

人参再造丸及大活络丹中有关成分的含量测定

王强 张勇 仲浪红¹

(中国药科大学药学教研室, 南京 210009; ¹ 苏州雷允上制药厂, 苏州 215003)

摘要 人参再造丸和大活络丹是大组方的复方中药制剂, 人参再造丸由 56 味中药组成, 大活络丹由 50 味中药组成。本文对两种中成药中的有关成分进行了含量测定研究, 采用高效薄层-扫描法测定了成药中所含的大黄蒽醌类成分(大黄酚、大黄素、大黄酸)和小檗碱; 用程序升温毛细管气相色谱法测定其中所含的 α -和 β -细辛醚。

关键词 含量测定; 人参再造丸; 大活络丹; 高效薄层-扫描法; 程序升温毛细管气相色谱法

目前用于中药复方制剂分析的方法较多, 但对组分较多的中成药的定量分析尚存在一定难度, 故尚少见报道。我们选用了大组方的中成药人参再造丸和大活络丹进行研究, 其中人参再造丸由 56 味中药材组成, 大活络丹则含有 50 味中药。这两种中成药都具有活血祛风, 舒筋活络作用, 是中医治疗偏瘫、中风的优良传统成药。我们采用高效薄层板分离, 再用双波长薄层扫描仪测定成药内大黄中的蒽醌类成分(大黄酚、大黄素和大黄酸)、黄连中的小檗碱; 采用毛细管气相色谱及程序升温方法测定石菖蒲油的 α -和 β -细辛醚。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

1.1.1 样品 人参再造丸(苏州雷允上制药厂, 批号为 900806, 900808, 920504), 大活络丹(苏州雷允上制药厂, 批号为 910916, 930423, 930517)。大黄、黄连标准药材取自中国药科大学标本室, 石菖蒲油系取标准药材自行用挥发油提取器提得。

1.1.2 药品 标准品大黄酚(chrysophanol)、大黄素(emodin)购自中国药品生物制品检定

所, 其中大黄素由苏州市药品检验所黄洁敏主任提供; 大黄酸(rhein)购自美国 Aldrich Chem. Co.; 盐酸小檗碱购自第二军医大学附属药厂; β -细辛醚(β -asarone)由北京中医药大学杨春澍教授提供; α -细辛醚(α -asarone)由我校药物分析研究室李世壮、张亮先生提供粗品, 自行精制, 经气相色谱检查为单峰。高效硅胶 GF₂₅₄ 预制板(10 cm×10 cm)、高效硅胶 G 预制板(10 cm×10 cm)均购自青岛海洋化工厂。试剂均为分析纯。

1.1.3 仪器 日本岛津 CS-910、CS-9000 型双波长薄层扫描仪, C-E1B 计算机; 岛津 GC-14A 气相色谱仪, C-R5A 记录仪。

1.2 实验方法

1.2.1 样品液的制备

测定蒽醌类成分样品液的制备 精密称取经 50℃ 干燥至恒重、过 46 目筛的人参再造丸及大活络丹粉末各 3 g, 均加入 10% 硫酸水溶液 25 ml 和氯仿 20 ml, 置水浴上回流水解 3 h, 水解物过滤, 再用氯仿洗涤药渣至滤液无色。滤液转移至分液漏斗中, 待分层后, 分取氯仿层, 再以氯仿萃取酸水液二次(25 ml×2), 合并氯仿萃取液, 用蒸馏水洗涤氯仿萃取液至中性, 继用无水硫酸钠脱水, 回

收稿日期 1995-09-21

收氯仿,残留物以甲醇定容至 2 ml。另精密称取大黄药材粉末 0.2 g,同法制备,甲醇定容至 2 ml。

测定小檗碱样品液的制备 对于样品进行了三种提取方法的比较。a. 冷浸 36 h,超声波提取 30 min,提取溶剂为甲醇; b. 热回流提取,先用石油醚提取 2 h,再用甲醇提取 4 h; c. 索氏提取器提取,先用石油醚脱脂至无色,继用甲醇提取至无色。对各方法进行含量测定比较,如以 c 法提取所得含量作为 100%,则 a 法和 b 法所得含量分别为 76.3% 和 62.2%,故采用 c 法。精密称取经 50℃干燥至恒重、过 46 目筛的人参再造丸和大活络丹粉末各 2 g,加入 30 ml 石油醚,用索氏提取器于水浴上回流提取至无色,分取石油醚,样品干燥后继用 30 ml 甲醇提取至无色,回收甲醇,残留物用甲醇定容至 5 ml。另精密称取黄连药材粉末 0.2 g,同法制备,甲醇定容量至 2 ml。

