

复方宁神颗粒的质量标准研究

黄 阳^{1*}, 臧文怡², 毛春芹^{2#}, 陆兔林², 周亚萍²(1.昆山市中医医院, 江苏 昆山 215300; 2.南京中医药大学药学院, 南京 210023)

中图分类号 R917;R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4285-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.35

摘要 目的:建立复方宁神颗粒的质量标准。方法:采用薄层色谱法(TLC)对制剂中当归和白芍进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定制剂中斯皮诺素和毛蕊花糖苷的含量;色谱柱为Kromasil C₁₈,流动相为乙腈-0.1%乙酸溶液(16:84, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为330 nm,柱温为30 ℃。结果:当归和白芍的TLC图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。斯皮诺素和毛蕊花糖苷检测进样量线性范围分别为0.055 44~0.277 2 μg($r=0.999\ 4$)、0.055 98~0.279 9 μg($r=0.999\ 5$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<3.0%;加样回收率分别为95.62%~100.53%(RSD=1.77%, $n=9$)、95.63%~102.57%(RSD=2.74%, $n=9$)。结论:该研究所建标准可用于复方宁神颗粒的质量控制。
关键词 复方宁神颗粒;薄层色谱法;高效液相色谱法;斯皮诺素;毛蕊花糖苷;质量标准

Study on the Quality Standard for Fufang Ningshen Granule

HUANG Yang¹, ZANG Wenyi², MAO Chunqin², LU Tulin², ZHOU Yaping²(1.Traditional Chinese Medicine Hospital of Kunshan, Jiangsu Kunshan 215300, China; 2.College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standards for Fufang ningshen granule. METHODS: TLC was used for the qualitative identification of *Radix angelicae* and *White paenoy*; HPLC was adopted for the contents determination of spinosin and verbascoside: the column was Kromasil C₁₈ with the mobile phase of acetonitrile-0.1% acetic acid (16:84, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 330 nm, column temperature was 30 ℃. RESULTS: The TLC spots of *R. angelicae* and *W. pae-noy* were clear with good separation, negative control without interference. The linear range was 0.055 44-0.277 2 μg for spinosin ($r=0.999\ 4$) and 0.055 98-0.279 9 μg for verbascoside ($r=0.999\ 5$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3.0%; recoveries were 95.62%-100.53% (RSD=1.77%, $n=9$) and 95.63%-102.57% (RSD=2.74%, $n=9$). CONCLUSIONS: The standard can be used for the quality control of Fufang ningshen granule.
KEYWORDS Fufang ningshen granule; TLC; HPLC; Spinosin; Verbascoside; Quality standard

复方宁神颗粒系根据临床有效经验方研制而成的中药新制剂,处方由酸枣仁、熟地黄、当归、白芍4味中药材组成,具有安神补血、滋阴补肾的功效,临床主要用于肝肾阴虚所致的头昏、耳鸣、心悸、失眠等症的治疗。方中酸枣仁具有镇静催眠、抗焦虑等药理作用,现代研究表明,酸枣仁中的黄酮类化合物斯皮诺素是酸枣仁镇静催眠的主要有效成分^[1-2]。熟地黄具有促进红细胞新生的作用,可以改善血虚所致的机体功能低下,而毛蕊花糖苷是熟地黄的主要有效成分,对造血干细胞具有促进增殖、分化作用,可显著改善造血功能^[3]。芍药苷是白芍的主要有效成分,相关研究显示,芍药苷具有抗血小板聚集、降低血液黏度、扩张血管等多种药理作用,可改善血液循环。当归可补血活血、调经止痛,其含有的挥发油、有机酸等成分主要通过刺激与造血相关的细胞、分子等来改善造血系统。为有效控制复方宁神颗粒的质量,本研究采用薄层色谱(TLC)对方中当归、白芍进行TLC鉴别,采用高效液相色谱法(HPLC)同时对方中有效成分斯皮诺素和毛蕊花糖苷进行定量分析,以期建立复方宁神颗粒质量标准提供依据。

* 副主任中药师。研究方向:中药制剂。E-mail: 15962512022@163.com
通信作者:高级实验师。研究方向:中药制剂。电话:025-85811835。E-mail: mcq63@163.com

