

痫宁片的质量标准研究

黄月纯,屠宝英*,熊颖*,孙亦群

(广州中医药大学第一附属医院,广州 510405)

摘要:采用 TLC 法对痫宁片中黄芪、三七、白芍及柴胡进行了定性鉴别;并采用薄层扫描法测定黄芪甲甙及人参皂甙 Rg₁ 的含量,其平均回收率分别为 97.55%、97.30%;RSD 分别为 3.22%、2.96%。

关键词:痫宁片;黄芪甲甙;人参皂甙 Rg₁;薄层扫描法

中图分类号:R284.1 文献标识码:B 文章编号:1005-9903(2000)02-0010-04

A Study on Quality Standard of Xianning Tablet

HUANG Yue-chun, TU Bao-ying, XIONG Ying, SUN Yi-qun

(The First Affiliated Hospital, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405)

Abstract: Astragalus, radix notoginseng, radix paeoniae alba and Bupleurum in Xianning tablets were identified by thin-layer chromatography. Astragaloside and Ginsenoside Rg₁ were determined by the TLC-scanner. The average recoveries of astragaloside and Ginsenoside Rg₁ were 97.55% and 97.30%; the RSD were 3.22% and 2.96%.

Key words: Xianning tablets; astragaloside; Ginsenoside Rg₁; TLC-scanner

痫宁片是黄芪、三七、白芍、柴胡等多味中药组成,具有益气活血、调和阴阳、熄风化痰之功效,用于治疗各种类型癫痫及头痛^[1]。为控制产品质量,采用 TLC 法对方中黄芪、三七、白芍及柴胡进行了定性研究,并对主药黄芪中黄芪甲甙和三七中人参皂甙 Rg₁ 进行定量分析,现报导如下。

1 仪器与试药

CS-9301 PC 薄层扫描仪(日本岛津);定量毛细管(日本);硅胶 G(青岛海洋化工厂);黄芪甲甙、人参皂甙 Rg₁、人参皂甙 Rb₁、三七皂甙 R₁、芍药甙对照品,黄芪、三七、白芍、柴胡对照药材(中国药品生物制品检定所提供);痫宁片(本院制剂);阴性样品(按处方工艺制得缺味样品);所用化学试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层定性鉴别

2.1.1 供试品溶液的制备 取本品 5 片,除去糖衣,研细,加甲醇 30ml 水浴回流 2h,滤液蒸干,残渣用 10ml 水溶解,用水饱和的正丁醇提取 3 次(20, 10, 10ml),合并正丁醇提取液,用 2% 氢氧化钠洗涤 2 次(5, 5ml),弃去水层,正丁醇液再用正丁醇饱和的水洗涤 2 次(5, 5ml),正丁醇液水浴蒸干。残渣加甲醇 1ml 使溶解,作为供试品溶液。

2.1.2 对照药材及阴性对照液的制备 分别取黄芪、三七、白芍、柴胡对照药材适量,按供试品溶液制备方法,制成相应的对照药材溶液。分别取缺黄芪、三七、白芍、柴胡阴性对照,按供试液制备方法,制成相应的阴性对照液。

2.1.3 黄芪与三七的鉴别^[2] 分别取黄芪甲甙、人参皂甙 Rg₁、人参皂甙 Rb₁、三七皂甙 R₁ 对照品适量,各加甲醇制成每 ml 含 1mg 的对照品溶液。吸取各对照品溶液、供

* 广州中医药大学中药学院 99 届毕业生

试品溶液、黄芪及三七对照药材溶液以及缺黄芪与三七阴性对照液各 $8\mu\text{l}$, 分别点于同一含 CMC-Na 硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-甲醇-水(3: 0.8: 0.1)为展开剂, 饱和 20min, 展开 5cm, 取出, 晾干; 再饱和 20min, 展开 8cm, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, $100\sim 105^{\circ}\text{C}$ 烘烤 5~7min. 供试品在与对照品及对照药材相应的位置上, 显相同颜色的斑点; 阴性无干扰, 结果见图 1。

