知柏地黄丸含量测定的实验研究

甄汉深　(广西中医学院　南宁　530001)

摘要　采用薄层扫描法测定了知柏地黄丸中菝葜皂甙元和盐酸小檗碱的含量,该法准确、灵敏,并能排除方中其它成分的干扰,可作为该药的质量控制手段。

关键词　薄层扫描　菝葜皂甙元　盐酸小檗碱　知柏地黄丸

Determination of Active Principles in Zhibai Dihuang Pill

Zhen Hanshen (*Guangxi College of TCM*, *Nanning*, 530001)

Abstract: Using TLCS, a method was descrided for determination of sarsasapogenin and berberine hydrochloride content in Zhibai Dihuang pill. The method was accurate and sensitive, and no interference of the other compositions was observed in the determination. Therefore, the method for estimating berberine level can be recommended for the quality control of Zhibai Dihuang pill.

Key words: TLCS, sarsasapogenin, berberine hydrochloride, Zhibai Dihuang pill

知柏地黄丸为常用传统的中成药,收载于现行中国药典中[1],由黄柏、知母、熟地黄、山茱萸、牡丹皮、山药、茯苓、泽泻等味中药组成,具有滋阴降火之功效,主要用于阴虚火旺,潮热盗汗,口干咽痛,耳鸣遗精,小便短赤等症。该药中主药知母、黄柏的主要有效成分分别为菝葜皂甙元、盐酸小檗碱。对于该药中两成分同时测定未见有报道。药典也无含量测定项目[1]。为了完善其质量标准,本文采用双波长薄层扫描法,分别对该药这两成分进行测定,效果满意,现报道如下。

1　仪器和材料　CS-9000双波长飞点快速扫描仪,紫外分析仪(均为日本岛津);定量毛细管(Drummond Scientific co USA);PBQI型薄层自动铺板器(重庆南岸新力实验电器厂)。知柏地黄丸(潮州市宏兴制药厂,批号:950610,950619,950622,950625)。菝葜皂甙元、盐酸小檗碱对照品(均由中国药品生物制

品检定所提供)。硅胶 G(青岛海洋化工厂产品)。实验所用试剂均为分析纯。

2　实验方法和结果

2.1　菝葜皂甙元含量测定

2.1.1　对照液制备　精密称取菝葜皂甙元适量,加氯仿溶解后,定容,制成 0.600mg/ml 的对照液。

2.1.2　薄层板的制备　取硅胶 G 加 0.7% CMC-Na 按 1∶3 比例,用自动铺板器铺板(10cm × 20cm × 0.5mm),室温晾干,于 105℃活化 1h,置干燥器中备用。

2.1.3　样品液制备　将知柏地黄丸研成粉末(过 80 目筛),置烘箱中 60℃烘 6h。精密称取样品粉末约 10g,置索氏提取器中,加乙醇回流提取至无色,浓缩后定容至 50ml,加 5mlHCl 回流水解 1h,定容至 50ml,滤过,取滤液 5ml,每次用 5ml 石油醚萃取,共萃取 10 次,合并萃取液,挥干石油醚,残渣加氯仿-乙醇(1∶1)混合液溶解并移至 5ml 容量瓶中定容,即得样品供试液。

2.1.4　薄层定性　分别吸取样品液与对照液适量点于同一薄层板上,以正己烷-丙酮(8∶2)为展开剂,展距 15cm,喷以 8%香草醛-3%高氯酸(1∶1)乙醇液,于 105℃显色 5min。样品与对照液在相同 R_f 值处有相同颜色的斑点,见图 1。同样制备阴性对照在此 R_f 值处无斑点。

2.1.5　光谱扫描　对上述样品与对照品 R_f 值相同的斑点在 370～760nm 波长范围内进行光谱扫描,结果表明两者在 455nm 波长处有最大吸收;而在 600nm 波长处吸收较小,故采用 $\lambda_s=455$nm;$\lambda_R=600$nm,双波长反射法锯齿扫描。

2.1.6　线性关系考察　分别用定量毛细管精密吸取菝葜皂甙元对照液 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0μl 点于同一薄层板上,按上述条件展开,显色、扫描测定其峰面积,结果表明在 0.60～3.00μg 范围内,浓度与峰面积有良好的线性关系,得回归方程:$Y=97189.0x-56087.2$　$r=0.9999$

2.1.7　精密度试验　按上述条件,对样品中与菝葜皂甙元 R_f 值相同斑点,同一斑点连续扫描 5 次,测得峰面积的 $RSD=0.93\%$,同一被测样品在同一薄层板上不同位置点样测得 $RSD=1.32\%(n=5)$;同一被测样品在不同薄层板上点样,测得 $RSD\leqslant 2.45\%$。

2.1.8　稳定性试验　吸取对照品液,按上述条件点样测定,每隔 20min 测定一次,结果表明显色后 1.5h 内峰面积基本稳定($RSD=2.23\%,n=5$)。

2.1.9　样品测定　用定量毛细管分别精密吸取样品液 8μl,对照液 2μl、3μl,分别随行点于同一薄层板上,按上述条件测定,用外标两点法计算含量,结果见表 1。

表 1　知柏地黄丸中菝葜皂甙元含量(%)

样品批号	菝葜皂甙元含量($n=4$)	RSD(%)
950610	0.0847	1.84
950619	0.0835	1.50
950622	0.0823	2.24
950625	0.0825	2.45

