

藏药十味诃子丸的质量控制

张幸福*, 才毛, 骆桂法
(青海省食品药品检验所, 西宁 810016)

[摘要] 目的:建立藏药十味诃子丸的质量控制方法。方法:采用显微鉴别和薄层色谱法进行定性鉴别,采用 HPLC 法测定羟基红花黄色素 A 和没食子酸的含量。结果:通过显微可鉴别出红花和诃子;TLC 法可鉴别出诃子、红花、山矾叶、紫草茸、獐牙菜和藏茜草及其活性成分的特征斑点;羟基红花黄色素 A 回归方程为 $Y = 2.5263 \times 10^6 X - 1.1957 \times 10^4$ ($r = 0.9997$) 线性范围 0.013 6~0.271 7 μg ;没食子酸方程 $Y = 3.0529 \times 10^6 X - 9.392 \times 10^3$ ($r = 0.9997$), 线性范围 0.157 9~0.947 5 μg ;平均回收率分别为 99.9%, 99.1%;RSD 分别为 2.2%, 1.6% ($n = 6$)。结论:建立的方法可全面控制十味诃子丸的质量,鉴别方法专属性强,定量方法准确,可有效控制该制剂的质量。

[关键词] 十味诃子丸; 红花; 诃子; 紫草茸; 藏茜草; 獐牙菜; 山矾叶; 羟基红花黄色素 A; 没食子酸

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)09-0051-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014090051

Quality Control of Tibetan Medicine Shiwei Hezi Pills

ZHANG Xing-fu*, CAI Mao, LUO Gui-fa
(Qinghai Institute for Food and Drug Control, Xi'ning 810016, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for quality control of Tibetan Medicine Shiwei Hezi Pills. **Method:** Traditional Tibetan medicine in prescription were identified by a series of Microstructure and TLC methods. Hydroxysafflor yellow A; gallic acid was determined by HPLC. The separation was performed on Phenomenex C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). **Result:** The linear range of Hdroxysafflor yellow A and gallic acid was within the range of 0.013 6-0.271 7 μg and 0.157 9-0.947 5 μg . The average recovery was 99.9% and 99.1%, the RSD was 2.2%. and 1.6%. **Conclusion:** The method can be applied to the quality control of Shiwei Hezi Pills.

[Key words] Shiwei Hezi pills; Carthami Flos; Chebulae Fructus; Lacc; Radix et Rhizome Rubiae; Zhangyacai; Folium sympiocos; hydroxysafflor yellow A; gallic acid

[收稿日期] 20130930(006)
[基金项目] 国家药品标准提高项目(民族药 414)
[通讯作者] * 张幸福, 本科, 副主任药师, 从事中藏药材及成药的研究工作, Tel:0971-8215400, E-mail:happydrug@163.com

[参考文献]

[1] 赵文静, 刚宏林. 胶类动物药的临床与现代研究[J]. 中医药信息, 2004, 21(3): 27.

[2] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 302.

[3] 罗晓健, 吴志鹏, 黄璐琦, 等. 氨基酸的柱前衍生高效液相色谱分析在中草药研究中的应用[J]. 中草药, 2005, 36(4): 630.

[4] 陆明, 孙黛妮, 汪杨, 等. OPA-FMOC 联用柱前衍生化

法测定复方氨基酸注射液中氨基酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(12): 2424.

[5] 武文, 李卓明, 苏冀彦, 等. 鹿茸柱前衍生化高效液相指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(9): 58.

[6] 柯雪红, 孙维广, 姚江雄, 等. 夏桑菊颗粒氨基酸类成分指纹图谱的研究[J]. 中成药, 2007, 29(6): 781.

[7] 唐涛. 氨基酸柱前衍生化 HPLC 方法发展及应用[D]. 南京: 南京理工大学, 2006.

