

益气固脱颗粒质量标准

杨炳火¹, 谈瑄忠^{1*}, 郎永英²

(1. 南京市中医院, 南京 210001; 2. 南京中医药大学药学院, 南京 210023)

[摘要] 目的:建立益气固脱颗粒的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对方中的黄芪、当归、枳壳进行定性鉴别,用 HPLC 对黄芪甲苷、阿魏酸进行含量测定。结果:TLC 斑点清晰,分离度良好,阴性对照无干扰;黄芪甲苷、阿魏酸分别在 0.112 0~1.120,0.012 0~0.120 g·L⁻¹ 与峰面积积分值呈良好的线性关系,平均回收率依次为 98.54%,97.79%,RSD 分别为 2.2%,1.9%。结论:定性定量方法简便、结果准确可靠、专属性强,所建标准可用于益气固脱颗粒的质量控制。

[关键词] 益气固脱颗粒;质量标准;高效液相色谱法;薄层鉴别;黄芪甲苷;阿魏酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)21-0070-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015210070

Quality Standard of Compound Yiqi Gutuo Granules YANG Bing-huo¹, TAN Xuan-zhong^{1*}, LANG Yong-ying² (1. Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanjing 210001, China; 2. School of Pharmacy, Nanjing University of TCM, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quality standard of Yiqi Gutuo granules. **Method:** Qualitative identification of Astragalus, Angelica and Citrus Aurantium in the formula was carried out by thin-layer chromatography (TLC). HPLC method was used for the determination of astragaloside and ferulic acid contents. **Result:** TLC spots were clear and well-separated without negative interference. The linear range of calycosin glucoside, ferulic acid were 0.012 0-0.120 and 0.112 0-1.120 g·L⁻¹, respectively, with good linear relationship with the peak area integral value. The average recoveries were 98.54% and 97.79%, respectively. RSD were 2.2% and 1.9%, respectively. **Conclusion:** The qualitative and quantitative method is simple, convenient, accurate and reliable with good precision. It can be used for the quality control of Yiqi Gutuo granules.

[Key words] Yiqi Gutuo granules; quality standard; HPLC; TLC; astragaloside; ferulic acid

益气固脱颗粒是由黄芪、当归、枳壳、诃子、续断等中药组成,具有益气固脱,升阳举陷之功效。本方属医院制剂,已在临床使用多年,对脾肾两虚型盆腔器官脱垂具有较好的治疗作用^[1-3]。本文对益气固脱颗粒的质量标准进行了研究,对黄芪、当归、枳壳进行薄层鉴别,黄芪是方中君药,有益气固脱,升阳举陷之效,主要有效成分为黄芪甲苷;配当归以益气养血,气血同调,益冲任之脉,阿魏酸是其主要药效成分^[4-5];配伍枳壳,升清降浊,振奋中气^[6];山茱萸、续断补益肾气。采用 HPLC 法结合 VWD 检测器与蒸发光散射检测器的串联同时测定方中阿魏酸、黄芪甲苷的含量。分离效果理想,达到了全面控制

该制剂质量的目的,可为临床安全用药提供有力的科学依据。

1 材料

1290 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司,配有 G1314E 型检测器, G4260A 型蒸发光散射检测器),Kromasil C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)(淮阴汉邦科技有限公司),Milli-Q Integral 水纯化系统(美国 Millipore 公司),MS105DU 型电子分析天平(梅特勒-托利多公司)。

阿魏酸(批号 110773-200611),黄芪甲苷(批号 110781-200613)对照品购自中国食品药品检定研究院。乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂为化学

[收稿日期] 20141229(002)

[基金项目] 南京市医学科技发展专项(3601027)

[第一作者] 杨炳火,副主任中药师,从事中药复方质量控制研究, Tel:025-52276121, E-mail:86371797@qq.com

[通讯作者] *谈瑄忠,主任中药师,从事中药复方质量控制研究, E-mail:zhaoying12314@163.com

纯。益气固脱颗粒自制(批号分别为130820, 130822, 130824)。

2 方法与结果

2.1 TLC鉴别

2.1.1 黄芪鉴别^[7-8] 取益气固脱颗粒2 g,用水10 mL溶解,溶液用水饱和的正丁醇振摇提取,每次40 mL,萃取3次,合并正丁醇萃取液,合并的溶液用氨试液洗涤,每次40 mL,洗涤2次,弃去氨试液,取正丁醇提取液,挥干,残渣加蒸馏水3~5 mL使溶解,通过D101大孔树脂柱(内径1.5 cm,长12 cm),以蒸馏水50 mL洗脱,弃去洗脱液,再用40%乙醇30 mL洗脱,弃去洗脱液,继续用70%乙醇80 mL洗脱,收集洗脱液,水浴蒸干,用甲醇定容至5 mL量瓶,作为供试品溶液。取黄芪对照药材2 g同法制成对照药材溶液。取缺黄芪的阴性样品2.5 g,同法制成阴性对照溶液。分别吸取上述溶液各10 μ L,点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(30:10:1)为展开剂,展开,取出晾干,喷以5%硫酸乙醇溶液,于105 $^{\circ}$ C加热显色,置于365 nm紫外光灯下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材相应的位置上,显示相同颜色的荧光斑点,阴性制剂无干扰。

