

2.9 回收率试验: 采用加样回收率方法。精密称取批号 20080317 样品细粉适量, 分别加入黄芪甲苷对照品 0.420 1、0.504 0、0.588 0 mg, 制备供试品溶液, 进样, 依法测定, 计算回收率。结果表明, 本方法的平均回收率为 96.01%, RSD 为 1.34% ($n=9$)。

2.10 样品测定: 取 3 个不同批号的补血颗粒样品, 每批 6 份, 依法测定, 用回归方程计算, 得批号为 20070911、20080119、20080317 补血颗粒中黄芪甲苷的质量分数分别为 11.62、11.86、12.07 mg/袋。

3 讨论

本品为复方中药颗粒剂, 许多成分干扰黄芪甲苷的测定。根据实践工作发现, 薄层色谱法对薄层条件要求比较苛刻, 重现性不理想; 同时, 黄芪甲苷无特征紫外吸收, 在紫外 203 nm 处有末端吸收, 采用 HPLC-UV 检测时, 受流动相影响大, 基线不理

想, 检测灵敏度较低。本次研究中, 采用的蒸发光散射检测器为通用型质量检测器, 检测时流动相在检测器内挥发成气体, 样品组分形成气溶胶, 进入检测器产生响应, 从而获得理想的基线和检测灵敏度, 克服了紫外末端检测的不足。

试验中曾对黄芪甲苷的提取溶剂进行考察, 表明在 2% KOH 甲醇中略溶。在供试品溶液的制备中, 采用超声 10、20、30、40、60 min 溶解, 结果显示超声 40 min 能使黄芪甲苷完全溶出, 其他色谱条件的优化还有待进一步的探索性试验工作。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005
- [2] 吴玉强, 罗 轶. HPLC-ELSD 法测定复方扶芳藤合剂中黄芪甲苷[J]. 中草药, 2006, 37(9): 1353-1354
- [3] 梁瑞雪, 张新军, 贾元印, 等. 薄层扫描法测定尘肺清颗粒中黄芪甲苷的含量[J]. 时珍国医国药, 2006, 9(17): 1689-1690

苁黄补肾胶囊质量标准的研究

侯 峰, 刘 芳, 莫启武*

(广州美晨药业有限公司, 广东 广州 510075)

摘 要: 目的 建立苁黄补肾胶囊的质量标准。方法 采用 TLC 法鉴别处方中的肉苁蓉、熟地黄、菟丝子、五味子; 用 HPLC 法测定肉苁蓉中的松果菊苷。其中 HPLC 法采用 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 30 ℃; 流动相为甲醇-乙腈-1% 醋酸溶液(13: 10: 77); 体积流量: 1 mL/min; 检测波长为 334 nm。结果 TLC 鉴别色谱特征斑点明显; 松果菊苷在 0.48~1.92 μg 存在良好的线性关系, 平均回收率为 99.1%, RSD 为 1.52%。结论 所建立的 TLC 和 HPLC 法专属性强, 重复性好, 可用于苁黄补肾胶囊的质量控制。

关键词: 苁黄补肾胶囊; 肉苁蓉; 熟地黄; 菟丝子; 五味子; 松果菊苷; 薄层色谱; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2009)08-1249-04

苁黄补肾胶囊由肉苁蓉、熟地黄、菟丝子、五味子(酒蒸)制成, 丸剂标准收载于《国家药品监督管理局国家中成药标准汇编》内科肾系分册, 具有滋补肾阴、强筋壮骨的功效。为了提高该药质量的可控性和检验方法的专属性, 本研究建立了熟地黄、菟丝子、五味子的薄层色谱鉴别方法, 改变了肉苁蓉鉴别供试品溶液的制备方法。通过试验, 发现检测本品的毛蕊花糖苷存在比较大的干扰, 所以改为测定肉苁蓉另一活性成分松果菊苷, 并建立了 HPLC 检测方法。

1 仪器和材料

紫外点样仪(上海安亭电子仪器厂); SPD-10A_{vp} 紫外检测仪(日本岛津公司); P4000 四元泵(美国热电公司); AT-130 色谱柱恒温箱(天津市恒奥科技发展有限公司); HN1006 超声清洗机(华南超声设备厂); HM202 电子分析天平(日本 AND 公司); 4K15C 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司)。

