

表 1 不同厂家三黄片中黄芩苷的测定结果 (n=6)
Table 1 Determination of baicalin in Sanhuang Tablets from different manufactures (n=6)

批号	黄芩苷/(mg·片 ⁻¹)	RSD/%
050707	13.60	2.39
050717	13.53	3.89
060101	9.57	4.02
060111	3.83	2.38

杂质吸收的干扰。

3.2 缓冲体系的选择:考察了硼砂、硼酸、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾缓冲体系作为运行缓冲液时样品的分离情况,结果发现,硼砂分离效果较好,基线较平稳。

3.3 缓冲溶液浓度和 pH 值对分离的影响:缓冲溶液的浓度和 pH 值会影响 Zeta 电势、电渗流和分析物的带电情况、扩散系数、溶液的黏度系数和毛细管的表面,从而影响各组分在缓冲溶液中的迁移行为,对分离的影响很大。本实验依次考察了 pH 7~10 和浓度在 20~60 mmol/L 时样品的分离情况。结果表明,pH 值<9.5 时黄芩苷与前后未知峰都能够达到基线分离,但当 pH 值>8.95 时,分析时间延长,峰拖尾因子增大。可能是离子强度增大,产生较多的焦耳热,导致谱带展宽和各组分迁移行为的改变。因

此选择 pH 8.95 作为最佳 pH 值条件。随着缓冲液浓度的增加,分离度提高,但样品的迁移时间延长,并会增加焦耳热效应。本实验选择浓度为 40 mmol/L 硼砂缓冲溶液,此条件下黄芩苷与前后两个未知峰均能很好分离且峰形较好。

3.4 分离电压和进样时间的影响:实验考察了分离电压 12~24 kV 和进样时间 2~15 s 对分离的影响。结果表明,随着分离电压的升高,迁移时间明显缩短,峰高增加,说明升高电压在一定范围内可提高电泳分离效率。随着进样时间的增加,峰高和峰宽增加,当分离电压超过 18 kV 和进样时间超过 10 s 后,峰高增加程度减慢,但基线噪音升高,峰展宽加剧。综合考虑,本实验选用 18 kV 分离电压和 10 s 进样时间作为最优条件。

全面、系统的质量控制是中药现代化的重要内容。为保证三黄片的整体疗效,笔者认为应对三黄片中的黄芩浸膏的质量进行定量控制。本实验建立的测定三黄片中黄芩苷的高效毛细管区带电泳法,可作为三黄片质量控制的一种有效分析方法,同时对市售三黄片的质量监测有一定意义。

拨云退翳丸的质量控制方法研究

宋新波,张丽娟,李 锦,张永旺,郑 瑾,刘黄刚
(天津中医药大学,天津 300193)

拨云退翳丸是《中国药典》2005 年版一部收录的成方制剂,是由密蒙花、蒺藜(盐炒)、菊花、木贼、蛇蜕、蝉蜕、荆芥穗、蔓荆子、薄荷、当归、川芎、黄连、地骨皮、花椒、楮实子、天花粉、甘草 17 味中药组成的传统蜜丸。具有散风明目、消障退翳的功效,用于目翳外障、视物不清、隐痛流泪。为进一步提高其质量标准,更有效地控制内在质量,本实验对其进行显微鉴定,检出全方 17 种组成药味,避开交叉,排除干扰,选取各药具有鉴别价值的特征,绘制墨线图。并研究了其中花椒、甘草、木贼、蔓荆子的薄层色谱行为,与显微鉴定结论吻合。采用 HPLC 法建立了拨云退翳丸中甘草酸的测定方法。结果表明方法专属性较强,能够有效地控制拨云退翳丸中的质量。

1 显微鉴定

- 1.1 仪器与材料:Olympus CX41 生物显微镜,拨云退翳丸由天津达仁堂制药厂生产,批号 D542014、D542015、D542019。
- 1.2 方法与结果:以水溶解蜜丸,滤过后制备粉末制片,镜下观察各药味的鉴别特征。见图 1。
 - 1.2.1 密蒙花:星状毛多碎断,完整者体部 2 细胞,基部并列,每细胞 2 分叉,分叉较平直或稍弯曲,先端渐尖。花粉粒呈类圆形,具 3 孔沟,表面纹饰不明显,隐约可见呈颗粒状。
 - 1.2.2 木贼:茎表皮碎片表皮细胞表面观呈长方形,垂周壁甚厚,深波状弯曲,整齐;纵断面观壁厚,有孔沟。茎表皮碎片气孔深陷,纵行排列,长椭圆形,保卫细胞内壁具多数横向平行的条状增厚。
 - 1.2.3 蒺藜:内果皮纤维成束,淡黄色,上下数层纵

