

• 药剂 •

# 固本止咳膏质量标准的研究

黄瑞松<sup>1</sup>, 陈燕军<sup>2</sup>, 苏青<sup>1</sup>, 邓汝铭<sup>1</sup>, 杨东爱<sup>1</sup>

(1. 中国中医研究院广西民族医药研究所, 广西南宁 530001; 2. 广西中医学院, 广西南宁 530001)

**摘要:** 目的: 建立固本止咳膏质量控制的方法。方法: 采用薄层色谱法对该药的土壅大白蚁巢、五味子、淫羊藿和黄芪进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法测定该药五味子甲素的含量。液相色谱法条件为: 色谱柱 Shim-Pack CLS-ODS 柱(150 × 6.0mm); 流动相: 甲醇-水(85:15), 流速 1ml·min<sup>-1</sup>, 检测波长 254nm。结果: 该药薄层层析斑点清晰集中, 含量测定五味子甲素在 0.06~0.54μg 范围内具有良好线性关系, 平均回收率为 96.0%, RSD = 2.15% (n = 6)。结论: 本方法灵敏准确、重现性好、专属性强, 可作为固本止咳膏的质量控制标准。

**关键词:** 固本止咳膏; 薄层鉴别; 液相色谱法

中图分类号: R284.1 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2003)04-0001-04

## Studies on the Quality Standard of Guben Zhike Electuary

HUANG Rui-song<sup>1</sup>, CHEN Yan-jun<sup>2</sup>, SU Qing<sup>1</sup>, DENG Ru-ming<sup>1</sup>, YANG Dong-ai<sup>1</sup>

(1. Guangxi Institute of Minority Nationality Medicine and Pharmacology, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

2. Guangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

**Abstract:** Objective: To establish the method for quality control of Guben Zhike Electuary. Methods: Nidus Macrotermis, Fructus Schisandrae, Herba Epimedii and Radix Astragali were identified by TLC. The content of deoxyschisandrin was determined by HPLC. Conditions of HPLC were: Shim-Pack CLS-ODS column(150 × 6.0mm) with detection wavelength at 254nm. The mobile phase consisting of a mixture of methanol-water(85:15). The flow rate was 1 ml·min<sup>-1</sup>. Result: The spots of TLC were clear and concentrative. The linear regression for Deoxyschisandrin was obtained over the range of 0.06~0.54μg. The average recovery was 96.0%, RSD = 2.15% (n = 6). Conclusion: The methods are sensitive, accurate, reproducible and exclusive. It can be use for quality control of Guben Zhike Electuary.

**Key words:** Guben Zhike Electuary; TLC; HPLC

固本止咳膏是中国中医研究院广西民族医药研究所根据广西壮医理论和用药经验研制而成的壮药制剂, 由土壅大白蚁巢、五味子、淫羊藿和黄芪等中草药组成, 具有补肺温肾, 止咳祛痰, 平喘之功。用于肺气虚(兼挟寒痰)之慢性支气管炎具有较好疗效。为控制该药品的质量, 本研究对该药上述四味药材进行薄层鉴别, 并采用 HPLC 法测定该药五味子中的五味子甲素含量。本方法灵敏准确、重现性好、专属性强, 可有效控制该药品的质量。

## 1 仪器与试药

**1.1 仪器** LC-8A 高效液相色谱仪, 日本岛津公司; SPD-6AV 可见-紫外光检测器; C-R4A 色谱处理机;

BP211D 型 1/10<sup>5</sup> 电子分析天平, 德国赛多利斯公司; 薄层板自动涂布器, 重庆贝尔德仪器技术公司; SB2200 超声波清洗器, 上海必能信超声有限公司。

**1.2 试药** 固本止咳膏及各被检药材的阴性制剂由梧州瑞福祥药业有限公司提供; 五味子甲素、淫羊藿苷和黄芪甲苷对照品购于中国药品生物制品检定所; 土壅大白蚁巢对照药材由广西民族医药研究所提供; 高效液相流动相所用甲醇为色谱纯(天津市四友生物医学技术有限公司); 水为重蒸馏水; 硅胶 G、H GF<sub>254</sub> 为化学纯(青岛海洋化工厂); 聚酰胺薄膜片(浙江省台州市路桥四青生化材料厂); 其它化学试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 薄层鉴别