测定细辛醚样品液的制备 精密称取人参再造丸及大活络丹各 2.5 g,用适量石英砂分散拌匀,加石油醚(60℃~90℃)冷浸 24 h,超声波振荡提取 30 min,过滤并用石油醚定容成 10 ml。另取石菖蒲油 0.2 ml,加石油醚,定容成 5 ml。

1.2.2 薄层色谱分析条件的选择

测定波长及扫描条件 参考有关文献^[1~4],并经多次实验比较,确定下列测定波长:大黄酚 λ_s 420 nm、 λ_R 700 nm、大黄素 λ_s 430 nm、 λ_R 700 nm、大黄酸 λ_s 425 nm、 λ_R 700 nm,小檗碱 λ_s 355 nm、 λ_R 400 nm。采用反射法锯齿型扫描,扫描速度 20 mm/min。

薄层层析条件 蒽醌类含量测定选用高效硅胶 G 板,用前经 110℃活化 30 min,展开剂采用石油醚(30℃~60℃)-甲酸乙酯-甲酸-水(15:5:1:1,上层液),在此条件下,中成药中的大黄酚、大黄素、大黄酸得到较好分离,并与薄层板上随行点样的标准品和大黄标准药材中的相同成分 R_f 值一致。

小檗碱含量测定选用高效硅胶 GF₂₅₄ 板,使用前不活化,展开剂采用乙酸乙酯-氯仿-甲醇-二乙胺-氨水(8:2:2:0.5:1),在此条件下中成药中的小檗碱与随行点样的标准品和黄连标准药材中小檗碱 R_f 值相同,与其它组分得到较好的分离。

1.2.3 气相色谱分析条件的选择

参考有关文献^[5~7],并经摸索,选用以下分析条件:色谱柱 OV-17 石英毛细管柱(25 m×0.33 mm);N₂ 1.2 kg/cm²,空气 0.5 kg/cm²,H₂ 0.7 kg/cm²;氢火焰离子化检测器;程度升温:140℃ $\xrightarrow{10^\circ\text{C}/\text{min}}$ 170℃(保留 5 min) $\xrightarrow{10^\circ\text{C}/\text{min}}$ 220℃,进样口及离子化室温度均为 250℃。在此条件下,样品中的 β -细辛醚的保留时间为 5.2 min 左右, α -细辛醚为 6.8 min 左右,能达到基线分离,并与标准品及石菖蒲油中相关成分的保留时间相近似。

1.2.4 标准曲线的制备

精密称取大黄酚、大黄素、大黄酸标准品,用甲醇定容制备标准溶液。分别吸取大黄素(0.283 mg/ml)、大黄酚(0.521 mg/ml)、大黄酸(0.192 mg/ml)标准溶液 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 ml 依次点于高效硅胶 G 薄层板上,按上述薄层层析条件展开后扫描测定,得斑点积分面积,据此绘制标准曲线。并计算求得大黄素的回归方程为 $Y=3575.1X+746.2$, $r=0.9997$;大黄酚的回归方程为 $Y=2538.3X+292.4$, $r=0.9992$;大黄酸的回归方程为 $Y=2295.5X+100.6$, $r=0.9991$ 。

精密称取盐酸小檗碱标准品,用甲醇定容成标准溶液(0.245 mg/ml),分别吸取 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 μ l 依次点于高效硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,按上述薄层层析条件展开后扫描,得斑点积分面积,绘制标准曲线,计算得盐酸小檗碱的回归方程为 $Y=2766.7X+124.8$, $r=0.9996$ 。

