

藏药二十五味鬼臼丸定性定量方法研究

许传梅^{1,2}, 星玉秀^{1,2}, 肖远灿^{1,2}, 皮立¹, 董琦¹, 胡凤祖*

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 目的:建立藏药二十五味鬼臼丸的定性定量方法。**方法:**采用 TLC 法对二十五味鬼臼丸中的沉香、诃子进行鉴别; 采用 RP-HPLC 法, Symmetry C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-水(60:40)为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 343 nm, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL, 对二十五味鬼臼丸中的胡椒碱进行含量测定。**结果:**薄层斑点清晰, 专属性强; 胡椒碱浓度在 2.24 ~ 11.2 μg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好($r=0.9991$), 平均回收率($n=6$)为 97.4% (RSD 为 1.7%)。**结论:**该方法快速、简单、准确, 重复性好, 可有效控制二十五味鬼臼丸的质量。

关键词:二十五味鬼臼丸; 胡椒碱; 定性定量; 薄层色谱; 反相高效液相色谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2008)01-0108-03

Study on the qualitative and quantitative methods of Ershiwuwei Guijiu pills

XU Chuan - mei^{1,2}, XING Yu - xiu^{1,2}, XIAO Yuan - can^{1,2}, PI Li¹, DONG Qi¹, HU Feng - zu^{1*}

(1. Northwest Plateau Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Objective: To establish the qualitative and quantitative methods of Ershiwuwei Guijiu pills. **Method:** Lignum Aquilariae Resinatum and Fructus Chebulae were identified by TLC, and piperine content in Fructus Piperis was determined by HPLC. Symmetry C₁₈ column(150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was methanol - water(60:40) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, the detection wavelength was set at 343 nm, column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results:** The TLC identification was highly specific and spots were clear. Piperine showed a good linear relationship in the range of 2.24 - 11.2 μg · mL⁻¹ ($r=0.9991$); The average recovery($n=6$) was 97.4%, RSD = 1.7%. **Conclusion:** The method is simple, reliable and has a good repeatability, and can be used for the quality control of Ershiwuwei Guijiu pills.

Key words: Ershiwuwei Guijiu pills; piperine; qualitative and quantitative; TLC; HPLC

藏药二十五味鬼臼丸(藏药名: 吾斯尼阿日布)是根据藏医古典名著《四部医典》, 参照《青海省藏药标准》研制的妇科用药, 已收载于中华人民共和国卫生部药品标准(藏药第一册)^[1]中。由鬼臼、藏木香、诃子(Fructus Chebulae)、肉桂、枸杞、胡椒(Fructus Piperis)、沉香(Lignum Aquilariae Resinatum)等 25 味药组成, 具有祛风镇痛、调经血的功能^[1]。适用于妇女血症、风症、月经不调等。方中沉香行气止痛、温中止呕, 诃子涩肠敛肺、降火利咽, 胡椒温中散寒、下气^[2,3]。为控制该药质量, 保证临床用药安全、有效, 本文建立了制剂中沉香、诃子的

TLC 鉴别及胡椒中胡椒碱含量的 HPLC 测定方法, 可用于该药的质量控制。

1 仪器与试剂

Waters 515 高效液相色谱仪, Waters 2996 二极管阵列紫外检测器, Empower 色谱工作站, 50 mm × 100 mm 硅胶 G 板(青岛海洋化工厂), KQ-100E 型超声波清洗器(昆山超声仪器科技有限公司), MOLELEMENT 元素型超纯水机(上海摩勒生物科技有限公司), Cary300 紫外扫描分光光度计(美国 Varian)。

胡椒碱(中国药品生物制品检定所提供, 批号: 0775-200203); 对照药材: 诃子(中国药品生物制

* 通讯作者 Tel: (0971)6132750; E-mail: hufz@nwipb.ac.cn

品检定所提供,批号:1015-9601),沉香(由药厂提供,经鉴定符合2005年版中国药典和卫生部药品标准的规定)。

二十五味鬼臼丸(批号:20040221,20040226,20040227),由青海喜马拉雅药业提供,规格:每丸1g。甲醇为HPLC级,其余均为分析纯。

2 薄层鉴别

2.1 沉香 本品研细,称取粉末3g,用25mL乙醇浸渍,浸出物置小坩埚中,在水浴上蒸干,残渣用10mL丙酮溶解后,作为供试品溶液;另取沉香对照药材,同法制成对照药材溶液;按处方除去沉香依法制成缺沉香阴性样品,同法制成阴性样品溶液。吸取上述3种溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以苯-丙酮(9:1)为展开剂,展开至9cm,取出,晾干,喷以5%的香草醛浓硫酸溶液,置紫外灯(365nm)下检视。样品色谱中,在与对照药材相应的位置上,显相同颜色的斑点,而阴性样品在相应的位置上未有斑点显示,表明样品中其他组分对沉香的鉴别无干扰,见图1。

