

再造丸定性定量方法研究

翟宏焱^{1,2}, 吴德玲^{2,3*}, 程世云¹, 黄丽丹¹

(1 安徽省食品药品检验所, 合肥 230051; 2 安徽中医学院药学院, 合肥 230031; 3 安徽省现代中药重点实验室, 合肥 230031)

摘要 目的: 建立再造丸的定性定量方法。方法: 采用 TLC法对方中的人工牛黄、大黄、当归和川芎、麻黄进行定性鉴别; 采用 TLC法对乌头碱的限量进行检查; 采用 HPLC法测定再造丸中天麻的活性成分天麻素的含量; 使用岛津 Shim-pack VP- ODS (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-磷酸盐溶液(含磷酸氢二钠和磷酸二氢钾各 0.1 mol·L⁻¹)-水(0.5:3:96.5)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 221 nm, 柱温 30℃。结果: TLC 色谱中可检出人工牛黄、大黄、当归和川芎、麻黄; 天麻素进样量在 0.0428~1.284 μg 范围内, 线性关系良好, 平均回收率为 95.5% (RSD=1.2%, n=6)。结论: 该法准确, 重复性好, 可用于再造丸质量控制。

关键词: 再造丸; 定性定量方法; 人工牛黄; 大黄; 当归; 川芎; 麻黄; 乌头碱; 天麻素; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)01-0107-05

Study on qualitative and quantitative methods for Zaizao pills

ZHAIHong-yan^{1,2}, WU De-ling^{2,3*}, CHENG Shi-yun¹, HUANG Li-dan¹

(1. Anhui Institute for Food and Drug Control Hefei 230051, China)

2. College of Pharmaceutical Anhui University of Traditional Chinese Medicine Hefei 230031, China

3. Key Laboratory of Anhui Province Modern Chinese Medicine Hefei 230031, China)

Abstract Objective To establish the methods for qualitative and quantitative of Zaizao pills **Methods** Calculus Bovis, Radix et Rhizoma Rhei, Radix Angelicae Sinensis and Rhizoma Chuanxiong, Herba Ephedrae were identified by TLC. Limit test for aconitine was examined by TLC. The content of gastrodin was determined by HPLC. HPLC was performed on a Shimadzu Shim-pack VP- ODS(150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with methanol-phosphate solution(containing 0.1 mol·L⁻¹ disodium hydrogen phosphate and 0.1 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate)-water(0.5:3:96.5) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, detected at 221 nm. The column temperature was at 30℃. **Results** Calculus Bovis, Radix Angelicae Sinensis and Rhizoma Chuanxiong, Radix et Rhizoma Rhei, Herba Ephedrae could be identified by TLC. The gastrodin showed a good linear relationship at the range of 0.0428-1.284 μg, the average recovery(n=6) was 95.5% with RSD of 1.2%. **Conclusion** The method is accurate with a good reproducibility, and can be used for the quality control of Zaizao pills

Key words Zaizao pills; methods for qualitative and quantitative; Calculus Bovis, Radix et Rhizoma Rhei, Radix Angelicae Sinensis, Rhizoma Chuanxiong, Herba Ephedrae, aconitine, gastrodin; TLC; HPLC

再造丸处方来源于《威信医方集》回天再造丸方加减, 清宫廷《丸散膏丹名药配本》收载, 同仁堂代清宫太医制药时, 处方工艺传入同仁堂成为古方。自 1963 年收入中国药典一部以来, 各版均保留收载, 原标准仅收载显微特征鉴别^[1], 为更有效地控制其质量, 本文建立了再造丸中人工牛黄、大黄、当

归和川芎、麻黄的 TLC 鉴别方法, 采用 TLC 法对乌头碱的限量进行检查, 建立 HPLC 法测定再造丸中有效成分天麻素的含量。

1 仪器与试剂

美国 Agilent 公司 1100 高效液相色谱仪; METTLER TOLEDO AG 285(0.01 mg); Sartorius BP160p

* 通讯作者: Tel: (0551) 5169222; E-mail: dwu7375@sina.com

电子天平 (0.1 mg); 市售硅胶 G 薄层板 (烟台大学生物科学与工程研究所, 青岛海洋化工厂分厂); 对照品胆酸 (批号 100078-200414 供含量测定用)、大黄酚 (批号 110796-200615 供含量测定用)、盐酸麻黄碱 (批号 171241-200506 供含量测定用)、乌头碱 (批号 110720-200410 供含量测定用) 及对照药材当归 (批号 120927-200613)、川芎 (批号 120918-200608) 均购自中国药品生物制品检定所, 再造丸 (安徽华佗国药厂, 批号 20060501, 20060502, 20060503, 9 g 每丸); 中性氧化铝 (国药集团化学试剂有限公司) 为分析纯、乙腈 (美国沃凯) 为色谱纯, 水为纯化水, 其余试剂均为分析纯。