2.1.4 白芍的鉴别^[3] 取芍药甙对照品适量, 加甲醇制成每 ml 含 1mg 的对照品溶液。吸取对照品溶液、供试品溶液、白芍对照药材溶液及缺白芍阴性对照液各 $8\mu\text{l}$, 分别点于同一含 CMC-Na 硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-醋酸乙酯-甲醇-甲酸(40: 5: 10: 0.2)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 的香草醛硫酸溶液, 热风吹至斑点显色清晰, 供试品在与对照品及对照药材相应的位置上, 显相同颜色的斑点; 阴性无干扰, 结果见图 2。

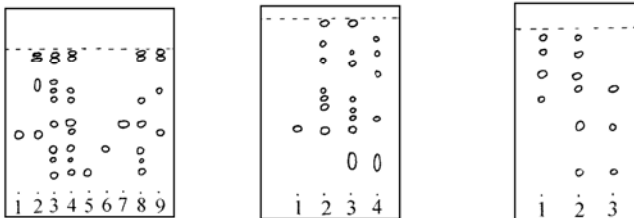


图 1 黄芪、三七 TLC 图谱

1. 黄芪甲甙; 2. 黄芪; 3. 缺黄芪阴性对照; 4. 样品; 5. 人参皂甙 Rb₁; 6. 三七皂甙 R₁; 7. 人参皂甙 Rg₁; 8. 三七; 9. 缺三七阴性对照

图 2 白芍 TLC 图谱

1. 芍药甙; 2. 白芍; 3. 样品; 4. 缺白芍阴性对照

图 3 柴胡 TLC 图谱

1. 柴胡; 2. 样品; 3. 缺柴胡阴性对照

2.1.5 柴胡的鉴别^[4] 吸取供试液与缺柴胡阴性对照液各 $10\mu\text{l}$ 、柴胡对照药材溶液 $4\mu\text{l}$, 分别点于同一含 CMC-Na 硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-甲醇-水(30: 10: 1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 2% 的对氨基苯甲醛的 40% 硫酸溶液, 60°C 加热显色, 供试品在与对照药材相应位置上, 显相同颜色的斑点; 阴性无干扰, 结果见图 3。

2.2 黄芪甲甙及人参皂甙 Rg₁ 的含量测定

2.2.1 标准曲线的制备 分别精密称取黄芪甲甙、人参皂甙 Rg₁ 对照品适量, 加甲醇制成每 ml 各含 0.49mg 和 1.20mg 的混合对照品溶液。用定量毛细管吸取上述对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5, $6\mu\text{l}$ 分别点于同一含 0.2% CMC-Na 硅胶 G 薄层板上, 按样品含量测定项下方法展开, 显色, 扫描测定各斑点积分面积。以测得的积分面积为横坐标, 以点样量 (μg) 为纵坐标, 得黄芪甲甙回归方程为: $Y = -0.051989 + 0.0015092x$ $r = 0.9994$, 表明黄芪甲甙在 0.49~2.94 μg 之间, 线性关系良好; 人参皂甙 Rg₁ 回归方程 $Y = -0.062432 + 0.0016475x$ $r = 0.9979$, 表明人参皂甙 Rg₁ 在 1.2~7.2 μg 之间, 线性关系良好。两曲线均不通过原点。

2.2.2 精密度试验 分别在同一薄层板上点 5 个 $2\mu\text{l}$ 的上述对照品溶液, 测得黄芪甲甙及人参皂甙 Rg₁ 的积分面积平均值分别为 701.484、1781.828, RSD 分别为 3.4%、1.99%, 表明同板精密度较好; 再分别对同一对照品斑点重复扫描 5 次, 结果黄芪甲甙及人参皂甙 Rg₁ 的积分面积平均值分别为 694.486、1775.079, RSD 分别为 0.55%、1.53%, 表明仪器精密度良好。

2.2.3 稳定性试验 在同一硅胶 G 板上点上述混合对照品溶液 $2\mu\text{l}$, 展开显色后, 分别在 30, 60, 90, 120, 150min 对同一对照品斑点进行扫描, 结果黄芪甲甙及人参皂甙 Rg₁ 的积分面积平均值分别为 695.479、1770.412, RSD 分别为 3.04%、3.39%, 表明黄芪甲甙及人参皂甙 Rg₁ 均在显色后 2.5h 内较稳定。

