

黄芪天麻胶囊的质量标准研究

樊莉^{1*},周世文²(1.第三军医大学第二附属医院药学部,重庆 400037;2.第三军医大学第二附属医院临床药理基地,重庆 400037)

中图分类号 R283.65;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)35-3314-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.35.16

摘要 目的:建立黄芪天麻胶囊的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对黄芪天麻胶囊中的黄芪、人参、天麻、川芎进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定天麻中天麻素的含量;色谱柱为C₁₈(300 mm×3.9 mm,10 μm),流动相为乙腈-水(4:96,V/V),柱温为25℃,检测波长为221 nm,流速为0.8 ml/min。结果:TLC斑点清晰、分离度好,阴性对照无干扰。天麻素的进样量在0.404 8~2.428 8 μg范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD均<2%;平均加样回收率为98.88%,RSD=0.97%($n=9$)。结论:所建标准可用于黄芪天麻胶囊的质量控制。

关键词 黄芪天麻胶囊;质量标准;黄芪;人参;天麻;川芎;天麻素;薄层色谱法;高效液相色谱法

Study on Quality Standard of Huangqi Tianma Capsules

FAN Li¹,ZHOU Shi-wen²(1.Dept. of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400037, China;2.Clinical Pharmacology Base, The Second Affiliated Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of Huangqi tianma capsules. METHODS: Astragali Radix, *Panax ginseng*, *Gastrodia elata* and *Ligusticum chuanxiong* were identified by TLC. The content of gastrodin was determined by HPLC: the determination was performed on C₁₈(300 nm×3.9 mm,5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-water(4:96,V/V) at the flow rate of 0.8 ml/min. The temperature was 25℃ and the detection wavelength was set at 221 nm. RESULTS: TLC spots were clear and well-separated without interference from negative sample. The linear range of gastrodin was 0.404 8-2.428 8 μg($r=0.999\ 9$) with an average recovery of 98.88% (RSD=0.97%, $n=9$). RSDs of precision, stability and reproducibility were all lower than 2%. CONCLUSIONS: The standard is suitable for the quality control of Huangqi tianma capsules.

KEY WORDS Huangqi tianma capsule; Quality standard; Astragali Radix; *Panax ginseng*; *Gastrodia elata*; *Ligusticum chuanxiong*; Gastrodin; TLC; HPLC

醇提取液与25%盐酸溶液进行了4:1、3:1、2:1三种体积比的比较,结果发现甲醇提取液与25%盐酸溶液的体积比为4:1时水解程度最高,故选择甲醇提取液-25%盐酸溶液(4:1,V/V)作为水解酸度。

本试验在样品提取时采用了酸水解法,而酸水解的3个关键条件是水解温度、盐酸体积分数和水解时间。因此,笔者在确定盐酸体积分数为25%的前提下,考察了不同水解温度(70、80、90℃)与不同水解时间(30、60、90 min)的水解效果。结果表明,在水解温度为80℃、水解时间为60 min的条件下将对叶大戟草中的黄酮苷水解完全。

本试验通过紫外扫描,发现槲皮素在254 nm与360 nm波长处均有最大吸收,考虑到山柰素在360 nm波长处也有最大吸收,故选择测定波长为360 nm。在流速的考察过程中,分别选用0.8、1.0、1.2 ml/min作为流速的参考值,结果表明1.0 ml/min的流速可使槲皮素和山柰素的分离度达到最好的效果。另外,本试验还考察了25、30、35℃三个不同柱温对槲皮素和山柰素分离效果的影响,结果发现30℃时被测成分色谱峰的峰形和分离效果最佳,故选择柱温为30℃。

本试验采用HPLC法测定了10批对叶大戟草药材中山柰

酚和槲皮素的含量,结果发现10批样品中山柰酚和槲皮素的含量差异较大,这种差异可能与药材的生长环境、采集时间有关,有待进一步的研究。目前,新疆和田地区为对叶大戟草商品药材的主要供应地点,鉴于长期以来药用对叶大戟草大多为人工栽培品种,故在制定限度时参考了和田地区种植的药材品质。在此条件下,建议药用对叶大戟草的产地固定为新疆和田地区和吉木萨尔周边地区;其他地区若采用人工栽培品种,建议考察产地的生态条件。

参考文献

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会.中国植物志:第34卷第3册[M].北京:科学出版社,1997:121.
- [2] 张维库,张晓琦,叶文才.对叶大戟地上部分的化学成分[J].中国药科大学学报,2007,38(4):315.
- [3] 张维库,杨国恩,李茜,等.对叶大戟化学成分的研究[J].中国中药杂志,2006,31(20):1 694.
- [4] 潘馨,陈森鸿. HPLC法测定土荆芥中槲皮素和山柰素的含量[J].药物分析杂志,2008,28(9):1 500.
- [5] 刘亚蓉. HPLC法同时测定沙棘膏中槲皮素、山柰素、异鼠李素的含量[J].药物分析杂志,2008,28(5):759.
- [6] 邵振中,贾晓斌,辛然,等.白花蛇舌草中黄酮类抗肿瘤活性成分的HPLC分析[J].中国药房,2010,21(15):1 394.

