

论 著

· 实验研究 ·

藏药十五味萝蒂明目片的质量标准提高^{*}郭静 刘红 张学花 邢会香 曹得辉 石慧慧^{**}

(青海普兰特药业有限公司, 青海 西宁 810007)

摘要:目的 提高十五味萝蒂明目片质量标准。方法 采用高效液相色谱法测定处方中甘草有效成分甘草酸的含量;采用重金属检查法与二乙基二硫代氨基甲酸银比色法对其含有的金属杂质、砷盐进行检查。结果 含量测定甘草酸在0.0164~0.205 mg·mL⁻¹范围内呈良好的线性关系, $r=0.9999$,精密度、稳定性、重复性试验的RSD均<2.2%;平均回收率为99.9%,RSD为1.7%;重金属、砷盐检查方法操作性强,实验重复性好。结论 所建方法操作简便,专属性强,重现性良好,结果准确,可为十五味萝蒂明目片的质量标准提高提供科学参考。

关键词:十五味萝蒂明目片;甘草酸;重金属;砷盐;质量标准

中图分类号:R283

文献标识码:A

文章编号:2096-1340(2022)04-0082-05

DOI:10.13424/j.cnki.jsctcm.2022.04.018

十五味萝蒂明目片是传统藏药复方制剂,由萝蒂、寒水石(奶制)、藏茴香、石灰华、甘草、红花、渣驯膏、丁香、金钱白花蛇、绿绒蒿、铁屑、诃子、余甘子(去核)、代赭石、毛诃子组成^[1]。原标准^[1]含量检测指标单一,只检测了萝蒂(阿魏酸)含量。已有相关文献报道以甘草酸、甘草苷作为指标性成分进行含量测定^[2-3],在查看大量处方相关含量检测文献^[4-12]并经实验分析后,采用HPLC法测定甘草中甘草酸含量;矿物药中存在重金属与砷较多,该处方中含多味矿物药材(代赭石主含三氧化二铁,铁屑主含铁,石灰华主含碳酸钙^[13],寒水石主含硫酸盐^[14])。由于重金属及砷含量严重影响药品质量,结合前期相关文献报道^[16-18]及2020年版《中国药典》含类似矿物品种重金属、砷盐检查方法分析^[19-22],制定出该制剂中重金属、砷盐检查方法,为有效控制该制剂的质量提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器 ACQUITY Arc 高效液相色谱仪(沃特世科技有限公司)、LC-15C 高效液相色谱仪(岛津

有限公司);ML204T/02 万分之一电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);C3860 超声波清洗仪(深圳市洁盟清洗设备有限公司有限公司);SX-4-10 箱式电阻炉(天津泰斯态仪器有限公司);HH-S11.4 电热恒温水浴锅(江苏金怡仪器有限公司);ACE Excel 5 C₁₈ 色谱柱(广州菲罗门科学仪器有限公司);万用电炉。

1.2 药材与试剂 砷标准溶液、铅标准溶液(国家有色金属及电子材料分析测试中心,批号分别为:GSB-04-1714-2004、GSB-04-1742-2004);甘草酸铵对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110731-201720,纯度:97.7%),甲醇、乙腈均为进口色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为屈臣氏蒸馏水;十五味萝蒂明目片、缺甘草阴性均由青海普兰特药业有限公司生产。

2 方法与结果

2.1 重金属检查

2.1.1 对照溶液的制备 称取硝酸铅0.1599 g,置1000 mL量瓶中,加硝酸5 mL与水50 mL溶解

* 基金项目:西宁市科技计划项目(2020-Y-20)

** 通讯作者:石慧慧,研究生。E-mail:768126795@qq.com

后,用水稀释至刻度,摇匀,作为贮备溶液。临用前,精密量取贮备液 10 mL,置 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得标准铅溶液(每 1 mL 相当于 10 μg 的 Pb)。取一支 25 mL 纳氏比色管,加标准铅溶液 3 mL 与醋酸盐缓冲溶液(pH3.5)2 mL 后加水稀释成 25 mL,记作甲管。

