

薯蓣丸的质量标准研究

赵亮^①, 曹红^②

[摘要] 目的 建立薯蓣丸的质量标准。方法 采用薄层色谱法对薯蓣丸中当归、川芎、白芍和防风进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法测定该制剂中甘草酸的含量, 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-1% 醋酸溶液 (36:64); 流速: 1.0 ml/min 检测波长: 250 nm; 柱温: 40℃。结果 薄层色谱法可鉴别出该制剂中的当归、川芎、白芍和防风。甘草酸在 0.264~2.64 μg 范围内呈良好线性关系, $r = 0.9991$, 平均回收率为 99.56%, RSD 为 0.81% ($n = 6$)。结论 该方法准确、重复性好, 能有效控制薯蓣丸的质量。

[关键词] 薯蓣丸; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 甘草酸

[中图分类号] R927.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9926(2010)06-0513-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1008-9926.2010.06.013

Studies on the Quality Standard of *Shuyu Wan*

ZHAO Liang^①, CAO Hong^②

^① Department of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

^② Institute for Drug and Instrument Control of Health Dept GLD of PLA, Beijing 100071, China

[Abstract] **Objective** To establish a quality standard for *Shuyu Wan*. **Methods** Thin layer chromatography was applied to *Angelicae sinensis* (Oliv.) Diels, *Ligusticum chuanxinog Hort*, *Paeonia Lactiflora Pall* and *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. The content of glycyrrhizic acid was determined by high performance liquid chromatography. Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used as the chromatographic column and acetonitrile-1% acetic acid solution (36:64) as the mobile phase. The detection wavelength was 250 nm; the flow rate was 1.0 ml/min and the column temperature was 40℃. **Results** *Angelicae sinensis* (Oliv.) Diels, *Ligusticum chuanxinog Hort*, *Paeonia Lactiflora Pall* and *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk were identified by thin layer chromatography. Glycyrrhizic acid showed a good linear relationship within a range of 0.264-2.64 μg, $r = 0.9991$. The average recovery was 99.56%. RSD was 0.81% ($n = 6$). **Conclusion** This method is simple with good reproducibility and can be used as the quality control of *Shuyu Wan*.

[Key words] *Shuyu wan*; thin layer chromatography; high performance liquid chromatography; glycyrrhizic acid

薯蓣丸^[1]是由山药、人参、白术(麸炒)、茯苓、甘草、地黄、当归、白芍、川芎、阿胶、六神曲(麸炒)、大豆黄卷、大枣(去核)、苦杏仁(去皮、炒)、桂枝、柴胡、防风、干姜、桔梗、白藜、麦冬 21 味中药组成的复方制剂, 具有调理脾胃, 益气 and 营的功效。用于气血两虚, 脾肺不足所致之虚劳, 胃脘痛, 痹症, 闭经, 月经不调散风。该复方制剂为国家药典委员会“提高国家药品标准行动计划”中要求的中成药, 其原标准收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》(中药成方制剂)第一册, 原有质量标准中

仅有性状和检查项。为进一步控制药品的内在质量, 保证临床用药安全有效, 本文在原有质量标准基础上, 增加了当归、川芎、白芍、防风等药材的薄层色谱 (thin layer chromatography, TLC) 法鉴别; 并且用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法测定了薯蓣丸中甘草酸的含量, 结果准确可靠, 全面提高了该药品的质量控制方法。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪; 紫外检测器, 化学工作站 (美国 Agilent 公司)。

1.2 试药 薯蓣丸 (规格: 3 g 丸, 北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂, 批号: 6013828, 6013829, 6013830)。当归、川芎、防风对照药材 (均由中国药品生物制品检定所提供); 开麻苷、5-O 甲