(收稿日期:2012-09-17 修回日期:2013-02-19)

* 主管药师,硕士。研究方向:药剂学。电话:023-68774707。
E-mail: fanli1977411@126.com

黄芪天麻胶囊是以黄芪、天麻、人参、川芎等7味中药提取加工而成的复方制剂,具有益气养阴、平肝息风、活血通络之功效,临床用于防治急性高原病,治疗急性缺氧导致的头痛、胸闷、气短和失眠等。为确保制剂的安全性与有效性,笔者对黄芪天麻胶囊的质量标准进行了研究,以期建立有效的质量控制方法。

1 材料

1.1 仪器

高效液相色谱(HPLC)仪,包括126型多溶剂输送泵、166型紫外检测器、32Karat™型色谱工作站(美国Beckman公司);RE52CS型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);AS3120A型超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司,功率:20 W,频率:40 kHz);BDS1型电热三用水箱(北京市医疗设备厂);BP310S型电子天平(德国Sartorius公司);定量毛细管(美国Drummond公司);硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂)。

1.2 药品与试剂

黄芪天麻胶囊(本院自制,批号:080701、080702、080703);黄芪甲苷、天麻素、人参皂苷R_{g1}、人参皂苷R_{b1}、人参皂苷Re对照品与川芎对照药材(中国食品药品检定研究院,批号分别为110781-200613、110807-200205、110703-200424、110704-200420、110754-200421、120918-200809);D101型大孔吸附树脂(重庆医药股份有限公司科仪化玻分公司);水为重蒸馏水,乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 黄芪的TLC鉴别^[1] 取胶囊内容物10 g,加100 ml甲醇,水浴回流提取2 h,提取液浓缩至干,残渣加水30 ml使溶解,分别用水饱和的正丁醇萃取3次,每次30 ml,合并正丁醇液,用氨试液洗涤3次,每次20 ml,弃去氨液,再用20 ml蒸馏水洗涤正丁醇层。弃去水液,正丁醇层蒸干,残渣用10 ml蒸馏水溶解,过D101型大孔吸附树脂(内径1.5 cm、长12 cm),以50 ml蒸馏水洗脱,弃去水液,再用40%乙醇30 ml洗脱,弃去醇液,继用70%乙醇150 ml洗脱,收集洗脱液,水浴蒸干,残渣用甲醇溶解并定容至2 ml,摇匀,作为供试品溶液。另取阴性样品(缺黄芪药材)10 g,同法制备阴性对照溶液。再取黄芪甲苷对照品,加甲醇制成每1 ml含1 mg的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱(TLC)法^[2]试验,吸取上述3种溶液各5 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2, V/V/V)10℃以下放置过夜的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,于105℃加热至斑点显色清晰,分别置于日光及紫外光灯(365 nm)下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,日光下显示相同的棕褐色斑点,紫外光灯(365 nm)下显示相同的橙黄色荧光斑点;阴性对照无干扰。黄芪的TLC图见图1。

2.1.2 天麻的TLC鉴别^[3] 取胶囊内容物3 g,研细,置于具塞锥形瓶中,加乙醚20 ml,超声处理10 min,挥干乙醚,再加70%乙醇50 ml,超声处理30 min,滤过,蒸干滤液,残渣加甲醇1 ml使之溶解,作为供试品溶液。另取阴性样品(缺天麻药材)3 g,同法制备阴性对照溶液。再取天麻素对照品,加甲醇制成每1 ml含0.5 mg的溶液,作为对照品溶液。照TLC法^[2]试验,吸取上述3种溶液各5 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-甲醇-水(9:1:0.2, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%磷钼酸乙醇溶液,于105℃加热至斑点清晰,日光下

检视。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显增相同颜色的斑点;阴性对照无干扰。天麻的TLC图见图2。

