

近视复明丸质量标准的研究

周新蓓, 欧阳荣, 胡铁骊

(湖南中医学院第一附属医院, 湖南 长沙 410007)

摘要:目的: 建立近视复明丸的质量标准。方法: 采用薄层色谱法对方中柴胡、丹参、黄芪、当归进行定性鉴别; 采用 HPLC 法测定芍药苷的含量。结果: 芍药苷的线性范围为 108ng~1080ng ($r=0.99996$, $n=5$), 平均回收率为 98.54%。结论: 方法可行, 重复性好, 可作为该产品质量控制的方法。

关键词: 近视复明丸; 芍药苷; 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(2005)02-0016-03

Method for the Quality Control of Jinshifuming Wan

ZHOU Xin-pei, OU Yang-rong, HU Tie-li

(The First Affiliated Hospital, Hunan College of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

Abstract: Objective: To set up the quality standards for Jinshifuming Wan. Methods: Radix Bupleuri, Radix Salviae, Miltiorrhizae, Radix Astragali and Radix Angelicae Sinensis were identified by TLC method. The content of paeoniflorin in Jinshifuming Wan was determined by HPLC. Results: A good linear relationship between peak area and amount was noted for 108~1080ng of paeoniflorin, with a correlation coefficient of 0.99996, and the average recovery was 98.54%. Conclusion: The method is convenient, accurate and practicable. It can be used for quality control of the Jinshifuming Wan.

Key words: Jinshifuming Wan; paeoniflorin; HPLC

近视复明丸为我院眼科传统制剂, 由白芍、柴胡、丹参、黄芪、当归等多味中药组成。具有疏肝健脾, 养血活血, 升阳明目作用; 用于青少年近视、弱视。其中白芍为君药, 具有平肝止痛, 养血调经功能^[1], 在方中起重要作用。白芍的主要成分为芍药苷^[2], 含量较高, 易控制, 可选为定量指标。另外, 采用薄层色谱法对柴胡、丹参、黄芪、当归进行定性鉴别。该实验操作简便, 方法灵敏、可靠, 重现性好, 结果准确, 专属性强, 可作为该制剂的内在质量控制方法。

1 仪器与试剂

仪器: 高效液相色谱仪: Agilent1100 系列四元梯度泵, Agilent1100 手动进样器, Agilent1100 系列二极管阵列检测器, Agilent1100 工作站(Agilent 公司); 超声波清洗器(昆山市淀山湖检测仪器厂)、万分之一电子分析天平(沈阳龙腾电子称量仪器有限公司)。

试剂: 甲醇(色谱纯, 上海陆都化学试剂厂,

20021026), 水为注射用水; 其余所用试剂均为分析纯。

对照品: 芍药苷对照品(0736-200118, 供含测定), 黄芪甲苷(781-200210), 丹参酮 II A(0736-9909, 供含测定), 当归对照药材(927-9907); 均由中国药品生物制品检定所提供。

近视复明丸(本院自制; 000903, 010215, 010711)

2 近视复明丸的薄层色谱鉴别

2.1 柴胡的鉴别 取本品 10g, 研细, 加甲醇 30mL 超声处理 30min, 滤过, 滤液加入预先处理的中性氧化铝柱(100~200 目; 5g; 内径 10~15mm)上, 用 40% 甲醇 100mL 洗脱, 收集洗脱液, 置水浴上蒸干, 残渣加水 15mL 溶解, 用饱和的正丁醇提取三次, 每次 15mL, 合并正丁醇液, 用水洗涤两次, 每次 15mL, 弃去水液; 正丁醇回收至干, 残渣加甲醇 2mL 使溶解, 作为供试品溶液; 按处方量称取除柴胡外的其他药材, 按制备工艺方法制成缺柴胡的阴性样品, 再同上法处理制成缺柴胡的阴性对照液; 另取北柴胡对照药材 1g, 加甲醇 10mL 超声处理 30min, 滤过, 滤液置水浴上蒸干, 残渣加甲醇 2mL 使溶解, 作为对照药材

溶液。照薄层色谱法试验^[1], 吸取上述三种溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以醋酸乙酯-乙醇-水(18: 2: 1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 1% 对二甲氨基苯甲醛乙醇液-10% 硫酸(1: 1)溶液, 于 105 $^{\circ}$ C 烘烤数分钟至斑点显色清晰。分别置日光及紫外光灯(365nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照药材相应的位置分别显相同颜色的斑点和荧光斑点; 去柴胡样品试验无干扰, 结果见图 1。