作者简介: 赵亮, 硕士研究生。研究方向: 药物分析。

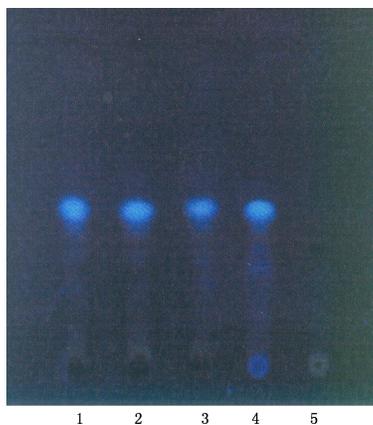
作者单位: ① 200433 上海, 第二军医大学研究生院; ② 100071 北京, 总后勤部卫生部药品仪器检验所中药室

通讯作者: 曹红, Tel: (010) 66949080, E-mail: caohong6699@sina.com

基维斯阿米醇苷对照品 (均由中国药品生物制品检定所提供); 甘草酸铵对照品 (供含量测定用, 中国药品生物制品检定所)。乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 TLC鉴别

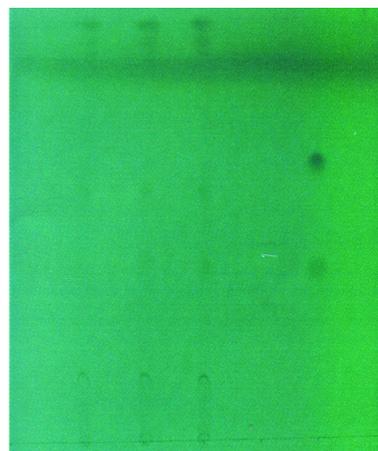
2.1 当归与川芎^[2] 取本品 4丸, 加适量硅藻土, 研细, 加乙醚 20 ml, 超声处理 20 min, 滤过, 滤液浓缩至 1 ml 作为供试品溶液。另取当归和川芎对照药材各 0.5 g, 加乙醚 10 ml, 同法制成对照药材溶液。按以上方法制备缺少当归和川芎药材的阴性对照溶液。照文献 [2] TLC 法试验, 吸取上述 3种溶液各 10 μl, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-乙酸乙酯 (5: 1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外灯 (365 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。阴性对照试验未见干扰。见图 1。



1, 2, 3 3批样品; 4 当归和川芎对照药材; 5 阴性对照

图 1 当归与川芎 TLC 图

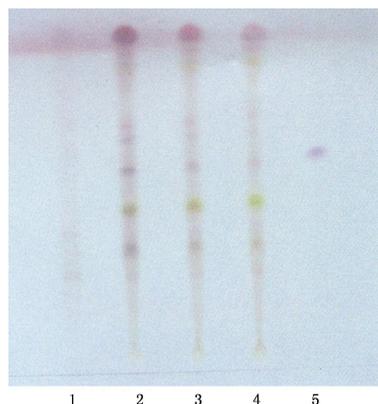
2.2 防风^[2] 取本品 6丸, 加硅藻土适量, 研细, 加甲醇 50 ml, 超声处理 20 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 30 ml 使溶解, 加三氯甲烷振摇提取 2次, 每次 20 ml, 弃去三氯甲烷液, 用水饱和的正丁醇提取 4次 (15, 15, 10, 10 ml), 合并正丁醇提取液, 置水浴上蒸干, 残渣加甲醇 1 ml 使溶解, 作为供试品溶液。按以上方法制备缺少防风药材的阴性对照溶液。另取升麻苷和 5-O 甲基维斯阿米醇苷对照品, 加甲醇制成 1 mg/ml 的混合对照品溶液, 作为对照品溶液。吸取上述 3种溶液各 10 μl 点于同一硅胶 G₂₅₄ 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇 (4: 1) 为展开剂, 展开, 展开 2次, 取出, 晾干, 置紫外灯 (254 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应位置上, 显相同颜色的荧光斑点。阴性对照试验未见干扰。见图 2。