2.1.2 供试品溶液的制备 取本品 1 g,精密称定,置铂坩埚中,缓缓炽灼至完全炭化,放冷,加硫酸 1 mL 使湿润,加热至硫酸蒸汽除尽后,加硝酸 0.5 mL,蒸干,至氧化氮蒸汽除尽后,在 500 ~ 600 $^{\circ}\text{C}$ 炽灼使完全灰化,放冷,加 7 mol \cdot L⁻¹ 盐酸溶液 10 mL,搅拌 5 min,滤过,滤渣用 7 mol \cdot L⁻¹ 盐酸溶液洗涤 3 次,每次 5 mL,合并滤液,置分液漏斗中,用乙醚振摇提取 3 次,每次 20 mL 振摇 10 次,弃去乙醚液,酸液置水浴上蒸干,加水 15 mL,滴加氨试液至对酚酞指示液显微红色,再加醋酸盐缓冲溶液(pH3.5)2 mL,微热溶解后,加 20% 盐酸羟胺溶液 2 mL,滤过,滤液置 25 mL 纳氏比色管中,滤渣用水洗涤,合并洗涤液,加水稀释至刻度作为供试品溶液,记作乙管。

2.1.3 检测溶液的制备 分别加入与乙管相同质量的供试品和与甲管相同质量的标准铅溶液,照 2.1.2 法制成测试溶液,记作丙管。

2.1.4 空白对照溶液 照 2.1.2 方法不加样品制成空白对照溶液。

2.1.5 比色结果 将上述三支 25 mL 纳氏比色管及空白对照溶液同置白纸上,自上向下透视,结果显示丙管(D)中显出的颜色深于甲管,故乙管与甲管比较,乙管(C)中显出的颜色浅于甲管(B),即样品中重金属含量少于百万分之三十,见图 1。



A. 空白溶液;B. 对照溶液;C. 供试品溶液;D. 检测溶液

图 1 重金属实验结果图

2.2 砷盐检查

2.2.1 标准砷对照液的制备 精密量取标准砷溶液 2 mL,置 A 瓶中,加盐酸 5 mL 与水 21 mL,再

加碘化钾试液 5 mL 与酸性氯化亚锡试液 5 滴,在室温放置 10 min 后,加锌粒 2 g,立即将导气管 C 与 A 瓶密塞,使生成的砷化氢气体导入 D 管中,并将 A 瓶置 25 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 45 min,取出 D 管,添加三氯甲烷至刻度,混匀,即得。仪器装置,见图 2。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品 0.67 g,精密称定,置铂坩埚中,加氢氧化钙 1.0 g,混匀,加水 2 ~ 4 mL,搅匀,缓缓炽灼至完全炭化,在 500 ~ 600 $^{\circ}\text{C}$ 炽灼使完全灰化,放冷,加水 5 mL,再缓缓加盐酸 4 mL(注意煮沸),搅拌 5 min,滤过,加水 15 mL 洗涤滤渣,合并滤液,再加盐酸 4 mL,照 2.2.1 检查法,自“再加碘化钾试液 5 mL”起,至添加三氯甲烷至刻度,混匀,即得。

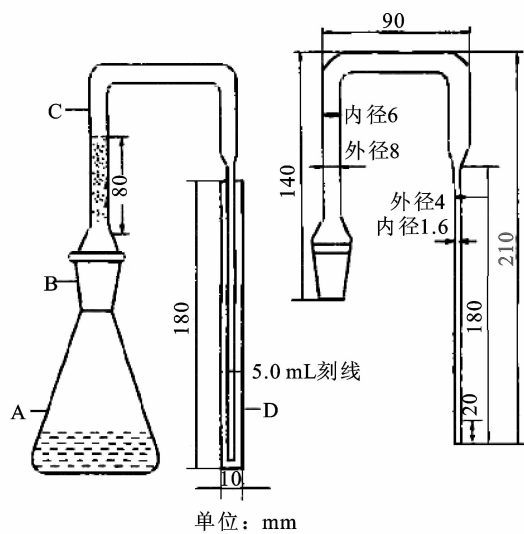
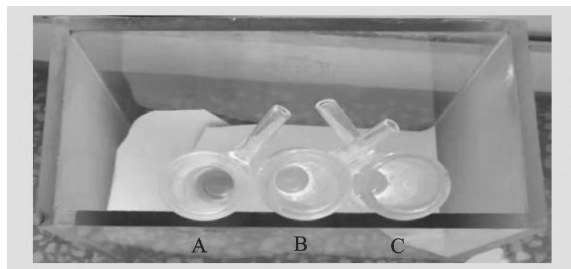