[责任编辑 顾雪竹]

十味诃子丸,藏药名阿如久巴日布,是采用藏药秘典《四部医典》中的名方结合现代工艺精制而成的治疗肾结石的新药。标准收载于《卫生部药品标准》藏药第一册^[1],由诃子、藏茜草、红花、刀豆、豆蔻、山矾叶、渣驯膏、紫草茸、獐牙菜、圆柏膏等十味药组成,清肾热,利尿功效。用于肾炎,腰膝酸痛,尿频或尿闭,血尿,尿道结石等。但是涉及十味诃子丸单味药成分的鉴别及测定方法的研究却很少^[2-3]。本方法建立了诃子、红花的显微特征鉴别,建立了诃子、红花、山矾叶、紫草茸、獐牙菜和藏茜草的 TLC 鉴别,对其中的有效成分羟基红花黄色素 A (HSSA) 和没食子酸进行了含量测定。

1 材料

1.1 仪器 岛津 LC-20ATVP 高效液相色谱仪, AR5120 型电子天平 (奥豪斯公司), HANGPING FA1004 型电子天平 (上海天平仪器厂), CP225D 型电子天平 (赛多利斯公司), CPA225D 型电子天平 (赛多利斯公司), KQ5200B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), 硅胶 G 薄层板 (青岛海洋化工厂), BX51 型照相显微镜 (日本奥林巴斯公司), 卡玛薄层数码成像仪, Phenomenex C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。

1.2 试药 没食子酸 (批号 110831-200803, 含量为 90.1%)、羟基红花黄色素 A (批号 111637-200503)、齐墩果酸 (批号 110709-200505)、诃子 (批号 121015-201004)、红花 (批号 120907-201111)、紫草茸 (批号 121052-200302)、獐牙菜 (批号 121581-200701), 以上对照品、对照药材均购自中国食品药品检定研究院。藏茜草和山矾叶由青海省食品药品检验所藏药标本室提供。

液相用甲醇、乙腈均为色谱纯,水为重蒸水;其他试剂均为分析纯。十味诃子丸样品情况见表 1。

表 1 十味诃子丸样品信息

No.	生产厂家	批号	No.	生产厂家	批号
1	A	20110205	6	B	2010070101
2	A	20110517	7	C	20110902
3	A	20101016	8	C	20110302
4	B	2009080102	9	C	20111113
5	B	2010060101	10	A	20111133

2 方法与结果

2.1 显微鉴别^[1,4] 取本品粉末少许,置载玻片上,加水合氯醛封片,置显微镜下观察:石细胞成群或单个散在,淡黄色或鲜黄色,呈类圆形、长卵形、类

方形、长方形或长条形,有的略分枝或一端稍尖突,直径 15 ~ 54 μm,壁厚 8 ~ 20 μm,孔沟细密而清晰,不规则分叉或数回分叉,有的胞腔内含黄色颗粒物 (诃子)。花粉粒圆球形或椭圆形,直径约 60 μm,外壁有刺,有 3 个萌发孔 (红花),见图 1。

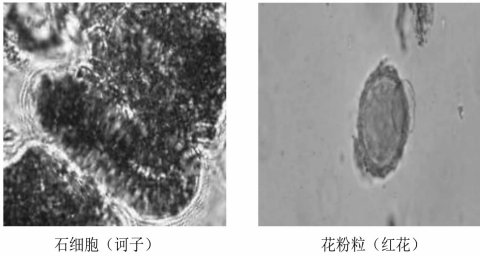


图 1 十味诃子丸显微特征图

2.2 TLC 鉴别

2.2.1 诃子^[1,4-5] 取本品细粉 2 g,加乙酸乙酯 50 mL,超声处理 20 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙酸乙酯 1 mL 使溶解,作为供试品溶液;另取诃子对照药材 0.5 g,同法制成对照药材溶液;再取没食子酸对照品,加乙酸乙酯制成每 1 mL 含 0.3 mg 的溶液,作为对照品溶液;按十味诃子丸的处方比例制成缺诃子的阴性对照样品,取 2 g,同供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。吸取上述供试品溶液及阴性供试品溶液 10 μL,对照药材及对照品溶液各 3 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,三氯甲烷-丙酮-甲酸 (7:2:1) 为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 2% 三氯化铁乙醇溶液,105 ℃ 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