硅胶 G(青岛海洋化工有限公司); 甜菜碱(批号 894-200202)、5-羟甲基糠醛(批号 111626-200402)、五味子乙素(批号 765-200104)、山柰酚(批号 0861-200002)、松果菊苷(批号 111670-200502) 对照品由中国药品生物制品检定所提供; 苁黄补肾胶囊(450 mg/粒, 批号 070701、070702、070703) 及缺肉苁蓉、熟地黄、菟丝子、五味子阴性样品为广州美晨药业有

硅胶 G(青岛海洋化工有限公司); 甜菜碱(批号 894-200202)、5-羟甲基糠醛(批号 111626-200402)、五味子乙素(批号 765-200104)、山柰酚(批号 0861-200002)、松果菊苷(批号 111670-200502) 对照品由中国药品生物制品检定所提供; 苁黄补肾胶囊(450 mg/粒, 批号 070701、070702、070703) 及缺肉苁蓉、熟地黄、菟丝子、五味子阴性样品为广州美晨药业有

* 收稿日期: 2008-10-25

作者简介: 侯 峰(1976-), 男, 湖北安陆人, 工程师, 毕业于西北大学, 从事中成药的研发工作。

Tel: (020)37662297 E-mail: smallhome@163.com

限公司提供;乙睛为色谱纯(迪马公司),其余试剂为分析纯。

2 薄层色谱鉴别

2.1 肉苁蓉的薄层色谱鉴别:取本品内容物适量,研细,称取粉末 0.5 g,加水 20 mL,超声 10 min 使溶散,离心(4 500 r/min) 5 min,取上清液再真空抽滤,滤液过强酸性阳离子交换树脂(120 cm × 3 cm),用 20 mL 水洗柱,再用 2 mol/L 氨水溶液 40 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,用乙醇 2 mL 溶解,静置,取上清液作为供试品溶液。另取缺肉苁蓉的阴性样品 0.3 g,同法制成阴性供试液。取甜菜碱对照品适量,加乙醇制成 5 mg/mL 的对照品溶液。吸取供试品溶液和阴性供试液各 10 μL,对照品溶液 5 μL,分别点样于同一硅胶 G 薄层板上,以甲醇-冰醋酸-水(18:1:4)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以改良碘化铋钾试液。结果供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,而阴性样品色谱无对应斑点,见图 1。

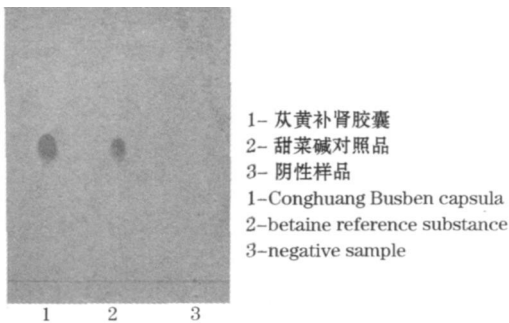


图 1 苻黄补肾胶囊中肉苁蓉的薄层色谱图

Fig 1 TLC Chromatogram of *Herba Cistanches* in Conghuang Bushen Capsula

2.2 熟地黄的薄层色谱鉴别:取本品内容物适量,研细,称取粉末 2.0 g,加水 30 mL,超声处理 10 min,离心(4 500 r/min) 5 min,取上清液用醋酸乙酯提取 2 次,每次 15 mL,合并提取液,回收醋酸乙酯至干,残渣加乙醇 1 mL 溶解,作为供试品溶液。另取缺熟地黄的阴性样品 1.5 g,同法制成阴性供试液。取 5-羟甲基糠醛对照品适量,加乙醇制成 0.5 mg/mL 对照品溶液。吸取供试品溶液和阴性供试液各 10 μL,对照品溶液 5 μL,分别点样于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,以石油醚(60~90 °C)-醋酸乙酯(1:1)上层液为展开剂,展开,取出,晾干,置于 254 nm 紫外灯下检视。结果供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的暗斑点,阴性样品色谱无对应暗斑点,见图 2。

