

麒麟丸质量标准的提高研究^Δ

陈小凯^{1*}, 段启^{2#a}, 何伟^{1#b}, 李勇¹, 朱怡洁¹, 庄义修²(1. 广东药学院药物研究所/广东省药物新剂型重点实验室, 广州 510006; 2. 广东食品药品职业学院, 广州 510520)

中图分类号 R283.64;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)23-2164-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.23.18

摘要 目的:提高麒麟丸的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法定性鉴别麒麟丸中的丹参、锁阳、枸杞子、青皮;采用高效液相色谱法测定何首乌中二苯乙烯苷的含量。色谱柱为Kromasil 100-5 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(15:85, V/V),流速为1.0 ml/min,柱温为25 ℃,检测波长为320 nm。结果:TLC图谱斑点清晰、分离度好,且阴性对照无干扰。二苯乙烯苷的进样量在0.040 04~0.600 60 μg范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD均<2%;平均加样回收率为96.40%,RSD=0.93%($n=6$)。结论:提高后的质量标准能更好地控制麒麟丸的质量。

关键词 麒麟丸;质量标准;提高;薄层色谱法;高效液相色谱法;二苯乙烯苷;锁阳;枸杞子

Study on the Improvement of Quality Standard for Kirin Pill

CHEN Xiao-kai¹, DUAN Qi², HE Wei¹, LI Yong¹, ZHU Yi-jie¹, ZHUANG Yi-xiu²(1. Medicine Institute of Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong Key Laboratory of Advanced Drug Delivery, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To improve the quality standard of Kirin pill. METHODS: *Salvia miltiorrhiza*, *Citrus reticulata*, *Lycium barbarum* and *Cynomorium songaricum* in this prescription were identified by TLC. The content of stilene glucoside in *Polygonum multiflorum* was determined by HPLC. The determination was performed on Kromasil 100-5 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (15:85, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was maintained at 25 ℃, and detection wavelength was set at 320 nm. RESULTS: TLC spots were clear and well-separated without interference from negative sample. The linear range of stilene glucoside were 0.040 04-0.600 60 μg ($r=0.999\ 9$) with an average recovery of 96.40% (RSD=0.93%, $n=6$). The RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. CONCLUSIONS: Established standard is suitable for the quality control of Kirin pill.

KEY WORDS Kirin pill; Quality standard; Improvement; TLC; HPLC; Stilene glucoside; *Cynomorium songaricum*; *Lycium barbarum*

麒麟丸收载于《中华人民共和国卫生部部颁标准新药转正标准》(第十三册),由制何首乌、丹参、锁阳等15味中药组成^[1],具有补肾填精、益气养血之功效,用于治疗肾虚精亏、血气不足、腰膝酸软、倦怠乏力、面色不华,男子精液清稀、阳痿早泻,女子月经不调等症候。现有质量标准对制剂中何首乌、青皮、丹参、白芍进行了薄层色谱(TLC)定性鉴别,但未建立含量测定标准。为进一步加强对麒麟丸质量的可控性,本研究对该制剂中丹参、青皮的TLC鉴别方法进行了修订,增加了锁阳、枸杞子的TLC鉴别法,并建立了方中君药何首乌中有效成分二苯乙烯苷的含量测定方法。

1 材料

1.1 仪器

3000型高效液相色谱(HPLC)仪,含二极管阵列检测器

Δ 基金项目:广东省建设中医药强省立项资助科研课题(No.20121108)

* 硕士研究生。研究方向:中药制剂研发。电话:020-39352511。

E-mail:chenxiaokay2008@163.com

#a 通信作者:副教授,硕士。研究方向:中药质量控制。电话:020-28854935。E-mail:duanq2005@163.com

#b 通信作者:教授。研究方向:中药新药、新剂型。电话:020-39352503。E-mail:weih8201@163.com

(DAD)、Chromleon 色谱工作站(美国戴安公司);UV1101型紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司);ZF-90型暗箱式紫外仪(上海顾村光电仪器厂);KQ-300VDE型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);TH-1型薄层加热器(上海科哲生化科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

