

# 青娥丸质量标准研究——君药杜仲的含量测定

陈洁<sup>1,2</sup>, 徐颖<sup>3</sup>, 张紫佳<sup>1,2\*</sup>, 廖立平<sup>1,2</sup>, 王峥涛<sup>1,2</sup>

- (1. 上海中医药大学中药研究所中药标准化教育部重点实验室, 中药新资源与质量标准综合评价国家中医药管理局重点研究室, 上海市复方中药重点实验室, 上海 201210;
2. 上海中药标准化研究中心, 上海 201210;
3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 制定复方青娥丸的质量标准。方法: 采用 HPLC 对方中松脂醇二葡萄糖苷 (PDG) 含量进行定量测定。结果: HPLC 法测定松脂醇二葡萄糖苷在 4.43 ~ 443 mg·L<sup>-1</sup> 线性关系良好, 回归方程为  $Y = 28\ 849X - 2\ 119.5$  ( $r = 0.999\ 9$ ), 平均加样回收率为 100.99% (RSD 2.17%), 符合分析要求。结论: 所建立定量检测方法操作简便、准确可靠、灵敏度高、专属性强, 可有效控制青娥丸的质量。

**[关键词]** 青娥丸; 杜仲; 质量标准

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0112-04

## Quality Standard for Qing'e Wan—the Quantitative Methods of Eucommiae Cortex

CHEN Jie<sup>1,2</sup>, XU Ying<sup>3</sup>, ZHANG Zi-jia<sup>1,2\*</sup>, LIAO Li-ping<sup>1,2</sup>, WANG Zheng-tao<sup>1,2</sup>

- (1. Key Laboratory of Standardization of Chinese Medicines of Ministry of Education, Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai Key Laboratory for Compound Chinese Medicine, Shanghai 201210, China;
2. Shanghai R&D Centre for Standardization of TCM, Shanghai 201210, China;
3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicinal Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the quality standard for Qing'e Wan. **Method:** (+)-Pinoresinol di-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (PDG) was determined by HPLC. **Result:** The results of quantitative evaluation showed that (+)-pinoresinol di-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (PDG) concentration was linear in the range of 4.43-443 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.999\ 9$ ), the average recovery rate was 100.99% (RSD 2.17%). This method met the analysis requirement. **Conclusion:** The established quantitative methods were simple, accurate, reliable and reproducible, which can be effectively used for the quality control of Qing'e Wan.

**[Key words]** Qing'e Wan; Eucommiae Cortex; pinoresinol di-glucopyranoside; quality standard

青娥丸为古今补肾良方,首载于宋代的《太平惠民和剂局方》,由杜仲(盐炒)、补骨脂(盐炒)、核桃仁(炒)、大蒜 4 味药组成,功用补肾强腰。中国

药典(2005 年版一部)<sup>[1]</sup> 记载的青娥丸项下的检验项目有性状、粉末显微鉴别和检查项,无薄层鉴别和含量测定项。青娥丸的君药杜仲具有降压、补肝肾、

**[收稿日期]** 20120620(410)

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(30901952);国家药典委员会项目(ZH-398);上海市中医药事业发展三年行动计划项目。

**[第一作者]** 陈洁,硕士生,从事中药活性成分与质量标准, Tel:021-51322513, E-mail:fengyu.chen@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \*张紫佳,副研究员,博士,从事中药活性成分与质量标准, Tel:021-51322513, E-mail:zijiazhang66@hotmail.com

抗骨质疏松、抗氧化等药理作用<sup>[2-5]</sup>,其主要活性成分为松脂醇二葡萄糖苷、京尼平苷酸、栀子苷等<sup>[6-7]</sup>。本文以其活性成分松脂醇二葡萄糖苷建立含量测定项,制订青娥丸的质量标准。虽然已有文献<sup>[8-9]</sup>报道青娥丸中君药杜仲的含量测定方法,但该测定方法与本文建立的方法相比,松脂醇二葡萄糖苷对照品色谱峰与干扰峰未能达到基线分离。目前本文所建立的方法已被《中国药典》(2010年版一部)收录。

## 1 仪器与试剂

Waters Alliance 系列高效液相色谱仪(Waters 2998 Photodiode Array Detector、Waters e2695 Separations Module),电子分析天平(AE200, METTLER TOLEDO, 瑞士),电子分析天平(BP211D, Sartorius, 德国)。

松脂醇二葡萄糖苷对照品,购自中国药品生物制品检定所(批号 111537-200502)。青娥丸样品包括 3 批自制水蜜丸样品和 2 批自制大蜜丸样品。乙腈、磷酸为色谱纯;水为超纯水。其他试剂均为分析纯。