**2.1.1 土壅大白蚁巢鉴别** 取本品 15g, 加温水

10ml, 搅溶, 放冷, 加乙醚超声提取 3 次 (20, 20, 20ml), 每次 20min, 合并乙醚溶液, 挥干, 残渣用氯仿 2ml 溶解, 作为供试品溶液; 另取缺土垄大白蚁巢的阴性制剂 15g, 同法制成阴性对照品溶液; 再取土垄大白蚁巢对照药材粉末 6g, 加水 80ml, 煎煮 1.5h, 滤过, 滤液浓缩至 20ml, 同法制成对照药材溶液。吸取上述三种溶液各 2 $\mu$ l, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 H 薄层板上, 以氯仿-甲醇-醋酸乙酯 (6: 1: 3) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以新配制的重氮化对硝基苯胺试液 (对硝基苯胺 0.7g, 加浓盐酸 9ml, 加水稀释至 100ml。取此溶液 4ml, 逐滴加到冰冷的 1% 亚硝酸钠溶液 5ml 中, 再加冰冷的水稀释至 100ml。用前取此溶液与等体积 1% 碳酸钠溶液混匀, 即得), 放置约 5~ 15min。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显一个相同紫红色的斑点。阴性对照品色谱则无此斑点。见图 1-A。

**2.1.2 五味子鉴别** 取缺五味子的阴性制剂 15g, 同上述 2.1.1 方法制成阴性对照品溶液; 另取五味子甲素对照品, 加氯仿制成每 1ml 含 1mg 的溶液, 作

为对照品溶液。吸取 2.1.1 项下供试品溶液和上述阴性对照品溶液各 10~ 15 $\mu$ l、对照品溶液 2 $\mu$ l, 分别点于同一硅胶 GF<sub>254</sub> 薄层板上, 以环己烷-醋酸乙酯 (15: 5) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (254nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同的暗褐色斑点。阴性对照品色谱则无此斑点。见图 1- B。

**2.1.3 淫羊藿鉴别** 取上述 2.1.1 项下经乙醚超声提取的下层水溶液, 挥去乙醚, 加醋酸乙酯超声提取 2 次 (20, 20ml), 每次 20min, 合并醋酸乙酯溶液, 蒸干, 残渣加水 5ml 使溶解, 通过 D<sub>101</sub> 型大孔吸附树脂柱 (7g, 内径 1.5cm), 分别以水 60ml、30% 乙醇 80ml 洗脱, 弃去洗脱液, 继用 50% 乙醇 80ml 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣加甲醇 1ml 使溶解, 作为供试品溶液; 另取缺淫羊藿的阴性制剂 15g, 同法制成阴性对照品溶液; 再取淫羊藿苷对照品, 加甲醇制成每 1ml 含 0.5mg 的溶液, 作为对照品溶液。吸取上述三种溶液各 2 $\mu$ l, 分别点于同一聚酰胺薄膜片上, 以醋酸乙酯-丁酮-甲酸-水 (20: 1: 1: 1) 为展开剂, 展开, 取