2.2.4 重现性试验 精密称取同批样品 5

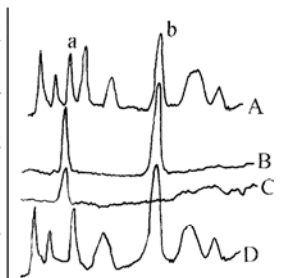


图 4 黄芪甲甙及人参皂甙 Rg₁ 薄层扫描图

a. 黄芪甲甙; b. 人参皂甙 Rg₁; A. 样品; B. 对照品; C. 缺三七阴性对照; D. 缺黄芪阴性对照

份(相当 10 片的量),按供试品溶液的制备和测定项下平行试验,测得样品中黄芪甲甙及人参皂甙 R_{g1} 的积分面积平均值分别为 741.506、2998.098, RSD 分别为 2.95%、3.26%。

2.2.5 阴性干扰试验 分别取缺黄芪阴性对照及缺三七阴性对照适量,按供试液制备的方法制得空白对照液,在同一薄层板上分

别点上述混合对照品溶液 $2\mu\text{l}$ 、供试液及阴性对照液各 $4\mu\text{l}$,按样品测定项下的方法展开,显色,扫描,结果阴性对照对测定均无干扰,见图 4。

2.2.6 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品适量,精密加入一定量的黄芪甲甙、人参皂甙 R_{g1} 对照品,按供试品溶液的制备和测定项下操作,结果见表 1。

表 1 加样回收率测定结果

黄芪甲甙						人参皂甙 R_{g1}					
样品量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	\bar{x} (%)	RSD (%)	样品量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	\bar{x} (%)	RSD (%)
0.206	0.245	0.434	93.06			1.545	1.280	2.733	92.97		
0.200	0.245	0.435	95.92			1.494	1.280	2.786	100.94		
0.223	0.245	0.466	99.18	97.55	3.22	1.393	1.280	2.633	96.88	97.30	2.96
0.219	0.245	0.460	98.36			1.378	1.280	2.625	97.42		
0.208	0.245	0.456	101.22			1.412	1.280	2.670	98.28		

2.2.7 供试品溶液的制备和测定 取本品除去糖衣,精密称定,研细,精密称取约 10 片的量,装入滤纸筒内,置索氏提取器中,加乙醚适量提取至近无色,弃去乙醚液,滤纸筒挥去乙醚后加甲醇 40ml 浸泡过液,再加甲醇适量提取至无色,提取液水浴蒸干。残渣用 20ml 水微热使溶解,用 0.1mol/L 氢氧化钠饱和的正丁醇提取 6 次, (20ml \times 3, 15ml \times 2, 10ml \times 1)。合并正丁醇提取液,用正丁醇饱和的 0.1mol/L 氢氧化钠洗涤 3 次(10ml \times 3),再用正丁醇饱和的水洗涤 2 次(15ml \times 2),正丁醇液加氧化镁 6g 搅匀水浴蒸干,用脱脂棉沾少量无水乙醇将氧化镁装入滤纸筒内,置索氏提取器中,加甲醇适量提取约 4h,提取液水浴蒸干。残渣加甲醇使溶解,定量转移至 2ml 量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。取标准曲线项下制得的混合对照品溶液作为对照品溶液。照薄层色谱法(中国药典 1995 年版一部附录 VIB)试验,精密吸取供试品溶液 $4\mu\text{l}$,对照品溶液 $2\mu\text{l}$ 与 $4\mu\text{l}$,分别交叉点于同一含 0.2% CMC-Na 硅胶 G 薄层板上,以正丁醇-醋酸丁酯-水(4: 1: 5)上层液为展开剂,在浓氨水饱和条件下