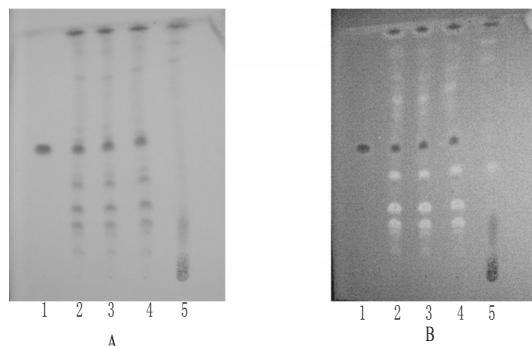


图1 黄芪的TLC图

A.日光下;B.365 nm紫外光灯下;1.黄芪甲苷对照品;2~4供试品;5.阴性对照

Fig 1 TLC of Astragali Radix

A. by sunlight; B. under ultraviolet lamp at 365 nm; 1. astragaloside IV control; 2-4. test samples; 5. negative control

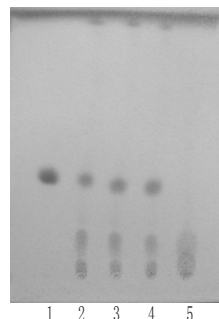


图2 天麻的TLC图

1.天麻素对照品;2~4.供试品;5.阴性对照

Fig 2 TLC of Gastrodia elata

1. gastrodin control; 2-4. test samples; 5. negative control

2.1.3 人参的TLC鉴别^[1] 取胶囊内容物5 g,研细,加蒸馏水3 ml,搅拌湿润,加水饱和的正丁醇20 ml,超声处理30 min,吸取上清液,加入3倍量氨试液,摇匀,放置分层,上层液蒸干,残渣加甲醇1 ml使之溶解,作为供试品溶液。另取阴性样品(缺人参药材)5 g,同法制备阴性对照溶液。再取人参皂苷R_{b1}、人参皂苷Re、人参皂苷R_{g1}对照品,加甲醇制成每1 ml各含2 mg的混合溶液,作为人参皂苷混合对照品溶液。照TLC法^[2]试验,吸取上述3种溶液各5 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10, V/V/V/V)10℃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,于105℃加热至斑点清晰,分别置于日光及紫外光灯(365 nm)下检视。结果,供试品色谱中,在与混合对照品色谱相应的位置上,分别显相同颜色的斑点或荧光斑点;阴性对照无干扰。人参的TLC图见图3。

2.1.4 川芎的TLC鉴别^[4] 取胶囊内容物3 g,加乙醚20 ml,加热回流1 h,滤过,滤液挥干,残渣加乙酸乙酯2 ml使之溶解,作为供试品溶液。另取阴性样品(缺川芎药材)3 g,同法制备阴性对照溶液。再取川芎对照药材1 g,同法制成对照药材溶液。照TLC法^[2]试验,吸取上述3种溶液各5 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以正丁烷-乙酸乙酯(9:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显示相同颜色的荧光

斑点。川芎的TLC图见图4。

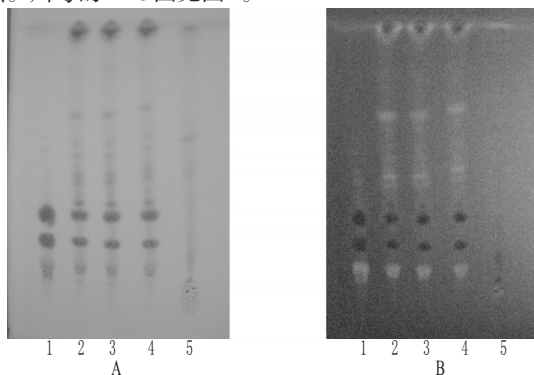


图3 人参的TLC图

A. 日光下; B. 365 nm 紫外光灯下; 1. 人参皂苷混合对照品; 2~4 供试品; 5. 阴性对照

Fig 3 TLC of *Panax ginseng*

A. by sunlight; B. under ultraviolet lamp at 365 nm; 1. ginsenoside mixed control; 2-4. test samples; 5. negative control



图4 川芎的TLC图(365 nm 紫外光灯下)

1. 川芎对照药材; 2~4. 供试品; 5. 阴性对照

Fig 4 TLC of *Ligusticum chuanxiong* (under ultraviolet lamp at 365 nm)

1. Chuanxiong Rhizoma reference substance; 2-4. test samples; 5. negative control

2.2 天麻素的含量测定^[5]