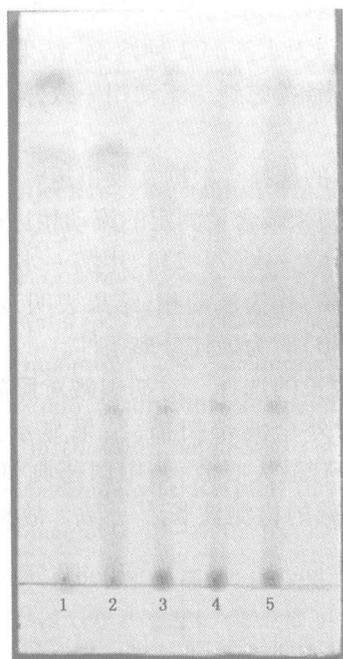


图1 沉香 TLC 鉴别色谱图

Fig 1 Thin layer chromatogram of Lignum Aquilariae Resinatum

1. 阴性样品(negative sample without Lignum Aquilariae Resinatum) 2. 沉香对照药材(reference crude drug of Lignum Aquilariae Resinatum) 3,4,5. 样品(samples)

2.2 诃子 本品去核后研细,取粉末3g,加乙醇10mL,超声(100W,40kHz)处理20min,上清液作为供试品溶液;另取诃子对照药材,同法制成对照药材溶液;按处方除去诃子依法制成缺诃子阴性样品,

同法制成阴性样品溶液。吸取上述3种溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸(6:4:1)为展开剂,展开至9cm,取出,晾干,喷以2%的三氯化铁乙醇溶液。样品色谱中,在与对照药材相应的位置上,显相同颜色的斑点,而阴性样品在相应的位置上未有斑点显示,表明样品中其他组分对诃子的鉴别无干扰,见图2。

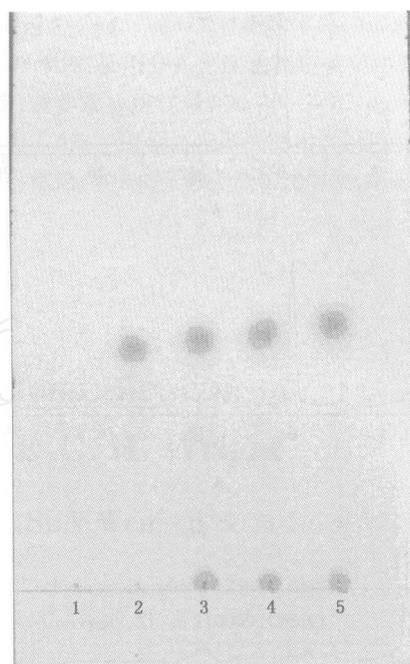


图2 诃子 TLC 鉴别色谱图

Fig 2 Thin layer chromatogram of Fructus Chebulae

1. 阴性样品(negative sample without Fructus Chebulae) 2. 诃子对照药材(reference crude drug of Fructus Chebulae) 3,4,5. 样品(samples)

3 含量测定

3.1 溶液的制备

3.1.1 对照品溶液 精密称定胡椒碱对照品5.6mg,置10mL棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液。精密吸取储备液0.1mL置于10mL棕色量瓶中,加流动相定容,制成每1mL含胡椒碱5.6 μ g的溶液,即得。

3.1.2 供试品溶液 本品研细,取粉末2.0g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇100mL,密塞称重,超声(100W,40kHz)处理1h,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过。滤液作为供试品溶液^[4]。

3.1.3 阴性样品溶液 按处方比例制成不含胡椒药材的二十五味鬼臼丸阴性样品,按供试品溶液的制备方法,制成阴性样品溶液。

3.2 色谱条件与系统适用性 色谱柱:Symmetry

C_{18} (150 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇 - 水 (60:40); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长为 343 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μ L。在此条件下, 胡椒碱与其他组分均能达到基线分离, 理论塔板数按胡椒碱峰计算在 6000 以上, 且样品中其他组分对胡椒碱测定无干扰。结果见图 3。

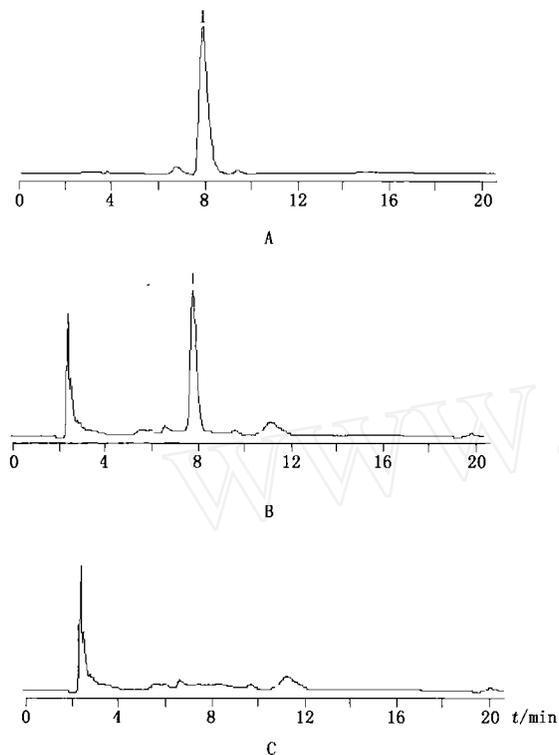


图3 对照品(A)、二十五味鬼臼丸样品(B)、胡椒阴性样品(C) HPLC 色谱图

Fig 3 Chromatograms of piperine(A), Ershiwuwei Guiji pills(B) and negative samples without Fructus Piperis(C)