1, 2, 3 3批样品; 4 阴性对照; 5 对照品

图 2 防风 TLC 图

2.3 白芍^[2] 取本品 6丸, 加硅藻土适量, 研细, 加甲醇 50 ml, 超声处理 20 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 30 ml 使溶解, 加三氯甲烷振摇提取 2次, 每次 20 ml, 弃去三氯甲烷液, 用水饱和的正丁醇提取 4次 (15, 15, 10, 10 ml), 合并正丁醇提取液, 置水浴上蒸干, 残渣加甲醇 5 ml 使溶解, 置于中性氧化铝柱 (100目, 4 g 内径 1 cm) 上, 以甲醇 40 ml 洗脱、蒸干, 残渣加甲醇 1 ml 使溶解, 作为供试品溶液, 按处方量制备缺少白芍药材的阴性对照样品, 以上述方法制备缺少白芍药材的阴性对照溶液。另取芍药苷对照品, 加甲醇制成 1 mg/ml 的溶液, 作为对照品溶液, 吸取上述 3种溶液各 10 μl 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-水 (13: 7: 2) 的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 在 105℃ 加热至斑点显色清晰, 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰。见图 3。



1: 阴性对照; 2, 3, 4 3批样品; 5: 芍药苷对照品

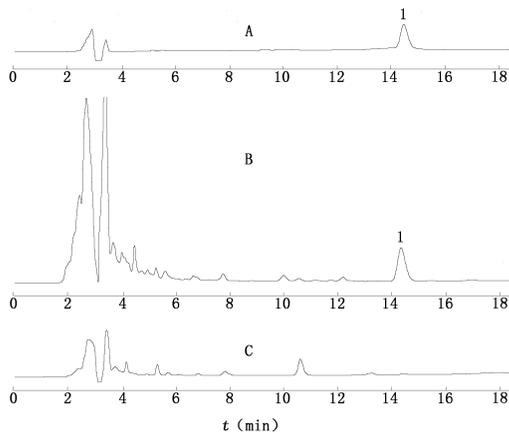
图 3 白芍 TLC 图

3 含量测定

3.1 色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相: 乙腈-1% 醋酸溶液 (36:64); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长为 250 nm; 柱温: 40°C; 进样量: 10 μl。理论板数以甘草酸峰计算不得少于 2000。

3.2 溶液的制备 (1) 对照品溶液 精密称取甘草酸铵对照品适量, 加甲醇制成 90 μg/ml 的溶液, 即得。(甘草酸 = 甘草酸铵重量 / 1.0207)。(2) 供试品溶液 取重量差异项下的本品, 研细, 取约 1.5 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加甲醇 25 ml 称定重量, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。(3) 阴性对照溶液 按处方量比例称取除甘草以外的其余药材, 按制备工艺制成缺甘草药材的阴性对照样品, 照供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。

3.3 专属性试验 取供试品溶液、甘草酸对照品溶液、阴性对照样品溶液 10 μl 进样, 按上述色谱条件测定, 记录色谱图, 结果在所选定的色谱条件下, 样品中甘草酸色谱峰与其他组分色谱峰能达到基线分离, 阴性对照液对测定无干扰, 见图 4。



A: 对照品溶液; B 供试品溶液; C: 阴性对照; 1: 甘草酸

图 4 HPLC 色谱图

3.4 线性关系的考察 取甘草酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成含甘草酸 0.2642 mg/ml 的对照品贮备液, 精密吸取该对照品贮备液适量, 以甲醇按不同比例稀释, 得甘草酸浓度分别为 0.2642, 0.2114, 0.1585, 0.1057, 0.0528 及 0.0264 mg/ml 的对照品溶液, 分别取上述溶液各 10 μl 进样分析, 以进样量 (μg) 为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 进行计算, 得回归方程。

$$Y = 682.52X + 7.91, r = 0.9991, n = 6$$

结果表明甘草酸在 0.264~2.64 μg 范围内有良好的线性关系。

3.5 精密度试验 取同一 (批号: 6013828) 样品 1.5 g 精密称定, 平行 6 份, 按 3.2(2) 项下方法制备成供试品溶液, 在上述色谱条件下分别进样 10 μl 测得甘草酸的平均含量为 1.255 mg/g, RSD 为 1.25% (n = 6)。结果表明此法重复性良好。