精密称取 β -及 α -细辛醚标准品,用石油醚(60℃~90℃)定容成标准溶液。分别吸取

β -细辛醚标准溶液(1.102 mg/ml) 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 μ l, 吸取 α -细辛醚标准溶液(0.940 mg/ml) 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 μ l, 按上述气相色谱条件进样分析, 得峰面积, 绘制标准曲线并计算回归方程。 β -细辛醚的回归方程为 $Y = 1119.8X + 406.2$, $r = 0.9948$; α -细辛醚的回归方程为 $Y = 900.6X + 220.1$, $r = 0.9986$ 。

1.2.5 稳定性及精密度实验

稳定性实验是取大黄蒽醌和小檗碱标准品一定量, 分别点于薄层板上, 展层后得各自积分面积, 以后每隔 30 min 测定一次, 结果显示大黄酸在 180 min 内积分值稳定, 大黄酚、大黄素稳定时间为 90 min, 小檗碱在 240 min 内积分值保持稳定。

精密度实验是由同一薄层板上点同一标准溶液, 同样点样量各 6 份, 按实验条件展层, 结果大黄酚 $RSD = 2.14\%$, 大黄素 $RSD = 2.79\%$, 大黄酸 $RSD = 3.02\%$, 小檗碱 $RSD = 1.84\%$, 表明精密度较好。另将同一展层后的斑点, 连续 6 次扫描测定, 结果大黄酚 $RSD = 1.37\%$, 大黄素 $RSD = 1.17\%$, 大黄酸 $RSD = 1.42\%$, 小檗碱 $RSD = 0.87\%$, 说明重现性好。

气相色谱法的精密度实验是分别吸取 α -及 β -细辛醚标准溶液 2 ml 进样分析计算, 结果得 α -细辛醚的 $RSD = 2.89\%$ ($n = 6$), β -细辛醚的 $RSD = 2.72\%$ ($n = 6$)。

1.2.6 样品测定

精密称取每个批号人参再造丸和大活络丹各 3 份, 按样品液制备项下方法制备样品液。取样品液一定量, 用微量注射器点于高效薄层板上, 同板点对照用标准品溶液, 按薄层层析条件展层, 扫描测定, 并采用最小二乘法计算样品中待测组分的含量, 结果见表 1。

用微量注射器吸取样品液一定量, 按气相色谱条件进行分析, 根据所测得组分的峰面积, 用标准曲线法计算含量, 结果见表 2。

Tab 1. Determination of anthraquinone and berberine by HPLC-scanning ($n = 3$)

Product No.	Chrysophanol, %	Emodin, %	Rhein, %	Berberine, %
Rensengzaizao Wan				
900806	0.021	0.088	0.020	0.369
900808	0.024	0.083	0.019	0.331
920504	0.023	0.090	0.024	0.319
Dahuoluo Dan				
910916	0.017	0.080	0.027	0.722
930423	0.019	0.091	0.038	0.652
930517	0.020	0.094	0.031	0.604

Tab 2. Determination of asarone by GC ($n = 3$)

Product No.	α -Asarone, %	β -Asarone, %
Rensengzaizao Wan		
900806	0.015	0.202
900808	0.018	0.222
920504	0.016	0.235
Dahuoluo Dan		
910916	0.015	0.212
90423	0.021	0.275
930517	0.022	0.311

1.2.7 回收率测定

取人参再造丸粉末 2 g, 准确加入一定量的盐酸小檗碱标准品, 按样品分析方法测定, 计算结果, 结果为 3 份样品测定的平均值, 成药中小檗碱的回收率为 95.03%, $RSD = 3.07\%$ 。

取人参再造丸和大黄蒽醌标准溶液一定量, 采用薄层板上加样回收率试验方法测定, 计算 3 份样品测定的平均值, 成药中大黄素的回收率为 99.75%, $RSD = 1.72\%$; 大黄酚回收率为 96.47%, $RSD = 1.39\%$; 大黄酸回收率为 96.67%, $RSD = 2.07\%$ 。

取人参再造丸 2 g, 准确加入一定量的 β -及 α -细辛醚标准品, 按样品分析方法测定, 计算回收率, 结果为 3 份样品的平均值, 成药中 β -细辛醚的回收率为 96.82%, $RSD = 2.38\%$; α -细辛醚的回收率为 95.68%, $RSD = 2.84\%$ 。