## 2 松脂醇二葡萄糖苷的含量测定

**2.1 色谱条件** 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以乙腈-水(磷酸调 pH 4)(10:90)为流动相,流速  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,柱温为  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,检测波长为  $227\text{ nm}$ 。理论板数按松脂醇二葡萄糖苷峰计算应不低于 8 000。对照品、样品、阴性对照色谱图见图 1。

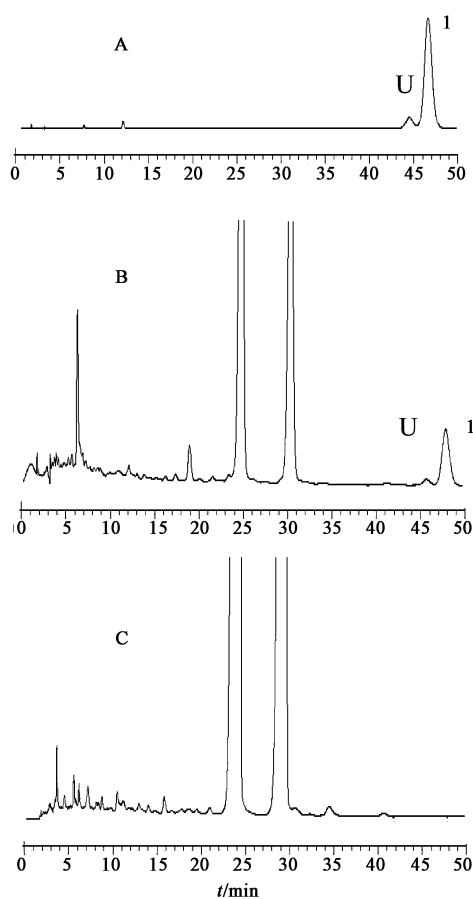
**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取松脂醇二葡萄糖苷对照品适量,加 10% 乙腈制成每 1 mL 含松脂醇二葡萄糖苷  $50\text{ }\mu\text{g}$  的溶液,即得。

**2.3 供试品溶液的制备** 本品水蜜丸适量,研细,取约  $0.8\text{ g}$ ,精密称定;或取大蜜丸,剪碎,混匀,取约  $1.0\text{ g}$ ,精密称定,置索氏提取器中,加三氯甲烷适量,加热回流 6 h,弃去三氯甲烷液,药渣挥去三氯甲烷,再置索氏提取器中,加甲醇适量,加热回流 6 h,提取液回收甲醇至干,残渣加水 10 mL 使溶解,通过大孔树脂(内径为  $1.7\text{ cm}$ ,柱高为  $10\text{ cm}$ )中依次以 20% 乙醇 50 mL 洗脱,弃去洗脱液,再用 40% 乙醇 50 mL 洗脱,收集洗脱液,减压浓缩至干,残渣加 10% 乙腈适量溶解,并转移至 5 mL 量瓶中,加 10% 乙腈到刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

### 2.4 检测限和定量限

**2.4.1 检测限** 以对照品峰信噪比(S/N)为 3 时计算,确定松脂醇二葡萄糖苷的检测限为  $0.266\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**2.4.2 定量限** 按对照品峰信噪比(S/N)为 10 时



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性对照;

1. 松脂醇二葡萄糖苷; U. 未知峰

图 1 青娥丸的高效液相色谱

计算,重复测量 6 次求得平均值,确定松脂醇二葡萄糖苷的定量限为  $0.443\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**2.5 线性关系考察** 精密称取松脂醇二葡萄糖苷对照品  $4.82\text{ mg}$ ,置 10 mL 量瓶中,以 10% 乙腈溶液稀释并定容至刻度,摇匀,得到质量浓度为  $482\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的对照品溶液。精密吸取该溶液稀释配制一系列不同质量浓度的对照品溶液。精密吸取上述对照品溶液各  $20\text{ }\mu\text{L}$ ,按上述确定的色谱条件进行测定,以峰面积积分值(Y)为纵坐标,对照品的浓度(X)为横坐标,绘制标准曲线,得到松脂醇二葡萄糖苷的线性回归方程  $Y=28\ 849X-2\ 119.5$ ,线性范围为  $4.43\sim 443\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $r=0.999\ 9$ )。

