

当归补血浸膏的定性定量分析

徐宇¹, 方鲁延², 黄 勋² (1. 四川大学药学院, 四川 成都 610041; 2. 四川大学分析测试中心, 四川 成都 610041)

摘要:目的 快速简便的鉴别当归补血浸膏剂中的当归与党参、甘草与芍药。方法 用 HPLC 方法测定制剂中芍药苷和甘草酸的含量。薄层色谱法鉴别 4 味药材。结果 薄层色谱上均鉴别出制剂和各自药材的特征斑点, 而空白对照液无此斑点。高效液相色谱方法的建立, 相关系数分别为芍药苷 $r=0.9999$, 甘草酸 $r=0.9996$, 平均回收率芍药苷 99.54%, RSD 1.11%。甘草酸 98.79%, RSD 0.60%。结论 方法简便, 结果准确。

关键词: 当归补血浸膏制剂; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 鉴别; 含量测定

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2004)02-0121-03

Qualitative and quantitative analysis of Danggui Buxue Jingao

XU Yu¹, FANG Lu yan², HUANG Xun² (1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, 2. Analytical and Testing center of Sichuan University, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To identify Danggui, danshen, gancao and baoshao, and determine the contents of paeoniloric acid and glycyrrhizic acid in Danggui buxue jingao. **METHOD** TLC and HPLC method were applied to identification and quantitative analysis, respectively. **RESULTS** The characteristic dots of four medicinal materials were found on TLC chromatogram of sample, however they were not shown in negative sample. The regression coefficient for determination of paeoniloric acid and glycyrrhizic acid by HPLC were 0.9999 and 0.9996, and the average recovery were 99.54% (RSD=1.11%) and 98.79% (RSD=0.60%), respectively. **CONCLUSION** The methods developed are simple and accurate.

KEY WORDS: Danggui Buxue Jingao; TLC; HPLC; simultaneous identification; content

当归补血浸膏具有气血双补之功效, 主治气血两虚、面色苍白、心悸、易疲劳等症。是补血中成药之一。在同类制剂的鉴别试验中, 常采用每味药材分别地进行鉴别确认[中国药典[S]. 一部. 2000, 65, 78]。对该制剂的薄层色谱采用 2 种色谱条件, 即可鉴别当归与党参、甘草与芍药 4 味药材。用高效液相色谱法对该制剂中指标成分芍药苷与甘草酸进行含量测定和方法建立。

1 仪器及材料

1.1 仪器

LC-9A 高效液相色谱仪; SPD-6AV 紫外可见检测器; SIL-6B 自动进样器; C-R4A 数据处理机(日本岛津); Drummond 固定式点样器(美国); BUCHI 旋转薄膜蒸发器(瑞士); SB3200 超声波仪。

1.2 材料

硅胶 G 板(青岛 10cm × 20cm, 0.25 μm); 甘草酸、芍药苷对照品(日本和光纯药工业株式会社含量 99.0% 以上); 甲醇、乙晴(色谱纯); 对照药材当归、党参、白芍、甘草经四川大

学华西药学院生药教研室王天志教授鉴定; 制剂样品由四川大学华西药学院提供; 其它试剂均为分析纯。

2 定性鉴别

2.1 对照药材提取物与阴性药材提取物的制备

分别取经粉碎的党参、白芍、甘草、当归一定量, 加入 60% 的乙醇 10 倍, 冷浸 24h 后, 再按 30 mL/min 的速度进行渗滤, 收集渗滤液, 回收乙醇液, 滤液浓缩, 喷雾干燥或冷冻干燥得党参、白芍、甘草、当归的对照药材提取物及各自缺味药材的阴性对照药材提取物。

2.2 鉴别样品的制备

取本品制剂 8g, 党参、白芍、甘草对照药材提取物粉末 0.05g, 当归对照药材提取物粉末 0.02g 以及缺党参、甘草阴性对照药材提取物 0.7g, 缺白芍阴性对照药材提取物 0.6g, 缺当归阴性对照药材提取物 0.3g, 分别加入 20 mL 水, 混匀后, 再加入醋酸乙酯 30 mL, 超声波提取 30 min, 离心 10 min, 分取上层液旋转薄膜蒸发器减压浓缩至干, 残留物加 1 mL 无水乙醇溶解, 即得样品供试液, 党参、白芍、甘草、当归对照药材试

