

提高坐珠达西质量标准的研究

马肖¹, 王兰霞^{2*}, 赵建邦², 杨锡², 刘柏龙²(1.甘肃中医学院, 兰州 730000; 2.甘肃省食品药检所, 兰州 730000)

摘要: 目的 提高坐珠达西品种的质量标准。方法 采用薄层色谱法对熊胆、牛黄、木香、丁香等主要药味进行了定性鉴别以及马钱子的液相鉴别, 以高效液相色谱法对其主药西红花中西红花苷 I 进行含量测定。结果 定性鉴别分离度好, 专属性强; 西红花苷 I 在 0.031 62~0.284 58 μg 范围内呈良好的线形关系, $r=0.9997(n=7)$, 平均回收率为 97.7%, RSD 为 1.55%($n=6$)。结论 本法可靠, 准确, 专属性强, 可有效控制坐珠达西的质量。

关键词: 坐珠达西; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 西红花苷 I; 质量标准

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2012)03-0250-04

Study on Enhancing the Quality Standard of Zuozhudaxi

MA Xiao¹, WANG Lanxia^{2*}, ZHAO Jianbang², YANG Xi², LIU Bolong²(1.Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2.Food and Drug Inspection Office in Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To enhance the quality standard of Zuozhudaxi. **METHODS** Thin-layer chromatography (TLC) was employed to identify Bear Gall, Calculus Bovis, Aucklandia lappa Decne, Syzygium aromaticum(L.) Merr.et Perry (Clove) and high performance liquid chromatography (HPLC) was applied for the identification of Semen strychni, while high performance liquid chromatography (HPLC) was applied for the determination of Crocin- I in Croci Stigma in Zuoxidazhu. **RESULTS** The identification by TLC and HPLC were distinct and highly specific. A linearity was obtained from 0.031 62 μg to 0.284 58 μg of Crocin-I in Zuozhudaxi with a good correlation ($r=0.9997, n=6$). The average recovery was 97.7%, and RSD was 1.55($n=7$). **CONCLUSION** The method is reliable, accurate and specific and can be used for quality control of Zuozhudaxi. **KEY WORDS:** Zuozhudaxi; TLC; HPLC; Crocin I; quality standard

坐珠达西收载于《卫生部药品标准中药成方制剂藏药第一册》^[1], 由寒水石、石灰华、天竺黄、船形乌头、西红花、肉豆蔻、草果、熊胆、牛黄、麝香等 35 味药物制成, 该制剂原标准为两个化学反应鉴别、船形乌头薄层鉴别以及常规检查项, 标准过于简单, 不能准确、专属的控制坐珠达西的质量。现对该标准进行提高, 本文对熊胆、牛黄、木香、丁香的薄层色谱以及马钱子中马钱子碱的液相色谱鉴别做了进一步研究, 并且用液相色谱的方法测定了西红花中西红花苷 I 的含量, 所建立的方法能更有效地控制制剂的质量。

1 仪器和试剂

安捷伦 1200 高效液相色谱仪(美国); Waters2487 高效液相色谱仪(美国); Mettler AE 160

电子天平(瑞士); Mettler AE 240 电子天平(瑞士); KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂); 船形乌头对照药材、马钱子对照药材、木香对照药材(批号分别为 120987-200405, 121164-200603, 120970-200403), 熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、胆酸、丁香酚、马钱子碱、西红花苷 I (批号分别为 0755-9003, 0806-9102, 100078-200414, 110725-200601, 110706-200505, 111588-200501) 均购自中国药品生物制品检定所; 供试品坐珠达西由青海金诃藏药药业股份有限公司(批号分别为 20091214, 20100219, 20110106)和西藏自治区藏药厂(批号分别为 11081A, 11082A, 10114A) 所提供; 乙腈、甲醇为色谱纯; 乙醇为分析纯;

基金项目: 国家药典委员会国家药品标准提高项目(644)

作者简介: 马肖, 女, 硕士生
E-mail: lanxia_wang@163.com

Tel: 18919879274 E-mail:675622826@qq.com

*通信作者: 王兰霞, 女, 主任药师 Tel: 13919403391

水为重蒸水；其它试剂均为分析纯。

2 定性鉴别

2.1 薄层色谱法^[2]