1 材料
1.1 仪器
DGU-20A型HPLC仪,包括SPD-M20A检测器(日本Shimadzu公司);Milli-Q Integral型水纯化系统(美国Millipore公司);JY02S型紫外分析仪(武汉爱斯佩科学仪器有限公司);TYHD-60W型超声波清洗器(北京天佑恒达科技有限公司,功率:250 W,频率:33 kHz)。
1.2 药品与试剂
复方凝神颗粒(南京市中医院自制,批号:140901、140902、140903,规格:6 g/袋);斯皮诺素对照品(批号:111869-201203,纯度:98%);毛蕊花糖苷对照品(批号:111530-201310,纯度:93.3%);当归对照药材(批号:120927-201516)、白芍对照药材(批号:120905-201109)均购自中国食品药品检定研究院;硅胶G薄层板(青岛海洋化工有限公司);乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。
2 方法与结果
2.1 定性鉴别
2.1.1 当归 取本品5 g,加乙醚30 ml,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇1 ml溶解,作为供试品溶液^[4-5]。另精密称取当归对照药材0.5 g,按供试品溶液制备方法制备对

照药材溶液。按复方凝神颗粒处方和制备工艺制备缺当归的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按TLC法[2015年版《中国药典》(四部)]^[6]试验,吸取上述3种溶液各10 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯(4:1, 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位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,详见图1。

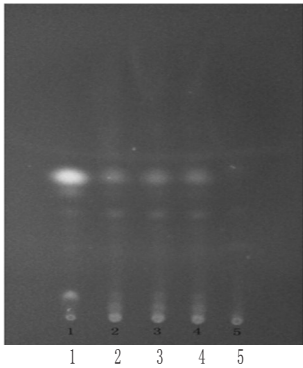


图1 当归的薄层色谱图

1.对照药材;2~4.供试品;5.阴性对照

Fig 1 TLC chromatograms of *Angelica sinensis*

1.control medicinal herb; 2-4.test samples; 5.negative control

2.1.2 白芍 取本品5 g,加乙醇50 ml,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水20 ml溶解,加入20 ml水饱和正丁醇充分萃取,分层后收集正丁醇液,备用;再次加入20 ml水饱和正丁醇充分萃取,合并2次正丁醇液,加入50 ml氨试液振摇洗涤,分层后将氨液弃去,正丁醇液减压回收近干,加入乙醇1 ml复溶,作为供试品溶液^[7-8]。另精密称取白芍对照药材0.5 g,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。按复方凝神颗粒的处方和制备工艺制备缺白芍的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液。按TLC法[2015年版《中国药典》(四部)]^[6]试验,吸取上述3种溶液各10 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以二氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸溶液,于105℃加热显色至斑点清晰,置日光下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,详见图2。

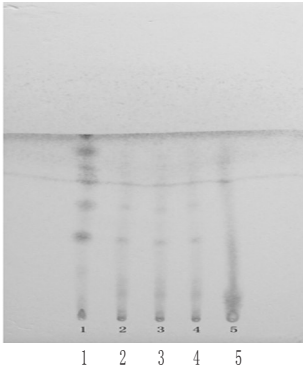


图2 白芍的薄层色谱图

1.对照药材;2~4.供试品;5.阴性对照

Fig 2 TLC chromatograms of *Paeonia lactiflora*

1.control medicinal herb; 2-4.test samples; 5.negative control

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.1%乙酸溶液(16:84,

V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:330 nm;柱温:30℃。在上述色谱条件下,理论板数以斯皮诺素和毛蕊花糖苷峰计≥3 000;各成分基线分离良好,分离度>1.5,详见图3。

