

地黄降糖颗粒质量标准研究

李若存, 陈 丹, 夏红英

(湖南省中医药研究院中药研究所, 湖南 长沙 410013)

摘要:目的: 建立地黄降糖颗粒的质量标准。方法: 采用TLC法对方中地黄、绞股蓝、苍术、玄参进行鉴别; 用薄层扫描法测定菝葜皂苷元的含量。结果: 在TLC色谱中检出地黄、绞股蓝、苍术、玄参; 菝葜皂苷元在0.92~4.6 μ g范围内显良好的线性关系, $r=0.9998$, 平均回收率99.16%, RSD 为0.84%。结论: 所建立的方法简便可行, 重现性好, 为地黄降糖颗粒质量控制提供了方法。

关键词: 地黄降糖颗粒; 菝葜皂苷元; 质量标准

中图分类号: R284.1 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2003)03-0014-03

Study on Quality Standard for Dihuang Jiangtang Granule

LI Ruo-cun, CHEN Dan, XIA Hong-ying

(Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410013, China)

Abstract Objective: To establish a quality standard for Dihuang Jiangtang Granule. Methods: Radix Rehmanniae, Herba Gynostemmae, Rhizoma Atractylodis and Radix Scrophulariae were identified by TLC. Sarsasapogenin was determined by TLC-Scanning. Results: Radix Rehmanniae, Herba Gynostemmae, Rhizoma Atractylodis and Radix Scrophulariae were detected by TLC. A good linear relationship was noted at the range of 0.92~4.6 μ g of sarsasapogenin, ($r=0.9998$). The average recovery was 99.16%, and RSD was 0.84%. Conclusion: The established methods are simple, feasible and reproducible. This study provided a method for the quality control of Dihuang Jiangtang Granule.

Key words: Dihuang Jiangtang Granules; Sarsasapogenin; quality standard

地黄降糖颗粒是中药三类新药, 由地黄、知母、绞股蓝等制成, 功能滋阴清热、健脾益气, 用于2型糖尿病, 证属阴虚内热兼气虚者。症见口渴喜饮、五心烦热、倦怠乏力、自汗、盗汗、气短懒言、心悸失眠、舌红少津、苔薄或花剥、脉弦或细数等。为有效地控制其质量, 采用薄层色谱法对制剂中的地黄、绞股蓝、苍术、玄参进行了鉴别, 并采用薄层扫描法测定了菝葜皂苷元的含量。该方法能有效控制该制剂的质量。

1 仪器与试液

CS-930薄层扫描仪(日本岛津), 定量毛细管(美国, Drummond公司), PBQ-II型薄层自动铺板器(重庆南岸新力实验电器厂), 硅胶G(青岛海洋化工厂), 地黄、苍术、玄参对照药材; 人参二醇、菝葜皂苷元对照品均由中国药品生物制品检定所提供, 所用

试剂均为分析纯。

2 定性鉴别

2.1 地黄的鉴别 取本品7g, 加水50ml, 煮沸20min, 放冷, 滤过, 滤液加醋酸乙酯萃取2次, 每次20ml, 分取醋酸乙酯层, 置水浴上蒸干, 残渣加甲醇1ml使溶解, 作为供试品溶液。同法制成地黄阴性对照液。另取地黄对照药材4g, 加水50ml煎煮二次, 每次30min, 滤过, 滤液同法制成对照药材溶液。吸取上述三种溶液各10 μ l, 分别点于同一硅胶G薄层板上, 以甲苯-醋酸乙酯(1:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以二硝基苯肼乙醇试液。供试品色谱中, 在与对照药材相应的位置上, 显相同颜色的斑点。而阴性对照液无相应的斑点。

2.2 绞股蓝的鉴别 取本品12g, 研细, 加乙醇60ml, 超声处理40min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加45%硫酸乙醇溶液(7 \rightarrow 100)15ml, 加热回流2h, 挥去乙醇, 用氯仿10ml振摇提取2次, 分取氯仿层, 用适量