2.1.1 熊胆、牛黄的薄层鉴别 取本品 3 g 研细，加乙醇 20 mL 超声处理 10 min 使溶解，滤过，滤液蒸干，残渣加 10% 氢氧化钠溶液 20 mL，置水浴上加热回流水解 6 h，冷却，滴加盐酸调节 pH 值至 2~3，用乙酸乙酯萃取 2 次，每次 15 mL，合并乙酸乙酯液，蒸干，残渣加乙醇 5 mL 使溶解，静置，取上清液作为供试品溶液。取熊去氧胆酸对照品、鹅去氧胆酸对照品和胆酸对照品，加乙醇制成每 1 mL 各含 0.5 mg 的混合溶液，作为对照品溶液。取缺熊胆、牛黄的阴性对照样品，同法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法^[2]试验，分别吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照溶液各 4 μ L，点于同一硅胶 G 薄层板上，以异辛烷-石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-正丁醇-冰醋酸-水(10:5:3:5:1)的上层溶液(临用配制)为展开剂，以 10% 硫酸乙醇溶液作为显色剂，分离效果较好且阴性无干扰，结果见图 1。

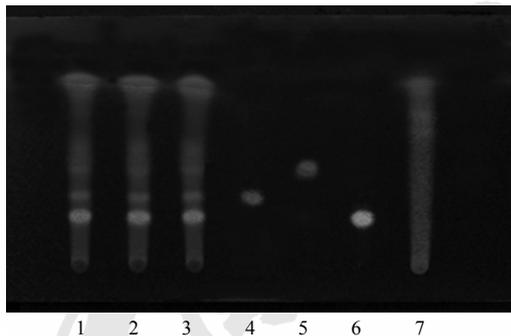


图 1 熊胆、牛黄 TLC

1、2、3-供试品(批号: 20091214 批号: 20100219 批号: 20110106);
4-熊去氧胆酸对照品; 5-鹅去氧胆酸对照品; 6-胆酸对照品; 7-阴性

Fig 1 TLC of Bear Gall and Calculus Bovis

1, 2, 3-sample; 4-standard solution of usodesoxycholic acid; 5-standard solution of chenodeoxycholic acid; 6-cholic acid; 7-negative reference substance

2.1.2 木香的薄层色谱鉴别 取本品 1 g 研细，加甲醇 10 mL 超声处理 10 min，放置使澄清，取上清液作为供试品溶液。另取木香对照药材 1 g，同法制成对照药材溶液。取缺木香的阴性对照样品，同法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法^[2]试验，分别吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照溶液各 2 μ L，点于同一硅胶 G 薄层板上，以环己烷-甲酸乙酯-甲酸(5:5:1)的上层液为展开剂，以 5% 香草醛硫酸溶液为显色剂，分离效果较好且阴性无干扰，结果见图 2。

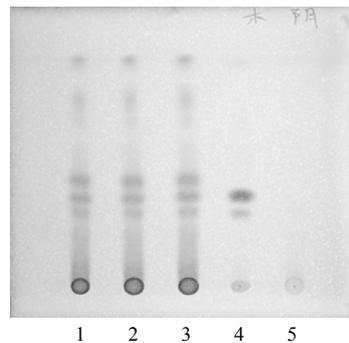


图 2 木香 TLC

1、2、3-供试品(批号: 20091214 批号: 20100219 批号: 20110106);
4-木香对照药材; 5-阴性

Fig 2 TLC of Aucklandia lappa Decne

1, 2, 3-sample; 4-standard solution of Aucklandia lappa Decne; 5-negative reference substance

2.1.3 丁香的薄层色谱鉴别

取本品 1.5 g 研细，加乙醚 10 mL，振摇 5 min，滤过，滤液作为供试品溶液。另取丁香酚对照品，加乙醚制成每 1 mL 含 16 μ L 的溶液，作为对照品溶液。取缺丁香的阴性对照样品，同法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法^[2]试验，分别吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照溶液各 10 μ L，点于同一硅胶 G 薄层板上，以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(9:1)为展开剂，以 5% 香草醛硫酸溶液为显色剂，分离效果较好且阴性无干扰，结果见图 3。

