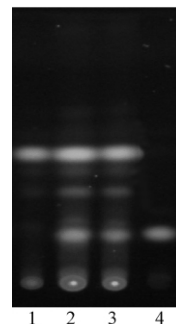


图2 佛手 TLC 图

1. 佛手阴性对照溶液
2. 供试品溶液
3. 供试品溶液
4. 佛手对照药材溶液

2.1.1.5 佛手的薄层色谱测定 吸取上述相应溶液各 5 μL , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以环己烷-乙酸乙酯 (9:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视 (见图 2)。

2.1.2 白芍的薄层色谱鉴别

2.1.2.1 供试品溶液制备 取当归、川芎鉴别项下用乙醚提取后的药渣, 加乙醇 60 mL 超声处理 30 min, 滤过, 滤液

收稿日期: 2009-03-40

作者简介: 郭巧技 (1979-), 女, 主管药师, 研究方向: 中成药质量分析。Tel: (0755) 26031744 E-mail: guoqiao128@126.com

蒸干,残渣加水30 mL使溶解,用水饱和正丁醇振摇提取3次,每次20 mL,合并正丁醇提取液,用正丁醇饱和的水洗涤3次,每次15 mL,弃去水液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。

2.1.2.2 对照品溶液制备 取芍药苷对照品,加无水乙醇制成每1 mL含0.5 mg的溶液,作为对照品溶液。

2.1.2.3 对照药材溶液制备 另取白芍对照药材0.5 g,与供试品溶液同法制备对照药材溶液。

2.1.2.4 阴性对照溶液制备 按处方及制法,制成缺白芍的阴性对照样品,取相当于供试品的量,按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

2.1.2.5 白芍的薄层色谱测定 吸取上述相应溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸溶液,在105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,日光下检视(见图3)。

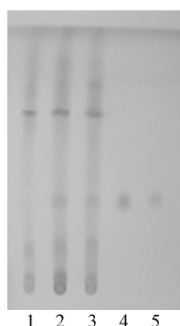


图3 白芍 TLC 图

1. 白芍阴性对照溶液
2. 供试品溶液
3. 芍药苷对照品溶液
4. 芍药苷对照药材溶液
5. 白芍对照药材溶液

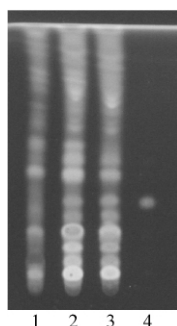


图4 黄芪 TLC 图

1. 黄芪阴性对照溶液
2. 供试品溶液
3. 黄芪甲苷对照品溶液
4. 黄芪甲苷对照药材溶液

2.1.3 黄芪、西洋参薄层色谱鉴别

2.1.3.1 供试品溶液制备 取本品36 g,剪碎,加硅藻土20 g,研匀,加乙醚60 mL,超声处理30 min,滤过,弃去滤液,滤渣挥干溶剂,加水饱和过的正丁醇60 mL,超声处理60 min,滤过,取滤液,用氨试液洗涤两次,每次20 mL,弃去氨试液,再用正丁醇饱和的水洗涤3次,每次15 mL,弃去水液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。

2.1.3.2 对照品溶液制备 取黄芪甲苷,人参皂苷Rb₁,人参皂苷Re,人参皂苷Rg₁,拟人参皂苷F₁₁,分别加甲醇制成每1 mL含0.5 mg的溶液,作为对照品溶液。

2.1.3.3 阴性对照溶液制备 按处方及制法,制成缺黄芪、西洋参的阴性对照样品,取相当于供试品的量,按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

2.1.3.4 黄芪的薄层色谱测定 吸取上述相应溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2)10 $^{\circ}$ C以下放置过夜的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(365 nm)下检视(见图4)。

2.1.3.5 西洋参的薄层色谱测定 吸取上述相应溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,使成条带状,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10)10 $^{\circ}$ C以下放置过夜的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(365 nm)下检视(见图5)。