两次展开,第一次展开 13cm,取出,晾干;第二次展开 15cm,取出,晾干。喷以 10% 硫酸乙醇溶液,在 100~ 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 5~ 7min 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。照薄层色谱法(中国药典 1995 年版一部附录 VIB 薄层扫描法)试验,波长: $\lambda_s = 525\text{nm}$, $\lambda_R = 700\text{nm}$, $S_X = 3$,狭缝 0.4 \times 0.4mm,双波长反射法锯齿扫描测定供试品与对照品积分面积,用外标两点法计算,结果见表 2。

表 2 样品测定结果($n = 3$)

批次	黄芪甲甙		人参皂甙 R_{g1}	
	\bar{x} (mg/片)	RSD (%)	\bar{x} (mg/片)	RSD (%)
1	0.0527	1.69	0.247	2.83
2	0.0512	2.35	0.274	2.45
3	0.0507	2.91	0.283	2.61

3 讨论

3.1 由于黄芪甲甙与三七中皂甙结构相似,采用常规自制的含 CMC-Na 硅胶 G 板薄层层析分离鉴别较难,用中国药典 95 版一部黄芪项下收载的展开剂氯仿: 甲醇: 水(65: 35: 10) 10 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜的下层液或三七项下收载的展开剂氯仿-醋酸乙酯-甲醇-水(15:

40: 22: 10) 10℃放置过夜的上层液展开,无法将黄芪甲甙与人参皂甙 R_{g_1} 分开。有文献^[5]报导以正丁醇-醋酸丁酯-水(4: 1: 5)上层液为展开剂能分离鉴别黄芪甲甙及人参皂甙,但实验发现供试液背景干扰很大,分离度差。文献^[2]报导以氯仿-甲醇-水(3: 0.8: 0.1)为展开剂二次展开,可将黄芪甲甙与人参皂甙 R_{g_1} 分开。经试验此系统可在同板上鉴别黄芪和三七,且展开速度快,但黄芪甲甙和人参皂甙 R_{g_1} 两斑点较接近,不利于测定其含量。通过实验采用文献^[5]报导的展开剂在浓氨水饱和条件展开则斑点集中,大大消除背景干扰,二次展开可在同板上测定黄芪甲甙和人参皂甙 R_{g_1} 含量。经试验浓氨水的用量约为展开剂的 2/3 为宜。

3.2 含黄芪复方制剂中含有多种氨基酸、多糖及酸性物质等,样品预处理复杂。本实验曾用^[6]水饱和的正丁醇萃取后碱水处理,再用D101大孔吸附树脂处理,仍有背景干扰。文献^[7]报导采用碱水饱和的正丁醇萃取,能有效地除去含黄芪复方制剂中的杂质,本实验采用碱水饱和的正丁醇萃取,用正丁醇饱和的碱水洗涤,正丁醇液再用^[8]氧化镁处理,可排除背景干扰。曾比较用0.05、0.1、0.15mol/L等不

同浓度的氢氧化钠来饱和正丁醇,结果0.1和0.15mol/L效果较好,故选择0.1mol/L的氢氧化钠。

参考文献:

- [1] 张横柳,贾晓林. 痫宁片治疗癫痫 266 例脑电图分析. 中医杂志, 1996, 37(6): 353
- [2] 徐晖,曾元儿,钟镜金. 薄层扫描法测定人参及其制剂中人参皂甙 R_{g_1} 含量. 中药新药与临床药理, 1998, 9(2): 106
- [3] 中华人民共和国药典. 一部. 广州: 广东科学技术出版社, 1995. 86
- [4] 李光慧,朱青,李虹,等. 御感速袋泡剂质量标准的研究. 中国实验方剂学杂志, 1997, 3(4): 9
- [5] 秦海林,赵天增,高令杰,等. 人参皂甙与黄芪甲甙的薄层色谱分析. 中国中药杂志, 1995, 20(4): 226
- [6] 李玲,王宝珍. 黄芪及其复方制剂中黄芪甲甙的薄层扫描测定. 中成药, 1993, 15(6): 10
- [7] 王旭,周富荣. 薄层扫描法测定隆必清胶囊中黄芪甲甙的含量. 中国中药杂志, 1999, 24(5): 285
- [8] 鲁静,王宝珍. 黄芪甲甙的薄层扫描测定. 中成药, 1992, 14(6): 34

(收稿日期: 1999-07-06)