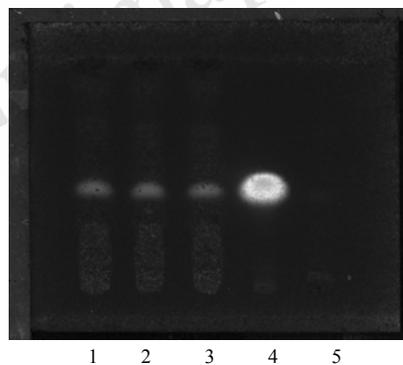


图 3 丁香 TLC

1、2、3-供试品(批号 20091214 批号 20100219 批号 20110106); 4-丁香酚对照品; 5-阴性

Fig 3 TLC of Clove

1, 2, 3-sample; 4-standard solution of Eugenol; 5-negative reference substance

2.2 马钱子的液相色谱鉴别

2.2.1 色谱条件^[3-4] 色谱柱: 资生堂 C₁₈(4.6 mm \times 250mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.01mol \cdot L⁻¹ 庚烷磺酸钠与 0.02 mol \cdot L⁻¹ 磷酸二氢钾等量混合溶液(用 10% 磷酸调节 pH 值 2.8)(20:80); 流速: 1 mL \cdot min⁻¹, 柱温: 25 $^{\circ}$ C, 检测波长: 260 nm。理

论板数按马钱子碱峰计算应不低于 3 000。

2.2.2 对照品溶液的制备 取马钱子碱对照品约 6 mg, 精密称定, 分别至 10 mL 量瓶中, 加三氯甲烷适量使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 2 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 含 0.024 mg 的溶液, 作为对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品 2 g, 研细, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加氢氧化钠试液 10 mL, 混匀, 放置 30 min, 精密加入三氯甲烷 25 mL, 密塞, 超声处理 30 min, 放冷, 摇匀, 分取三氯甲烷液, 用铺有少量无水硫酸钠的滤纸滤过, 弃去

初滤液, 精密量取续滤液 10 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 取缺马钱子的阴性样品按“2.2.3”项下的制备方法制成阴性对照溶液。

2.2.5 测定结果 取上述对照品溶液、阴性对照品溶液及供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件, 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照液各 10 μ L, 注入液相色谱仪, 测得液相色谱图, 结果见图 4。结果表明, 马钱子碱色谱峰分离良好, 且阴性对照对测定结果无干扰。

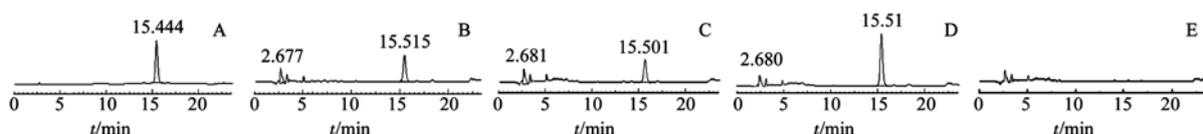


图 4 马钱子 HPLC 色谱图

A-马钱子碱对照品; B、C、D-供试品(批号 20091214 批号 20100219 批号 20110106); E-阴性

Fig 4 HPLC chromatograms

A-standard solution of strychnine; B, C, D-sample; E-negative reference substance

3 西红花苷 I 的含量测定研究

3.1 高效液相色谱条件^[5-6]

色谱柱: Hypersil C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m); 流动相为: 甲醇-水(45:55); 检测波长为 440 nm; 流速为 0.9 mL·min⁻¹; 柱温为 25 $^{\circ}$ C。理论塔板数按西红花苷 I 计算应不低于 3 500。

3.2 对照品溶液的制备

取西红花苷 I 对照品适量, 精密称定, 加稀乙醇制成每 1 mL 含 20 μ g 的溶液, 即得。

3.3 供试品溶液的制备

取本品研细, 取约 1 g, 精密称定, 置 50 mL 棕色瓶中, 加稀乙醇适量, 置冰浴中超声处理 20 min, 放至室温, 加稀乙醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