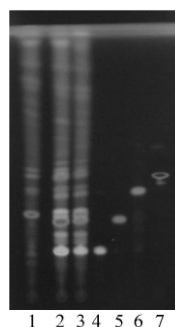


图5 西洋参 TLC 图

1. 西洋参阴性对照溶液
2. 供试品溶液
3. 对照品溶液
- 4-7. 分别为人参皂苷Rb₁、Re、Rg₁、拟人参皂苷F₁₁对照品溶液

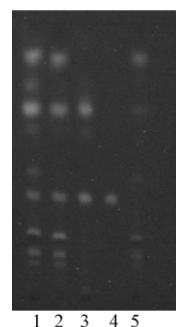


图6 延胡索 TLC 图

1. 供试品溶液
2. 延胡索对照药材溶液
3. 延胡索乙素对照品溶液
4. 延胡索阴性对照溶液

2.1.4 延胡索的薄层色谱鉴别

2.1.4.1 供试品溶液制备 取本品12 g,剪碎,加硅藻土6 g,研匀,加70%乙醇50 mL,超声处理3 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水20 mL使溶解,加浓氨试液调节pH至11,用乙酸乙酯振摇提取2次,每次20 mL,合并乙酸乙酯提取液,蒸干,残渣加乙酸乙酯1 mL使溶解,作为供试品溶液。

2.1.4.2 对照品溶液制备 取延胡索乙素,加甲醇制成每1 mL含0.1 mg的溶液,作为对照品溶液。

2.1.4.3 对照药材的制备 取延胡索对照药材0.2 g,按供试品溶液制备方法,同法制得对照药材溶液。

2.1.4.4 阴性对照溶液制备 按处方及制法,制成缺延胡索的阴性对照样品,取相当于供试品的量,按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

2.1.4.5 延胡索的薄层色谱测定 吸取上述相应溶液各10 μ L,分别点于同一用1%氢氧化钠溶液制备的硅胶G薄层板上,以甲苯-丙酮(9:2)为展开剂,展开,取出,晾干,置碘缸中约3 min后取出,挥尽板上吸附的碘后,置紫外光灯(365 nm)下检视(见图6)。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为Alltima HP C₁₈(4.6 mm $\times$ 250 mm 5 μ m);流动相:乙腈-水梯度洗脱 0~33 min(19:81), 33~35 min(19:81 $\rightarrow$ 40:60), 35~42 min(40:60), 42~45 min(19:81), 检测波长为203 nm。

2.2.2 对照品溶液的制备 取人参皂苷Re对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含0.1 mg的溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品适量,剪碎,精密称定,再精密加入半量的硅藻土,粉碎,过三号筛,取约12 g,精密称定,置索氏提取器中,加入二氯甲烷适量,加热回流3 h,弃

去二氯甲烷提取液,残渣挥干,再置索氏提取器中,加入甲醇 70 mL,加热回流提取至无色,甲醇提取液蒸干,残渣趁热加水 40 mL,使溶解,用水饱和的正丁醇振荡提取 5 次(20、20、15、15、10 mL),合并正丁醇提取液,用氨试液洗涤 2 次,每次 20 mL。合并洗涤过的氨试液,用水饱和的正丁醇提取 2 次,每次 10 mL。合并正丁醇提取液,用正丁醇饱和的水洗涤 2 次,每次 15 mL,弃去水液,正丁醇液蒸干,残渣用甲醇溶解,加甲醇转移至 25 mL 量瓶中,并加甲醇至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 线性关系 精密吸取不同浓度的人参皂苷 Re 对照品溶液各 10 μL ,注入液相色谱仪,记录峰面积,以对照品的浓度(mg/mL)为横坐标,测得的峰面积为纵坐标,绘制标准

曲线,得回归方程: $Y = 0.0898X + 0.1079$, $r = 0.9995$ 。结果表明,人参皂苷 Re 对照品浓度在 20.56 ~ 1028 $\mu\text{g/mL}$ 之间与其峰面积呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密吸取人参皂苷 Re 对照品溶液(0.1 mg/mL)10 μL ,注入液相色谱仪,重复进样 5 次,测定峰面积,以人参皂苷 Re 的峰面积计算,RSD 为 0.75%,表明本方法精密度良好。

2.2.6 专属性 精密吸取人参皂苷 Re 对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL ,分别注入液相色谱仪,按含量测定的方法测定。结果未见阴性对照溶液对试验有干扰(见图 7)。