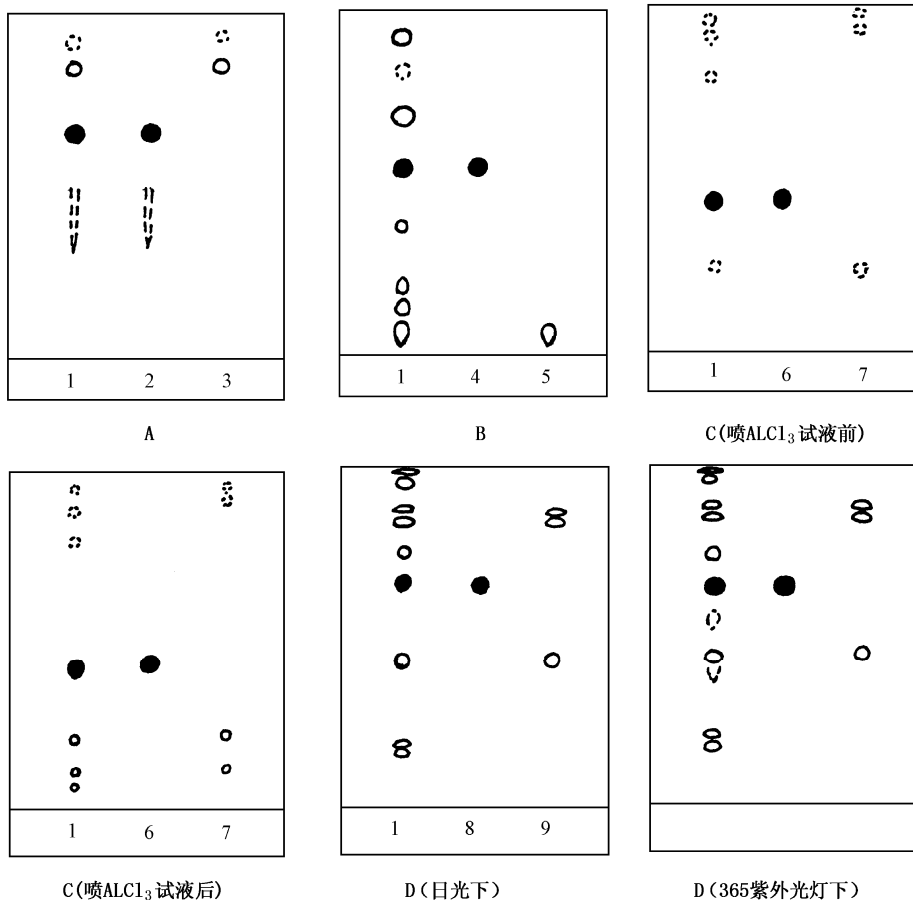


图 1 TLC 色图谱

A. 土垄大白蚁巢的鉴别 B. 五味子的鉴别 C. 淫羊藿的鉴别 D. 黄芪的鉴别

1. 固本止咳膏; 2. 土垄大白蚁巢对照药材; 3. 缺土垄大白蚁巢的阴性制剂; 4. 五味子甲素对照品; 5. 缺五味子的阴性制剂; 6. 淫羊藿对照品; 7. 缺淫羊藿的阴性制剂; 8. 黄芪甲苷对照品; 9. 缺黄芪的阴性制剂

出,晾干,置紫外光灯(365nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上显相同的暗褐色斑点;喷以三氯化铝试液,在50℃烘约10min,置紫外光灯(365nm)下检视,显相同的橙黄色斑点。阴性对照品色谱则无此斑点。见图1-C。

**2.1.4 黄芪鉴别** 取上述2.1.3项下经醋酸乙酯超声提取的下层水溶液,用水饱和的正丁醇超声提取3次(20, 20, 20ml)每次20min,合并正丁醇溶液,用氨试液洗涤2次(30, 30ml),弃去氨水溶液,取正丁醇溶液,蒸干,残渣加水5ml使溶解,放冷,通过D<sub>101</sub>型大孔吸附树脂柱(7g, 内径1.5cm),分别以水80ml、40%乙醇100ml洗脱,弃去洗脱液。继用70%乙醇80ml洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇0.5ml使溶解,作为供试品溶液;另取缺黄芪的阴性制剂15g,同法制成阴性对照品溶液;再取黄芪甲苷对照品,加甲醇制成每1ml含1mg的溶液,作为对照品溶液。吸取供试品和阴性对照品溶液各5 $\mu$ l、对照品溶液2 $\mu$ l,分别点于同一硅胶G薄层板上,以氯仿-甲醇-水(13:7:2)的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105℃烘约5~10min。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,日光下显相同的棕褐色斑点,紫外光灯(365nm)下显相同的橙黄色荧光斑点。阴性对照品色谱则无此斑点。见图1-D。

## 2.2 含量测定

**2.2.1 对照品溶液的制备** 精密称取干燥恒重的五味子甲素对照品适量,加甲醇制成每1ml含60 $\mu$ g的溶液,即得。

**2.2.2 供该品溶液的制备** 取本品5g,精密称定,加入乙醇4ml和硅藻土8g,拌匀,于80℃干燥4h,将

硅藻土粉装入滤纸筒,置索氏提取器中,用乙醚60ml回流提取2h,乙醚液挥干,残渣用甲醇溶解,移置10ml量瓶,加甲醇至刻度,摇匀。再精密吸取1ml置5ml量瓶,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

**2.2.3 阴性对照品溶液的制备** 取缺五味子的阴性制剂5g,按上述2.2.2方法制备,即得。

**2.2.4 色谱条件的选择及系统适用性试验** 色谱柱:Shim-Pack CLS-ODS柱(150 $\times$ 6.0mm);流动相:甲醇-水(85:15),流速1ml $\cdot$ min<sup>-1</sup>;检测波长:254nm。分别精密吸取上述对照品溶液的稀释液(1.5ml~10ml)、供试品溶液和阴性对照品溶液各20 $\mu$ l,注入高效液相色谱仪,以此色谱条件试验。结果表明,供试品溶液的色谱图中均有与五味子甲素保留时间相同的吸收峰,且五味子甲素峰与相邻杂质峰分离度大于1.5,可达到基线分离。理论板数按五味子甲素峰计算不低于1500。阴性对照品溶液的色谱图则无五味子甲素相对应的吸收峰。说明用本方法测定五味子甲素含量无阴性干扰,专属性强。见图2。