2.2.2 红花^[1-2,4] 取本品细粉 2 g,加 80% 丙酮 15 mL,超声处理 10 min,滤过,滤液浓缩至 4 mL,作为供试品溶液;另取红花对照药材 0.2 g,同法制成对照药材溶液;按十味诃子丸的处方比例制成缺红花的阴性样品,取 2 g,同供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。吸取上述供试品溶液及阴性溶液 10 μL,对照药材溶液 5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-甲酸-水 (6:1:1) 为展开剂,展开,取出,晾干。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。

2.2.3 紫草茸^[1-2,5] 取本品细粉 2 g,加乙醚 20 mL,振摇 10 min,滤过,滤液浓缩至 5 mL,作为供试品溶液;另取紫草茸对照药材 0.5 g,同法制成对照药材溶液;按十味诃子丸的处方比例制成缺紫草茸的阴性样品,取 2 g,同供试品溶液的制备方法制

成阴性对照溶液。吸取上述供试品溶液及阴性溶液各 8 μL,对照药材溶液 4 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(60 ~ 90 ℃)-甲酸乙酯-甲酸(10:6:0.3)上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的主斑点,阴性对照无干扰。

2.2.4 山矾叶^[1-2,6] 取本品细粉 2 g,加甲醇 15 mL,加热回流 30 min,冷却,滤过,滤液浓缩至 5 mL,作为供试品溶液;另取山矾叶对照药材 0.5 g,同法制成对照药材溶液;按十味诃子丸的处方比例制成缺山矾叶的阴性样品,取 2 g,同供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。吸取上述供试品溶液及阴性溶液 5 ~ 10 μL,对照药材溶液 5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(60 ~ 90 ℃)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 的硫酸乙醇溶液,在 105 ℃ 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。

2.2.5 獐牙菜 取本品细粉 2 g,加甲醇 10 mL,超声处理 30 min,过滤,取上清液,作为供试品溶液;另取獐牙菜对照药材 0.5 g,同法制成对照药材溶液;再取齐墩果酸对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液;按十味诃子丸的处方比例制成缺獐牙菜的阴性样品,取 2 g,同供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。吸取上述供试品溶液及阴性溶液各 5 ~ 10 μL,对照药材溶液 5 μL,对照品溶液 3 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷-三氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸(20:5:8:0.1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,在 105 ℃ 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材及对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的紫红色斑点,阴性对照无干扰。

2.2.6 藏茜草 取本品细粉 2 g,置锥形瓶中,加水 20 mL,摇匀,再加三氯甲烷 25 mL,加热回流 30 min,放冷,分取三氯甲烷液,蒸干,残渣加三氯甲烷 2 mL 溶解,作为供试品溶液。另取藏茜草对照药材 0.5 g,同法制成对照药材溶液;按十味诃子丸的处方比例制成缺藏茜草的阴性样品,取 2 g,同供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。吸取上述供试品溶液及阴性溶液各 5 ~ 10 μL,对照药材溶液 5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正己烷-乙酸乙酯-甲酸(5:4:0.5)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显一个明显的黄色荧

光斑点,阴性对照无干扰。

2.3 含量测定^[7-11]

2.3.1 检测波长、提取方法、测定条件的选择 对 HSSA 和没食子酸对照品溶液进行 DAD 紫外吸光谱扫描,结果 HSSA 在 403 nm、没食子酸在 273 nm 处有最大吸收。在同一条件下(甲醇回流、277 nm、乙腈-水),2 种成分能够被同时检测。但经不同溶剂、不同提取方法及不同检测波长来考察样品的提取效率、分离度、线性范围和加样回收率后认为,单独测定每个成分的含量更符合质量标准的科学性和严谨性。