图 2 砷装置图

2.2.3 比色结果 将所得溶液与标准砷对照液同置白色背景上,从 D 管上方向下观察、比较,结果显示供试品溶液的颜色较标准砷对照液的颜色浅,即样品中砷盐含量少于百万分之三,见图 3。



A: 砷对照液;B、C: 供试品溶液

图 3 砷实验结果图

2.3 甘草酸的含量测定

2.3.1 色谱条件^[23] 色谱柱:ACE Excel 5 C18 (250×4.6 mm,5 μm);流速:1.0 mL·min⁻¹;流动相:乙腈-3.3% 冰醋酸溶液(33:67);检测波:252 nm;柱温:28 ℃。理论板数按甘草酸峰计应不低于 5000。

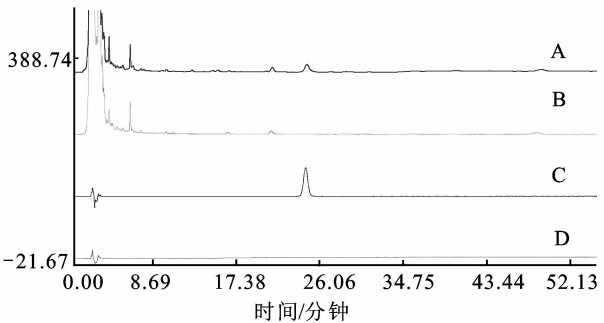
2.3.2 甘草酸对照品溶液的制备 取甘草酸铵对照品适量,精密称定,加 70% 乙醇制成每 1 mL 含 0.2 mg 的溶液,即得。(甘草酸重量 = 甘草酸铵重量/1.0207)。

2.3.3 供试品溶液的制备 取十五味蓼蒂明目片适量,研细,精密称取 1 g,置具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇 25 mL,称定重量,超声处理(功率 480 w,频率 40 kHz)30min,放冷,再称定重量,用稀乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3.4 阴性样品溶液的制备 按十五味蓼蒂明目片处方,除甘草外按比例称取其余药材,根据制备工艺,制成阴性样品,按 2.3.3 项下供试品溶液制备的方法制成阴性对照溶液。

2.3.5 空白溶液的制备 稀乙醇溶液

2.3.6 专属性试验 精密量取甘草酸对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液、空白溶液各 10 μL,按 2.3.1 项下色谱条件进行测定,记录色谱,见图 4。结果显示空白溶液、阴性样品溶液对主色谱峰无干扰,对照品和供试品溶液中主色谱峰保留时间一致。另采用 PDA 检测器对对照品溶液、供试品溶液中的主色谱峰进行峰光谱扫描和纯度检测。结果显示对照品和供试品溶液中主色谱峰纯度角度小于纯度阈值,纯度符合要求,具体数据见表 1,本试验提示该方法专属性良好。