2.1.2 当归鉴别^[9-10] 取益气固脱颗粒1 g,加入乙醚10 mL,超声提取30 min,放冷滤过,滤液水浴蒸干,残渣加乙醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。取当归对照药材0.5 g,同法制成对照药材溶液。取缺当归的阴性样品2.5 g,同法制成阴性对照溶液。分别吸取上述溶液各10 μ L,点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯(4:1)为展开剂,展开,取出晾干,置于(365 nm)紫外光灯下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材相应的位置上,显示相同颜色的荧光斑点,阴性制剂无干扰。

2.1.3 枳壳鉴别^[11-12] 取益气固脱颗粒2 g,加甲醇20 mL,密塞,超声20 min,滤过,取滤液10 mL,蒸干,残渣加甲醇2 mL作为供试品溶液。取枳壳对照药材1 g,同法制成对照药材溶液。取缺枳壳的阴性样品2.5 g,同法制成阴性对照溶液。分别吸取上述溶液各10 μ L,点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:6:2)下层为展开剂,展开,取出,晾干,喷以三氯化铝试液,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性制剂无干扰。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件及系统适用性试验 Kromasil C₁₈

色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),流动相乙腈(A)-0.1%甲酸溶液(B)梯度洗脱(0~20 min, 15% A; 20~25 min, 15%~13% A; 25~40 min, 13%~40% A; 40~60 min, 40%~60% A),流速1 mL \cdot min⁻¹,检测波长316 nm,柱温30 $^{\circ}$ C,载气流速2.7 L \cdot min⁻¹;气化温度60 $^{\circ}$ C,进样量10 μ L。理论塔板数按黄芪甲苷峰计算不低于4 000,按阿魏酸峰计算不低于5 000。

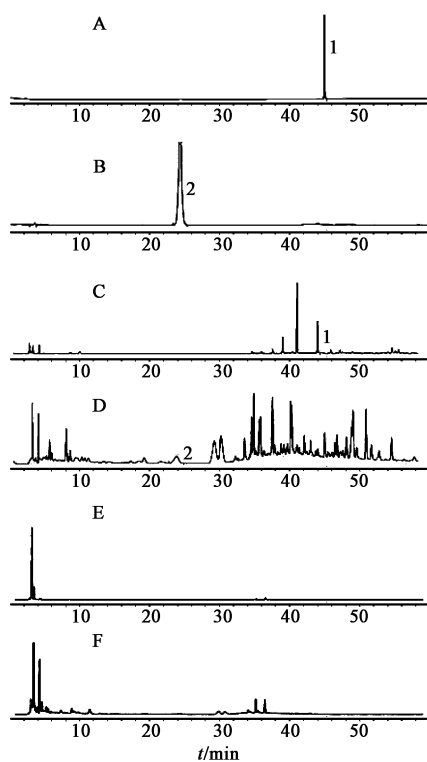
2.2.2 混合对照品储备液的制备 精密称取黄芪甲苷和阿魏酸对照品适量,加甲醇制成含黄芪甲苷、含阿魏酸1.12, 0.12 g \cdot L⁻¹的混合对照品储备溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取益气固脱颗粒约4 g,研细,精密称定,加入90%的甲醇25 mL,超声(300 W 40 kHz)提取45 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水10 mL使溶解,水饱和的正丁醇萃取4次,每次40 mL,氨试液萃取2次,每次40 mL,滤过,滤液蒸干,残渣加水5 mL溶解,过D101型大孔树脂,以水50 mL,洗脱,弃去水液,40%乙醇30 mL,洗脱,弃去洗脱液,70%乙醇80 mL洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇定容至5 mL,即得。

2.2.4 阴性样品溶液的制备 按处方比例称取除黄芪、当归的其余味药,按照颗粒的制备工艺,制备不含黄芪、当归的阴性样品。按2.2.3项下方法操作,制成阴性对照溶液。