作者简介: 徐宇(48 岁), 女, 本科, 现从事新药研究与开发工作。

液以及缺党参、白芍、甘草、当归阴性对照药材试液。

取甘草酸和芍药苷对照品溶液,分别加乙醇制成每1 mL含1 mg的对照品溶液。

2.3 鉴别

取样品供试液和白芍、甘草对照药材试液以及缺白芍、甘草阴性对照药材试液,芍药苷、甘草酸对照品溶液各10 μ L,点样于硅胶G板,用醋酸乙酯-甲醇-水-冰醋酸(7:2:1:2滴)混合液为展开剂,预饱和10 min,展距12 cm,风干后用5%香草醛乙醇液-10%硫酸乙醇液(1:1)混合试液喷雾显色,105 $^{\circ}$ C加热数分钟至斑点清晰。供试品色谱与白芍对照药材和芍药苷对照品相应的R_f值位置0.55有一致的紫色鉴别斑点,而对应的缺白芍阴性对照药材R_f值位置无相同的紫色鉴别斑点,以此鉴别白芍。供试品色谱与甘草对照药材和甘草酸对照品相应的R_f值位置0.58有一致的黄色鉴别斑点,而对应的缺甘草阴性对照药材R_f值位置无相同的黄色斑点,以此鉴别甘草。见图1。

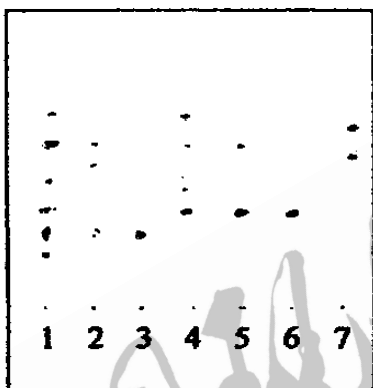


图1 TLC图谱

Fig 1 Chromatogram of TLC

1. 当归补血浸膏;2. 白芍对照药材;3. 芍药苷对照品;4. 缺白芍阴性对照样品;5. 甘草对照药材;6. 甘草酸对照品;7. 缺甘草阴性对照样品

1. dangui buxue jingtiao;2. baishao;3. paeonilorin;4. negative sample(without baishao);5. gancao;6. glycyrrhizic acid;7. negative sample(without gancao)

取样品供试液和党参、当归对照药材试液以及缺党参、当归阴性对照药材试液各10 μ L,点样于硅胶G板,用石油醚-醋酸乙酯-冰醋酸(6:4:1)混合液为展开剂,预饱和10 min,展距12 cm,风干后用5%香草醛乙醇液:10%硫酸乙醇液(1:1)喷雾后,105 $^{\circ}$ C加热数分钟至斑点清晰。供试品色谱与党参对照药材对应的R_f值位置0.3有颜色一致的兰色鉴别斑点,而对应的缺党参阴性对照药材R_f值位置无相同兰色斑点,以此鉴别党参。见图2。在紫外灯365 nm下观察,供试品色谱与当归对照药材对应的R_f值位置0.48有颜色一致的的黄绿色荧光鉴别斑点,而对应的缺当归阴性对照药材R_f值位置无相同的黄绿色荧光斑点,以此鉴别当归,见图2。