3.6 稳定性试验 取供试品溶液 (批号: 6013828), 于 0, 2, 4, 6, 8 h 测定, 结果供试品溶液在 8 h 内峰面积基本不变, RSD 为 1.08%。

3.7 加样回收率试验 称取已知样品 (批号: 6013828) 0.75 g 共 6 份, 精密称定, 分别精密加入甘草酸对照品 0.9125 mg, 按 3.2(2) 项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件进样分析, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 甘草酸加样回收率试验测定结果 (n = 6)

取样量 (g)	样品量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	\bar{x} (%)	RSD (%)
0.7548	0.9473	0.9125	1.8597	99.99		
0.7567	0.9497	0.9125	1.8604	99.80		
0.7558	0.9485	0.9125	1.8492	98.71	99.56	0.81
0.7592	0.9528	0.9125	1.8574	99.13		
0.7849	0.9850	0.9125	1.9053	100.85		
0.7354	0.9229	0.9125	1.8253	98.89		

3.8 样品测定 取薯蓣丸样品 3 批, 依上述方法制备对照品溶液和供试品溶液, 依相同色谱条件测定, 以外标法计算甘草酸的含量, 结果见表 2。根据薯蓣丸样品的测定结果, 暂定本品每丸含甘草以甘草酸 (C₄₂H₆₂O₁₆) 计, 不得少于 2.7 mg。

表 2 薯蓣丸甘草酸的含量测定结果 (n = 3)

样品批号	含量 (mg/g)	含量 (mg/丸)
6013828	1.255	3.77
6013829	1.228	3.68
6013830	1.207	3.62

4 讨论

4.1 色谱柱的选择 试验中比较了不同商品类型的色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 分析柱、SHIMADZU VP-ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 分析柱及 Agilent ZORBAX EXTEND-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 分析柱, 结果表明每个分析柱分离效果均较好。

4.2 流动相的选择 试验比较了乙腈-1% 醋酸水 (35: 65)、乙腈-1% 醋酸水 (36: 64)、乙腈-1% 醋酸水 (37: 63) 等系统, 最终确定了乙腈-1% 醋酸水 (36: 64) 作为流动相。

4.3 提取方法的选择 试验考察了超声提取 30 min 回流提取 1 h 等方法, 结果表明, 加热回流提取结果高于超声处理, 又考察了加热回流提取 0.5、1、2 h 对甘草酸含量的影响, 结果确定采用加热回流 30 min 作为薯蓣丸样品的提取方法。

4.4 提取溶剂的选择 本文考察了用甲醇、50% 甲醇、乙醇、50% 乙醇溶液为提取溶剂加热回流提取

30 min 按照上述方法进行测定, 结果表明甲醇为提取溶剂时, 甘草酸的峰与其他物质的峰分离较好, 峰形较好, 因此最终确定甲醇溶液作为提取溶剂。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会.《中华人民共和国卫生部药品标准》(中药成方制剂)第一册[S].北京:化学工业出版社,1989:169
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[S].北京:化学工业出版社,2005:68-89,102

(收稿日期: 2010-09-07; 修回日期: 2010-09-28)

(本文编辑 魏 萍)

(上接 477页)