A. 供试品溶液;B. 阴性样品溶液;C. 甘草酸对照品溶液;D. 空白溶液

图 4 专属性考察

表 1 样品和对照品主色谱峰纯度角度和纯度阈值列表

主色谱峰名称	甘草酸铵	
	纯度角度	纯度阈值
对照溶液	0.213	0.737
供试品溶液	2.091	3.241

2.3.7 线性关系考察 精密称取甘草酸铵对照品 21.36 mg,加 70% 乙醇制成 0.209 mg·mL⁻¹ 的对照品贮备溶液。分别精密移取 2、3、5、7 mL 置 25 mL 容量瓶中,加 70% 乙醇稀释至刻度,摇匀得标准系列浓度的测试溶液。分别精密吸取各系列浓度的对照品溶液 10 μL 按 2.3.1 项下色谱条件进行测定,记录色谱。以质量浓度(X ,mg·mL⁻¹)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性拟合,得回归方程 $Y=9E+06X-225.22$ ($r=0.9999$)。结果表明,甘草酸在 0.0164~0.205 mg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好。

2.3.8 重复性试验 由实验员(甲)照 2.3.3 方法平行制备 6 份供试品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件进行测定,记录色谱。结果十五味蓼蒂明目片甘草酸含量的 RSD 为 1.5%,在样品中待测成分含量为 0.1% 时 RSD<3(%),提示该方法重复性良好。

2.3.9 中间精密度试验 由另外一名实验员(乙)照 2.3.3 方法平行制备 6 份供试品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件用另一台(HPLC-15C)高液相色谱仪进行测定,记录色谱。结果甲乙两名实验员在不同仪器、不同日期、不同色谱柱、不同厂家试剂上测得甘草酸含量的 RSD 为 2.2%,提示该方法中间精密度良好,具体数据见表 2。

表 2 中间精密度试验结果($n=9$)

样品	含量(mg·g ⁻¹)	RSD(%)
甲-1	1.45	2.20
甲-2	1.48	
甲-4	1.48	
甲-5	1.48	
甲-6	1.52	
乙-1	1.43	
乙-2	1.43	1.47
乙-3	1.45	
乙-4	1.48	
乙-5	1.47	
乙-6	1.47	

2.3.10 加样回收率试验 精密称取已知含量的十五味萝藦明目片样品(批号 190510),研细,平行 9 份样品,分为 3 组,分别加入 3 个质量分数水平(50%、100% 和 150%)的甘草酸铵对照品。按

“2.3.3”项下方法制备回收供试品溶液,按“2.3.1”项下方法进样测定,并计算甘草酸的加样回收率,提示该方法的准确度较好,结果见表 3。

表 3 回收率试验结果($n=9$)

编号	样品中的量(mg)	对照品加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均值(%)	RSD(%)	备注
1	0.4900	1	1.48	99.0			0.5:1
2	0.5340		1.53	99.6			
3	0.4899		1.48	99.0			
4	0.7410	0.8	1.54	99.9	99.9	1.70%	1:1
5	0.7413		1.52	97.3			
6	0.7416		1.53	98.6			
7	0.8920	0.6	1.50	101.3			1.5:1
8	0.8917		1.51	103.0			
9	0.9126		1.52	101.2			

2.3.11 稳定性试验 取“2.3.3”项下供试品溶液适量,分别于制备后 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测

定,记录峰面积,计算含量。结果表明供试品在稀乙醇溶液中 24 h 内稳定性良好,具体数据见表 4。

表 4 稳定性试验结果

时间(h)	0	2	4	6	8	12	24	RSD
样品含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	1.41	1.41	1.41	1.41	1.41	1.44	1.43	0.88%

3 讨论

在重金属检查中,由于制剂中矿物药种类较多,应先用强酸进行有机破坏。其次考虑供试品在高铁盐情况下,用乙醚萃取的方式去除铁屑和代赭石的颜色干扰,再用 20% 盐酸羟胺酸性液将 3 价 Fe 还原为 2 价,消除氧化硫化氢产生的白色浑浊。

在砷盐检查中,由于有机物对砷盐可能存在吸附、络合等作用影响检出,在选用氢氧化钙法做有机破坏时,经有机破坏与未经有机破坏的试验进行对比,发现经有机破坏的样品能有效排除铁粉和代赭石颜色干扰。

