

芪术益气润肠颗粒质量控制方法

周亚萍¹, 谈瑄忠^{2*}, 毛春芹^{1*}, 陆兔林¹, 徐炜杰¹

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

[摘要] 目的:建立一种简便、可靠的控制芪术益气润肠颗粒质量的方法。方法:采用 HPLC 测定芪术益气润肠颗粒中黄芪甲苷、松果菊苷和毛蕊花糖苷的含量,对其中的黄芪、白术、枳壳饮片进行薄层色谱鉴别。结果:毛蕊异黄酮葡萄糖苷在 0.041 4~0.207 μg,松果菊苷 0.146 7~0.733 5 μg,毛蕊花糖苷 0.035 1~0.175 5 μg,均成良好的线性关系;相关系数分别为 0.999 5,0.999 5,0.999 6;平均回收率在 97.8%~102.2%,RSD 在 1.8%~2.3%。薄层色谱中检出了黄芪、白术、枳壳的特征斑点,阴性对照无干扰。结论:该方法重复性好、简便、快速,能够有效控制芪术颗粒的质量。

[关键词] 芪术益气润肠颗粒;黄芪甲苷;松果菊苷;毛蕊花糖苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0067-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030067

Quality Control Method for Qizhu Yiqi Runchang Granules

ZHOU Ya-ping¹, TAN Xuan-zhong^{2*}, MAO Chun-qin^{1*}, LU Tu-lin¹, XU Wei-jie¹

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2. Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a simple and reliable quality control method for Qizhu Yiqi Runchang granules. **Method:** The contents of calycosin glucoside, echinacoside, and acteoside were determined by HPLC, and Astragali Radix, Atractylodes Macrocephalae Rhizoma, and Aurantii Fructus were identified by thin-layer chromatography (TLC). **Result:** The good linear ranges were 0.041 4-0.207 μg for calycosin glucoside, 0.146 7-0.733 5 μg for echinacoside, and 0.035 1-0.175 5 μg for acteoside; correlation coefficient was 0.999 5, 0.999 5 and 0.999 6, respectively. The average recovery rate was 97.8%-102.2%, with RSD of 1.8%-2.3%. Simultaneously, the characteristic spots of Astragali Radix, Atractylodes Macrocephalae Rhizoma, and Aurantii Fructus were detected by TLC, and the negative control test showed no interference. **Conclusion:** This method is reproducible, simple and fast, and can be used to effectively control the quality of Qizhu Yiqi Runchang granule.

[Key words] Qizhu Yiqi Runchang granule; calycosin glucoside; echinacoside; acteoside

据报道,慢性便秘发病率较高,已成为一个社会问题,严重影响到患者的生活质量^[1-5]。中医认为脾主运化,脾虚运化失司,糟粕内停,加之脾胃虚弱,气血生化乏源,气虚则大肠传送无力,大便排出困难。芪术益气润肠颗粒为南京市中医院名老中医李柏年(李柏年名老中医药专家传承工作室)多年临

床的积累,由黄芪、白术、肉苁蓉、枳壳等组成,具有健脾益气,润肠通便的功效,用于功能性便秘脾虚气弱证。方中黄芪、白术,健脾益气,黄芪主要的有效成分为毛蕊异黄酮葡萄糖苷,具有增强免疫、抗心肌缺血、保肝、抗炎、抗突变、清除自由基等药理作用^[6-7]。肉苁蓉补肾益精;松果菊苷与毛蕊花糖苷

[收稿日期] 20150803(019)

[基金项目] 南京市医学发展项目(YKK14146)

[第一作者] 周亚萍,硕士,从事中药质量标准研究及新药研发,Tel:18351895572,E-mail:18351895572@163.com

[通讯作者] *谈瑄忠,教授,主任药师,从事中药学、药事管理研究,Tel:13951696369,E-mail:txz282@sohu.com;

*毛春芹,高级实验员,从事中药质量标准研究及新药研发,Tel:025-85811835,E-mail:mcq63@163.com

是其主要活性成分,具有补肾壮阳、肝保护、抗氧化等多种生物活性^[8]。枳壳行气导滞,宽肠解郁。为控制芪术益气润肠颗粒的质量,对该制剂生产工艺进行了研究和规范,并在此基础上研究制定了质量标准,对其中的黄芪、白术、枳壳 3 味饮片采用薄层色谱法进行定性鉴别。对君药黄芪的活性成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷和臣药肉苁蓉的活性成分松果菊苷和毛蕊花糖苷为指标进行定量测定。2010 年版《中国药典》中只对君药进行含量测定,本研究对君臣药均进行定量测定,更加有利于控制制剂的质量,为临床安全用药提供保障。