**2.2.5 线性关系的考察** 分别精密吸取对照品溶液0.5、1.5、2.5、3.5、4.5ml,分别置10ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,分别吸取20 $\mu$ l注入高效液相色谱仪,按上述2.2.4色谱条件测定五味子甲素峰的峰面积,以峰面积积分值为纵坐标(Y),进样量为横坐标(X),绘制标准直线。回归方程为 $Y=473.1+126005X$ , $r=0.9998$ 。五味子甲素在0.06~0.54 $\mu$ g范围内,与峰面积呈良好线性关系。

**2.2.6 精密度考察** 精密吸取五味子甲素对照品甲醇溶液(9 $\mu$ g $\cdot$ ml<sup>-1</sup>)20 $\mu$ l,重复进样5次,测得五味子甲素峰面积积分值,计算RSD。结果5次测定峰

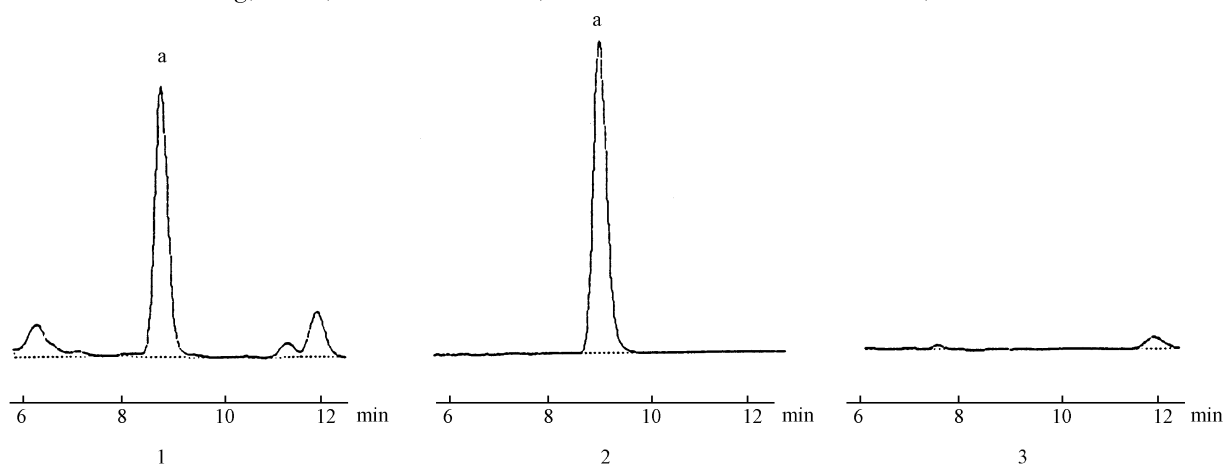


图2 HPLC 色谱图

1. 固本止咳膏; 2. 五味子甲素对照品; 3. 缺五味子的阴性制剂; a. 五味子甲素

面积积分值相差不大,  $RSD = 1.05\%$ 。

**2.2.7 重现性试验** 取同一批号制剂制备的5个供试品,在上述色谱条件下,分别精密吸取20 $\mu$ l进样,测得峰面积积分值,计算百分含量和 $RSD$ 。结果同一批号的5个平行供试品溶液百分含量相差不大,  $RSD = 1.26\%$ 。

**2.2.8 稳定性试验** 分别精密吸取供试品溶液20 $\mu$ l,在上述色谱条件下,每隔2h进样测定一次峰面积积分值,共测定5次,第6次在24h测定。结果表明峰面积积分值在24h内基本稳定,  $RSD = 3.88\%$ 。

**2.2.9 回收率试验** 采用加样回收法,分别取已测得含量的同一批号本品5g共6份,分别添加五味子甲素对照品适量,按前述方法和条件进行供试品溶液制备和含量测定,计算回收率。结果平均回收率 = 96.0%,  $RSD = 2.15\%$ ,见表1。