2.2.1 色谱条件 色谱柱: C_{18} (300 mm×3.9 mm, 10 μ m); 流动相: 乙腈-水 (4:96, V/V); 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 检测波长: 221 nm; 流速: 0.8 ml/min; 进样量: 20 μ l。色谱见图5。

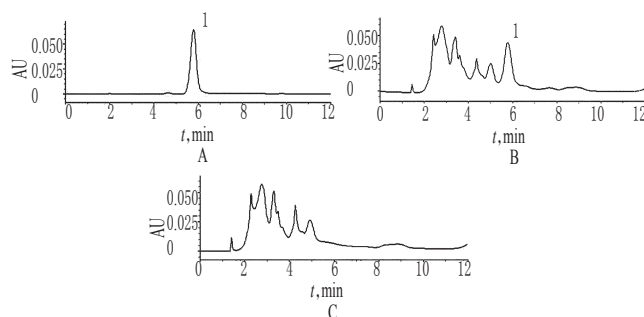


图5 高效液相色谱图

A. 天麻素对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 天麻素

Fig 5 HPLC chromatograms

A. gastrodin control; B. test sample; C. negative control; 1. gastrodin

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥后的天麻素对照品

10.12 mg, 置于 50 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 即得质量浓度为 0.202 4 mg/ml 的天麻素对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取适量胶囊内容物, 研细, 称取 3.0 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 精密加入 50% 乙醇 100 ml, 称定质量, 加热回流提取 2 h, 放冷, 再称定质量, 用 50% 乙醇补足减失的质量, 滤过, 取续滤液 10 ml, 浓缩至干, 残渣加甲醇使之溶解并转移至 10 ml 量瓶中, 补加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取上述对照品溶液 1、2、3、4、5、6 ml, 置于 10 ml 量瓶中, 加甲醇定容, 分别吸取 20 μ l 注入色谱仪中, 按上述色谱条件重复进样测定 3 次, 记录峰面积。以进样量 (x, μ g) 为横坐标, 峰面积积分值 (y) 为纵坐标, 进行线性回归分析, 得回归方程为 $y = 3\,000\,000x + 40\,243$ ($r = 0.999\,9$, $n = 6$)。结果表明, 天麻素的进样量在 0.404 8~2.428 8 μ g 范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 取同一供试品溶液适量, 重复进样 5 次, 按上述色谱条件测定, 记录峰面积。结果, $RSD = 0.89\%$ ($n = 5$), 表明本方法精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取同一批样品适量, 共 6 份, 分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 照上述色谱条件各取 20 μ l 进样测定, 记录峰面积, 计算样品含量。结果, 每 1 g 样品平均含天麻素 2.921 mg, $RSD = 1.24\%$ ($n = 6$), 表明本方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液适量, 分别于放置 0、3、6、9、12 h 进样, 按上述色谱条件测定, 记录峰面积。结果, $RSD = 1.2\%$ ($n = 5$), 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取同一批 (批号: 080703) 已测定天麻素含量 (2.975 mg/g) 的样品适量, 共 9 份, 每 3 份为一组, 分别加入低、中、高剂量对照品, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 照上述色谱条件进样测定, 计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果 ($n = 9$)

Tab 1 Results of recovery tests ($n = 9$)

序号	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	$\bar{x}$, %	RSD, %
1	1.016 1	3.023	1.213	4.215	98.27		
2	0.995 2	2.961	1.213	4.145	97.61		
3	1.000 4	2.976	1.213	4.180	99.26		
4	1.011 1	3.007	3.629	6.615	99.42		
5	1.012 7	3.010	3.629	6.593	98.73	98.88	0.97
6	0.980 3	2.916	3.629	6.450	97.38		
7	1.020 7	3.034	4.832	7.850	99.67		
8	1.036 5	3.084	4.832	7.930	100.29		
9	1.044 1	3.106	4.832	7.905	99.32		

2.2.9 样品含量测定 取 3 批黄芪天麻胶囊各适量, 分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 照上述色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以峰面积计算样品中天麻素的含量。结果, 3 批样品 (批号: 080701、080702、080703) 中每 1 g 分别含天麻素 2.968、2.757、2.975 mg。

3 讨论

采用 HPLC 法测定天麻素含量时, 笔者对流动相系统进行了多次考察筛选。结果表明, 采用乙腈-水 (4:96, V/V) 作为流动相, 能保证色谱图中保留时间较短、基线较平、峰形对称、理论板数高、分离度好、无拖尾现象, 利于提高检测效率。方法学考察结果表明, 本方法简便、可靠、重复性好, 可用于制剂中