麒麟丸(汕头市麒麟药业有限公司,批号:20090209、20100110、20100607);丹酚酸B(批号:111562-200403)、熊果酸(批号:110742-200516)、甜菜碱(批号:110894-200503)、橙皮苷(批号:110721-201014)、二苯乙烯苷(批号:110844-200607,供含量测定用)对照品与丹参(批号:120923-200610)、锁阳(批号:121393-200401)、青皮(批号:121156-200602)对照药材均购自中国食品药品检定研究院;硅胶G、硅胶GF₂₅₄(青岛海洋化工有限公司);聚酰胺薄膜(台州市路桥四甲生化塑料厂);HPLC用甲醇、乙腈为色谱纯(美国Tedia公司);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 丹参的TLC鉴别 取麒麟丸约3g,研成细粉,精密称定,加入75%甲醇50ml,超声(功率:300W,频率:45kHz)处

理 30 min, 滤过, 滤液挥干, 残渣加水 20 ml 使溶解, 用盐酸调 pH 值至 2^[2], 置分液漏斗中, 用乙醚提取 3 次, 每次 20 ml, 合并乙醚提取液, 滤液挥干, 残渣加甲醇 1 ml 使溶解, 作为供试品溶液; 按处方比例自制缺丹参的阴性样品, 同法制备阴性对照溶液; 取丹酚酸 B 对照品, 加 75% 乙醇制成每 1 ml 含 2.0 mg 的对照品溶液^[9]; 取丹参对照药材粉末 0.2 g, 加 75% 甲醇 25 ml, 加热回流提取 1 h, 滤过, 滤液浓缩至 1 ml, 作为对照药材溶液。照 TLC 法^[3]试验, 吸取上述 4 种溶液各 6 μ l, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 以甲苯-乙酸乙酯-甲醇-甲酸 (5:4:2:1, V/V/V/V) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (254 nm) 下检视。结果, 供试品色谱中, 在与对照品色谱及对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点; 阴性对照无干扰。丹参的 TLC 图见图 1。

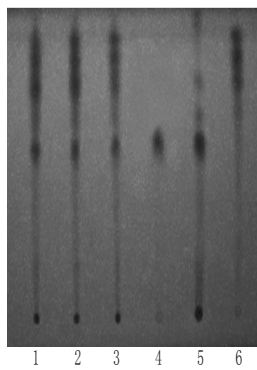


图 1 丹参的 TLC 图

1~3. 供试品; 4. 丹酚酸 B 对照品; 5. 丹参对照药材; 6. 阴性对照

Fig 1 TLC of *Salvia miltiorrhiza*

1-3. test samples; 4. salvianolic acid B control; 5. *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* reference substance; 6. negative control

2.1.2 锁阳的 TLC 鉴别 取麒麟丸约 10 g, 研成细粉, 精密称定, 加水 50 ml, 搅拌 30 min, 滤过, 滤渣加乙酸乙酯 50 ml, 超声 (功率: 300 W, 频率: 45 kHz) 处理 30 min, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 2 ml 使溶解, 作为供试品溶液; 按处方比例自制缺锁阳的阴性样品, 同法制备阴性对照溶液; 取锁阳对照药材粉末 1 g, 加乙酸乙酯 20 ml, 超声 (功率: 300 W, 频率: 45 kHz) 处理 30 min, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 2 ml 使溶解, 作为对照药材溶液; 取熊果酸对照品适量, 加甲醇制成每 1 ml 含 0.5 mg 的对照品溶液。照 TLC 法^[3]试验, 吸取上述 4 种溶液各 5 μ l, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-乙酸乙酯-甲酸 (20:4:0.5, V/V/V) 为展开剂^[3], 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 于 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰, 日光下检视。结果, 供试品色谱中, 在与对照品色谱及对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点; 阴性对照无干扰。锁阳的 TLC 图见图 2。