2.3.2 溶液的制备 取羟基红花黄色素 A 对照品适量,精密称定,加 25% 甲醇制成每 1 mL 含 30 μg 的溶液,即得羟基红花黄色素对照品溶液。取没食子酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 80 μg 的溶液,即得没食子酸对照品溶液。

红花供试品溶液 取本品细粉约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 25% 甲醇 50 mL,密塞,称定质量,静置 30 min 后,超声处理 40 min,放冷,再称定质量,用 25% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

诃子供试品溶液 取本品细粉约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,密塞,称定质量,加热回流 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液(或适当稀释),即得。

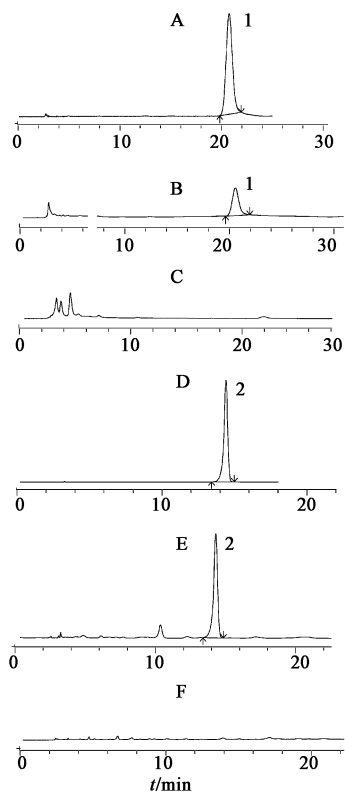
按十味诃子丸的处方比例分别制成缺诃子、红花的阴性样品。

2.3.3 色谱条件 按表 2 色谱条件进样,供试品溶液色谱中,在与 HSSA 和没食子酸对照品相应位置处,有保留时间相同的色谱峰,阴性无干扰,见图 2。

表 2 色谱条件及进样条件

成分	流动相	检测波长	进样量
		/nm	/μL
红花	甲醇-乙腈-0.7% 磷酸(26:2:72)	403	10
没食子酸	甲醇-水-磷酸(10:90:0.01)	273	5

2.3.4 线性关系考察 分别精密吸取 HSSA 对照品溶液(13.6 mg · L⁻¹)1,2,4,6,8,10,14,16,20 μL;没食子酸对照品溶液(78.96 mg · L⁻¹)2,4,6,8,10,12 μL,注入液相色谱仪,以峰面积为纵坐标,对照品进样量为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程结果 HSSA 在 0.013 6 ~ 0.271 7 μg 线性良好, $Y=2.526\ 3 \times 10^6 X-1.195\ 7 \times 10^4$, $r=0.999\ 7$ 。



A, D. 对照品; B. 供试品(红花); C. 红花阴性;
E. 供试品(诃子); F. 诃子阴性;
1. 羟基红花色素; 2. 没食子酸

图 2 十味诃子丸 HPLC

没食子酸在 0.157 9 ~ 0.947 5 μg 线性关系良好, $Y = 3.052\ 9 \times 10^6 X - 9.392 \times 10^3$, $r = 0.999\ 7$ 。

2.3.5 稳定性试验 取供试品溶液(批号 20101016), 室温下避光保存, 分别于配置后 0, 4, 8, 12, 16, 18, 22 h, 精密吸取 10 μL, 依法进样, HSSA 峰面积的 RSD 1.2% ($n = 7$)。取供试品溶液(批号 20110302), 室温下保存, 分别于配置后 0, 4, 8, 12, 16, 18, 22 h, 精密吸取 5 μL, 依法进样, 没食子酸峰面积的 RSD 0.3% ($n = 7$)。结果表明 HSSA、没食子酸在 22 h 内的稳定性良好。