### 2.6 精密度试验

**2.6.1 日内精密度** 准确吸取同一对照品溶液  $20\text{ }\mu\text{L}$ ,连续进样 5 次,测定松脂醇二葡萄糖苷的峰面积,计算 RSD  $0.33\%$ 。

**2.6.2 日间精密度** 上述供试品分别测定 3 天,每天测定 5 次,测定松脂醇二葡萄糖苷的峰面积,计算 RSD  $0.73\%$ 。

**2.7 重复性试验** 取同一批号样品(批号 20090302)6 份,按 2.3 项下操作,在上述色谱条件下进行测定,计算松脂醇二葡萄糖苷色谱峰的单位质量峰面积的 RSD 2.05%。

**2.8 稳定性试验** 取青娥丸粉末 0.8 g,精密称定,按 2.3 项下操作,在上述色谱条件下,分别在 0,4,8,24,48,72 h 进行测定,以松脂醇二葡萄糖苷的峰面积进行考察,计算 RSD 0.86%。结果表明样品在 72 h 内稳定性良好。

**2.9 加样回收率试验** 取已知松脂醇二葡萄糖苷含量的青娥丸(水蜜丸)粉末(批号 20090302) 0.4 g,精密称定 9 份,每 3 份加入相同量(分别为已知含量的 50%,100%,150%)的松脂醇二葡萄糖苷对照品,按供试品溶液制备项下方法操作,测定。计算回收率及 RSD,结果见表 1。

表 1 松脂醇二葡萄糖苷加样回收率试验

成药量 /g	含有量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 / (%)	平均回收 率/ %	RSD / %
0.402 9	101.69	47.25	148.78	99.66		
0.398 8	100.66	47.25	147.88	99.64		
0.399 8	100.91	47.25	148.66	101.05		
0.401 8	101.41	94.51	194.48	98.47		
0.398 0	100.46	94.51	193.45	98.40	100.99	2.17
0.399 6	100.86	94.51	195.96	100.63		
0.401 5	101.34	141.76	247.55	103.14		
0.398 7	100.63	141.76	246.39	102.82		
0.402 7	101.64	141.76	250.18	104.78		

**2.10 耐受性试验** 按含量测定色谱条件以及改变色谱柱(Agilent Zorbax Extend C<sub>18</sub>, Waters xbridge),柱温(25,30,35 ℃),流速(1.2,1.1,1.0,0.9 mL·min<sup>-1</sup>),流动相比(乙腈-水(磷酸调 pH 4)分别为 10:90,10.5:89.5,9:91),流动相 pH(3,3.7,4.6)后进样分析,测得松脂醇二葡萄糖苷的含量和 RSD。除柱温应低于 30 ℃外,其余各项 RSD 或 SD 均 < 4%,分离效果理想。因此,青娥丸中松脂醇二葡萄糖苷的含量测定条件具有较好的耐受性。

**2.11 样品测定结果** 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,测定。每 1 g 青娥丸水蜜丸中松脂醇二葡萄糖苷的含量为 0.11~0.65 mg,平均含量为 0.27 mg。每 1 g 青娥丸大蜜丸中松脂醇二葡萄糖苷的含量为 0.17~0.32 mg,平均含量为 0.25 mg。

### 3 讨论

**3.1 HPLC 含量测定** 分别考察了提取方法、样品前处理、色谱条件等的影响。

表 2 各批次青娥丸松脂醇二葡萄糖苷含量(n=2)

No	剂型	批号	成药含量/ %
1	水蜜丸	20070502	0.018
2		20081201	0.020
3		20061201	0.016
4		20090401	0.037
5		20090402	0.046
6		20090403	0.011
7		20090301	0.022
8		20090302	0.025
9		20090303	0.065
10		200705	0.012
11		15001	0.027
12	大蜜丸	090701	0.032
13		090702	0.017

**3.1.1 提取方法考察** 因君药杜仲中含有大量杜仲胶,且青娥丸中还含有大量低极性成分,故选择用三氯甲烷进行脱脂。先后考察了甲醇、80% 甲醇、60% 甲醇、乙醇 4 种溶剂提取,结果表明甲醇、80% 甲醇、60% 甲醇提取效果相当,t 检验无显著性差异,而乙醇提取效率较低,故选择回流较为容易的甲醇作为提取溶剂。

**3.1.2 样品前处理考察** 由于本品为中药复方,成分复杂,为获得良好的色谱分离效果,考察了液-液萃取、过固相萃取(SPE)小柱、过大孔树脂(D101)3 种样品前处理方法。考虑处理效果,操作步骤及操作成本,确定采用过大孔树脂柱处理方法。