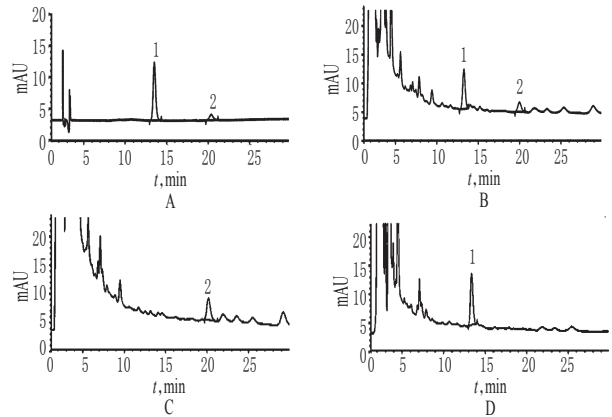


图3 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.缺酸枣仁的阴性对照;D.缺熟地黄的阴性对照;1.斯皮诺素;2.毛蕊花糖苷

Fig 3 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance; B.test sample; C. negative control without *Ziziphus jujube*; D. negative control without *Rehmanniae Radix Praeparata*; 1.spinosin; 2.verbascoside

2.2.2 混合对照品溶液的制备 取斯皮诺素对照品适量,置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,得斯皮诺素质量浓度为0.98 mg/ml的对照品贮备液。取毛蕊花糖苷对照品适量,精密称定,加流动相溶解,得毛蕊花糖苷质量浓度为1.04 mg/ml的对照品贮备液。分别取上述斯皮诺素、毛蕊花糖苷对照品贮备液适量,置于同一5 ml量瓶中,加80%甲醇定容,得到斯皮诺素和毛蕊花糖苷质量浓度分别为27.72、27.99 μg/ml的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品适量,研细,称取5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加80%甲醇80 ml,密塞,称定质量,超声处理40 min,取出放冷,再次称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按复方凝神颗粒处方和制备工艺分别制备缺酸枣仁、熟地黄的单一阴性样品,并按“2.2.3”项下方法分别制成缺酸枣仁、熟地黄的单一阴性对照溶液。

2.2.5 线性关系考察 分别精密量取“2.2.2”项下混合对照品溶液2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 μl,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以斯皮诺素和毛蕊花糖苷进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得斯皮诺素和毛蕊花糖苷回归方程分别为 $y=2\,352\,704.25x-2\,801.30$ ($r=0.999\,4$)、 $y=1\,416\,279.37x-6\,117.00$ ($r=0.999\,5$)。结果表明,斯皮诺素和毛蕊花糖苷检测进样量线性范围分别为0.055 44~0.277 2、0.055 98~0.279 9 μg。

2.2.6 精密度试验 取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,斯皮诺素和毛蕊花糖苷峰面积的RSD分别为1.04%、1.26% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:140902)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、12 h时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,斯皮诺素和毛蕊花糖苷峰面积的RSD分别为2.31%、1.49% ($n=6$),表明供试品溶液在12 h内基本稳定。

2.2.8 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:140902)适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,斯皮诺素和毛蕊花糖苷的含量平均值分别为0.066 98、0.042 37 mg/g,RSD分别为2.65%、2.11%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 取已知含量样品(批号:140902)适量,共6份,每份2.5 g,分别加入低、中、高质量的斯皮诺素和毛蕊花糖苷对照品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,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)

待测成分	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
斯皮诺素	0.167 1	0.133 3	0.298 5	98.57	97.92	1.77
	0.167 6	0.133 3	0.301 6	100.53		
	0.167 9	0.133 3	0.299 8	98.95		
	0.167 8	0.166 6	0.334 2	99.88		
	0.167 6	0.166 6	0.326 9	95.62		
	0.168 0	0.166 6	0.329 3	96.82		
	0.167 3	0.200 0	0.358 6	95.65		
	0.167 6	0.200 0	0.363 1	97.75		
	0.167 3	0.200 0	0.362 4	97.55		
毛蕊花糖苷	0.105 7	0.084 2	0.188 9	98.81	98.81	2.74
	0.106 0	0.084 2	0.190 6	100.47		
	0.106 2	0.084 2	0.187 2	96.20		
	0.106 1	0.105 3	0.214 1	102.57		
	0.106 0	0.105 3	0.206 7	95.63		
	0.106 3	0.105 3	0.208 9	97.44		
	0.105 8	0.126 3	0.234 8	102.13		
	0.106 0	0.126 3	0.226 9	95.72		
	0.105 8	0.126 3	0.232 5	100.32		

2.2.10 样品含量测定 取3批样品各适量,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of contents determination of samples(n=3)