2.1.3 枸杞子的 TLC 鉴别 取麒麟丸约 10 g, 研成细粉, 精密称定, 加入甲醇 30 ml, 超声 (功率: 300 W, 频率: 45 kHz) 处理 30 min, 静置, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 20 ml 使溶解, 置分液漏斗中, 加乙酸乙酯提取 2 次, 每次 20 ml, 收集水层, 浓缩至 10 ml, 加入中性氧化铝 2 g, 水浴蒸干, 通过中性氧化铝柱 (内径 2.0 cm, 长 20 cm, 5 g 中性氧化铝干法上柱), 依次用石油醚、石油醚-乙酸乙酯-乙醇 (7:2:1, V/V/V)、乙酸乙酯-甲醇 (8:2, V/V) 洗至流出液近无色, 继用甲醇洗脱, 收集甲醇洗脱液, 水浴蒸干, 残渣加甲醇 1 ml 使溶解, 作为供试品溶液; 按处方比例

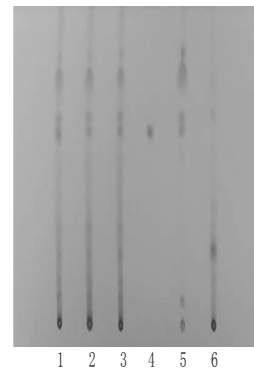


图 2 锁阳的 TLC 图

1~3. 供试品; 4. 熊果酸对照品; 5. 锁阳对照药材; 6. 阴性对照

Fig 2 TLC of *Cynomorium songaricum*

1-3. test samples; 4. ursolic acid control; 5. *Cynomorii Herba* reference substance; 6. negative control

自制缺枸杞子的阴性样品, 同法制备阴性对照溶液; 取甜菜碱对照品适量, 加甲醇制成每 1 ml 含 2.0 mg 的对照品溶液。照 TLC 法^[3]试验, 吸取上述 3 种溶液各 6 μ l, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以丙酮-无水乙醇-盐酸 (10:6:1, V/V/V) 为展开剂^[3], 展开, 取出, 晾干, 喷以碘化铋钾试液, 于 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰, 日光下检视。结果, 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点; 阴性对照无干扰。枸杞子的 TLC 图见图 3。



图 3 枸杞子的 TLC 图

1~3. 供试品; 4. 甜菜碱对照品; 5. 阴性对照

Fig 3 TLC of *Lycium barbarum*

1-3. test samples; 4. betaine control; 5. negative control

2.1.4 青皮的 TLC 鉴别 取麒麟丸约 5 g, 研成细粉, 精密称定, 加 1% NaOH 溶液 50 ml, 超声 (功率: 300 W, 频率: 45 kHz) 处理 30 min, 放冷, 滤过, 滤液用稀盐酸调 pH 值为 5^[4], 再次滤过, 残渣加适量甲醇使溶解, 作为供试品溶液; 按处方比例自制缺青皮的阴性样品, 同法制备阴性对照溶液; 取青皮对照药材粉末 2 g, 同法制备对照药材溶液; 取橙皮苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 ml 含 1.0 mg 的对照品溶液。照 TLC 法^[3]试验, 吸取上述 4 种溶液各 5 μ l, 分别点于同一聚酰胺薄膜上, 以乙醇-水 (55:45, V/V) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 三氯化铝乙醇溶液, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视。结果, 供试品色谱中, 在与对照品色谱及对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点; 阴性对照无干扰。青皮的 TLC 图见图 4。

2.2 二苯乙烯苷的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil 100-5 C₁₈ (250 mm \times 4.6