橫交錯排列,纖維長短不一,壁較厚,木化。

1.2.4 当归:纺锤形韧皮薄壁细胞,壁较一般薄壁细胞稍厚,非木化,有极细微的斜向交错网状纹理,中间有菲薄而稍弯曲的横隔。

1.2.5 川芎:木栓细胞深黄棕色,多层重叠,呈多角形,壁薄,微波状弯曲。

1.2.6 天花粉:淀粉粒较多,类圆形,脐点点状、短缝状或人字状,复粒由2~14分粒组成,常有一个大的盔帽形分粒下端与10多个小分粒复合。石细胞单个散在或多个整齐连接,呈长方形、类方形或多角形,纹孔或孔沟细密。

1.2.7 楮实子:果皮栅状细胞为果皮下皮黏液细胞,细胞壁有纵向细条纹增厚,非木化,条纹增厚边缘呈细齿状。种皮表皮细胞呈多角形,略呈连珠状,非木化,胞腔内含黄棕色物。

1.2.8 甘草:晶鞘纤维,纤维束周围的细胞中,含有草酸钙方晶,形成晶鞘纤维,微木化或非木化。木栓细胞为棕红色,多角形,大小均匀,细胞壁平直,表面观细胞排列整齐。

1.2.9 薄荷:非腺毛多碎断,稍弯曲,略呈折节状,疣状突起较细密。

1.2.10 荆芥穗:内果皮石细胞淡棕色,垂周壁深波状弯曲,密具纹孔。宿萼表皮细胞,细胞呈类多角形,壁薄,垂周壁深波状弯曲。

1.2.11 蔓荆子:非腺毛壁稍厚,有疣状突起,顶端细胞较密,且基部稍粗,足部皱缩。

1.2.12 蛇蛻:細胞長橢圓形,灰褐色。

1.2.13 花椒:种皮表皮细胞红棕色,表面观呈多角形,壁略呈念珠状增厚。

1.2.14 黄连:石细胞呈鲜黄色,单个散在,呈类圆形或类方形,边缘大多不平整或有凹凸。

1.2.15 菊花:花粉粒呈黄色,呈类圆形,表面为负网状纹饰并具刺。

1.2.16 蝉蛻:体壁碎片淡黄色,表面密布有圆锥形短刺,乳头状突起,有的刚毛基痕可见。刚毛棕红色,单细胞,具柄,长短不一,多碎断。

1.2.17 地骨皮:草酸钙砂晶常散在,极微细,略呈箭头形。

2 薄层色谱鉴定

2.1 仪器与材料:拨云退翳丸由天津达仁堂制药厂生产,批号 D542014、D542015、D542019;花椒(批号 1106-200001)、甘草(批号 120904-200511)对照药材由中国药品生物制品检定所提供。