2.3 菟丝子的薄层色谱鉴别:取本品内容物适量,

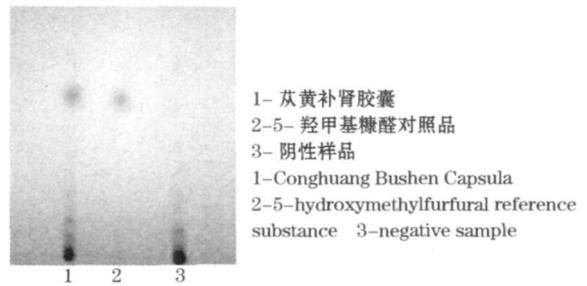


图 2 苻黄补肾胶囊中熟地黄的薄层色谱图

Fig 2 TLC Chromatogram of *Radix Rehmanniae Preparata* in Conghuang Bushen Capsula

研细,称取粉末 2.0 g,加无水乙醇 10 mL,超声处理 15 min,滤过,滤液浓缩至干,加无水乙醇 1 mL 溶解残渣,作为供试品溶液。另取缺菟丝子的阴性样品 1.9 g,同法制成阴性供试液。取山柰酚对照品适量,加乙醇制成 0.2 mg/mL 对照品溶液。吸取供试品溶液和阴性供试液各 10 μL,对照品溶液 5 μL,分别点样于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-醋酸乙酯-甲醇(5:5:3)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 3% 三氯化铝乙醇溶液,置于 365 nm 紫外灯下检视。结果供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性样品色谱无对应斑点,见图 3。

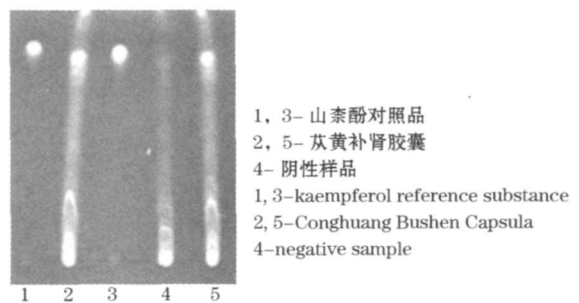


图 3 苻黄补肾胶囊中菟丝子的薄层色谱图

Fig 3 TLC Chromatogram of *Semen Cuscutae* in Conghuang Bushen Capsula

2.4 五味子的薄层色谱鉴别:取本品内容物适量,研细,称取粉末 10.0 g,加入氯仿 20 mL,加热回流 30 min,滤过,滤液浓缩至约 1 mL,作为供试品溶液。另取缺五味子的阴性样品 20.0 g,同法制成阴性供试液。取五味子乙素对照品适量,加乙醇制成 0.4 mg/mL 对照品溶液。吸取供试品溶液、阴性供试液和对照品溶液各 10 μL,分别点样于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,以石油醚-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1)上层液为展开剂,展开,取出,晾干,置于 254 nm 紫外灯下检视。结果供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的暗斑点,阴性样

品色谱无对应暗斑点, 见图 4。

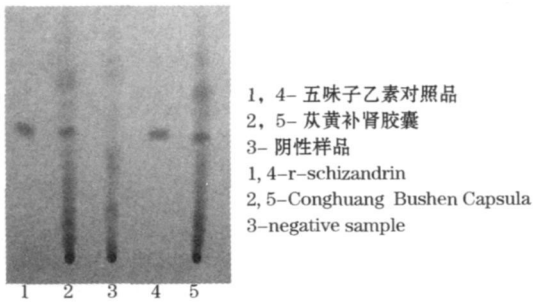


图 4 苁黄补肾胶囊中五味子的薄层色谱图

Fig 4 TLC Chromatogram of *Fructus Schisandrae Chinensis* in Conghuang Bushen Capsula

3 松果菊苷的 HPLC 法测定

3.1 色谱条件: Kromasil-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 30 °C; 流动相为甲醇-乙腈-1% 醋酸溶液 (13: 10: 77); 体积流量: 1 mL/min; 检测波长为 334 nm。理论塔板数按松果菊苷峰计算应不低于 4 000。

