

• 含量测定 •

归苓益智片定性定量方法研究

张金凤, 罗 兰, 安广峰, 朱丹妮*
(中国药科大学, 江苏 南京 210038)

[摘要] 目的: 建立归苓益智片(茯苓、白术、当归)的定性定量方法。方法: 采用薄层色谱法对方中茯苓当归进行鉴别; 采用 SPE-HPLC 法测定白术中的白术内酯 III。结果: 定性鉴别分离度好, 专属性强; 白术内酯 III 在 0.064 μ g~0.705 μ g 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 相关系数为 0.9996, 平均回收率为 97.1%。结论: 该方法简便可靠, 可用于归苓益智片质量控制。

[关键词] 归苓益智片; 白术内酯 III 固相萃取; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)07-0001-03

Study on Quality Control of Guilingyizhi Tablets

ZHANG Jin-feng, LUO Lan, AN Guang-feng, Zhu Dan-ni*
(China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method to control the quality of Guilingyizhi Tablets. **Methods:** TLC was used to identify Radix Angelicae Senensis and Poria of the prescription; SPE-RP-HPLC was used to determine the content of atractylenolide III in Guilingyizhi Tablets. **Results:** It can especially identify Angelicae Senensis and Poria in TLC. The linearity of the method (SPE-RP-HPLC) was well with the average recovery of 97.0%. **Conclusion:** The method is simple, reliable and sensitive. It can be used in quality control of Guilingyizhi Tablets.

[Key words] Guilingyizhi Tablets; Atractylenolide III; Solid Phase Extraction (SPE); HPLC

归苓益智片由茯苓、当归、白术 3 味药组成, 由经典方当归芍药散精简而成^[1], 具有祛痰化湿, 益气活血的功能, 主治气虚型血管性痴呆。药理研究表明, 精简方对血管性痴呆模型的治疗作用相当甚至优于原方^[2]。白术中所含的白术内酯 III 本研究室应用联二亚硫酸钠和过氧化氢对 PC12 细胞造模进行研究, 发现白术内酯 II 有较好的神经保护作用, 对复方的整体功效有一定的代表性。本文采用 TLC 对方中的茯苓和当归进行鉴别, 并建立了固相萃取-高效液相色谱法 (SPE-HPLC) 测定归苓益智片中白术

内酯 III 的方法。为该制剂提供了较为全面的质量控制方法。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), 包括四元泵 Waters600E, 996PDA 检测器, Millennium³² 工作站; KQ-100DE 型超声波提取器 (昆山市超声仪器有限公司), 十万分之一电子天平 (METTLER)。

1.2 试剂 白术内酯 III 自制, 经 MS、NMR 鉴定结构, HPLC 测定纯度达 98% 以上。阿魏酸 (中国药品生物制品鉴定所, 批号为 0773-9607)。C₁₈ 固相萃取小柱 (500mg SUPELCO)。纯净水 (乐百氏), 色谱纯乙腈 (MERCK), 色谱纯甲醇 (江苏百林科技有限公司)。归苓益智片由上海市国家制剂中心提供。

2 方法和结果

2.1 薄层鉴别

2.1.1 当归的薄层鉴别 取本品 (除去包衣) 粉末

[收稿日期] 2005-08-18

[基金项目] 国家新药基金 (96-901-05-38); 国家自然科学基金 (30271604); 教育部重点项目 (104200)

[通讯作者] 朱丹妮, Tel: (025) 85391042; E-mail: Danzhu@163.com

约 3g, 加 1% 碳酸氢钠溶液 50mL, 超声处理 10min, 离心, 取上清液用稀盐酸调节 pH 值 2~ 3, 用乙醚提取 2 次, 每次 20mL, 合并醚液, 挥干, 残渣加甲醇 1mL 使溶解, 作为供试品试液。取阿魏酸对照品, 加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液, 作为对照品溶液。取缺当归的阴性对照样品粉末 3g, 同法制成阴性对照溶液。吸取供试液、对照液和阴性对照液各 10 μ L, 分别点于同一块硅胶 GF254 薄层板上, 以苯-乙酸乙酯-甲酸(4: 1: 0.1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷 10% 三氯化铁溶液, 105 $^{\circ}$ C 烘烤至显色清晰, 供试品色谱中, 在与对照品溶液色谱相应的位置显相同颜色的斑点, 而阴性对照液在该位置无此斑点。

2.1.2 茯苓的薄层鉴别 取本品(除去包衣)粉末约 1g, 加乙酸乙酯溶液 30mL, 超声处理 30min 滤过, 滤液挥干, 残渣加乙酸乙酯 1mL 溶解, 作为供试品试液。取茯苓对照药材粉末约 3g, 同法制备, 作为茯苓对照药材溶液。取缺茯苓的阴性对照样品粉末 3g, 同法制成阴性对照溶液。吸取供试液、对照药材溶液和阴性对照液各 10 μ L, 分别点于同一块硅胶 GF254 薄层板上, 以二氯甲烷为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 再以氯仿-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(8.5: 1.5: 0.05: 0.1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷 10% 硫酸乙醇溶液, 105 $^{\circ}$ C 烘烤至显色清晰, 供试品色谱中, 在与对照药材溶液色谱相应的位置上显相同颜色的斑点, 而阴性对照液在该位置无此斑点。

2.2 含量测定

2.2.1 检测波长的确定 经 200~ 400nm 紫外扫描, 白术内酯 III 在 220nm 处有最大吸收。

2.2.2 色谱条件 以 SHIMADZU-ODS (4.6 \times 250mm) 为色谱柱, 乙腈-水(1: 1) 为流动相, 流速为 1.0mL \cdot min $^{-1}$, 柱温为 30 $^{\circ}$ C, 检测波长为 220nm。