无水硫酸钠脱水, 滤过, 滤液浓缩蒸干, 残渣加氯仿 1ml 使溶解作为供试品溶液。同法制成绞股蓝阴性对照液。另取人参二醇对照品, 加氯仿制成每 1ml 含 1mg 的溶液, 作为对照品溶液。吸取上述三种溶液各 8 μ l, 分别点于同一以 0.5% 羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上, 以环己烷-丙酮(2:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。而阴性对照液无相应的斑点。

2.3 苍术的鉴别 取本品 5g, 加水 20ml 使溶解, 通过 D₁₀₁ 型大孔树脂柱(内径 1.2cm, 长 15cm), 用水 50ml 洗脱, 弃去水液, 再用 70% 乙醇 50ml 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣加水 10ml 使溶解, 加盐酸 1ml, 加热回流 1h, 冷后, 用苯 20ml 萃取, 分取萃取层, 蒸干, 残渣加苯 1ml 使溶解, 作为供试品溶液。同法制成苍术阴性对照液。另取苍术对照药材 3g, 加水煎煮二次, 每次 30ml, 滤过, 滤液, 同法制成对照药材溶液。吸取上述三种溶液各 10 μ l, 分别点于同一以 0.5% 羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上, 以苯-丙酮(8:2)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 在紫外灯(365nm)下检视, 供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。而阴性对照液无相应的斑点。

2.4 玄参的鉴别 取本品 10g, 加丙酮 40ml, 加热回流 1h, 滤过, 滤液挥干, 残渣加丙酮 1ml 使溶解, 作为供试品溶液。同法制成玄参阴性对照液。另取玄参对照药材 2g, 加丙酮 20ml, 同法制成对照药材溶液。吸取上述三种溶液各 10 μ l, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(3:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 在紫外灯(365nm)下检视, 供试品色谱中, 在与对照药材相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。而阴性对照液无相应的斑点。结果见图 4。

3 含量测定

3.1 层析条件 0.5% CMC-Na 硅胶 G 薄层板, 规格 10cm \times 20cm, 薄板厚度 0.5mm, 110 $^{\circ}$ C 活化 0.5h。温度: 25 $^{\circ}$ C, 湿度: 60%。

3.2 扫描条件 经光谱扫描后确定菝葜皂苷元 $\lambda = 443\text{nm}$, 单波长反射式锯齿扫描, 狭缝宽度 0.4mm \times 0.4mm, SX=3。

3.3 对照品溶液的制备 精密称取菝葜皂苷元对照品约 5.0mg, 置 10ml 容量瓶中, 加苯溶解, 并稀释

至刻度, 摇匀, 即得。

3.4 样品溶液的制备 取本品约 6.0g, 精密称定, 置锥形瓶中, 加水 40ml 使溶解, 再加盐酸 5ml, 水浴上回流 2.0h, 放冷, 加氯仿 40ml, 加热回流 0.5h, 放冷, 分取氯仿层, 水层再用氯仿分别萃取 2 次, 每次 40ml, 合并氯仿部分, 水浴挥干氯仿, 残渣用苯溶解, 转移至 25ml 量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

3.5 阴性对照液的制备 取除知母外的其余处方量药材, 按制备工艺制备缺知母的阴性样品, 按上述供试品溶液制备方法制成缺知母的阴性溶液。

吸取阴性对照溶液、样品溶液和对照品溶液各 4 μ l, 分别点于同一薄层板上, 按标准曲线的制备展开、显色, 样品溶液色谱中, 在与对照品溶液相应位置上, 显相同颜色的黄色斑点, 阴性对照品溶液无相应的斑点。结果见图 5。

3.6 标准曲线的制备 分别精密吸取上述菝葜皂苷对照品溶液 2.4.6.8.10 μ l 分别点于同一块薄层板上, 以苯-丙酮(9:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以显色剂[甲液: 取水 25ml, 缓慢加硫酸 50ml, 放冷后, 再加乙醇 25ml, 摇匀; 乙液: 8% 的香草醛无水乙醇溶液, 用时将甲液 5 份与乙液 1 份混合]后, 在 70 $^{\circ}$ C 加热 7~10min, 至斑点显色清晰, 取出, 在薄层板上覆盖同样大小的玻璃板, 周围用胶布固定。按扫描条件进行测定。以菝葜皂苷元的浓度(x)为横坐标, 峰面积为纵坐标(y), 绘制标准曲线, 其回归方程为: $Y = 10837.50X + 770.546$, $r = 0.9998$ 。结果表明菝葜皂苷元在 0.92~4.6 μ g 范围内具有良好的线性关系。