完全取消了 Res 保护心肌细胞的作用, 这说明 Res 通过 cGMP 途径模拟预处理早期保护效应, 且 NO-cGMP 通路起着非常关键的作用。PKC 拮抗剂和 K_{ATP}^+ 通道阻断剂均可减弱 Res 对心肌细胞缺氧损伤的保护作用, 但并未完全取消, 表明 PKC 激活和 K_{ATP}^+ 通道开放是 cGMP 的下游事件, 同时, 也不能排除有其它信号分子参与了 cGMP 后的信号传导过程。即 NO 通过 cGMP 途径, 在其下游分别激活了多条信号通路, 以不同的作用机制最终产生细胞保护作用。Ehmowafy 等^[5] 实验证明白藜芦醇通过激活冠状动脉平滑肌细胞上的鸟苷酸环化酶增加 cGMP。Mahyar-Roemer 等^[6] 认为白藜芦醇的抗心血管疾病作用与它对细胞信号事件的抑制、延迟和反转有关。

PKC 已被公认为介导 IPC 保护作用的重要蛋白激酶^[7], 绝大多数研究表明 PKC 的激活及其所介导的细胞内蛋白磷酸化是其细胞保护的关键环节。在 HPC 早期保护作用中, PKC 是通过受体-G 蛋白-PLC-DG 途径而激活的, 而在 NO 模拟的预处理早期保护作用中, PKC 的活化是继 cGMP 激活之后产生的。 K_{ATP}^+ 通道是介导 IPC 保护作用的重要环节, 很多学者提出它是介导此保护作用的最终效应器, 因而成为当前研究的一个热点。本实验用 K_{ATP}^+ 通道阻断剂格列本脲明显减弱了 Res 诱导的预处理保护作用, 表明 K_{ATP}^+ 通道的开放是 NO-cGMP 的一个下游事件。它与 PKC 活化的关系本实验中未进行研究, 根据文献报道, PKC 激活后可促进 K_{ATP}^+ 通道开放^[8]; 但也有实验发现, K_{ATP}^+ 通道开放剂二氮嗪在发挥心肌细胞保护作用的同时, 也使 PKC 激活并易位到线粒体膜上, K_{ATP}^+ 通道阻断剂 5-HD 或 PKC 抑制剂 Calphostin C 可完全取消二氮嗪对缺血再灌注

心肌的保护作用。由此可见, K_{ATP}^+ 通道开放与 PKC 激活, 二者之间可能不仅仅是简单的先后关系。

综上所述, Res 可通过 cGMP 依赖途径发挥保护作用, PKC 活化和 K_{ATP}^+ 通道的开放是其下游重要的环节。

[参考文献]

- [1] Jang MS, Cai LN, Udeani GO, *et al.* Cancer chemopreventive activity of resveratrol: a natural product derived from grapes[J]. *Science*, 1997, 275(5297): 218-220
- [2] Das DK, Maulik N. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine[J]. *Mol Interv*, 2006, 6(1): 36-47
- [3] Olas B, Wachowicz B. Resveratrol: a phenolic antioxidant with effects on blood platelet functions[J]. *Platelets*, 2005, 16(5): 251-260
- [4] Shen M, Jia Guo-Liang, Wang Yue-Min, *et al.* Cardioprotective effect of resveratrol pretreatment on myocardial ischemia reperfusion induced injury in rats *Vascular Pharmacology*, 2006, 45(2): 122-126
- [5] Ehmowafy AM. Resveratrol activates membrane-bound guanylyl cyclase in coronary arterial smooth muscle: a novel signaling mechanism in support of coronary protection[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291(5): 1218-1224
- [6] Mahyar-Roemer M, Kohler H, Roemer K. Role of Bax in resveratrol induced apoptosis of colorectal carcinoma cells[J]. *BMC Cancer*, 2002, 17: 2-27
- [7] Cain BS, Mekum DR, Harken AH. Protein kinase C in normal and pathologic myocardial states[J]. *J Surg Res*, 1999, 81(2): 249-259
- [8] Tanno M, Tsuchida A, Nozawa Y, *et al.* Roles of tyrosine kinase and protein kinase C in infarct size limitation by repetitive ischemic preconditioning in the rat[J]. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000, 35(3): 345-352

(收稿日期: 2010-03-23; 修回日期: 2010-09-27)

(本文编辑 魏 萍)