2.3.6 精密度试验 取 HSSA 对照品溶液(13.6 mg·L⁻¹), 重复进样 5 次, 每次 10 μL。结果 HSSA 峰面积的 RSD 1.0%。取没食子酸对照品溶液(78.96 mg·L⁻¹), 重复进样 5 次, 每次 5 μL, 结果没食子酸峰面积的 RSD 0.3%。表明 HSSA 和没食子酸的精密度良好。

2.3.7 重复性试验 取十味诃子丸(批号 20101016), 研细, 取约 0.5 g, 精密称定 6 份, 按 2.3.2 和 2.3.3 项下方法制备并测定, 结果 6 份样品的 HSSA 含量为 1.53, 1.57, 1.56, 1.49, 1.53, 1.51 mg·g⁻¹, 平均 1.53 mg·g⁻¹, RSD 2.0%。

取十味诃子丸(久美藏药, 批号 20110302), 研细, 取约 0.5 g, 精密称定 6 份, 按 2.3.2 和 2.3.3 项下方法制备并测定, 结果 6 份样品的没食子酸为 13.45, 13.47, 13.51, 13.60, 12.98, 13.85, 13.42 mg·g⁻¹, 平均 13.47 mg·g⁻¹, RSD 1.9%。

由上可见, HSSA 和没食子酸的重复性良好。

2.3.8 回收率试验 取已知含量的十味诃子丸(批号 20101016, HSSA 含量为 1.52 mg·g⁻¹) 约 0.25 g, 平行 6 份, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入 HSSA 对照品溶液(15.5 mg·L⁻¹) 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 200 W, 频率 40 kHz) 40 min, 放冷, 再称定质量, 用 25% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

取已知含量的十味诃子丸(批号 20110205, 没食子酸含量为 4.13 mg·g⁻¹) 约 0.25 ~ 0.30 g, 平行 6 份, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入合适浓度的没食子酸对照品溶液 50 mL, 密塞, 称定质量, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

按 2.3.3 项条件测定 HSSA 和没食子酸的含量, 计算回收率, 结果见表 3。

表 3 十味诃子丸加样回收率考察试验

成分	样品含量 /mg	加入量 /mg	实测总量 /mg	回收率 /%	平均 /%	RSD /%
HSSA	0.379 7	0.775 0	1.172 9	102.4	99.9	2.2
	0.403 7	0.775 0	1.195 9	102.2		
	0.338 7	0.775 0	1.101 6	98.4		
	0.390 0	0.775 0	1.173 4	101.1		
	0.389 7	0.775 0	1.148 6	97.9		
	0.389 6	0.775 0	1.145 9	97.6		
没食子酸	1.160 5	2.489 9	3.574 8	100.0	99.1	1.6
	1.182 0	2.489 9	3.633 5	98.5		
	1.169 2	2.489 9	3.634 4	99.0		
	1.182 0	2.489 9	3.628 1	98.2		
	1.133 7	2.489 9	3.630 6	100.3		
	1.087 0	2.489 9	3.612 0	101.4		

2.3.9 样品测定 按 2.3.2 和 2.3.3 项方法对 10 批十味诃子丸中的 HSSA 和没食子酸的含量进行测定, 结果见表 4。

3 讨论

各药材占处方的比例为诃子 26%, 红花 15%, 其余藏茜草、山矾叶、紫草茸和獐牙菜均各占 10%, 除了诃子, 比例差别不是很大。在薄层色谱的预试

表 4 十味诃子丸中含量测定 mg·g⁻¹

No.	生产厂家	批号	HSSA	没食子酸
1	A	20110205	1.50	4.13
2	A	20110517	1.52	4.17
3	A	20101016	1.52	4.08
4	B	2009080102	0.44	11.74
5	B	2010060101	0.18	11.73
6	B	2010070101	0.57	10.58
7	C	20110902	0.40	26.45
8	C	20110302	0.97	13.48
9	C	20111113	0.86	26.23
10	A	20111133	1.51	4.13