3.4 阴性对照溶液的制备

取缺西红花阴性样品, 按照“3.3”项下方法提取, 按“3.1”项下色谱条件分析。与对照品相应的位置上, 无明显其他峰出现。结果证明阴性样品对该试验无干扰, 结果见图 5。

3.5 线性关系的考察

精密称取西红花苷 I 对照品适量, 加稀乙醇制成每 1 mL 含西红花苷 I 15.81 μ g 的溶液, 精密吸取 2, 4, 6, 8, 10, 15, 18 μ L 注入液相色谱仪, 测定, 以对照品的进样量为横坐标, 峰面积值为纵坐标, 进行线性回归, 计算得回归方程为

$A=0.2319 \times 10^{-12}C+9.7586 \times 10^{-3}$, $r=0.9997$, 西红花苷 I 在 0.031 62~0.284 58 μ g 内呈良好的线形关系。

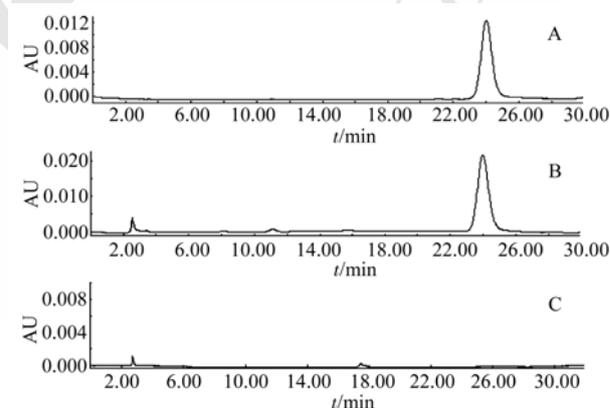


图 5 西红花 HPLC 色谱图

A-西红花苷 I 对照品; B-供试品; C-阴性

Fig 5 HPLC chromatograms

A-standard solution of Crocin-I; B-sample; C-negative reference substance

3.6 仪器适应性试验

精密吸取同一浓度对照品溶液 10 μ L, 注入液相色谱仪, 连续进样 6 次, 测定西红花苷 I 峰面积, RSD 为 2.1%, 结果表明仪器精密度良好。

3.7 稳定性试验

取同一供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h, 按“3.1”项下色谱条件各进样 1 次, 每次 10 μ L, 结果西红花苷 I 平均峰面积为 1 064 949.833,

RSD=1.12%(n=6), 表明样品溶液在 10 h 内稳定。

3.8 精密度试验

取同一供试品(青海金诃藏药药业股份有限公司, 批号: 20110106), 按“3.3”项下方法处理, 按“3.1”项下色谱条件测定西红花苷 I 含量, 平行测定 5 次, 结果西红花苷 I 平均含量为 1.349 6 mg·g⁻¹, 含量 RSD=2.37%(n=5)。

3.9 加样回收实验

精密称取已知含量的供试品溶液(青海金诃藏药药业股份有限公司, 批号: 20110106) 0.5 g 各 6 份, 精密加入西红花苷 I 对照品溶液(0.052 7 mg·mL⁻¹) 10 mL, 按“3.3”项下方法处理, 按“3.1”项下色谱条件测定, 结果见表 1。

表 1 加样回收率实验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery test(n=6)

样品原含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.658	0.527	1.157	97.6	97.7	1.55
0.667	0.527	1.178	98.7		
0.675	0.527	1.203	100.1		
0.673	0.527	1.150	95.8		
0.701	0.527	1.187	96.7		
0.680	0.527	1.177	97.5		

3.10 样品测定结果

青海金诃藏药药业股份有限公司(批号: 20091214, 20100219, 20110106)和西藏自治区藏药厂(批号: 11081A, 11082A, 10114A)的样品, 按“3.3”项下方法处理, 按“3.1”项下色谱条件测定, 6 批样品中西红花苷 I 含量分别为: 0.94, 1.24, 1.33, 0.65, 0.67, 0.70 mg·g⁻¹。