神安颗粒中水溶性成分的HPLC指纹图谱研究

易延遂^{1*}, 李跃辉², 蔡光先², 杨永华² (1. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515; 2. 湖南中医药大学超微工程技术中心, 长沙 410006)

中图分类号 R283.627; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)35-3317-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.35.17

摘要 目的: 制定神安颗粒中水溶性成分的指纹图谱, 为神安颗粒“全指纹图谱系”的建立提供依据。方法: 采用高效液相色谱法, 以斯皮诺素为参照物, 色谱柱为 C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-水 (梯度洗脱), 流速为 1.0 ml/min, 柱温为室温, 检测波长为 335 nm, 进样量为 10 μ l, 记录时间为 55 min。以斯皮诺素峰 (S 峰) 的保留时间和峰面积为 1, 计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, 并进行方法学考察; 采用国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A 版)”, 对 10 批样品进行相似度评价。结果: 制定了神安颗粒中水溶性成分的区间指纹图谱, 标注了 6 个共有指纹峰。各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致, $RSD < 2\%$; 10 批样品的相似度均在 0.80 以上。结论: 通过对神安颗粒中水溶性成分指纹图谱的制定, 可为其“全指纹图谱系”的建立提供试验依据, 为提高天然产物质量控制技术进行有意义的探索。

关键词 高效液相色谱法; 全指纹图谱系; 区间指纹图谱; 斯皮诺素; 神安颗粒

Study on HPLC Fingerprint of Water-soluble Constituent of Shen'an Granules

YI Yan-kui¹, LI Yue-hui², CAI Guang-xian², YANG Yong-hua² (1. School of TCM, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Ultra-micro Engineering Center, Hunan University of TCM, Changsha 410006, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish fingerprint of water-soluble components of Shen'an granules, and to provide reference for the establishment of “complete fingerprint system” of Shen'an granules. **METHODS:** HPLC method was adopted using spinosin as reference. C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) column was used with acetonitrile-water as mobile phase (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was room temperature, and detection wavelength was set at 335 nm. The sample size was 10 μ l, and record time was 55 min. The retention time and peak area of spinosin chromatographic peak (S peak) regarded as 1, relative retention time and relative peak area ratios of other peak were calculated and reviewed by methodology; the similarity of 10 batches of samples was evaluated by using “TCM chromatograph fingerprint similarity appreciation system” recommended by Chinese Pharmacopoeia Committee. **RESULTS:** The interval fingerprint of water-soluble constituent of Shen'an granules had been formulated, and 6 common peaks were marked. The relative retention time and relative peak area of each common peak were in substantial agreement ($RSD < 2\%$); 10 batches of samples showed the similarity was all more than 0.80. **CONCLUSIONS:** The formulation of the fingerprint of water-soluble constituent of Shen'an granules provide experiment basis for the construction of “complete fingerprint system”, and carry out significant exploration to improve quality controlling technology of natural products.

KEY WORDS HPLC method; Complete fingerprint system; Interval fingerprint; Spinosin; Shen'an granules

天然产物 (包括中药材、中药制剂、天然食品原料等) 指纹图谱是指某种天然产物中所共有的、具有特异性的某类或数类成分的色谱或光谱的图谱, 其特点在于: 通过指纹图谱的特

异性, 能有效鉴别样品的真伪与产地; 通过指纹图谱主要特征峰的含量或比例的制定, 能有效控制样品的质量, 确保样品质量的相对稳定。在有效成分不完全明确的前提下, 特定天然

天麻素含量的测定。

同时, 对方中黄芪、天麻、人参、川芎药味进行 TLC 定性鉴别, 可得斑点分离好、阴性无干扰, 表明所选方法专属性强。

综上, 所建标准可用于黄芪天麻胶囊的质量控制。

参考文献

[1] 陈英红, 姜瑞芝, 邓伟珍, 等. 参芪片质量标准研究[J]. 中成药, 2008, 30(3): 389.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010; 附录 34.

[3] 梁妍, 郝小燕, 朱洁, 等. 天参益智胶囊的质量标准研究[J]. 中成药, 2008, 30(5): 附 11.

[4] 钟颖. 天麻首乌胶囊的质量控制[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(8): 965.

[5] 王福霞, 康红英. 高效液相色谱法测定天麻胶囊中天麻素的含量[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(6): 1321.

(收稿日期: 2012-09-06 修回日期: 2013-01-08)

* 副教授, 博士。研究方向: 药物新剂型、新技术。电话: 020-61648263。E-mail: dareyyk@sina.com