2.2 方法与结果

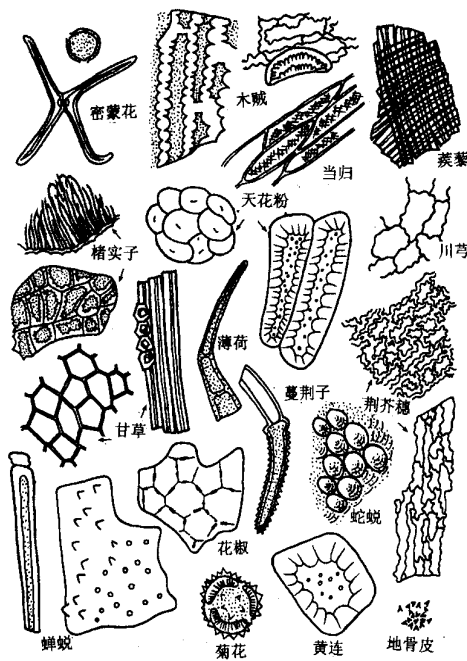


图 1 拨云退翳丸显微特征

Fig. 1 Microcharacteristics of components in Boyun Tuiyi Pills

2.2.1 花椒:称取拨云退翳丸 18 g,加硅藻土 9 g,研匀,加氨水 10 mL 浸润,氯仿 40 mL,超声 30 min,滤液蒸干,残渣加乙醚溶解成 2 mL,作为供试品溶液。按处方量自制成缺花椒的成药 17.4 g,同法制备阴性对照溶液。按处方量自制成药 18 g,同法制备阳性对照溶液。取花椒对照药材 0.6 g,粉碎,加氨水 10 mL 浸润,氯仿 40 mL,同法制备对照药材溶液。用毛细管分别吸取阴性对照溶液、阳性对照溶液、供试品溶液、花椒对照药材溶液各 5 μ L,分别点样于同一高效硅胶 G 板上,以苯-醋酸乙酯-无水乙醇-氨水(12:1:1:0.5)为展开剂,上行展开,取出,晾干,喷以香草醛-硫酸溶液,加热至斑点显色清晰。结果显示在供试品、阳性对照和对照药材的色谱中相应位置上均有一相同颜色的斑点,阴性对照则无。见图 2-A。

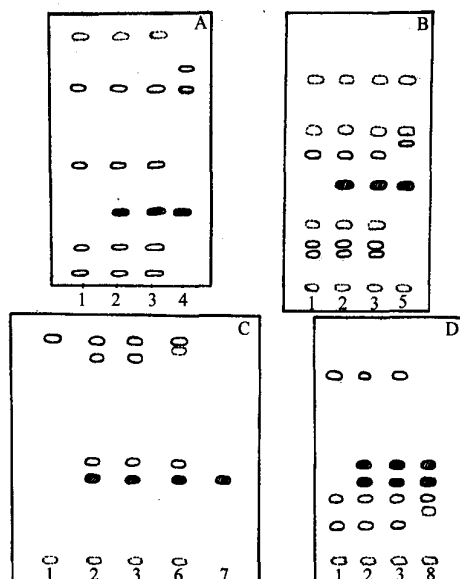
2.2.2 蔓荆子:称取拨云退翳丸 18 g,加硅藻土 9 g,研匀,加丙酮 30 mL,浸渍 4~6 h,滤过,滤液浓缩挥干,加 1 mL 丙酮溶解,作为供试品溶液。按处方量自制缺蔓荆子的成药 16.4 g,同法制备阴性对照溶液。按处方量自制成药 18 g,同法制备阳性对照溶液。称取蔓荆子对照药材 1.6 g,粉碎,加丙酮 30 mL,同法制备蔓荆子对照药材溶液。用毛细管分别吸取阴性对照溶液、阳性对照溶液、供试品溶液、蔓荆子对照药材溶液各 10 μ L,分别点样于同一高效

硅胶 G 板上,以石油醚-醋酸乙酯(3:2)为展开剂,上行展开,取出,晾干,喷以香草醛-硫酸溶液,加热至斑点显色清晰。结果显示:在样品色谱和阳性对照色谱中,与蔓荆子对照药材色谱相应位置上有相同的黄色斑点,阴性则无。见图 2-B。

2.2.3 甘草:称取拨云退翳丸 18 g,加硅藻土 9 g,研匀,加 0.5%氨水 150 mL,超声提取 3 次,合并 3 次提取液,浓缩至 40 mL,滤过,滤液加浓硫酸调 pH 3,滤取析出的沉淀,水洗 3 次,自然干燥后,加 95%乙醇 10 mL,加热回流 3 h,滤过,滤液浓缩至 2 mL,即得供试品溶液。按处方量自制成缺甘草的成药 17.7 g,同法制备阴性对照溶液。按处方量自制成药 18 g,同法制备阳性对照溶液。称取甘草对照药材 0.3 g,粉碎,加 0.5%氨水超声提取 3 次,每次 20 mL,合并 3 次提取液,浓缩至 5 mL,滤过,滤液加浓硫酸调 pH 3,滤取析出的沉淀,水洗 3 次,自然干燥后,加 95%乙醇 10 mL,加热回流 3 h,滤过,滤液浓缩至 2 mL,即得甘草对照药材溶液。称取甘草酸单铵盐 2 mg,加乙醇 1 mL 溶解,作为甘草酸对照品溶液。用毛细管吸取阴性对照溶液、阳性对照溶液、供试品溶液、甘草对照药材溶液、甘草酸单铵盐对照品溶液各 5 μ L,分别点样于同一块高效硅胶 G 板上,以醋酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15:1:1:2)为展开剂,上行展开,取出,晾干,喷以 1%碘的四氯化碳溶液后,加热至斑点显色清晰。结果显示在样品色谱、阳性对照、甘草对照药材色谱中均与甘草酸单铵盐对照品在相应位置上有相同颜色的斑点,阴性则无。见图 2-C。