在甘草酸含量测定中,发现样品流动相 pH 在 2.0 时对色谱柱的选择性较高。ACE 色谱柱较一般 C_{18} 色谱柱分离效果好,耐用性好,故在偏酸环境中推荐选择 ACE 色谱柱。

综上所述,十五味萝藦明目片含量测定、重金属、砷盐检查方法操作简单,重复性、准确度及耐

用性良好,本研究为今后该品种质量标准的提高奠定了良好的基础。

参考文献

[1]黄忠全. 藏药十五味萝藦明目片质量标准的研究[J]. 青海医药杂志,2010,40(7):10-13.
[2]贡布东智. RP-HPLC 法测定十五味萝藦明目丸中甘草苷的含量[J]. 中国药事,2011,25(8):811-812,820.
[3]王红,刘亚蓉. 十五味萝藦明目丸质量标准研究[J]. 青海医学院学报,2011,32(1):64-68.
[4]孙跃宁,王海英,孙楠. HPLC 测定绿绒蒿中槲皮素的含量研究[J]. 中国民族医药杂志,2013,19(7):34-35.
[5]次仁旺姆. 藏药绿绒蒿的质量标准研究[J]. 中国民族民间医药,2016,25(11):1-3.
[6]常炜,刘亚蓉. 青海地区五脉绿绒蒿总黄酮含量测定参数及测定条件设定[J]. 青海医学院学报,2013,34(4):281-288.
[7]刘亚蓉,刘学良,刘海青,等. 藏药五脉绿绒蒿中黄酮类成分的测定[C].《中国药学杂志》岛津杯第十一届全国药物分析优秀论文评选交流会. 中国药学会药物分

- 析专业委员会,2013.
- [8] 陈燕,黄志芳,德吉,等. 全缘绿绒蒿药材质量标准研究[J]. 中国执业药师,2009,6(2):36-38.
- [9] 文喜艳,王兰霞,邵晶,等. 甘肃产藏药绿绒蒿中总黄酮和总生物碱的含量测定[J]. 安徽农业科学,2017,45(29):134-138.
- [10] 舍莉萍,孙菁,周玉碧,等. 四种绿绒蒿属植物中总黄酮含量测定[J]. 天然产物研究与开发,2015,27(3):466-469.
- [11] 陈燕,德吉,黄志芳,等. 藏药全缘绿绒蒿的薄层色谱鉴别与含量测定[J]. 中药材,2009,32(8):1218-1220.
- [12] 刘倩伶,黄志芳,德吉,等. 藏药萝藦的质量标准研究[J]. 中国民族医药杂志,2009,15(3):70-71.
- [13] 四川省食品药品监督管理局. 四川省藏药材标准[M]. 成都:四川科学技术出版社,2014.
- [14] 江佩芬,赵中杰,胡玉清. 藏药石灰华化学成分的研究[J]. 中国医药学报,1988,3(4):31.
- [15] 曹元宇. 寒水石是什么?[J]. 化学通报,1987,50(10):60.
- [16] 聂黎行,钱秀玉,蒋沁悦,等. 中成药中重金属及有害元素残留分析、风险评估和限量制定建议[J]. 药学报,2020,55(11):2695-2701.
- [17] 王展辉,吴艳茹. 氧化铁及含氧化铁药品重金属检查方法的建立[J]. 浙江化工,2016,47(11):48-50.
- [18] 赖宇红. 中药砷盐检查有机破坏中存在的问题[J]. 中国药品标准,2006,7(2):48-51.
- [19] 李雪玉,邢波. 中国药典中砷盐检查项的实验研究[J]. 黑龙江医药,2000,13(2):106.
- [20] 王丽琴. 铁盐对重金属检查的干扰及其排除法[J]. 天津药学,1996,8(2):53-54.
- [21] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2020:1714-1715.
- [22] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 四部. 北京:中国医药科技出版社,2020:771-772.
- [23] 王红,刘亚蓉. 十五味萝藦明目丸质量标准研究[J]. 青海医学院学报,2011,32(1):64-68.

(修回日期:2021-03-26 编辑:崔春利)