3.2 对照品溶液制备: 精密称取松果菊苷对照品适量, 置棕色瓶中, 加流动相配成 0.16 mg/mL 的对照品溶液。

3.3 供试品溶液的制备: 取本品内容物, 研细, 取 0.5 g, 精密称定, 置 50 mL 棕色量瓶中, 精密加流动相 20 mL, 密塞, 摇匀, 称定质量, 浸泡 0.5 h, 超声处理 40 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 加流动相补足缺失的质量, 摇匀, 离心, 取上清液, 用 0.45 μm 微滤膜滤过, 滤液置棕色瓶中, 即得。取缺肉苁蓉的阴性样品 0.3 g, 同法制成阴性供试品溶液。

3.4 线性关系考察: 精密吸取 0.16 mg/mL 松果菊苷对照品溶液 3、5、7、10、12 μL 分别注入液相色谱仪, 测定峰面积值。以峰面积为横坐标, 进样质量为纵坐标, 计算得回归方程 $W = 7.97149 \times 10^{-10} A - 3.3143 \times 10^{-5}$, $r = 0.99996$ 。结果表明松果菊苷在 0.48~1.92 μg 有良好的线性关系。

3.5 阴性对照试验: 精密吸取松果菊苷对照品溶液、供试液和供试品溶液各 5 μL, 注入液相色谱仪, 结果在松果菊苷保留时间位置上阴性供试品溶液色谱没有明显干扰。见图 5。

3.6 精密度试验: 精密吸取 0.16 mg/mL 松果菊苷对照品溶液 5 μL 注入液相色谱仪, 重复 6 次, 记录峰面积, 结果其 RSD 为 1.03%。

3.7 稳定性试验: 分别于 0、2、4、6、8 h 精密吸取苁黄补肾胶囊供试品溶液各 5 μL 注入液相色谱仪, 记录松果菊苷峰面积, 计算, 结果其 RSD 为 1.41%。

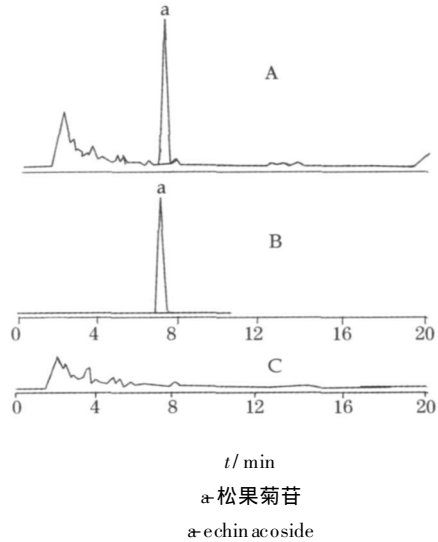


图 5 苁黄补肾胶囊(A)、松果菊苷对照品(B)和阴性样品(C)的 HPLC 色谱图

Fig 5 HPLC Chromatograms of Conghuang Bushen Capsula (A), echinacoside reference substance (B), and negative sample (C)

表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

3.8 重现性试验: 对批号 070701 样品取样 6 份, 制备供试品溶液, 测定, 记录松果菊苷的质量分数, 计算得其 RSD 为 1.01%。

3.9 回收率试验: 取同一批 (批号 070701, 含松果菊苷 9.2 mg/g) 样品, 按照 0.4、0.25、0.1 g 分别精密称定 3 份, 共 9 份, 分别精密加入 1.10 mg/mL 松果菊苷对照品溶液 3、2、1 mL, 制备供试品溶液, 测定, 计算, 结果平均回收率为 99.1%, RSD 为 1.52%。

3.10 样品测定: 按照上述方法对 3 批供试品进行测定, 按外标法计算, 结果见表 1。

表 1 苁黄补肾胶囊中松果菊苷的测定结果 (n=3)
Table 1 Determination of echinacoside in Conghuang Bushen Capsula (n=3)

批号	松果菊苷 / (mg · 粒 ⁻¹)	RSD / %
070701	4.14	0.87
070702	4.28	0.68
070703	3.96	0.74

4 讨论

甜菜碱的提取如果用原剂型标准中的方法, 供试品色谱中的斑点与对照品的斑点位置对应不上, 总是差一段距离, 具体原因有待进一步的研究。采用过强酸性阳离子树脂的提取法后, 两者斑点位置能很好的对应。