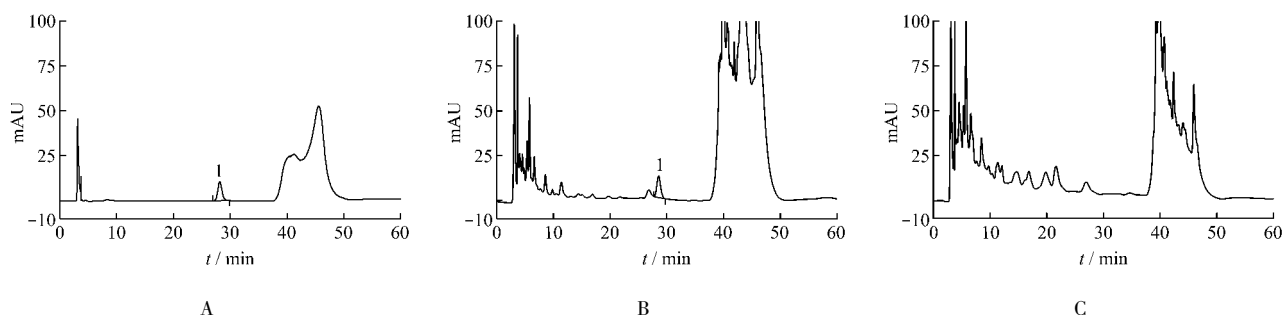


图 7 对照品(A)、供试品(B)、阴性对照样品(C)色谱图
1. 人参皂苷 Re

2.2.7 重复性考察 取同一批供试品 6 份,按含量测定方法测定。结果人参皂苷 Re 含量平均值为 0.29 mg/g,RSD 为 3.3%,表明重复性良好。

2.2.8 回收率试验 取同一批已知含量的供试品 6 份,分别精密加入一定量的人参皂苷 Re 对照品,按含量测定方法测定,结果见表 1。

表 1 人参皂苷 Re 回收率试验测定结果

供试品 取样/g	供试品中 含量/mg	对照品加 入量/mg	测定结 果/mg	回收率 /%	平均回收 率/%	RSD /%
4.010 6	2.463	2.400	4.864	100.04	100.5	1.1
4.009 4	2.462	2.400	4.899	101.54		
4.010 4	2.462	2.400	4.867	100.21		
4.011 0	2.463	2.400	4.831	98.67		
4.009 3	2.462	2.400	4.902	101.67		
4.011 4	2.463	2.400	4.880	100.71		

2.2.9 稳定性试验 取同一份供试品溶液,按含量测定方法,分别在制备后 0、5、10、15、20、25、30 h 进样测定。结果测得的人参皂苷 Re 峰面积的 RSD = 0.5%,表明供试品溶液自制备后 30 h 内基本稳定。

2.2.10 样品的测定 取本品 3 批,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,进样测定,结果见表 2。

表 2 样品测定结果(n=4)

批号	取样量 /g	含量 /(mg/g)	平均含量 /(mg/g)
070801	8.024 8	0.618	0.614
	8.021 9	0.610	
070802	8.018 2	0.603	0.606
	8.081 2	0.609	
061101	8.067 3	0.306	0.304
	8.063 0	0.302	

3 讨论

3.1 参考《中国药典》2005 年版一部当归、川芎、佛手的鉴别,本试验采用乙醚超声提取其脂溶性成分进行鉴别并考察方法学,结果表明当归、川芎双阴性对照溶液、佛手阴性对照溶液对供试液均无干扰;黄芪中的黄芪甲苷、西洋参中的人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁ 及拟人参皂苷 F₁₁ 均为皂苷类物质,因此采用常用的皂苷提取方法进行同步提取,更方便快捷。西洋参薄层鉴别中比较了在不同的湿度环境展开,结果表明低湿度展开效果更好。作者还考察了不同色谱条件下五味子的薄层色谱鉴别,结果层析效果不理想,未收入正文。

3.2 参照文献方法^[1-4],曾分别考察了二氯甲烷脱脂后甲醇索氏提取法、乙醚脱脂后正丁醇超声提取法、正丁醇超声提取法、正丁醇加热回流法等提取方式,结果以二氯甲烷脱脂

后甲醇索氏提取法提取最完全。考察了不同流动相条件,最终得到了正文 2.2.1 项下优化的流动相条件,此条件下人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 分离度为 1.96,人参皂苷 R_e 峰的理论板数为 8 643,待测峰人参皂苷 R_e 出峰后使用梯度可将极性小的杂质洗脱出来,防止影响下一针。

3.3 用二极管阵列检测器同时采集人参皂苷 R_e 对照品及供试品的紫外吸收光谱,结果对照品峰及供试品峰保留时间及紫外吸收光谱一致。供试品的峰纯度因子为 988,大于阈值 970,表明峰纯度良好。

参考文献:

[1] 张 宁,张 丽. HPLC 测定颈康胶囊中人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 与

三七皂苷 R_1 的含量[J]. 中成药 2008, 30(2):215-216.