**2.2.10 样品测定** 分别精密称取4批样品各3份,照上述2.2.2方法制备供试品溶液。分别精密吸取五味子甲素对照品溶液(9 $\mu$ g $\cdot$ ml $^{-1}$ )与供试品溶液各20 $\mu$ l,照上述2.2.4色谱条件进样,测定峰面积积分值,计算样品中五味子甲素的含量。结果4批样品五味子甲素含量在0.065~0.105mg $\cdot$ g $^{-1}$ 范围,平均含量为0.080mg $\cdot$ g $^{-1}$ 。见表2。

表1 回收率试验结果

编号	原有量 (mg)	添加量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.474	0.408	0.866	96.1	96.0	2.15
2	0.485	0.408	0.865	93.1		
3	0.492	0.408	0.875	93.9		
4	0.485	0.816	1.279	97.3		
5	0.484	0.816	1.285	98.2		
6	0.528	0.816	1.323	97.4		

表2 4批样品五味子甲素含量测定结果

批号	$X$ (mg $\cdot$ g $^{-1}$ )	RSD (%)	n
970224	0.105	1.59	3
970226	0.065	2.59	3
970228	0.096	1.26	5
970304	0.071	2.44	3

### 3 讨论

**3.1 固本止咳膏所含土垆大白蚁巢为方中君药**,土垆大白蚁巢文献报道含有18种氨基酸<sup>[1]</sup>,同属白蚁巢的化学成分有糖乙醇、D-甘露糖醇及多糖类、葡萄糖、牛乳糖、阿拉伯糖和木糖<sup>[2]</sup>,我们曾试验证实土垆大白蚁巢含有酚性成分、皂甙、植物甾醇或三萜、氨基酸、糖和多糖成分。我们曾对本品中土垆大白

蚁巢的氨基酸进行薄层鉴别,虽然制剂中可检出土垆大白蚁巢所含的氨基酸,但阴性对照品色谱有干扰。后我们改对酚性成分进行鉴别,结果样品均可检出土垆大白蚁巢的特征斑点,且无阴性干扰,故鉴别方法采用之。本品方中淫羊藿的鉴别,曾直接将醋酸乙酯提取部分点样于硅胶H-CMCNa板上,参考药典方法<sup>[5]</sup>展开、显色,结果层析效果欠佳,斑点拖尾,且斑点不明显。经改用聚酰胺薄膜片进行层析,淫羊藿甙斑点清晰集中,但仍有一定杂质干扰。后改进将醋酸乙酯提取部分通过D<sub>101</sub>型大孔吸附树脂处理,收集50%乙醇洗脱部分进行层析,基本可排除杂质干扰。

**3.2 土垆大白蚁巢为方中君药**,但因其有效成分尚未明确,化学成分方面的基础研究不多,故暂无法对其进行含量测定。五味子为臣药,五味子甲素为五味子主要有效成分之一,可选择其进行含量测定。五味子甲素的含量测定,文献报道多为薄层扫描法和高效液相色谱法<sup>[4-6]</sup>。因高效液相色谱法具有简便、灵敏、准确的特点,故我们选择高效液相色谱法进行五味子甲素含量测定。

**3.3 文献报道**,用甲醇、乙醇、乙醚、乙酸乙酯、苯、乙烷、氯仿、二氯甲烷、1,2-二氯乙烷等九种溶剂对北五味子种子中木脂素类成分的提取效果均较好,提取率相近<sup>[7]</sup>。我们曾分别试用氯仿或乙醚作溶剂进行索氏提取,按上述2.2.4条件进行高效液相测定。结果用氯仿提取供试品杂质峰较多,对五味子甲素吸收峰干扰大;用乙醚提取供试品杂质峰无干扰,五味子甲素峰与其它杂质峰分离度均大于1.5,故选用乙醚作提取溶剂。

#### 参考文献:

- [1] 吴练中,陈勇,张杰.土垆大白蚁菌圃总氨基酸和铁含量测定[J].中草药,1986,17(1):27.
- [2] 李栋.土白蚁文献资料综述[J].白蚁科技,1995,12(2):19-27.
- [3] 中华人民共和国药典.一部[S].北京:化学工业出版社,2000.267.
- [4] 王珂,童玉懿,宋万志.北五味子有效成分的薄层光密度法测定[J].药学学报,1990,25(1):49-53.
- [5] 张永煜,郭允珍.不同产地五味子中木脂素类成分的高效液相色谱法测定[J].药物分析杂志,1990,10(3):146-148.
- [6] 刘燕,王宝葵.更年安及五味子中五味子甲、乙素的HPLC测定[J].中成药,1992,14(9):12.
- [7] 王慕邹,李百龙.北五味子有效成分的高效液相层析测定[J].药学学报,1983,18(3):209-214.