2.2.5 专属性试验 分别取混合对照品溶液,供试品溶液及阴性供试品溶液,按上述色谱条件进样分析。在此条件下,黄芪甲苷色谱峰、阿魏酸色谱峰与其他组分峰可达基线分离,供试品与黄芪甲苷、阿魏酸对照品在相同保留时间有相同色谱峰,阴性对照未出现色谱峰。见图1。

2.2.6 标准曲线的制备 分别精密吸取上述混合对照品储备溶液2.5 mL,置5 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,得到含黄芪甲苷、阿魏酸质量浓度分别为0.56, 0.06 g \cdot L⁻¹对照品溶液,分别精密吸取上述混合对照品溶液0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL,置1 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,与对照品储备液组成系列对照品溶液,分别精密吸取上述6个浓度的混合对照品溶液10 μ L,注入液相色谱仪测定。以进样量对数为横坐标(X),峰面积对数平作为纵坐标(Y),进行线性回归。得到黄芪甲苷线性方程 $Y = 1.587X + 1.898$ ($r = 0.9995$),质量浓度在0.1120~1.120 g \cdot L⁻¹呈良好的线性关系;以质量浓度为横坐标(X),峰面积平均值(Y)作为纵坐标,进行线性回归,得到阿魏酸线性方程 $Y = 61.058X +$



A, B. 对照品; C. 供试品; D. 供试品 (ELSD); E. 黄芪阴性; F. 当归阴性; 1. 黄芪甲苷; 2. 阿魏酸

图 1 益气固脱颗粒 HPLC

Fig. 1 UPLC chromatography of Yiqi Gutuo capsule

表 1 黄芪甲苷加样回收率试验

Table 1 Results of recovery test of astragaloside

称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1.937 6	2.441 4	1.856 0	4.287 7	99.48		
1.954 5	2.462 7	1.856 0	4.242 0	95.87		
1.952 0	2.459 5	1.856 0	4.243 9	96.14		
1.924 0	2.424 2	2.320 0	4.752 6	100.36		
1.913 9	2.411 5	2.320 0	4.681 1	97.82	98.54	2.2
1.934 5	2.437 5	2.320 0	4.792 0	101.49		
2.002 0	2.522 5	2.784 0	5.346 7	101.44		
1.977 8	2.492 0	2.784 0	5.198 4	97.21		
2.001 0	2.521 3	2.784 0	5.221 8	97.00		

2.2.11 样品含量测定 取 3 个不同批号的益气固脱颗粒 ($n=3$), 按 2.2.3 项下的方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 结果 3 批样品中阿魏酸质量分数分别为 0.016 3, 0.016 5, 0.016 7 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$; 采用两点法计算黄芪甲苷质量分数分别为 1.272, 1.275, 1.264 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

3 讨论

3.1 检测器及波长的选择 由于黄芪甲苷是皂苷

类成分, 无明显的紫外吸收或仅有少许末端吸收, 预实验发现在紫外条件下黄芪甲苷末端吸收峰型不好, 面积较小, 且末端处杂峰较多, 干扰很大, 紫外检测器不能充分的反映黄芪甲苷的含量。而蒸发光散射检测器属于通用型检测器, 可以检测没有紫外吸收的物质, 基线稳定, 灵敏度高, 所以考虑采用蒸发光散射检测器检测黄芪甲苷的含量。阿魏酸属于普通有机酸类物质, 有明显的紫外吸收, 可以用紫外检

0.554 9 ($r=0.999 8$), 质量浓度在 0.012 0 ~ 0.120 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 呈良好的线性关系。

2.2.7 精密度试验 取上述混合对照品溶液, 在上述色谱条件下连续进样 6 次, 计算黄芪甲苷峰面积对数、阿魏酸的峰面积, 其 RSD 分别为 1.8%, 0.6%, 表明仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液 (批号 130820), 于室温下放置, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 测定样品中各组分的峰面积, 结果黄芪甲苷峰面积对数、阿魏酸峰面积的 RSD 分别为 0.02%, 1.7%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.9 重复性试验 精密称取益气固脱颗粒 (批号 130820) 6 份, 按照 2.2.3 项下方法平行制备 6 份供试品液, 测定, 并计算含量。结果样品中黄芪甲苷、阿魏酸平均质量分数分别为 1.26, 0.015 9 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 分别为 2.4%, 1.1%, 表明该方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 装量差异项下本品约 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 平行 9 份, 分别精密加入混合对照品溶液 (黄芪甲苷, 阿魏酸含量分别为 2.32, 0.030 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.8, 1.0, 1.2 mL 各 3 份, 按照上述供试品溶液方法制备样品。按 2.2.1 项下色谱条件进样 10 μL , 计算加样回收率, 结果见表 1, 2。