1 材料

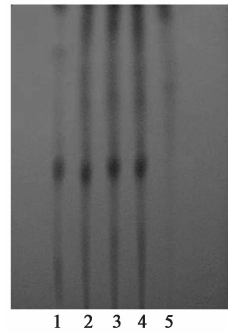
1.1 仪器 2695 型高效液相色谱仪(2998 检测器, Empower 色谱工作站,美国 Waters), KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), Milli-Q Integral 型水纯化系统(美国 Millipore 公司), MS105DU 型 1/10 万电子分析天平(梅特勒-托利多公司), FA 1104 型 1/1 万电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 试药 毛蕊花糖苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、松果菊苷对照品(批号 111530-201411, 111670-201304, 111920-201304)均购自中国食品药品检定研究院,黄芪、枳壳、白术对照药材(批号 20974-200508, 0981-200202, 120925-200407)购自中国食品药品检定研究院。3 批芪术益气润肠颗粒样品由南京市中医院提供(批号 141226, 141228, 141230)。乙腈质谱纯、甲醇色谱纯,磷酸分析纯,水为超纯水。

2 薄层色谱鉴别

2.1 黄芪薄层色谱鉴别 取本品 12 g,研细,加水 20 mL,超声 30 min,过滤,滤液用水饱和的正丁醇萃取 3 次,每次 40 mL,正丁醇萃取液合并,用氨试液充分洗涤 2 次,每次 40 mL,弃去氨液,正丁醇液蒸干,残渣加水 5 mL 使溶解,放冷,通过 D101 型大孔吸附树脂柱(内径 1.5 cm,柱高 12 cm),以水 50 mL 洗脱,弃去水液,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,蒸干,残渣加甲醇 2 mL 溶解,作为供试品溶液。另取缺黄芪阴性样品 10 g,同法制成缺黄芪阴性样品。取黄芪对照药材 4 g,加 60% 乙醇 50 mL 加热回流 2 h,滤过,滤液自“滤液用水饱和的正丁醇萃取 3 次”起,同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法(附录 VI B)试验,吸取上述 3 种溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(5:3:1:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫

酸乙醇溶液,在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,日光下显相同的斑点,且阴性样品无干扰,见图 1。

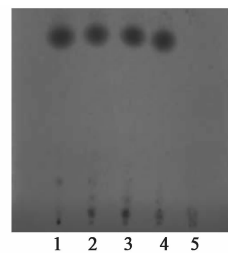


1. 黄芪对照药材;2~4. 供试品;5. 缺黄芪阴性样品

图 1 黄芪的 TLC 色谱

Fig. 1 TLC chromatogram of Astragali Radix

2.2 白术薄层色谱鉴别 取本品 10 g,研细,加水 100 mL,水蒸气蒸馏 3 h 提取挥发油,收集所得挥发油,提得的挥发油用乙醇 1 mL 溶解,作为供试品溶液。另取缺白术阴性样品 7 g,按供试品溶液制备方法制成缺白术阴性样品。再取白术对照药材 0.5 g,加环己烷 2 mL,超声处理 15 min,滤过,取滤液作为对照药材溶液。分别吸取上述新制备的 3 种溶液各 10 μ L,点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-正丁醇(25:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 香草醛硫酸溶液,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,日光下显相同的桃红色斑点,且阴性样品无干扰,见图 2。



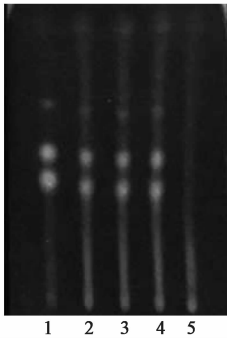
1. 白术对照药材;2~4. 供试品;5. 缺白术阴性样品

图 2 白术的 TLC 色谱

Fig. 2 TLC chromatogram of Atractylodes Macrocephalae Rhizoma

2.3 枳壳薄层色谱鉴别 取本品 0.8 g,研细,加甲醇 10 mL,超声 30 min,滤过,滤液蒸干,加甲醇 5 mL 溶解残渣,作为供试品溶液。另取缺枳壳阴性样品 0.7 g,同法制成缺枳壳阴性样品。再取枳壳对照药材 0.2 g,加水 30 mL,加热回流提取 1 h,滤过,滤液蒸干,自“加甲醇 10 mL”,同法制成对照药材溶液。吸取上述 3 种溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以二氯甲烷-甲醇-水(13:6:2)下层溶液