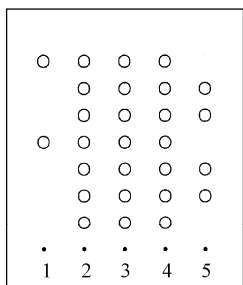


图 1 柴胡的薄层色谱图

1. 去柴胡空白 2. 3. 4. 为三批样品 5. 柴胡对照药材

2.2 黄芪的鉴别 取本品 10g, 研细, 加正丁醇 50mL, 置水浴上加热回流提取 2h, 滤过, 滤液用 1% 氢氧化钠溶液洗涤三次, 每次 15mL, 弃去碱液, 继续用正丁醇饱和的水洗至中性, 弃去水液, 正丁醇液置水浴上蒸干, 残渣加甲醇 1mL 使溶解, 作为供试品溶液; 按处方量称取除黄芪外的其他药材, 按制备工艺方法制成缺黄芪的阴性样品, 再同上法处理制成缺黄芪的阴性对照液; 另取黄芪甲苷对照品, 加甲醇制成每 1mL 中含 1mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法试验^[1], 吸取上述三种溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-甲醇-水(65: 35: 10) 10 $^{\circ}$ C 以下放置的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 热风吹至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应位置上, 显相同颜色的斑点; 去黄芪空白无干扰。结果见图 2。

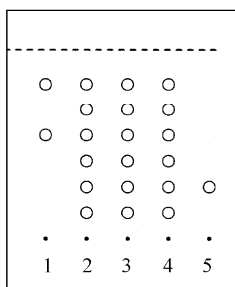


图 2 黄芪的薄层色谱图

1. 去黄芪空白 2. 3. 4. 为三批样品 5. 黄芪甲苷对照品

2.3 丹参的鉴别 取本品 5g, 研碎, 加乙醚 15mL, 浸渍 2h, 滤过, 滤液挥干, 残渣加醋酸乙酯 2mL 使溶解, 作为供试品溶液; 按处方量称取除丹参外的其他

药材, 按制备工艺方法制成缺丹参的阴性样品, 再同法处理制成缺丹参的阴性对照液; 另取丹参酮 IIA 对照品, 加醋酸乙酯制成每 1mL 中含 0.5mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法试验^[1], 吸取上述三种溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以苯-醋酸乙酯(19: 1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应位置上, 显相同颜色的斑点; 去丹参空白液无干扰。结果见图 3。

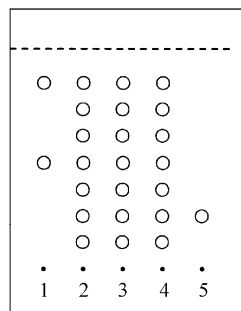


图 3 丹参的薄层色谱图

1. 去丹参空白 2. 3. 4. 为三批样品 5. 丹参酮 IIA 对照品

2.4 当归的鉴别 取本品 5g, 研碎, 加乙醚 40mL 超声处理 10min, 滤过, 滤液挥干, 残渣加正己烷 1mL 使溶解, 作为供试品溶液; 按处方量称取除当归外的其他药材, 按制备工艺方法制成缺当归的阴性样品, 再同法处理制成缺当归的阴性对照液; 另取当归对照药材 0.5g, 加乙醚, 同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法试验^[1], 吸取上述三种溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-醋酸乙酯(9: 1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365nm)下检视, 供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色荧光斑点; 且缺当归的阴性对照液无干扰。结果见图 4。

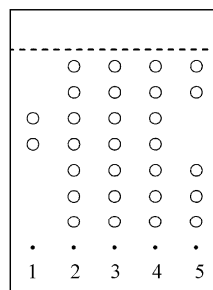


图 4 当归的薄层色谱图

1. 去当归空白 2. 3. 4. 为三批样品 5. 当归对照药材

3 芍药苷的含量测定

3.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil ODS C_{18} (5 μ m, 4.6mm $\times$ 100mm); 流动相: 甲醇-水(20: 80), 检测波长: 230nm; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 流速: 1.0mL/min。

3.2 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品 5.4mg, 置 50mL 量瓶中, 加稀乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。(0.1080mg/mL)。

3.3 供试品溶液的制备 取不同批号的近视复明丸 5g, 研碎, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加稀乙醇 50mL, 称定重量, 浸泡 60min, 并时时振摇, 然后超声处理 60min, 放冷, 再称定重量, 用稀乙醇补足减失的重量, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45μm) 滤过, 即得。