[2] 中国药典[S]. 一部. 2005:87.

[3] 张小平,徐世杰. 梯度洗脱高效液相色谱法测定三七片中三七总皂苷的含量[J]. 中国现代应用药学杂志 2006, 23(3):219-221.

[4] 石俊英,牟彩萍. 西洋参微粉加工与皂苷 R_{b_1} 含量的相关性研究[J]. 中成药 2004, 26(7):556-558.

山茛菪麝香膏质量标准研究

郭全兴¹, 刘亚蓉¹, 杨凤梅¹, 高占魁²

(1. 青海省药品检验所,青海 西宁 810016; 2. 青海宝鉴堂国药有限公司,青海 西宁 810016)

关键词:山茛菪麝香膏; 薄层色谱; 唐古特瑞香、樟脑、冰片、水杨酸甲酯; 祖师麻甲素; HPLC

摘要:目的:建立山茛菪麝香膏的鉴别及含量测定方法。方法:采用薄层色谱法鉴别唐古特瑞香,采用 GC 法鉴别方中樟脑、冰片、水杨酸甲酯;采用 HPLC 法测定唐古特瑞香中祖师麻甲素的含量。结果:祖师麻甲素在 0.046 3 μg ~ 0.231 4 μg 范围内线性关系良好,回归系数 $r=0.999\ 6$ ($n=5$),平均回收率 95.4%,RSD=0.5% ($n=9$)。结论:该方法专属性强,简便可行,重现性好,能有效的控制山茛菪麝香膏的内在质量。

中图分类号:R927.2

文献标识码:B

文章编号:1001-1528(2010)04-0692-04

山茛菪麝香膏为青海宝鉴堂国药有限公司(前身为青海省海北制药厂)研制的新药。收载于卫生部药品标准中药成方制剂第十三册中。具有活血镇痛、祛风除湿的功效。用于风湿痹痛、关节炎、类风湿关节炎、跌打损伤等症的疼痛^[1]。原部颁标准中仅有唐古特瑞香的纸层析鉴别(祖师麻甲素)和膏剂的常规检查项。无含量测定内容。为了更全面的控制该产品的内在质量,本实验对方中君药唐古特瑞香进行了含量测定研究,对方中其他药味进行了鉴别研究,并对原标准中唐古特瑞香的纸层析鉴别方法进行了修订。试验证明,方法简便快捷,专属性强,结果满意。

1 仪器和试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪,Agilent G1314 VWD 紫外检测器,HP 化学工作站(美国 Agilent 公司);CP-3800 瓦里安气相色谱仪;CP-8410 全自动进样器;FID 检测器;CP-Wax 毛细管柱;电子天平(Sartorius BT224S,北京赛多力斯仪器公司);超声波清洗器(B2500s-MT,上海必能信超声波清洗仪器有限公司)。

祖师麻甲素对照品(批号 110900-200405,含量测定用);

樟脑对照品(747-2001060;供含测);龙脑对照品(110881-200202,供含测);水杨酸甲酯(110707-200107)均由中国药品生物制品检定所提供;甲醇、乙腈为色谱纯,其它试剂均为分析纯;水为重蒸馏水。

山茛菪麝香膏 3 批(批号: XJ630062、XJ630060、XJ630083)及有关阴性对照样品均由青海宝鉴堂国药有限公司提供。

2 定性鉴别

2.1 TLC 法鉴别唐古特瑞香 取本品 140 cm^2 ,加乙酸乙酯 30 mL,加热回流 30 min,提取液转至分液漏斗中,用 4% 氢氧化钠溶液提取 3 次,每次 10 mL,合并提取液,以稀盐酸酸化至 pH 值 1~2,再以乙酸乙酯提取 3 次,每次 10 mL,合并提取液,浓缩至 10 mL,作为供试品溶液。取祖师麻甲素对照品,加乙酸乙酯制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。另取缺唐古特瑞香的阴性对照样品,同供试品溶液制备法制得阴性对照溶液。吸取上述 3 种溶液各 10 μL ,分别点于硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂)上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸-乙醚(10:1:1:3)为展开剂,展开,取出,晾

收稿日期:2009-02-16

作者简介:郭全兴(1963-)男,副主任药师;研究方向:中药检验。Tel:(0971)8227114 E-mail:gqx1963@yahoo.cn