表 2 阿魏酸加样回收率试验

Table 2 Results of recovery test of ferulic acid

称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1.937 6	0.030 8	0.024 4	0.055 3	100.24		
1.954 5	0.031 1	0.024 4	0.054 9	97.83		
1.952 0	0.031 0	0.024 4	0.055 1	98.53		
1.924 0	0.030 6	0.030 5	0.059 7	95.45		
1.913 9	0.030 4	0.030 5	0.059 9	96.57	97.79	1.9
1.934 5	0.030 8	0.030 5	0.060 0	95.90		
2.002 0	0.031 8	0.036 6	0.068 6	100.49		
1.977 8	0.031 4	0.036 6	0.067 5	98.44		
2.001 0	0.031 8	0.036 6	0.067 2	96.64		

测器检测,用一种检测器同时检测 2 种成分时存在问题。考虑过建立 2 套方法学检测这 2 种有效成分,从而建立一套质量标准,但是此方法繁琐、耗时、对于实际意义不大。通过查阅文献,考虑使用 2 种不同类型的检测器联用技术,通过实验发现技术可行,很好的解决了同时检测 2 种主成分的问题。

3.2 流动相的选择^[8-14] 磷酸作为一种不挥发性酸,在液相中使用广泛,可以使流动相的 pH 相对比较稳定,但也限制了其在液质联用中的应用。蒸发光散射检测器的原理是检测待测成分的挥发性要小于流动相的挥发性,故应尽量选择挥发性大的酸加入流动相调节 pH。本实验选择甲酸代替磷酸加入流动相调节 pH。考察了不同溶剂系统,如甲醇-水、乙腈-水、乙腈-甲酸水对色谱峰分离效果的影响。结果表明以不同比例的甲醇-水、乙腈-水为流动相的分离效果均不理想,以乙腈-甲酸水为流动相梯度洗脱分离效果好。

3.3 色谱柱的选择^[15-16] 对益气固脱颗粒中 2 个有效成分含量进行测定时,比较了汉邦 ODS2 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)和 Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),分别采用同一色谱条件进行分离,结果表明 Kromasil C₁₈ 柱各峰间分离度、对称性好,分离效果为佳。

[参考文献]

[1] 陆海英. 补中益气汤加味联合肌电生物反馈治疗盆腔器官脱垂的临床研究[D]. 南京:南京中医药大学,2010.
[2] 林宏城,任东林,苏丹,等. 盆底功能障碍性疾病的研究进展[J]. 结直肠肛门外科,2010,16(2):130-132.

[3] 巢元方(隋). 诸病源候论校注[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:2.
[4] 陈国辉,黄文凤. 黄芪的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国新药杂志,2008,17(17):1482-1485.
[5] 黄伟晖,宋纯清. 当归的化学和药理学研究进展[J]. 中国中药杂志,2001,26(03):147-151.
[6] 舒尊鹏,胡书法,翟亚东,等. 中药枳壳化学成分及药理作用研究[J]. 科技创新与应用,2012(13):8-9.
[7] 张学兰,唐玉秋,李慧芬,等. 固冲止血颗粒质量标准研究[J]. 中国新药杂志,2011,20(13):1174-1178.
[8] 潘金火,杨建平,朱和平. 醒脑苏胶囊的质量标准研究[J]. 中国医院药学杂志,2010,30(18):1535-1538.
[9] 王宇红,周新蓓. 脂清胶囊质量标准的研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(3):641-642.
[10] 许韵梅. 参茸强肾丸中红参白芍当归的薄层色谱鉴别[J]. 中医药学刊,2005,23(4):715.
[11] 焦玉. 经舒宁颗粒质量标准研究[J]. 亚太传统医药,2011,7(10):45-47.
[12] 陈彦,周勤文,孙晓芳. 脑康冲剂质量标准的研究[J]. 时珍国医国药,1998,9(5):414-415.
[13] 庄玉坚,孙冬梅,刘法锦. 诃子配方颗粒质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(11):7-9.
[14] 雨田,张雪妍,龙艳群,等. 六味止痛胶囊质量标准研究[J]. 成都大学学报:自然科学版,2009,28(2):98-100.
[15] 刘和平,彭招华,张润容,等. 黄芪药材中黄芪甲苷 UPLC-ELSD 含量测定方法的优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(5):92-94.
[16] 谢媛,涂瑶生,施之琪,等. HPLC 同时测定调经活血片中芍药苷、阿魏酸、金丝桃苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(17):84-87.

[责任编辑 顾雪竹]