2 定性鉴别

2.1 人工牛黄 取本品 9 g 剪碎, 加硅藻土 5 g 研匀, 加三氯甲烷 50 mL, 加热回流 2 h 放冷, 滤过, 取滤液 20 mL, 加 5% 碳酸氢钠溶液提取 3 次, 每次 20 mL, 合并碱液, 用盐酸调节 pH 至 2, 继用乙醚提取 2 次 (40 mL, 40 mL), 合并乙醚液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 即得供试品溶液; 另取胆酸对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液作为对照品溶液; 按工艺要求制成缺人工牛黄的阴性样品, 照供试品溶液制备方法, 制得阴性对照溶液。吸取供试品溶液 15 μ L、阴性对照溶液 15 μ L 和对照品溶液 2 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以异辛烷-乙酸乙酯-冰醋酸 (15:7:5) 为展开剂^[12], 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。样品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点; 阴性样品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 未显相同颜色的斑点, 见图 1。

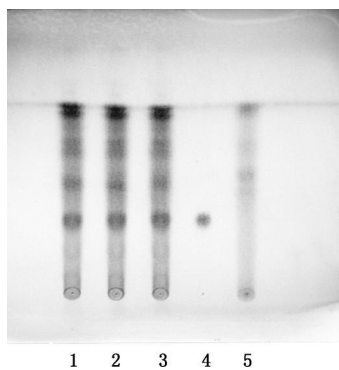


图 1 人工牛黄 TLC 图谱

Fig 1 TLC chromatogram of Calculus Bovis

1~3. 样品 (sample) 4. 胆酸对照品 (cholic acid reference substance)
5. 阴性样品 (negative sample without Calculus Bovis)

2.2 大黄 取再造丸 9 g 剪碎, 加硅藻土 5 g 研匀, 加甲醇 50 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 15 mL 使溶解, 再加盐酸 1 mL, 置水浴中加热 30 min, 立即冷却, 用乙醚振摇提取 2 次, 每次 20 mL, 合并乙醚液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 即得供试品溶液; 另取大黄酚对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液; 按工艺要求制成缺大黄的阴性样品, 照供试品溶液制备方法, 制得阴性对照溶液。吸取供试品溶液 10 μ L、阴性对照溶液 10 μ L 和对照品溶液 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚 (30~60 $^{\circ}$ C)-甲酸乙酯-甲酸 (15:5:1) 的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 氨蒸气中熏后, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视^[13]。样品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点; 阴性样品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 未显相同颜色的斑点。见图 2。

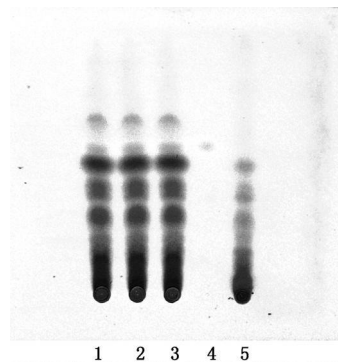


图 2 大黄 TLC 图谱

Fig 2 TLC chromatogram of Radix et Rhizoma Rhei

1~3. 样品 (sample) 4. 大黄酚对照品 (chrysophanol reference substance) 5. 阴性样品 (negative sample without Radix et Rhizoma Rhei)

2.3 当归和川芎 取再造丸 9 g 剪碎, 加硅藻土 4 g 研匀, 加乙醚 50 mL, 超声处理 10 min, 滤过, 滤液挥干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 即得供试品溶液; 另取当归和川芎对照药材各 1 g 分别加乙醚 25 mL, 同法制成对照药材溶液; 按工艺要求制成缺当归和川芎的阴性样品, 照供试品溶液制备方法, 制得阴性对照溶液。吸取供试品溶液 10 μ L、对照药材溶液及阴性对照溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-乙酸乙酯 (4:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视。样品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点^[14]; 阴性样品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 未显相同颜色的斑点, 见图 3。