为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 3% 三氯化铝乙醇溶液,在 105 °C 加热约 5 min,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,呈相同颜色的荧光斑点,且阴性样品无干扰,见图 3。



1. 枳壳对照药材;2~4. 供试品;5. 缺枳壳阴性样品

图 3 枳壳的 TLC 色谱

Fig. 3 TLC chromatogram of Aurantii Fructus

3 含量测定

3.1 色谱条件^[9-10] Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.2% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~5 min, 29%~31% A; 5~30 min, 31%~39.5% A),柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 307 nm,进样量 10 μL。

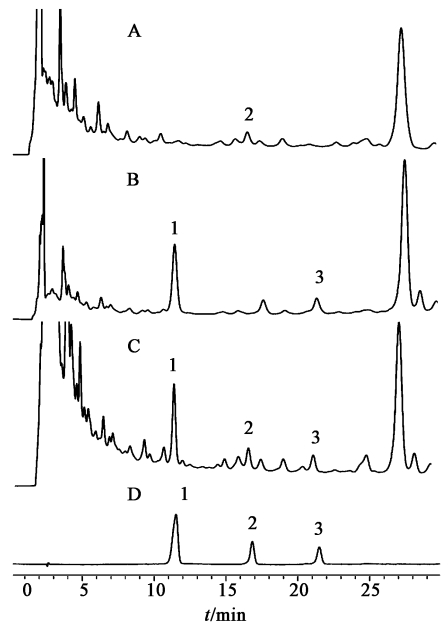
3.2 混合对照品溶液制备 分别精密称取各对照品适量,加甲醇超声溶解,制成分别含毛蕊异黄酮葡萄糖苷 0.138 g·L⁻¹,松果菊苷 0.489 g·L⁻¹,毛蕊花糖苷 0.117 g·L⁻¹的单一对照品溶液;分别精密量取上述单一对照品溶液适量,置 5 mL 量瓶中,加甲醇制成含毛蕊异黄酮葡萄糖苷、松果菊苷、毛蕊花糖苷分别为 0.027 6, 0.097 8, 0.023 4 g·L⁻¹的混合对照品溶液。

3.3 供试品溶液的制备 取颗粒 2 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 25 mL,称定质量,超声处理(200 W, 40 kHz) 30 min,放冷至室温,以 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀,过滤,取续滤液作为供试品溶液。

3.4 阴性对照溶液的制备 按处方工艺制备缺黄芪、肉苁蓉阴性制剂,将制剂按 3.3 项下的方法制成各阴性样品溶液。

3.5 专属性试验 分别精密吸取供试品溶液、各阴性样品溶液和混合对照品溶液适量,按 3.1 项下色谱方法进行分离。阴性样品对结果无干扰,供试品中 3 种成分达与其他成分色谱峰可达基线分离。见图 4。

3.6 线性关系考察 分别精密吸取 3.2 项下的混



A. 混合对照品;B. 供试品;C. 缺黄芪阴性样品;D. 缺肉苁蓉阴性样品;1. 松果菊苷;2. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷;3. 毛蕊花糖苷

图 4 芪术益气润肠颗粒 HPLC

Fig. 4 HPLC chromatograms of Qizhu Yiqi Runchang granule

合对照品溶液 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 mL,用甲醇稀释并定容至 2 mL,得到系列混合对照品溶液。分别进样 10 μL,由峰面积 Y 对质量 X (μg) 进行线性回归,求得毛蕊异黄酮葡萄糖苷 $Y = 1\ 602\ 964X - 29\ 354$ ($r = 0.999\ 5$),松果菊苷 $Y = 1\ 194\ 058X - 33\ 298$ ($r = 0.999\ 5$),毛蕊花糖苷 $Y = 1\ 410\ 201X - 18\ 204$ ($r = 0.999\ 6$),线性范围分别为 0.041 4~0.207, 0.146 7~0.733 5, 0.035 1~0.175 5 μg。