验过程中,以 2 g 为基数取样,以不同体积的提取溶剂和点样体积考察,各个薄层色谱结果未见斑点过浓或过浅的情况。

试验参照《中国药典》^[4]和文献资料^[7-9],选用流动相①甲醇-0.7% 磷酸溶液(20:80);②乙腈-0.7% 磷酸(30:70);③甲醇-乙腈-0.7% 磷酸(6:12:82)为流动相对十味诃子丸中的 HSSA 进行系统适应性试验,结果在甲醇中加入乙腈或在乙腈中加入甲醇,峰形达到基线分离且对称性比较好,无拖尾现象。

对红花药材和十味诃子丸模拟制剂在 40,60 ℃干燥 8 h,HSSA 含量变化不大;80 ℃干燥 16 min,1,8 h,红花药材中 HSSA 改变不大,而模拟制剂中 HSSA 含量明显降低 10%~30%,表明红花用于配伍用药时,干燥温度对红花黄色素的含量有显著影响,结果和文献一致^[12-13],即 HSSA 对热不稳定。另外 HSSA 对光也不稳定^[14],供试品溶液制备后要及时避光放置,对照品可用棕色量瓶配制。

含量测定结果表明,同一厂家生产的不同批次的的数据稳定,不同厂家生产的样品之间没食子酸和 HSSA 差异较大,分析原因为①不同的用药习惯厂家(诃子去核或不去核);②厂家制备工艺的不同(制丸过程中干燥温度及步骤对红花的影响);③企业所用药材间的差异。十味诃子丸应制定统一的生产工艺和规范。

薄层鉴别和含量测定还采用以下方法实验①采用不同厂家生产的薄层板、色谱柱。②在不同的仪器上测定。结果表明耐用性较好。

[参考文献]

[1] 卫生部药典委员会. 卫生部药品标准. 藏药第一册. [S]. 北京:中华人民共和国卫生部,1995,5,28,106,129,211.

[2] 赵明存. 藏药十味诃子片的质量标准研究[J]. 青海医药杂志,2010,40(8):6.

[3] 梁永欣,卢永昌. 反相高效液相色谱法测定十味诃子散中的没食子酸[J]. 河北农业科学,2008,12(1):169.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:141,156,173.

[5] 李超,韩泳平. 十三味菥冥丸的定性鉴别[J]. 西南民族大学学报:自然科学版,2012,38(6):927.

[6] 谢平,白央,尼玛潘多,等. 藏药材山矾叶的质量标准研究[J]. 中国民族民间医药杂志,2012,21(15):9.

[7] 张幸福. HPLC 测定藏药十四味羚羊角丸中的羟基红花黄色素 A[J]. 华西药学杂志,2009,24(1):86.

[8] 陈卉,陈燕忠,谢清春,等. 舒胸脉冲控释滴丸中阿魏酸和羟基红花黄色素 A 的测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(10):92.

[9] 武晓兰,邵文泉,斯日棍其其格,等. HPLC 测定胡日查六味丸中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(19):143.

[10] 陈壮,李耀华,梁臣艳,等. HPLC 测定地榆配方颗粒中没食子酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(1):106.

[11] 徐佳丽,苏柘瑾,陈龙,等. HPLC 测定地榆鞣质提取物中游离没食子酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(20):84.

[12] 王慧. 羟基红花黄色素 A 提取、精制及稳定性研究[D]. 太原:山西大学,2007.

[13] 赵国巍,王春柳,廖正根,等. 超微粉碎对七厘散中羟基红花黄色素 A 的稳定性影响研究[J]. 中成药,2013,35(7):1427.

[14] 王慧,张立伟,晋民杰,等. 羟基红花黄色素 A 稳定性研究[J]. 太原科技大学学报,2010,31(1):81.

[责任编辑 顾雪竹]