2.2.3 样品处理条件的考察 取苓归益智片适量, 除去包衣, 研细, 取 0.5g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入乙腈-水(1: 1) 10mL, 密塞, 称定重量, 超声 30min, 放冷, 补足丢失的溶剂, 滤过, 取续滤液 1.0mL, 过 500mg 固相萃取小柱, 用乙腈-水(1: 1) 洗脱, 用 1mL 量瓶接收, 顺次编号为 1, 2, 3 ..., 进 HPLC 检测, 结果为 1 2 号无白术内酯 III 洗出, 到 9 号白术内酯 III 全部洗下。

2.2.4 检测限和定量限的测定 取对照品溶液, 在上述色谱条件下以不同体积进样, 取峰面积为噪音 3 倍(S/N= 3) 和 10 倍(S/N= 10) 时的进样量为最低

检测限(LOD) 和最低定量限(LOQ)。白术内酯 III 的 LOD 为 0.00135 μ g, 白术内酯 III 的 LOQ 为 0.00405 μ g。
2.2.5 线性关系 取白术内酯 II 约 5.34mg, 精密称定, 置 5mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。分别精密吸取上述溶液 0.03, 0.06, 0.13, 0.20, 0.26, 0.33mL 至 10mL 的量瓶中, 加甲醇稀释至刻度。上述溶液分别进样, 按样品 2.2.2 项下色谱条件进行 HPLC 分析, 记录峰面积, 以样品浓度(μ g/mL) 为横坐标, 峰面积为纵坐标进行回归计算。结果表明, 白术内酯 III 在检测范围(3.2~ 35.2 μ g/ml) 内显示了良好的线性关系。

$$Y = 52805x + 20578 \quad r = 0.9996 (n = 6)$$

2.2.6 对照品溶液制备 取白术内酯 II 约 3mg, 精密称定, 置 5mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 精密吸取 0.05mL, 再以甲醇稀释至 5mL, 作为对照品溶液。

2.2.7 供试品溶液制备 取归苓益智片适量, 除去包衣, 研细, 取 0.5g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入乙腈-水(1: 1) 10mL, 密塞, 称定重量, 超声 30min, 放冷, 再称定重量, 补足丢失的溶剂, 滤过, 精密量取续滤液 1.0mL, 过 500mg 固相萃取小柱, 用乙腈-水(1: 1) 洗脱, 用 10mL 量瓶接收至近刻度, 定容, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2.8 精密密度测定 精密吸取对照品溶液 20 μ L, 连续进样 6 次, 相对标准偏差(RSD) 为 0.41%。

2.2.9 重复性测定 取本品 1 批, 按“2.2.7”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“样品测定”项下的方法测定含量, 平均含量为 0.125%, RSD 为 1.9% (n= 6)。

2.2.10 稳定性测定 取同一份供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8h 进样, 测定含量, RSD= 1.9% (n= 5), 说明在 8h 内供试品溶液是稳定的。

2.2.11 回收率测定 取已知含量的归苓益智片粉末 0.5g 共 6 份, 精密加入对照品溶液适量, 按“样品测定”项制备供试品溶液, 计算白术内酯 III 加样回收率。其平均回收率为 97.1%, RSD 为 1.1%。

回收率实验结果

| 样品 | 样品中白术内酯 III 的量(mg) | 加入白术内酯 III 的量(mg) | 测得白术内酯 III 的量(mg) | 回收率 (%) |
|----|--------------------|-------------------|-------------------|---------|
| 1 | 0.444 | 0.320 | 0.750 | 95.6 |
| 2 | 0.443 | 0.320 | 0.756 | 97.8 |
| 3 | 0.500 | 0.320 | 0.807 | 95.9 |
| 4 | 0.544 | 0.320 | 0.857 | 97.8 |
| 5 | 0.594 | 0.320 | 0.908 | 98.1 |
| 6 | 0.445 | 0.320 | 0.756 | 97.2 |

2.2.12 样品测定 取本品3批,按“2.2.7”项下制备供试品,进样20 μ L,测定含量,结果分别为含白术内酯 III 0.133, 0.127, 0.129%。

3 讨论

3.1 本制剂采用超临界提取工艺,采用参考文献报道^[3]的提取方法,即用甲醇超声提取后进样,60 min内都不能完全出峰,不仅耗时,且不利于色谱柱的保护,故采用相对简便快速的固相萃取的方法对样品进行前处理。

3.2 在使用固相萃取对样品进行前处理的过程中,刚开始使用甲醇提取样品后上柱然后使用不同浓度的甲醇洗脱,发现固相萃取小柱不能对杂质很好地保留,故改用流动相对样品进行提取上柱,用流动相洗脱,发现固相萃取小柱能很好地保留杂质。另外

考察了用甲醇提取样品和用流动相提取样品的差异,发现效果相当。

[参考文献]

- [1] 林志宏,朱丹妮,严永清.当归芍药散防治老年期痴呆的物质基础与作用机理研究 I ——组方作用协同性与选择性研究[J].中国实验方剂学杂志,2002,8(1):16-19.
- [2] 林志宏,朱丹妮,严永清.当归芍药散防治老年期痴呆的物质基础与作用机理研究 II ——抗脑老化组方功效相似性研究[J].中国实验方剂学杂志,2002,8(4):18-20.
- [3] 李伟,文红梅,张爱华,等.白术质量标准研究 I ——HPLC法测定2种白术内酯的含量[J].药物分析杂志,2001,21(3):170-173.