1. 胡椒碱(piperine)

3.3 线性关系考察 精密吸取 0.56 mg · mL⁻¹ 对照品储备液以甲醇制成每 1 mL 含胡椒碱 2.24, 4.48, 6.72, 8.96, 11.2 μ g 的对照品溶液, 分别吸取 10 μ L 进样。按上述色谱条件测定峰面积, 以胡椒碱浓度(μ g · mL⁻¹) 为横坐标, 峰面积积分为纵坐标, 绘制回归曲线, 得回归曲线方程:

$$Y = 1.8 \times 10^4 X - 1.4 \times 10^4 \quad r = 0.9991$$

结果表明, 胡椒碱在 2.24 ~ 11.2 μ g · mL⁻¹ 范围内呈良好的线性关系。

3.4 精密度试验 精密吸取 5.6 μ g · mL⁻¹ 对照品溶液 10 μ L 重复进样 5 次, 测定胡椒碱峰面积, 平均峰面积为 782658, 计算 RSD 为 0.59%。结果表明, 在该条件下精密度良好。

3.5 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号 20040221), 分别于 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 进样 10 μ L,

测定样品中胡椒碱的含量。结果表明, 供试品溶液 24 h 内稳定性良好, 含量的 RSD($n=7$) 为 1.3%。

3.6 重复性试验 取同一批样品(批号 20040221) 5 份, 按供试品溶液制备方法制得待测溶液, 进样 10 μ L, 测定样品中胡椒碱的含量。胡椒碱平均含量为 0.298 mg · g⁻¹, RSD 为 2.8%, 表明胡椒碱含量测定结果重复性良好。

3.7 回收率试验 精密称取 6 份已知含量的同一批号(20040221) 样品约 1 g, 分别加入胡椒碱对照品溶液(0.56 mg · mL⁻¹) 各 0.5 mL, 按上述供试品溶液制备方法制得所需溶液, 进样 10 μ L, 进行测定。测得胡椒碱回收率($n=6$) 为 97.4%, RSD 为 1.7%。

3.8 样品含量测定 在本文试验条件下对 3 批二十五味鬼臼丸样品进行测定, 按外标法计算胡椒碱含量。结果 3 批样品中胡椒碱的平均含量($n=3$) 分别为 0.290, 0.268, 0.240 mg · g⁻¹; RSD 分别为 1.4%, 1.8%, 1.9%。

4 讨论

4.1 提取溶剂的选择 2005 年版中国药典中胡椒碱含量测定是以无水乙醇为提取溶剂^[2], 本研究比较了甲醇^[4] 与无水乙醇 2 种溶剂, 结果所测得的胡椒碱含量相当, 考虑到与流动相一致, 故选择甲醇为提取溶剂。

4.2 流动相的选择 根据文献报道^[2,4], 对二十五味鬼臼丸中胡椒碱含量测定的流动相进行了优化选择, 曾采用甲醇 - 水(77:23)、甲醇 - 水(70:30)、甲醇 - 水(60:40) 作为流动相, 结果表明, 流动相为甲醇 - 水(60:40) 时为最佳分离条件。

4.3 检测波长的选择 对胡椒碱对照品的甲醇溶液进行了紫外全波长扫描, 结果显示: 胡椒碱在 342.8 nm 处有最大吸收, 与中国药典 2005 年版茛苳项下胡椒碱的检测波长^[2] 一致。故检测波长定为 343 nm。

参考文献

- 1 Chinese Patent Medicine Standard of the Ministry of Public Health, PR China(Tibetan Medicine)(中华人民共和国卫生部药品标准·藏药). Vol 1(第一册). 1995. C1-156
- 2 ChP(中国药典). 2005. Vol 1(一部):128, 129, 163, 168
- 3 CUI Guang-zhi(崔广志), LI Jun(李军), ZHANG Zhong-yi(张仲一), et al. Influence of piperine on CNS(胡椒碱对中枢神经系统功能的影响). *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2003, 38(4):268
- 4 WEN Ai-ping(温爱平), SU Rui-lin(苏瑞林). Study on quality standard of Naru-3 Gel(那如-3 凝胶剂质量标准的研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2005, 25(12):1466

(本文于 2007 年 1 月 11 日收到)