3 含量测定

3.1 供试品溶液的制备

3.1.1 测定甘草酸含量的供试品溶液的制备 取供试品6g,精密称定,加入稀乙醇,溶解混匀后,定容至50 mL,即得

供试品溶液1。

3.1.2 测定芍药苷含量的供试品溶液的制备 取供试品2g,精密称定,加入稀乙醇,溶解混匀后,定容至50 mL,即得供试品溶液2。

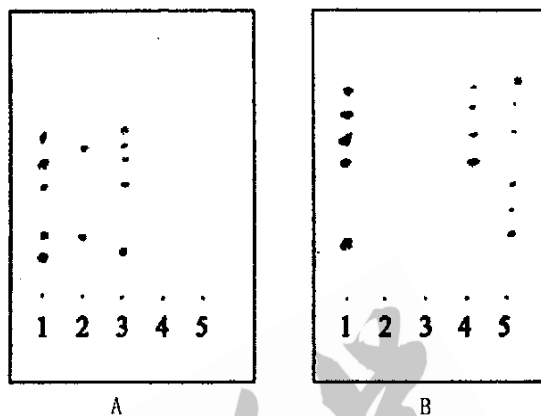


图2 A. TLC图谱(日光);B. TLC图谱(UV365 nm)

Fig 2 A. Chromatogram of TLC(daylight) B. Chromatogram of TLC (UV365 nm)

1 当归补血浸膏;2. 党参对照药材;3. 缺党参阴性对照样品;4. 当归对照药材;5. 缺当归阴性对照样品

1. dangui buxue jingtiao;2. dangshen;3. negative(without dangshen);4. danggui;5. negative sample(without danggui)

3.2 对照品溶液的制备

分别取经干燥至恒重的甘草酸50 mg,芍药苷21 mg,精密称定,用稀乙醇溶解定容至100 mL(储备液),再分别准确量取10.0 mL至100 mL量瓶中,用稀乙醇溶解定容,即得甘草酸对照品溶液和芍药苷对照品溶液。

3.3 色谱条件

色谱柱 Shimpack CLC ODS(6.0 mm \times 150 mm, 0.5 μ m);流动相:甘草酸测定采用四甲基氢化氮溶液(10-300)-甲醇(36:64),磷酸调pH=6.00;芍药苷测定采用乙腈-0.1%磷酸溶液(15:85);UV检测波长:甘草酸为254 nm,芍药苷为230 nm,柱温:甘草酸测定40 $^{\circ}$ C,芍药苷测定室温。

3.4 专属性试验

分别取定性鉴别用的缺甘草阴性对照药材、甘草酸对照品、当归补血浸膏制剂以及缺芍药阴性对照药材,芍药苷对照品,当归补血浸膏制剂,按3.1方法制备样品,按上述色谱条件进样分析,结果表明,甘草酸和芍药苷各自的保留时间内无干扰峰出现。见图3,图4。

3.5 线性关系考察

准确量取“3.2”甘草酸储备液(0.5 mg/mL) 1.0,3.0,5.0,7.0,10.0 mL分别置10 mL量瓶中,加稀乙醇稀释至刻度,摇匀,在上述色谱条件下分别进样分析。结果表明:在0.05~0.45 mg/mL的甘草酸浓度范围内峰面积与浓度呈良好的线性关系,回归方程:Y=4502+340752x, r=0.9996

准确量取“3.2”芍药苷储备液(0.21 mg/mL) 1.0,3.0,5.0,7.0,10.0 mL分置10 mL量瓶中,加稀乙醇稀释至刻度,摇匀,在上述色谱条件下分别进样分析。结果表明:在0.021~

0.21 mg/mL 的芍药苷浓度范围内峰面积与浓度呈良好的线性关系,回归方程: $Y=1\ 781.5+607\ 900x$, $r=0.999\ 9$

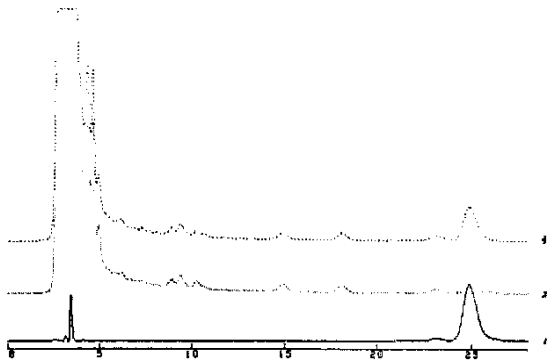


图3 甘草酸测定的 HPLC 图谱

Fig 3 HPLC Chromatogram for determination of glycyrrhizic acid
1. 甘草酸对照品; 2. 缺甘草阴性对照样品; 3. 当归补血浸膏
1. glycyrrhizic acid; 2. negative sample (without gancao); 3. dangui buxue jingao