2.2.4 木贼:称取拨云退翳丸 18 g,加硅藻土 9 g,研匀,加 75%甲醇 40 mL,盐酸 1 mL,加热水解 1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加水 10 mL 溶解,用醋酸乙酯提取 2 次,每次 10 mL,合并醋酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。按处方量自制成缺木贼的成药 16.4 g,同法制备阴性对照溶液。按处方量自制成成药 18 g,同法制备阳性对照溶液。称取木贼对照药材 1.6 g,加 75%甲醇 40 mL,盐酸 1 mL,加热水解 1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加水 10 mL 溶解,用醋酸乙酯提取 2 次,每次 10 mL,合并醋酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,即得木贼对照药材溶液。用毛细管分别吸取阴性对照溶液、供试品溶液、阳性对照溶液、木贼对照药材溶液各 5 μ L,分别点样于同一高效硅胶 G 板上,以环己烷-醋酸乙酯-甲酸(8:4:0.4)为展开剂,上行展开,取出,晾干,喷以 5%三氯化铝乙醇溶液,立即置

紫外光灯(365 nm)下检视。结果显示在样品、阳性对照和木贼对照药材的色谱中,同一位置上均有一相同颜色的荧光斑点,阴性则无。见图 2-D。



1-阴性对照 2-阳性对照 3-供试品溶液 4-花椒对照药材
5-蔓荆子对照药材 6-甘草对照药材 7-甘草酸对照品
8-木贼对照药材
1-negative sample 2-positive sample 3-sample
4-*Pericarpium Zanthoxyli* 5-*Fructus Viticis Simplicifoliae*
6-*Radix Glycyrrhizae* 7-glycyrrhizic acid reference substance
8-*Herba Equiseti Hiemalis*

图 2 拨云退翳丸中花椒(A)、蔓荆子(B)、甘草(C)和木贼(D)的 TLC 色谱

Fig. 2 TLC Chromatograms of *Pericarpium Zanthoxyli* (A), *Fructus Viticis Simplicifoliae* (B), *Radix Glycyrrhizae* (C), and *Herba Equiseti Hiemalis* (D) in Boyun Tuiyi Pills

3 拨云退翳丸中甘草酸的 HPLC 法测定

3.1 仪器与材料:Shimadzu LC-10AD 高效液相色谱仪,SPD-10A UV 检测器,Hamilton 进样器(25 μ L 定量管)、浙江大学 N-2000 双通道色谱工作站,KQ2200DB 型数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。甘草酸铵对照品由中国药品生物制品检定所提供,批号 110731-200306,拨云退翳丸由天津达仁堂制药厂生产,复方中各味药材购于药店,甲醇、乙腈(色谱纯),水为新制重蒸水、冰醋酸、氨水(分析纯)。

3.2 方法与结果

3.2.1 色谱条件:Thermo ODS C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m);流动相:乙腈-水-冰醋酸(36:62:2);体积流量:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C。

3.2.2 对照品溶液的制备:精密称取甘草酸铵 4.3

mg, 置 50 mL 量瓶中, 加入适量甲醇溶解, 超声处理 5 min, 取出放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得 (82.5 $\mu\text{g/mL}$)。

3.2.3 供试品溶液的制备: 拨云退翳丸剪碎, 取碎块 3 g, 精密称定, 加入 75 mL 3% 氨水-甲醇 (1:1), 称定质量, 超声提取 30 min, 取出放冷, 补足质量, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 续滤液, 即得, 备用。