松果菊苷和毛蕊花糖苷均为肉苁蓉中活性成分, 原剂型标准检测毛蕊花糖苷, 但是相同方法检测

本品中毛蕊花糖苷时发现比较大的干扰。试验了甲醇-乙腈-1%乙酸(13:10:77, 11:9:80, 15:10:75)、甲醇-0.1%甲酸(28:72, 35:65)流动相,以及 Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和 Ultimate-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱,结果均不能使干扰峰与毛蕊花糖苷的峰分开。而检测松果菊苷时没有发现明显干扰峰。所以选择松果菊苷作为测定成分。

松果菊苷对照品试过用甲醇溶解,注入色谱仪后,在其色谱峰前会有一个大包峰且峰面积与进样量

不呈线性。改用流动相溶解后,一切正常。松果菊苷和毛蕊花糖苷同为苯乙醇苷类化合物,有文献报道毛蕊花糖苷在甲醇中不稳定而在微酸性溶液中能保持稳定^[1]。试验结果表明,松果菊苷也有相同性质。

有文献报道检测松果菊苷用波长 330 nm^[2],但是经试验发现,其最大吸收波长在 334 nm。并且使用 334 nm 检测本品时,并没有发现明显干扰峰。

参考文献:

- [1] 陈发奎. 常用中草药有效成分含量测定[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997.
[2] 中国药典[S]. 一部. 2005

RP-HPLC 法测定散风止痛丸中欧前胡素

王蔚*

(广州中一药业有限公司, 广东 广州 510130)

摘要: 目的 建立散风止痛丸中欧前胡素的 HPLC 测定方法。方法 色谱柱为 Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(52:48); 检测波长为 250 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为室温; 进样量为 10 μL。结果 欧前胡素在 1.648~26.368 μg/mL 与其峰面积呈良好的线性关系, 平均加样回收率为 98.1%, RSD 为 1.6% (n=6)。结论 该方法灵敏、准确、快速、专属性强, 可用于散风止痛丸中欧前胡素的测定。

关键词: 散风止痛丸; 欧前胡素; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2009)08-1252-02

散风止痛丸由制白附子、白芷、白术、茯苓、益母草、甘草等组成, 具有祛湿通窍、活血消肿之功效, 用于头痛、疮疡肿痛等。白芷为散风止痛丸中主药之一, 其主要成分为香豆素类。故本实验以欧前胡素作为质量标准评价指标, 建立散风止痛丸中欧前胡素的高效液相色谱测定方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(DAD 检测器, 自动进样器), 华南超声波清洗器(功率 250 W, 频率 45 Hz)。

欧前胡素对照品(批号 110826-200511, 中国药品生物制品检定所), 乙腈(Merck, 色谱纯); 甲醇、丙酮等均为分析纯; 纯化水。散风止痛丸由本公司提供。

2 方法与结果

2.1 检测波长的选择: 用 DAD 检测器检测得到欧前胡素光谱图, 在约 220、250、300 nm 处有吸收。如选择 220 nm, 因波长较短, 干扰较大; 如选择 300 nm, 则

响应值较小, 故选择 250 nm 为测定波长。

2.2 流动相的选择: 参照《中国药典》2005 年版一部白芷项下测定方法中所用流动相时, 欧前胡素的色谱峰有杂质峰干扰。经过对流动相比率的比较, 确定以乙腈-水(52:48)为流动相。结果供试品溶液中欧前胡素峰可以达到基线分离, 峰形对称, 保留时间适中(8.676 min), 分离度大于 1.5, 理论板数为 13 531。

2.3 色谱条件^[1,2]: 色谱柱为 Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(52:48); 检测波长为 250 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为室温; 进样量为 10 μL。理论板数按欧前胡素峰计算应不低于 3 000。色谱图见图 1。

2.4 峰质量分数的检查: 分别精密吸取欧前胡素对照品溶液和供试品溶液各 10 μL, 测定, 并用二极管阵列检测器(DAD)在 220~400 nm 波长扫描, 检查峰的质量分数。结果供试品溶液中被测峰的质量分数因子比阈值 970 000 大, 表明该峰为纯物质峰。

* 收稿日期: 2009-02-31

作者简介: 王蔚 E-mail: fzfw03@yahoo.com.cn