对照品	加入量 (mg)	实测量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
甘草酸	1.598	1.582	99.00	98.79	0.60
	1.598	1.570	98.25		
	1.598	1.569	98.07		
	1.598	1.592	99.62		
	1.598	1.580	98.87		
芍药苷	1.005	0.998	99.30	99.54	1.11
	1.005	0.991	98.61		
	1.005	1.013	100.80		
	1.005	0.989	98.41		
	1.005	1.011	100.60		

3.8 重复性试验

准确量取甘草酸对照品溶液 ($0.05\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ $10\ \mu\text{L}$, 连续进样 6 次, RSD 为 0.94%, 准确量取芍药苷对照品溶液 (0.021 mg/mL) $10\ \mu\text{L}$, 连续进样 5 次, RSD 为 0.80%。

3.9 样品测定

分别取 3 批供试品溶液 1 和供试品溶液 2 按上述甘草酸和芍药苷色谱条件分别进样 $10\ \mu\text{L}$ 测定, 用甘草酸或芍药苷的峰面积计算该制剂中指标成分的含量, 结果见表 2。

表 2 当归补血浸膏中甘草酸与芍药苷的测定结果

Tab 2 The contents of paeoniloricin and glycyrrhizic in dangui buxue jingao

指标成分	批号	含量 (mg/g)	平均含量 (mg/g)	RSD (%)
甘草酸	20001	0.216	0.215	0.97
		0.213		
		0.217		
	20002	0.193	0.193	0.10
		0.191		
		0.195		
20003	0.237	0.234	1.54	
	0.235			
	0.230			
芍药苷	20001	0.911	0.904	1.22
		0.909		
		0.891		
	20002	0.810	0.807	0.68
		0.801		
		0.811		
	20003	0.888	0.880	1.31
		0.869		
		0.890		

4 讨论

4.1 在薄层色谱鉴别中的药材对照液和阴性(空白)对照液, 均由药材的单味浸膏粉和阴性浸膏粉制得, 与制剂的生产工艺相一致。保证了色谱鉴别方法的统一性, 平行性。

4.2 鉴别方法中的对照品提取物和阴性对照品的取样量是根据各自的提取收率和处方中的比例计算而得。

4.3 在鉴别中, 党参和当归未找到理想的标准对照品, 所以采用单味药材提取物作为斑点的对照。

收稿日期: 2003-03-10

图4 芍药苷测定的 HPLC 图谱

Fig 4 HPLC Chromatogram for determination of paeoniloricin
1. 芍药苷对照品; 2. 缺芍药阴性对照样品; 3. 当归补血浸膏剂
1. paeoniloricin; 2. negative sample (without baishao); 3. dangui buxue jingao

3.6 稳定性试验

分别准确量取同一批供试品溶液 $10\ \mu\text{L}$ 按上述色谱条件, 进样分析, 每隔 1h 测定 1 次, 共测定 5 次, 甘草酸和芍药苷含量的 RSD 分别为 1.12% 及 1.10%。每天测定 1 次, 连续测定 3d, 日间甘草酸和芍药苷含量的 RSD 2.01% 及 2.32%。

3.7 回收率试验

分别精密称取制剂处方中缺甘草阴性对照药材提取物 1g, 缺芍药阴性对照品提取物 0.1g, 各 5 份, 准确加入甘草酸对照品溶液和芍药苷对照品溶液一定量, 按“3.1.1”和“3.1.2”供试品溶液的制备方法同样操作, 分别准确量取回收率试验用供试液和甘草酸、芍药苷对照品溶液各 $10\ \mu\text{L}$, 按各自的色谱条件进行测定, 结果见表 1。

表 1 回收率试验结果

Tab 1 The result of recovery test