3.2.4 阴性对照溶液的制备: 按处方量精密称取除去甘草的各药材粉末 (粉碎过 100 目), 混匀成阴性对照粉末, 自制蜜丸剂, 取碎块 3 g, 按照供试品溶液的制备方法操作, 即得。

3.2.5 标准曲线的制备: 取 82.5 $\mu\text{g/mL}$ 甘草酸铵对照品溶液, 分别稀释为不同质量浓度, 用微量注射器吸取 10 μL 分别注入高效液相色谱仪, 进样测定, 记录峰面积。以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 6 \times 10^6 X - 7\ 164.9$, $r = 0.999\ 2$ 。结果表明甘草酸铵在 0.0825~1.650 μg 与峰面积的线性关系良好。

3.2.6 精密度试验: 精密吸取 82.5 $\mu\text{g/mL}$ 甘草酸铵对照品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪, 进样测定, 记录峰面积, 结果其 RSD 为 0.24% ($n=5$)。

3.2.7 重现性试验: 精密称同一批号拨云退翳丸碎块 3.0 g, 精密称定 5 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 记录甘草酸铵峰面积, 计算得其 RSD 为 1.4%。

3.2.8 稳定性试验: 取同一供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定甘草酸铵峰面积, 计算得其 RSD 为 1.2%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.2.9 回收率试验: 取样品 5 份, 每份 3.0 g, 精密称定, 置于锥形瓶中, 各精密加入 0.182 mg/mL 甘草酸对照品溶液 6 mL, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算得平均回收率为 103.2%, RSD 为 1.0%。

3.2.10 样品测定: 取 3 批拨云退翳丸剪碎, 每批称定 2 份, 每份 3.0 g, 制备供试品溶液, 微量注射器准确吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪, 进样测定, 以外标法计算甘草酸的质量分数。色谱图见图 3。结果见表 1。

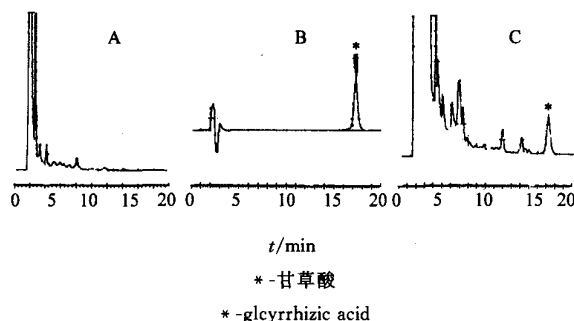


图 3 阴性对照 (A)、甘草酸对照品 (B) 和拨云退翳丸 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC Chromatograms of negative sample (A), glycyrrhizic acid reference substance (B), and Boyun Tuiyi Pills (C)

表 1 拨云退翳丸中甘草酸的测定结果
Table 1 Determination of glycyrrhizic acid in Boyun Tuiyi Pills

批 号	甘草酸/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
D542014	0.178 2
D542015	0.184 8
D542019	0.183 5

4 讨论

拨云退翳丸为传统蜜丸剂型, 具有方中药味多而比例小、含动物药、有效成分不明确的特点, 且处方中同时含有酸性成分和碱性成分, 很容易优先结合而对待测成分甘草酸的溶出形成干扰, 本实验以 3% 氨水-甲醇 (1:1) 为提取溶媒, 有效排除黄连、花椒和川芎所含生物碱的干扰。利用 HPLC 的高效分离能力, 将甘草酸从复杂的大复方蜜丸、多味药材干扰成分中分离并准确测定。

《中草药》杂志被评为“第五届中国百种杰出学术期刊”

2006 年 10 月 27 日中国科学技术信息研究所公布了“第五届中国百种杰出学术期刊”名单,《中草药》杂志获此殊荣——“第五届中国百种杰出学术期刊”。这个名单是按照期刊评价指标体系对重要指标 (影响因子、总被引频次、他引总引比、基金论文比和即年指标) 进行打分的结果, 并在近几年来召开了 20 余场专家研讨会, 对评价指标不断进行推敲和改进而评出的。

摘自中国科学技术信息研究所《2005 年度中国科技论文统计与分析年度报告》