2 讨 论

1) 人参再造丸(再造丸)方源自《清内廷法制丸散膏丹各药配本》, 由 58 味中药组成,

是药典中处方最大的中成药;大活络丹方源自《清西溪外史卫生鸿宝卷一》,多种中药制剂手册中有收载,原方由 52 味中药组成。笔者曾对老方的人参再造丸进行过显微鉴定和少数药物的薄层扫描定性研究^[1]。由于这两种中成药中含有国家禁止使用的动物药和有毒害的矿物药,不仅影响出口,并可能被停止使用。雷允上制药厂以中医理论为依据,对这两种中成药进行了处方修改,用狗骨代替虎骨、蜈蚣代全蝎、千年健代麝香、丁香代母丁香、乌蛇代蕲蛇、石菖蒲油代豆蔻、天麻,并删去了朱砂。经临床应用表明疗效类同于原方。我们认为进行新方的分析研究更有其现实意义,此次报道了其中所含大黄蒽醌、小檗碱、细辛醚的分析测定结果,其它组分的研究情况随后将加以报道。

2) 在薄层扫描法测定时,层析条件的选择决定了成药中组分的分离效果。我们比较了多种展开系统,这两组组分的分离均在两个以上溶剂系统中得到验证。报道采用酸性展开系统分离蒽醌类成分,用碱性系统分离小檗碱,其分离效果使佳。采用高效预制板进行分离,效果明显优于普通硅胶板,对于蒽醌类脂溶性成分的分离薄层板应活化后使用,而层析小檗碱这类水溶性成分还是以不活化

者为优。在进行蒽醌类成分的回收率测定时,由于标准品量所限,故采用板上加样方法测定回收率。

3) 气相气谱法测定采用毛细管色谱柱,并应用程序升温方法进行。先于低温逐步升温,分离低沸点相分,随后在 170℃ 停留一段时间使得待测组分分离出,最后升温到高温,分离出其它高沸点物质,这样既缩短了分离时间,又使待测组分在较恒定的温度下分离,基线较平稳,测定中发现石菖蒲油中 α -细辛醚含量的明显低于 β -细辛醚,约为后者的 1/10 到 1/15,成药中亦是如此,这和以往有关的研究报道^[8~9]相一致。

参考文献

- 1 王 强,徐国钧,金蓉鸾等. 中成药再造丸类的鉴定研究. 南京药学院学报,1982,(2):65
- 2 方忻平,王天志,张 浩等. 国产黄连 5 种生物碱的含量测定. 中国中药杂志,1989,14(2):34
- 3 周 晶,房志坤,李崇芳等. 薄层扫描法测定中成药中的大黄素. 中成药研究,1987,18(10):31
- 4 袁雪海,林翠类,崔维利等. 人参再造丸中五种药材的 TLC 鉴定. 中草药,1992,23(9):500
- 5 南京药学院中麻研究组. 石菖蒲挥发油的初步研究(第二版). 中草药通讯,1987,(7):289
- 6 徐俊平,杨健余. 石菖蒲属植物中细辛醚含量的初步测定. 中草药通讯,1979,(7):299
- 7 赵同芳,王宪楷. 成都产石菖蒲轻油和重油两种挥发油成分的研究. 华西药杂志,1987,2(3):129

Determination of the Relevant Consituents in Rensenzaizao Wan and Dahuoluo Dan

Wang Qiang, Zhang Yong, Zhong Langhong¹

Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ¹Suzhou Leigunshang Pharmaceutical Factory, Suzhou 215003

Abstract Rensenzaizao Wan and Dahuoluo Dan are compound Chinese patent medicines. Rensenzaizao Wan consists of 56 kinds of traditional Chinese drugs, and Dahuoluo Dan 50 kinds. The quantitative determination of the relevant constituents in the two preparations was studied. Chrysophanol, emodin, rhein and berberine were analysed by HPTLC-scanning; while α -asarone and β -asarone were determined by capillary PTGC.

Key words Determination; Rensenzaizao Wan; Dahuoluo Dan; HPTLC-scanning; Capillary PTGC