**3.1.3 色谱条件考察** 考察了甲醇-水、乙腈-水及乙腈-磷酸水 3 种流动相系统。松脂醇二葡萄糖苷对照品与其含有的杂质峰 U 在乙腈系统中能被基线分离,而在参考文献<sup>[9]</sup>所使用的甲醇-乙腈-水系统中二者无法分开,因此采用乙腈流动相系统;乙腈-磷酸水系统能改善其他干扰峰的峰形,降低基线噪音。对照品中松脂醇二葡萄糖苷色谱峰与杂质峰 U 的紫外吸收光谱图基本相同,质谱检测二者的分子量一样,为同分异构体。松脂醇二葡萄糖苷对照品中杂质峰面积约占总峰面积的 8.04%,因此在计算样品含量时,以对照品纯度为 91.96% 计。

**3.2 含量限度的制订** 《中国药典》(2010 年版一部)规定,杜仲药材中松脂醇二葡萄糖苷的含量应不低于 0.1%。按青娥丸处方量计算,水蜜丸中松脂醇二葡萄糖苷理论值应为 0.39 mg·g<sup>-1</sup>,按 90% 折算限度应定为每 1 g 不得低于 0.35 mg;大蜜丸中松脂醇二葡萄糖苷理论值应为 0.30 mg·g<sup>-1</sup>,按

# 顶空-气相色谱-质谱联用分析黄精炮制 过程化学成分的变化

魏征<sup>1</sup>, 曾林燕<sup>2</sup>, 宋志前<sup>2</sup>, 曹玉娜<sup>1</sup>, 张琳琳<sup>2</sup>, 刘振丽<sup>2\*</sup>

(1. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193;

2. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究炮制前后黄精中化学成分的变化。方法: 制备不同炮制时间的酒黄精, 顶空进样-气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术进行分析, 经数据库检索并参考正构烷烃标准品保留指数(RI), 确定化合物结构。应用色谱峰面积归一化法计算各成分的相对百分含量。结果: 生品与各炮制品共有的成分12个, 但每种成分含量不同。与生品比较, 炮制不同时间产生的成分20个, 检测不到的成分7个。结论: 黄精炮制后化学成分组成和含量发生变化。

[关键词] 黄精; 炮制; 顶空进样; 气相色谱-质谱

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)20-0115-04

## Comparative Analysis of Chemical Constituent from Polygonati Rhizoma before and After Processing by Headspace Injection-GC-MS

WEI Zheng<sup>1</sup>, ZENG Lin-yan<sup>2</sup>, SONG Zhi-qian<sup>2</sup>, CAO Yu-na<sup>1</sup>,  
ZHANG Lin-lin<sup>2</sup>, LIU Zhen-li<sup>2\*</sup>

[收稿日期] 20120528(377)

[基金项目] 国家自然科学基金面上课题(81073050)

[第一作者] 魏征, 硕士研究生, 从事中药分析专业, Tel: 13501184304, E-mail: marshallwee@hotmail.com

[通讯作者] \* 刘振丽, 研究员, 从事中药质量标准研究, Tel: 010-64014411-2503, E-mail: zhenli\_liu@sina.com.cn

90% 折算为  $0.27 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 限度应定为每丸不得低于 2.4 mg。

### [参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005: 487.
- [2] Luo L F, Wu W H, Zhou Y J, et al. Antihypertensive effect of *Eucommia ulmoides* Oliv. extracts in spontaneously hypertensive rats [J]. Journal of Ethnopharmacol, 2010, 129: 238.
- [3] Hung M Y, Timothy Fu Y C, Shih P H, et al. Du-Zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) leaves inhibits  $\text{CCl}_4$ -induced hepatic damage in rats[J]. Food Chem Toxicol, 2006, 44: 1424.
- [4] Zhang R, Liu Z G, Hu S J, et al. Du-Zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) cortex extract prevent OVX-induced osteoporosis in rats[J]. Bone, 2009, 45: 553.
- [5] Yen G C, Hsieh C L. Inhibitory effects of Du-Zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) against low-density

lipoprotein oxidative modification [J]. Food Chem, 2002, 77: 449.

- [6] Deyama T, Wishibe S, Nakazawa Y, et al. Constituents and pharmacological effects of *Eucommia* and Sibirian ginseng [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2001, 22: 1057.
- [7] Sih C J, Racikumar R R, Huang F C, et al. Letter: Isolation and synthesis of pinoresinol diglucoside, a major antihypertensive principle of Tu-Chung (*Eucommia ulmoides* Oliv.) [J]. American Chem Society, 1976, 98: 5412.
- [8] 甄汉深, 辛宁, 陈勇, 等. 青娥丸质量控制的实验研究[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(2): 95.
- [9] Xiong Z L, Luo X, Li X Q, et al. RP-HPLC Determination of pinoresinol diglucopyranoside in Qing'e pill extract[J]. Chinese Pharmaceutical Sciences, 2004, 13(2): 138.

[责任编辑 顾雪竹]