3.7 精密度试验 取上述对混合对照品溶液,按 3.1 项下色谱条件进样 6 次测定,结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、松果菊苷、毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 分别为 2.2%, 1.9%, 2.4%,表明仪器精密度良好。

3.8 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号 141226),按上述色谱条件分别于 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 进样分析,结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、松果菊苷、毛蕊花糖苷的峰面积 RSD 分别为 1.8%, 0.9%, 2.7%,表明所测供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.9 重复性试验 取本品颗粒(批号 141226) 6 份,按 3.3 项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件分别测定,结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷,松果菊苷,毛蕊花糖苷的平均质量分数分别为 0.172, 0.655, 0.156 mg·g⁻¹;RSD 分别为 1.3%, 0.7%, 2.7%,表明该方法重复性良好。

3.10 加样回收率试验 分别精密称取 3 种对照品

适量,置量瓶中,配制成单一对照品储备液。分别精密吸取适量对照品储备液,配置成含毛蕊异黄酮葡萄糖苷,松果菊苷,毛蕊花糖苷 0.178,0.630,0.162 $g \cdot L^{-1}$ 的混合对照品溶液,备用。取本品(批号

141226)适量,精密称取 6 份,每份约 1 g,置具塞锥形瓶中,分别精密吸取混合对照品溶液适量。按照 3.3 项下方法制备供试品溶液,进样 10 μL 测定,计算回收率。结果见表 1。

表 1 芪术益气润肠颗粒中 3 种成分的加样回收试验

Table 1 Results of recovery tests of Qizhu Yiqi Runchang granule

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值(RSD)/%
毛蕊异黄酮苷	1.002 1	0.172	0.178	0.351	100.4	102.2(1.8)
	1.003 2	0.173	0.178	0.351	100.3	
	1.002 1	0.172	0.178	0.352	100.8	
	0.998 9	0.172	0.178	0.357	104.0	
	0.999 2	0.172	0.178	0.357	103.8	
	1.001 7	0.172	0.178	0.357	103.9	
松果菊苷	1.002 1	0.656	0.630	1.278	98.7	97.8(2.0)
	1.003 2	0.657	0.630	1.292	100.8	
	1.002 1	0.656	0.630	1.258	95.5	
	0.998 9	0.654	0.630	1.269	97.6	
	0.999 2	0.654	0.630	1.259	96.0	
	1.001 7	0.656	0.630	1.275	98.3	
毛蕊花糖苷	1.002 1	0.156	0.162	0.318	99.5	98.1(2.3)
	1.003 2	0.156	0.162	0.322	101.9	
	1.002 1	0.156	0.162	0.312	96.4	
	0.998 9	0.156	0.162	0.313	96.9	
	0.999 2	0.156	0.162	0.315	98.2	
	1.001 7	0.156	0.162	0.311	95.7	

3.11 样品测定 取 3 批样品(批号 141226, 141228, 141230),每份精密称取 2 g,按 3.3 项下方法制备供试品溶液,再按 3.1 项下色谱条件测定,根据标准曲线计算样品中 6 种成分的量,结果见表 2。

表 2 芪术益气润肠颗粒中 3 中成分的含量测定

Table 2 Determination results of Qizhu Yiqi Runchang granule

批号	毛蕊异黄酮苷	松果菊苷	毛蕊花糖苷
141226	0.172	0.655	0.156
141228	0.168	0.706	0.156
141230	0.169	0.734	0.144

4 讨论

4.1 薄层色谱条件考察 2010 年版《中国药典》枳壳项下薄层色谱法,采用三氯甲烷-甲醇-水(13:6:2)下层溶液为展开剂,经查阅文献^[11-15],三氯甲烷具有急性毒性、皮肤毒性、生殖发育毒性、遗传毒性、致癌性、免疫毒性等。二氯甲烷与三氯甲烷虽都是

ICH Q3C 的二类溶剂(有动物致癌性的溶剂),但他们每日允许接触量的规定限度分别 600 ppm 和 60 ppm,可见,使用二氯甲烷相对更安全。因此此文中选用二氯甲烷。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,呈相同颜色的荧光斑点,且阴性样品无干扰,说明将三氯甲烷更改为毒性较小的二氯甲烷可行。黄芪的 TLC 的展开剂除考察了乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(5:3:1:1)外,还考察展开剂二氯甲烷-甲醇-水(30:10:1),但此展开剂展开路线到最后会有些歪曲。枳壳的 TLC 的展开剂除考察了二氯甲烷-甲醇-水(13:6:2)下层溶液外,还考察展开剂乙酸乙酯-甲酸-水(12:2:3),此展开剂的特征斑点较少,因此选择二氯甲烷-甲醇-水(13:6:2)下层溶液作为枳壳的展开剂。