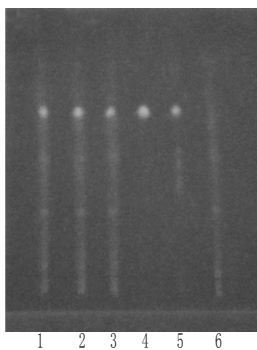


图4 青皮的TLC图

1~3.供试品;4.橙皮苷对照品;5.青皮对照药材;6.阴性对照

Fig 4 TLC of *Citrus reticulata*

1-3. test samples; 4. hesperidin control; 5. Reticulatae Pericarpium Citri Viride reference substance; 6. negative control

mm, 5 μm); 柱温: 25 °C; 流动相^[6]: 乙腈-水(15:85, V/V); 检测波长: 320 nm; 流速: 1.0 ml/min; 进样量: 10 μl。

2.2.2 检测波长的选择 取二苯乙烯苷对照品溶液适量, 用紫外分光光度计于190~600 nm波长范围内进行扫描, 结果发现在320 nm波长处有最大吸收, 故选用320 nm作为检测波长。二苯乙烯苷的紫外吸收光谱图见图5。

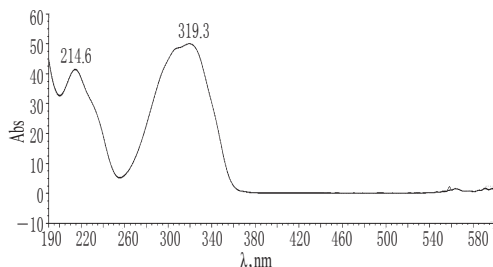


图5 二苯乙烯苷的紫外吸收光谱图

Fig 5 Absorption spectrum of stilene glucoside

2.2.3 供试品溶液的制备 取麒麟丸约0.5 g, 研成细粉, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 精密加入甲醇25 ml, 称定质量, 加热回流60 min, 放冷, 再次称定, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 静置, 上清液滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.2.4 对照品溶液的制备 精密称取二苯乙烯苷对照品0.010 01 g, 置10 ml量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 作为对照品贮备液。精密量取对照品贮备液1 ml, 置25 ml量瓶中, 加甲醇至刻度, 作为对照品溶液。

2.2.5 专属性试验 按处方比例及生产工艺制备缺何首乌的阴性样品, 按“2.2.3”项下方法制备阴性对照溶液。分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各10 μl, 注入液相色谱仪中, 按拟定的含量测定方法测定。结果, 阴性对照在二苯乙烯苷对照品峰相同保留时间处未见色谱峰, 说明供试品中其他组分对二苯乙烯苷的含量测定无干扰。二苯乙烯苷的HPLC图见图6。

2.2.6 线性关系考察 精密吸取二苯乙烯苷对照品溶液1、2、5、10、15 μl, 注入液相色谱仪中, 按上述色谱条件测定, 记录峰面积。以峰面积积分值(y)为纵坐标, 对照品进样量(x)为横坐标, 进行线性回归, 得二苯乙烯苷的回归方程为 $y=36.212x-0.1623$ ($r=0.9999, n=5$)。结果表明, 二苯乙烯苷的进样量在0.040 04~0.600 60 μg范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.2.7 精密度试验 精密吸取二苯乙烯苷对照品溶液10 μl, 注入液相色谱仪中, 重复进样6次, 按上述色谱条件测定, 记录