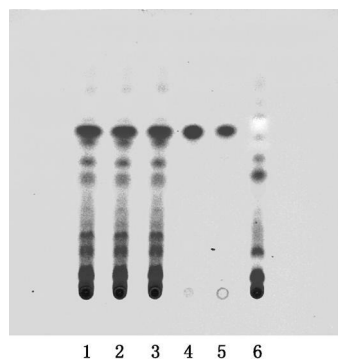


图 3 当归和川芎 TLC 图谱

Fig 3 TLC chromatogram of Radix Angelicae Sinensis and Rhizoma Chuanxiong

1~3 样品 (sample) 4. 当归对照药材 (Radix Angelicae Sinensis reference drug) 5 川芎对照药材 (Rhizoma Chuanxiong reference drug) 6 阴性样品 (negative sample without Angelicae Sinensis and Rhizoma Chuanxiong)

2.4 麻黄 取再造丸 18 g 剪碎, 加硅藻土 9 g 研匀, 加浓氨试液使湿润, 再加三氯甲烷 80 mL, 加热回流 1 h 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 即得供试品溶液^[5]; 另取麻黄对照药材 1 g 同法制成对照药材溶液; 再取盐酸麻黄碱对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液; 按工艺要求制成缺麻黄的阴性样品, 照供试品溶液制备方法, 制得阴性对照溶液。吸取供试品溶液、对照药材溶液和阴性对照溶液各 10 μ L, 对照品溶液 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 置以氨蒸气预饱和的展开缸内, 预饱和 10 min, 以二氯甲烷-甲醇 (30:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以茚三酮试液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。样品色谱中, 在与对照药材和对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点; 阴性对照色谱中, 在与药材和对照品色谱相应的位置上, 未显相同颜色的斑点, 见图 4。



图 4 麻黄 TLC 图谱

Fig 4 TLC chromatogram of Herba Ephedrae

1~3 样品 (sample) 4. 麻黄对照药材 (Herba Ephedrae reference drug) 5. 盐酸麻黄碱对照品 (ephedrine hydrochloride reference substance) 6 阴性样品 (negative sample without Herba Ephedrae)

3 乌头碱限量检查

取再造丸 20 g 剪碎, 加硅藻土 10 g 研匀, 加氨试液 30 mL, 再加乙醚 100 mL, 振摇 10 min, 超声处理 30 min, 放置过夜, 滤过, 残渣用乙醚 30 mL 分次洗涤, 合并滤液和洗液, 转移至分液漏斗中, 分取乙醚层, 用 2% 盐酸溶液提取 2 次 (50 mL, 40 mL), 合并酸水层, 用氨试液调 pH 至 9, 再用乙醚提取 3 次 (40 mL, 20 mL, 10 mL), 乙醚液蒸干, 残渣加无水乙醇 1 mL 使溶解, 即得供试品溶液; 另取乌头碱对照品适量, 加无水乙醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。精密吸取供试品溶液 10 μ L, 对照品溶液 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-乙酸乙酯-二乙胺 (14:4:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以稀碘化铋钾试液。样品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上未出现斑点, 见图 5。

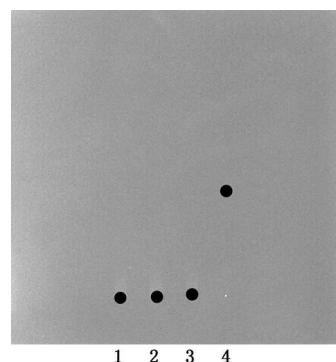


图 5 乌头碱 TLC 图谱

Fig 5 TLC chromatogram of Herba Ephedrae

1~3 样品 (sample) 4 乌头碱对照品 (aconitine reference substance)

4 含量测定

4.1 色谱条件 采用岛津 Shim-pack VP-ODS 色谱柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 以甲醇-磷酸盐溶液 (含磷酸氢二钠和磷酸二氢钾各 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹) - 水 (0.5:3:96.5) 为流动相^[6], 流速 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, 检测波长 221 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C^[7]。理论板数按天麻素峰计算应不低于 3000。

4.2 溶液制备

4.2.1 对照品溶液 取天麻素对照品适量, 精密称定, 加流动相制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液, 即得。

4.2.2 供试品溶液 取再造丸, 研细, 取约 4 g 精密称定, 加硅藻土 2 g 研匀, 置平底烧瓶中, 精密加入甲醇 50 mL^[8], 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, 滤过, 精密量取续滤液 25 mL, 置蒸发皿中, 蒸干, 残渣加 70% 乙醇使溶解^[9], 转移至中性氧化铝柱 (100~200 目, 10 g 内径 10~15 mm) 上, 用 70% 乙醇 100 mL 洗脱,