3.7 稳定性试验 对同一块薄层板上同 1 个菝葜皂苷元斑点每隔 20min 扫描测 1 次, 所得 RSD 为 1.83% ($n = 5$)。结果表明, 在 100min 内基本稳定。

3.8 精密度试验 同板精密度: 精密吸取同一供试品溶液 4 μ l \times 5 点于同一硅胶 G 薄层板上, 依标准曲线绘制方法测定, 结果峰面积积分值的平均值为 69816.58, RSD% 为 0.89 ($n = 5$); 异板精密度: 精密吸取同一样品溶液 4 μ l 分别点于 5 块不同的薄层板上, 依法测定。RSD% 为 2.31 ($n = 5$)。表明精密度良好。

3.9 样品含量测定 用定量毛细管吸取供试品 6 μ l, 对照品溶液 4 μ l 与 8 μ l, 分别点于同一块薄层板上, 按标准曲线方法进行测定, 用外标两点法计算供试品含量, 结果见表 1。

3.10 加样回收率实验 精密称取已知含量的(批

号 20001215) 颗粒剂约 3g, 分别精密加入菝葜皂苷对照品溶液 3.0ml、4.0ml、5.0ml、13.0ml、15.0ml, 按上述含量测定项下的方法测定含量, 结果见表 2。

表 1 样品中含量测定结果(n = 3)

批号	2001215	20001222	20001229
	2.50	2.52	2.57
含量(mg/g)	2.53	2.54	2.53
	2.49	2.56	2.59
平均含量(mg/g)	2.51	2.54	2.57

表 2 加样回收实验结果(n = 3)

NO.	编号	样品含量	加入量	测得量	回收率	平均回收率
	(mg)	(mg)	(mg)	(%)	(%)	(%)
1	5.9291	1.38	7.2939	98.90		
2	6.1738	1.84	8.0066	99.60		
3	6.1498	2.30	8.4015	97.90	99.16	0.84
4	6.1575	5.98	12.0958	99.30		
5	6.1866	6.90	13.0935	100.10		

4 讨论

地黄为方中君药, 在 TLC 法中, 我们拟采用梓醇化学对照品鉴别方中的地黄^[1], 但阴性干扰多, 未获成功, 后经反复试验, 确立了本文的方法。据文献报道, 从绞股蓝中分离到 80 多种皂苷, 其苷元为人参

二醇, 或人参二醇的异构体^[2]。本方中含有知母皂苷、黄芪皂苷、绞股蓝皂苷, 鉴别中成分相互干扰, 所以我们确立了皂苷类水解, 以人参二醇对照品鉴别方中绞股蓝的方法。

知母为方中臣药, 主含菝葜皂苷元, 本制剂采用薄层扫描法测定菝葜皂苷元的含量, 样品处理方法简便, 省时, 结果准确; 用苯-丙酮为展开剂, 一次展开即可获得良好的分离效果。水解时间控制 2h 为宜, 水解时间不足, 皂苷水解不完全, 测得菝葜皂苷元含量偏低。

中国药典 2000 年版一部 171 页规定, 知母中含菝葜皂苷元不得少于 1.0%, 研制本品中, 我们对多家药材公司出售的知母饮片进行菝葜皂苷元含量测定, 达不到药典的要求, 可能是加工过程中表皮部分损失较多, 为了保证制剂质量和临床疗效, 应尽量选择同一产地知母药材进行制剂生产, 且在生产投料前测定原料含量。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 94, 171.
- [2] 李若存, 朱昭雄, 易大年, 等. 绞股蓝中三萜皂苷元的分离和结构鉴定[J]. 南京大学学报. 1993, 71-74.