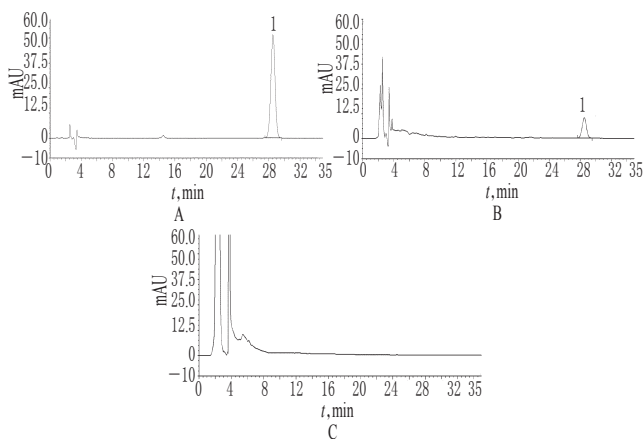


图6 二苯乙烯苷的HPLC图

A.二苯乙烯苷对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.二苯乙烯苷

Fig 6 HPLC chromatograms

A. stilene glucoside control; B. test sample; C. negative control; 1. stilene glucoside

峰面积。结果, $RSD=0.45\%$ ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.2.8 重复性试验 取同一批(批号: 20100110)麒麟丸粉末0.5 g, 平行6份, 分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液10 μl, 注入液相色谱仪中, 按上述色谱条件测定, 记录峰面积, 计算样品含量。结果, 每1 g样品平均含二苯乙烯苷0.946 3 mg, $RSD=1.18\%$ ($n=6$), 表明本方法重复性良好。

2.2.9 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号: 20100110)适量, 按上述色谱条件分别于0、1、2、4、8、12 h注入液相色谱仪中测定, 记录峰面积, 计算样品含量。结果, 每1 g样品平均含二苯乙烯苷0.940 0 mg, $RSD=0.89\%$ ($n=6$), 表明供试品溶液在12 h内基本稳定。

2.2.10 加样回收率试验 取已知二苯乙烯苷含量的同一批(批号: 20100110)麒麟丸粉末约0.23 g, 精密称定, 平行6份, 分别按约1:1的质量比加入相应量的二苯乙烯苷对照品, 照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算加样回收率, 结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

编号	称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
1	0.231 0	0.218 6	0.200 2	0.410 8	96.01		
2	0.229 5	0.217 2	0.200 2	0.411 2	96.92		
3	0.231 2	0.218 8	0.200 2	0.410 2	95.61	96.40	0.93
4	0.232 5	0.220 0	0.200 2	0.411 7	95.75		
5	0.230 8	0.218 4	0.200 2	0.410 9	96.15		
6	0.228 5	0.216 2	0.200 2	0.412 4	97.99		

2.2.11 样品含量测定 取3批样品各适量, 分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液。分别吸取对照品溶液、供试品溶液各10 μl, 注入液相色谱仪中, 按上述色谱条件测定, 记录峰面积, 以峰面积计算样品中二苯乙烯苷的含量, 结果见表2。

3 讨论

丹参的主要化学成分分为脂溶性成分和水溶性成分两大类, 其水溶性成分主要是酚酸类, 包括丹参素、原儿茶醛、丹酚酸等^[6]。丹参在麒麟丸中以水提取, 因此其TLC鉴别以丹酚酸B为指标性成分。另外, 其供试品溶液的制备尝试了多种操作方式, 最终选择以75%甲醇提取, 回收甲醇后采用盐酸调pH值, 再以乙醚提取的方法, 所得TLC图分离效果好, 斑点清晰、

HPLC法测定龙葵银屑片中澳洲茄碱和澳洲茄边碱的含量^Δ

徐建东*, 沈敏, 李莹, 陈萍, 江海平(上海市皮肤病医院药剂科, 上海 200443)

中图分类号 R283.64;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)23-2167-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.23.19

摘要 目的:建立测定龙葵银屑片中澳洲茄碱和澳洲茄边碱含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Intersil ODS-3(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水-50 mmol/L Na₂HPO₄(32:59:3, V/V/V),流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,检测波长为200 nm。结果:澳洲茄碱和澳洲茄边碱的进样量分别在0.18~5.76、0.203~6.496 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(*r*分别为0.999 5、0.999 9);精密度、稳定性、重复性试验的RSD均<2%;平均加样回收率分别为94.76%和95.17%,RSD分别为1.76%和1.57%(*n*均为9)。结论:该方法简便、准确,可用于龙葵银屑片中澳洲茄碱和澳洲茄边碱的含量测定。