收集洗脱液, 蒸干, 残渣加水使溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

4.2.3 阴性对照溶液 取处方中缺天麻的其他药味, 按处方比例制成缺天麻的阴性样品。取阴性样品按供试品溶液的制备方法制得阴性对照溶液。

4.3 系统适用性试验

4.3.1 理论板数(n)的测定 取天麻素对照品溶液 2 μ L, 注入液相色谱仪中, 测得天麻素 $t_R = 25.015$, $n = 8001$, 根据样品的分离度, 将理论板数 n 定为不得少于 3000。

4.3.2 分离度(R)的测定 取供试品溶液 20 μ L, 注入液相色谱仪中, 分离度为 2.4。

4.3.3 精密度试验 精密吸取天麻素对照品溶液 2 μ L, 连续进样 5 次, 结果: 平均峰面积的 RSD 为 1.0%。

4.3.4 拖尾因子 取对照品溶液 2 μ L, 注入液相色谱仪中, 测得天麻素拖尾因子 0.97。

4.4 专属性试验 吸取上述对照品溶液 2 μ L、供试品溶液 20 μ L 及阴性对照溶液 20 μ L, 在上述色谱条件下分别注入液相色谱仪, 供试品溶液取得了较好的分离效果, 天麻素与其他组分均能达到基线分离, 阴性对照无干扰, 见图 6。

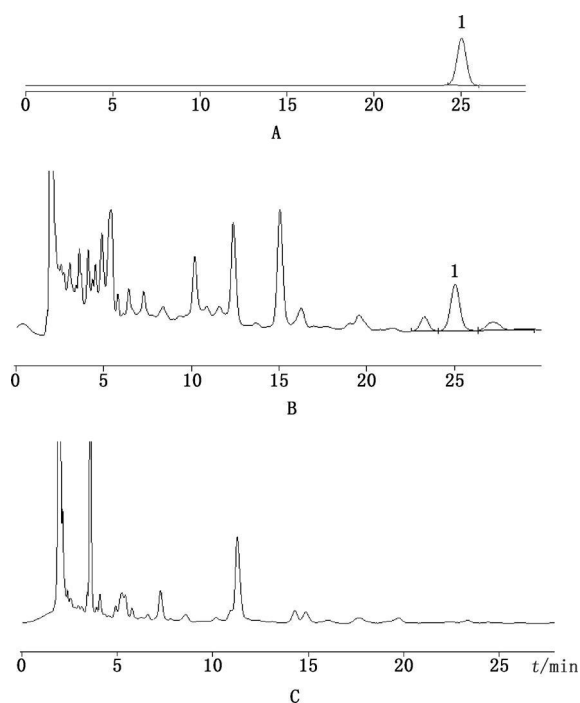


图 6 对照品(A)、再造丸样品(B)及阴性样品(C) HPLC 色谱图

Fig 6 HPLC chromatograms of reference substance(A), Zaizao pills sample(B) and negative sample with out Rhizoma Gastrodiae(C)

1 天麻素(gastrodin)

4.5 线性关系的考察 精密称取天麻素对照品 8.56 mg 置 100 mL 量瓶中, 加流动相使溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 再精密吸取 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液; 精密吸取上述溶液 2, 4, 8, 12, 16, 20, 30 μ L, 分别按上述色谱条件进样测定峰面积值, 以进样量 X (μ g) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 经直线回归, 得回归方程为:

$$Y = 1.962 \times 10^3 X - 3.769 \quad r = 0.9999$$

结果表明: 天麻素对照品进样量在 0.0428~1.284 μ g 范围内与峰面积值具有良好的线性关系。

4.6 稳定性试验 取新制备的供试品溶液, 分别在 0, 4, 8, 12, 24 h 进样 20 μ L, 测定峰面积, 结果峰面积的 RSD($n = 5$) 为 0.99%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

4.7 重复性试验 取同一批号(20060502)的样品 6 份, 分别依法制成供试品溶液, 进样 20 μ L, 测定天麻素的含量, 结果平均含量($n = 6$)为 65.4 μ g $\cdot$ g $^{-1}$, RSD 为 1.6%。

4.8 加样回收率试验 取已知天麻素含量(65.4 μ g $\cdot$ g $^{-1}$)的样品粉末 6 份, 每份约 2 g 精密称定, 精密加入浓度为 5.78 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 的对照品溶液 25 mL, 依法制成供试溶液, 进样 20 μ L, 测定天麻素的量, 计算回收率。结果平均回收率($n = 5$)为 95.5%, RSD 为 1.2%。