4 讨论

本实验还对肉豆蔻、红花、西红花、马钱子进行了薄层鉴别, 但由于方法不成熟, 暂不列入标准正文。由于在运用液相色谱法对马钱子中马钱子碱的含量进行测定时发现其信号峰太弱, 不能进行含量测定, 因此只能进行定性鉴别。

坐珠达西处方中西红花具有活血化痰, 清热解毒, 解郁安神的作用, 为方中的主药且为贵重药材, 故本试验以西红花的主要有效成分西红花苷 I^[5]为指标, 参考中国药典 2010 年版一部及有关文献[6-8], 建立了含量测定方法。本实验对水浴回流 2 h 和超声 30 min 进行比较, 提取效率接近, 故选超声 30 min 为提取方法; 由于西红花苷 I 对照品在稀乙醇中溶解较完全, 所以选定稀乙醇为提取溶剂; 此外, 本实验还考察了多种流动相系统, 其中以甲醇-水(45:55)为流动相分离效

果较好, 阴性无干扰, 但是因甲醇-水(45:55)的粘度比较高, 在流速 1 mL·min⁻¹ 柱压较高, 为了得到合适的检测时间和保持合理的柱压, 故改流速为 0.9 mL·min⁻¹。

根据 2010 年 6 月在拉萨协调会通过的《藏药标准纠错清单》制剂部分(西藏)将原标准处方修订为: 寒水石(制)、天竺黄、榜嘎、西红花、肉豆蔻、草果、熊胆、体外培育牛黄、人工麝香等 35 味药物制成。

据文献[9-12]报道熊胆、牛黄都含有胆酸、去氧胆酸、鹅去氧胆酸三种成分, 如果只做缺熊胆阴性样品或缺牛黄阴性样品进行方法专属性验证, 阴性有干扰; 又鉴于新药典有双阴性对照的标准, 所以进行了双阴性对照。

REFERENCES

- [1] Health ministry of China standard medicine and pharmacology (Vol.1) (中华人民共和国卫生部标准 藏药. 第一册) [S]. 1995: 318
- [2] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 4, 47, 57, 120, 141, 1241.
- [3] SONG Y G, PENG Z Y, ZHANG X R. et al. Simultaneous determination of strychnine and brucine in fengshifuyin pills by HPLC [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2010, 24(5): 507-509.
- [4] LIU Y, SONG Z Z, MO H T. et al. Simultaneous determination of strychnine and brucine in fufang zhongfengkangfu tablets by HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2010, 16(6): 74-76.
- [5] AUNG H H, WANG C Z, SHOYAMA M. Crocin from crocus sativus possesses significant anti-proliferation effect on human colorectal cancer cells [J]. Exp Oncol, 2007, 29(3): 175-180
- [6] NI Z H, A P, GE S S L. Determination of crocin I in medicine and pharmacology renqingchangjue by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2010, 32(8): 1445-1446.
- [7] NI Z H, A P, GE S S L. HPLC determination of crocin I in ershiwuwei Zhenzhu pills [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2011, 31(1): 151-153.
- [8] MARILENA K, ANASTASIA N, VASSILIOS T, et al. A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay [J]. BMC Clinical Pathology, 2002, 2(3): 1-16.
- [9] WEI F, ZHONG M, NI J T, et al. HPLC-ELSD determination of three cholic acid derivatives in Niudan powder [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2009, 29(1): 21-24.
- [10] ZHANG Y J, FAN S G, RUAN S B, et al. Fel ursi overview of literature in Chinese pharmacology and clinical application [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med (辽宁中医药大学学报), 2010, 12(10): 107-108
- [11] CHEN J R, XIE F, YIN X F, et al. Content determination of emodin and chrysophanol in Niu Huang Jie Du dropping pill by HPLC [J]. Her Med (医药导报), 2011, 30(4): 500-502
- [12] LI K, GAO Y S, LI B L, et al. Content determination of cholesterol in natural calculus bovis and cultivated calculus bovis by glucuronidase with HPLC-ELSD [J]. Her Med (医药导报), 2011, 30(12): 1633-1636.

收稿日期: 2011-07-27