4.2 色谱条件的优化 本实验考察甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸水溶液、甲醇-甲酸水溶液等多个流动相系统,结果表明甲醇-0.2% 磷酸水溶液分离效果较好,峰性良好。因此,选择甲醇-0.2% 磷酸水溶液

作为流动相。芪术益气润肠颗粒由数味饮片组成,化学成分较为复杂,对混合对照品溶液在200~400 nm波长进行吸收光谱扫描,结果330 nm处毛蕊异黄酮葡萄糖苷吸收很弱,在307 nm被测各种成分均能出峰,且低含量组分毛蕊异黄酮葡萄糖苷和毛蕊花糖苷检测灵敏度好,峰型好,各峰分离度适中。毛蕊异黄酮葡萄糖苷与松果菊苷、毛蕊花糖苷的最大吸收波长不一致,比较了在各自最大吸收波长下与同一波长下含量测定的结果,结果无差异。说明此方法更广泛,更简便快捷。

4.3 样品处理方法的选择 分别以50%甲醇、50%乙醇为提取溶剂时,发现50%乙醇为提取溶剂时,松果菊苷提取率降低,且峰型差。在选择纯甲醇,50%甲醇,30%甲醇为提取溶剂时,纯甲醇条件下,松果菊苷提取率会降低;30%甲醇条件下,杂质较50%甲醇条件下较多。同时考察了超声时间20,30,45 min,最终选择了30 min超声进行提取,提取完全,耗时少。

[参考文献]

[1] 郭晓峰,柯美云,潘国宗,等.北京地区成年人慢性便秘流行病学调查及其相关因素分析[J].基础医学与临床,2001(S1):106-107.
[2] 于普林,李增金,郑宏,等.老年人便秘流行病学特点的初步分析[J].中华老年医学杂志,2001,20(2):132-134.
[3] Stewart W F, Liberman J N, Sandler R S, et al. Epidemiology of constipation (EPOC) study in the United States: relation of clinical subtypes to sociodemographic features [J]. Am J Gastroenterol, 1999, 94(12):3530-3540.

[4] Pare P, Ferrazzi S, Thompson W G, et al. An epidemiological survey of constipation in Canada: definitions, rates, demographics, and predictors of health care seeking [J]. Am J Gastroenterol, 2001, 96(11):3130-3137.
[5] Stessman M. Biofeedback: its role in the treatment of chronic constipation [J]. Gastroenterol Nurs, 2003, 26(4):251-260.
[6] 刘德利,包华音,刘杨.近5年黄芪化学成分及药理作用研究进展[J].食品与药品,2014,16(1):68-70.
[7] 陈建真,吕圭源,叶磊,等.黄芪黄酮的化学成分与药理作用研究进展[J].医药导报,2009,28(10):1314-1316.
[8] 赵薇,潘英妮.肉苁蓉苯乙醇苷类成分药理作用研究进展[J].亚太传统医药,2013,9(5):77-79.
[9] 郎永英,谈瑄忠,陆兔林,等. RP-HPLC法同时测定复方芪归益气颗粒中5种成分[J].中成药,2013,35(12):2654-2657.
[10] 赵燕,李秋芬,张忠亮,等.参芪麝蓉丸质量评价[J].中草药,2014,45(7):942-948.
[11] 李灵宏,梁友信,蒋学之,等.氯仿亚急性吸入染毒的肝肾毒性研究[J].卫生毒理学杂志,1992,6(4):243-245.
[12] 王旭平,任道凤,金锡鹏.氯仿对大鼠皮肤屏障功能的影响[J].上海医科大学学报,1998,25(3):213-216.
[13] Kristensen O. A prospective study of hand eczema in an automobile manufacturing industry [J]. Contact Dermatitis, 1992,26(5):341-345.
[14] 唐明德,易义珍,陈毓.三氯甲烷致突变研究[J].卫生毒理学杂志,1988,2(3):169-170.
[15] 邹梅,赵生友,王玮,等.氯仿的免疫毒性作用[J].中国免疫学杂志,2002,18(3):178-183.

[责任编辑 顾雪竹]