4.9 耐用性试验 分别采用岛津 Shim-pack VP-ODS 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)色谱柱、菲罗门 C₁₈(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)色谱柱进行实验, 结果峰形及分离度均较好, 说明此法耐用性较好。

4.10 样品测定 按“4.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“4.1”项下色谱条件进样 20 μ L, 以外标法计算 3 批样品中天麻素的含量, 结果分别为 65.4, 66.3, 67.3 μ g $\cdot$ g $^{-1}$ 。

5 讨论

5.1 人工牛黄的薄层色谱 应该至少有 4 个主要斑点, 但在实验过程中, 发现只有胆酸的斑点较为清晰, 并且在缺味中无干扰现象出现, 于是仅选择胆酸作为鉴别指标。

5.2 曾考虑采用大黄酚对照品、大黄素对照品和大黄对照药材作为对照, 结果显示大黄素及大黄对照药材中大黄酚以外的其他斑点均不清晰, 不宜收入, 故只采用了大黄酚作为对照物质。

5.3 乌头碱限量检查中, 根据中国药典 2005 年版一

部附子项下乌头碱限量检查的限度折算,再造丸中附子含乌头碱的限量应不超出: $10\text{ g} \times 0.167\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} = 1.67\text{ mg}$ 按处方折算再造丸允许乌头碱含量的上限为: $1.67\text{ mg} / (1822 \sim 2070\text{ g}) = 0.8 \sim 0.9\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 乌头碱对照品的点样量为 $2.5\text{ }\mu\text{g}$ 时 (浓度 $0.5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 点样 $5\text{ }\mu\text{L}$), 斑点清晰, 依据此检测量, 约取再造丸样品 500 g 方可配成相应浓度, 明显无可行性。因而采用再造丸日服量考察, 考虑到再造丸日服量中附子量远在附子药材允许最高日服量之下, 故确定以乌头碱的最低检出量 $2.5\text{ }\mu\text{g}$ 为限度。

5.4 在样品含量测定中, 参考中国药典 2005 年版一部, 并取对照品溶液扫描 $200 \sim 350\text{ nm}$ 紫外区, 结果显示波长在 221 nm 处有最大吸收峰且干扰较少, 因此选择 221 nm 作为波长; 参考文献 [7] 并结合样品的分离情况, 柱温设定为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。理论板数实际测出为 8001, 考虑到色谱柱的差异性, 将理论板数设定为按天麻素峰计算应不低于 3000。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005 VolI (一部): 432
- 2 WU Da-yu(邬大玉), HUANG Guo(黄果). Improved TLC of composed Calculus Bovis Jianke capsules(剑克胶囊中人工牛黄 TLC 方法的改进). *J Pediatr Pharm* (儿科药科学杂志), 2001, 7(2): 19
- 3 MO Ze-qian(莫泽乾). Studies on the quality specification of Dishes-

eng tincture(跌圣酏的质量标准研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 1994, 14(6): 25

- 4 GUO Qiao-ji(郭巧技), LU Ji-jin(刘吉金), HUANG Cong-wei(黄从玮). Studies on the quality specification of Dingkun pills(定坤丸质量标准研究). *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2010, 32(4): 689
- 5 GONG Su-xiao(龚苏晓), ZHANG Tie-jun(张铁军), XU Jun(许浚), et al Quality standard of Ertong Qingfei syrup(小儿清肺糖浆质量标准研究). *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2008, 19(2): 467
- 6 XU Yang-biao(许杨彪). Study on quality standard of compound Tianma granules(复方天麻颗粒质量标准的研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2007, 27(5): 746
- 7 MEN Jin-yu(门金玉), DONG Zhen-min(董振敏), CUI Yu-qin(崔玉芹), et al RP-HPLC simultaneous determination of catalpol and gastrodin in Tianma Tofengling capsules(RP-HPLC法同时测定天麻头风灵胶囊中梓醇和天麻素的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2009, 29(6): 964
- 8 CUI Ying(崔颖), DAI Ping-ping(戴萍萍), LU Zhong-xiang(陆忠祥), et al Determination of gastrodin in Zaizao Nongsuo pills by RP-HPLC(再造浓缩丸中天麻素含量测定方法的研究). *Anhui Med Pharm J*(安徽医药), 2009, 13(7): 749
- 9 YE Li-ming(叶利明), HOU Shi-xiang(侯世祥), LU Yi(卢懿). The study of determining Rhizoma Gastrodiae by HPLC(天麻药材的 HPLC 含量测定方法比较研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2005, 25(4): 399

(本文于 2010 年 2 月 23 日收到)