样品批号	斯皮诺素		毛蕊花糖苷	
	含量,mg/g	RSD,%	含量,mg/g	RSD,%
140901	0.068 42	1.89	0.039 51	2.03
140902	0.066 98	2.65	0.042 37	2.11
140903	0.063 26	2.54	0.041 48	1.73

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择

根据方中活性成分的极性,试验中首先考察以甲醇和水作为提取溶剂,超声提取40 min。结果发现,水提取时杂质较多,干扰较为严重;再对比采用60%、80%、100%甲醇分别作为提取溶剂,发现80%甲醇对各成分的提取率相对高于其他体积分数的甲醇,且在该条件下各成分均能达到有效分离。因此,本试验最终采用80%甲醇作为提取溶剂。

3.2 检测波长的选择

斯皮诺素和毛蕊花糖苷的最大吸收波长分别为334、335 nm,本试验中设定检测波长为334 nm,即可满足斯皮诺素和毛

蕊花糖苷含量测定的要求,保证测定结果的准确性。

3.3 流动相的选择

参考文献[9-10],本试验考察了乙腈-乙酸溶液、乙腈-磷酸溶液、乙腈-水以不同比例作为流动相的结果。结果显示,当用乙腈-水为流动相时,待测成分峰形较差;采用乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相时,在334 nm波长处对基线干扰较大;采用乙腈-0.1%乙酸溶液作为流动相时各成分峰形良好,分离度均>1.5,故最终确定以乙腈-0.1%乙酸溶液为本试验的流动相。

中药复方成分复杂,作用广泛^[11-14]。本试验采用TLC法对方中当归和白芍进行了定性鉴别,分离效果良好;采用HPLC法同时对复方宁神颗粒中斯皮诺素和毛蕊花糖苷进行了定量分析。

综上所述,本文所建质量标准可用于复方宁神颗粒的质量控制。

(感谢南京市中医院提供复方宁神颗粒!)

参考文献

[1] 谭云龙,孙晖,孙文军,等.酸枣仁化学成分及其药理作用研究进展[J].时珍国医国药,2014,25(1):186.

[2] 闫艳,杜晨晖,李小菊,等.HPLC-DAD-ELSD法同时测定酸枣仁中斯皮诺素、酸枣仁皂苷A和B的含量[J].药物分析杂志,2011,31(1):30.

[3] 朱妍,徐畅.熟地黄活性成分药理作用研究进展[J].亚太传统药,2011,7(11):173.

[4] 谢仲德,方应权,李文烈,等.当归调经胶囊的薄层鉴别与阿魏酸、芍药苷的测定[J].中成药,2013,35(2):427.

[5] 张晓杭,袁乐,李媛媛,等.真元颗粒质量标准研究[J].中药材,2014,37(8):1478.

[6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:57.

[7] 何锦钧,黄健,陈淑映,等.固宝片质量标准研究[J].中药材,2013,36(4):668.

[8] 谭建宁,杜成智,黄秋洁,等.复方龙胆胶囊质量控制[J].中国医院药学杂志,2014,34(1):18.

[9] 解军波,刘艳,张彦青,等.HPLC法测定酸枣仁黄酮片中斯皮诺素[J].中草药,2010,41(10):1653.

[10] 林林,刘广桢,尹宁宁.HPLC法测定金匱肾气丸中马钱苷、芍药苷、毛蕊花糖苷和丹皮酚[J].中成药,2012,34(11):2137.

[11] 巩伟,孙旭,赵庆华,等.板蓝根配方颗粒的质量标准研究[J].中国药房,2015,26(18):2541.

[12] 潘莹.HPLC法同时测定通脉颗粒中丹参素、阿魏酸和葛根素的含量[J].中国药房,2011,22(4):376.

[13] 何慧,尹宁宁,郭东晓.复方阿胶颗粒质量标准研究[J].中成药,2013,35(10):2182.

[14] 张彦东,卢莹莹,郑晓英,等.罗汉果配方颗粒质量标准研究[J].中药新药与临床药理,2015,26(5):695.

(收稿日期:2015-12-03 修回日期:2016-05-27)

(编辑:张 静)