2.1.10　加样回收试验　取已测得含量样品加入一定量菝葜皂甙元对照品,按上述条件测定,结果见表 2。

表 2　菝葜皂甙元加样回收结果

编号	原样品含量(mg)	测得总量 mg	回收率%
1	4.830	7.207	99.04
2	4.755	7.098	97.63
3	4.885	7.290	100.21
4	4.773	7.141	98.67
5	4.995	7.325	97.08
$\bar{x}$　98.53%　RSD　1.24%			

注:加入菝葜皂甙元量均为 2.400mg

2.2　盐酸小檗碱含量测定

2.2.1　对照液制备　精密称取盐酸小檗碱适量,加甲醇溶解后,定容,使成 1mg/ml 甲醇液。

2.2.2　薄层板制备　同 2.1.2 项方法。

2.2.3　样品液制备　将知柏地黄丸研成粉末(过 80 目筛),在 60℃下烘 6h。精密称取粉末约 9g,置索氏提取器中,用甲醇∶盐酸(100∶1)回流至无色,浓缩后用甲醇定容于 50ml 容量瓶中。

2.2.4 薄层定性　在同一薄层板上,分别点盐酸小檗碱对照液和知柏地黄丸供试液适量,以正丁醇-冰醋酸-水(7∶1∶2)为展开剂展开,展距 15cm,晾干后于紫外灯(365nm)下观察,两者在相同位置上均显亮黄绿色荧光斑点,见图 2。而同法制备的阴性对照在此 R_f 值处无斑点。

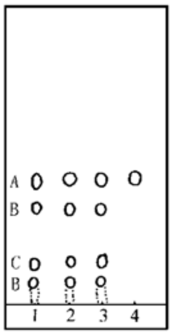

图 1　知柏地黄丸中
菝葜皂甙元 TLC 图谱
1、2、3　样品
4、菝葜皂甙元 A、浅黄色
B、灰黑色　C、橙色

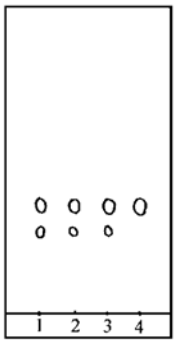

图 2　知柏地黄丸中
盐酸小檗碱 TLC 图谱
1、2、3　样品
4、盐酸小檗碱

2.2.5 扫描条件　对上述两者 R_f 值相同斑点,在 200～370nm 波长处进行光谱扫描,结果表明两者在 340nm 波长处均有最大吸收,而在 230nm 波长处吸收较小,故采用 λ_S = 340nm,λ_R = 230nm,双波长反射法锯齿扫描。

2.2.6 线性关系考察　用定量毛细管精密吸取盐酸小檗碱对照液各 1、2、3、4、5μl 点于同一薄层板上,按上述条件展开,扫描测定其峰面积,结果表明在 1～5μg 范围内浓度与峰面积线性关系良好,得回归方程:

$$Y = 46548.01x + 12704.06 \quad r = 0.9999$$

2.2.7 精密度试验　按上述条件,对被测样品中与盐酸小檗碱 R_f 值相同斑点,同一斑点连续扫描 5 次,各次测得峰面积 RSD = 0.38%,表明仪器重现性良好;同一被测样品在同一薄层不同位置点样测得峰面积 RSD = 1.48%;(n=5)同一被测样品在不同薄层上点样展开后测得峰面积 $RSD \leqslant 2.66\%$。

2.2.8 稳定性试验　取对照品点样展开,从晾干后 15min 起测定,每隔 30min 测定一次,直至 6h,面积积分值基本不变(RSD = 0.55%,n=12),结果表明盐酸小檗碱至少在 6h 内稳定。

2.2.9 样品测定　分别精密吸取盐酸小檗碱对照液 1μl、2μl,知柏地黄丸供试液 5μl,分别点于同一薄层板上,按上述条件进行测定,用外标两点法计算,结果见表 3。

表 3　知柏地黄丸中盐酸小檗碱含量(%)

样品批号	测定结果(n=4)	RSD(%)
950610	0.135	1.95
950619	0.133	1.98
950622	0.128	2.66
950625	0.131	2.36

2.2.10 加样回收测定　取已测得含量样品,加入一定量盐酸小檗碱对照品,以下操作按样品测定项下进行,结果见表 4。

表 4　盐酸小檗碱加样回收结果

编号	原样品含量 mg	测得总量 mg	回收率%
1	11.497	21.179	97.96
2	11.384	21.155	98.86
3	11.362	21.263	100.17
4	11.434	21.256	99.37
5	11.219	20.827	97.21
$\bar{x}$　98.71%　RSD　1.18%			

注:加入盐酸小檗碱量均为 9.884mg

3　讨论

3.1 上述实验结果表明,本法测定准确、灵敏,能排除方中其它成分干扰。在样品提取中,盐酸小檗碱只需简单提取至无色、定容即可。而菝葜皂甙之前处理稍复杂一些,但与文献法相比[2],本法不需经过硅胶 H 层析柱处理,较简单。

3.2 盐酸小檗碱较稳定,在 6h 内不影响测定结果;而菝葜皂甙元显色后颜色不够稳定,在 105℃显色 5min 后,取出,最好在 1.5h 内测定完毕,测定时在薄层板上覆盖同样大小的玻璃板,周围用胶布固定再行测定,这样会使结果的重现性好些。

参考文献

1　中华人民共和国药典(一部). 广州:广东科技出版社,1995. 527

2　王宝琹. 中成药质量标准与标准物质研究. 北京:中国医药科技出版社,1994. 135

(收稿:1996-08-19)