3.4 线性范围的考察 精密吸取浓度为 0.1080mg/mL 的芍药苷对照品溶液 1 2 3 4 5、10μL, 按上述色谱条件测定峰面积, 以对照品峰面积为纵座标, 以对照品浓度为横坐标进行线性回归, 其回归方程为: $Y = 1734.5265X - 6.1599$, $r = 0.99996$ 。可见芍药苷在 108ng~ 1080ng 范围内具有良好的线性关系(色谱图见图 5)。

3.5 空白试验 取去白芍的阴性制剂, 按 3.3 项下方法制得阴性对照液, 以上述色谱条件测定。结果阴性对照液与芍药苷相同保留时间处, 无色谱峰出现。HPLC 图谱见图 5。

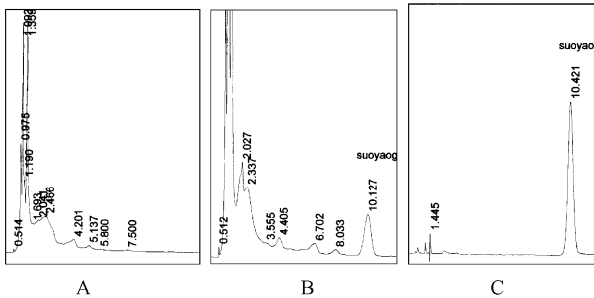


图 5 近视复明丸高效液相色谱图

A. 去白芍阴性对照 B. 近视复明丸供试品 C. 芍药苷对照品

3.6 精密度试验 取同一浓度的芍药苷对照品溶液, 在上述色谱条件下测定, 连续进样 5 次, 测定峰面积积分值, RSD 为 0.19%。

3.7 稳定性试验 分别精密吸取同一供试品溶液 10μL, 于 0.1 2 4 8 24h 进样, 测定其芍药苷峰面积积分值, RSD 为 0.52%。结果表明, 供试品溶液在 24h 内峰面积积分值基本稳定。

3.8 重复性试验 取批号 010702 的样品 5 份, 分别按上述条件, 测定其芍药苷含量, RSD 为 0.67%。结果表明, 本法重复性良好。

3.9 加样回收率试验 取已知含量的供试品(批号

010215), 精密称定, 各精密加入一定浓度的对照品溶液(取芍药苷 11.12mg 置 10mL 量瓶中, 加稀乙醇溶解并定容至 10mL, 摇匀, 即得) 1mL, 蒸干, 分别按 3.3 项下方法制得供试液, 以上述色谱条件测定芍药苷、含量, 芍药苷平均回收率为 98.54%, RSD 为 0.97%(结果见表 1)。

表 1 芍药苷的回收率试验结果(n= 6)

编号	样品 (g)	样品中含加入芍药 芍药苷量 (mg)	芍药 苷的量 (mg)	测得量 (mg)	回收 得量 (mg)	回收率 (%)	平均 回收率 (%)	RSD (%)
1	1.0832	1.1163	0.8896	1.9882	0.8719	98.01	98.54	0.97
2	1.0643	1.0968	0.8896	1.9856	0.8888	99.91		
3	1.1086	1.1425	1.1120	2.2358	1.0933	98.32		
4	1.0934	1.1268	1.1120	2.2100	1.0832	97.41		
5	1.0894	1.1227	1.3344	2.4319	1.3092	98.11		
6	1.1052	1.1390	1.3344	2.4663	1.3273	99.47		

3.10 样品的测定 取不同批号的近视复明丸样品 5g, 按 3.3 项下方法制得供试品试液, 以上述色谱条件测定。测定结果见表 2 及图 5。

表 2 芍药苷的测定结果

批 号	芍药苷含量(mg/g)	RSD(%)
000903	0.86	0.57
010215	1.13	0.44
010702	0.99	0.67

4 讨论

在供试品溶液的制备中, 采用了少量多次甲醇、稀乙醇超声提取法及一次加入足量甲醇、稀乙醇浸泡 1h, 超声提取 30min、1h 以及分次加溶媒等多种方法, 测定结果表明, 以 1 次加足量稀乙醇浸泡 1h、超声提取 1h 效果最好。

对其中 3 种主要药材进行了 TLC 定性分析, 同时定量测定了芍药苷的含量, 精密度高, 能有效地控制该制剂的内在质量。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2000. 18, 附录 37.
[2] 李家实. 中药鉴定学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996. 57.