关键词 龙葵银屑片;高效液相色谱法;澳洲茄碱;澳洲茄边碱;含量测定

Content Determination of Solasonine and Solamargine in Longkui Yinxie Tablets by HPLC

XU Jian-dong, SHEN Min, LI Ying, CHEN Ping, JIANG Hai-ping(Dept. of Pharmacy, Shanghai Dermatology Hospital, Shanghai 200443, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of solasonine and solamargine in Longkui yinxie tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Intersil ODS-3 column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-water-50 mmol/L Na₂HPO₄(32:59:3, V/V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 200 nm, and the column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear ranges of solasonine and solamargine 0.18-5.76 μg (*r*=0.999 5) and 0.203~6.496 μg (*r*=0.999 8); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%; average recoveries were 94.76% (RSD=1.76%, *n*=9) and 95.17% (RSD=1.57%, *n*=9), respectively. CONCLUSIONS: This method is simple and accurate, and could be used to determine the contents of solasonine and solamargine in Longkui yinxie tablets.

KEY WORDS Longkui yinxie tablets; HPLC; Solasonine; Solamargine; Content determination

表2 样品含量测定结果

Tab 2 Results of content determination of samples

批号	取样量, g	二苯乙炔苷含量, mg/g
20090209	0.501 2	0.839 5
20100110	0.501 6	0.945 2
20100607	0.501 7	1.050 7

圆整,背景干扰少。

枸杞子的主要指标性成分为甜菜碱,在其TLC鉴别的供试品溶液制备中,曾参照文献方法^[7]处理点样,但发现经TLC展开后背景颜色较深;后经多次试验,选择将样品先采用中性氧化铝柱处理,再依次采用石油醚、石油醚-乙酸乙酯-乙醇(7:2:1, V/V/V)、乙酸乙酯-甲醇(8:2, V/V)洗脱,有效地去除了背景干扰,且分离效果好。

据文献^[8]报道,二苯乙炔苷水溶液的稳定性与温度呈负相关;另有文献^[9]报道,二苯乙炔苷的提取多采用醇提法。因此,本研究比较了60、80 ℃环境下样品甲醇提取液中二苯乙炔苷的含量,结果显示二苯乙炔苷含量在甲醇提取液中随温度变化不大。

Δ 基金项目:上海市卫生局科研资助项目(No.2010Y010A)

* 副主任药师,硕士研究生导师。研究方向:药事管理、临床药学、药物分析。电话:021-61833000。E-mail: xujianong0607@yahoo.com.cn

综上,提高后的标准有利于更好地控制麒麟丸的质量。

参考文献

- [1] 江秀娟,梁华伦.麒麟丸的薄层色谱鉴别[J].现代医药卫生,2009,25(24):3 805.
- [2] 崔爽,唐真真,张秀云.舒冠胶囊质量标准研究[J].中国药房,2010,21(31):2 941.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:70、附录34.
- [4] 马洁珺,刘骞峰,沈宁.橙皮苷提取纯化工艺的优化[J].应用化工,2011,40(4):677.
- [5] 蒙双鹏,谢琳,郭钟慧.宁心补肾丸质量标准研究[J].现代食品与药品杂志,2007,17(5):43.
- [6] 李勇,何伟,袁万瑞,等.心舒滴丸中丹参水溶性成分提取工艺研究[J].食品与药品,2007,9(6):9.
- [7] 孟楣,高家荣,魏良兵.薄层色谱法鉴别枸杞子的实验研究[J].中国药事,2007,21(11):912.
- [8] 鲁坚,侯双菊,千梅,等.二苯乙炔苷的研究进展[J].安徽化工,2006,32(3):10.
- [9] 吕丽爽,汤坚.何首乌中二苯乙炔苷的醇提工艺[J].食品与发酵工业,2004,30(10):132.

(收稿日期:2012-07-23 修回日期:2013-01-08)