

## 参芪益智组分中药的质量标准研究

周威,雷永涛,梁妍,郝小燕\*  
(贵阳医学院药学院,贵阳 550004)

**[摘要]** **目的:**建立参芪益智组分中药的质量标准,为其质量标准的制定提供参考。**方法:**根据不同成分采用不同的提取方法处理样品,改用不同的溶剂系统对其薄层鉴别方法进行研究。采用高效液相色谱法测定参芪益智组分中药中 4 种黄酮成分的含量。**结果:**建立了参芪益智组分中药中阿魏酸、天麻素、淫羊藿总黄酮、人参总皂苷、黄芪总皂苷的薄层鉴别方法。参芪益智组分中药中 4 种黄酮成分线性方程、灵敏度、精密度、稳定性等均符合高效液相色谱法含量测定要求。**结论:**所建立的方法简便、可行、灵敏、准确、专属性强,重复性好,可作为参芪益智组分中药的质量控制方法。

**[关键词]** 组分中药; 人参总皂苷; 黄芪总皂苷; 质量标准; 薄层鉴别; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0093-04

**[doi]** 10.11653/syfy201324093

## Study on Quality Standard of Monomer Combination Drug of Shenqi Yizhi

ZHOU Wei, LEI Yong-tao, LIANG Yan, HAO Xiao-yan\*  
(School of Pharmacy, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the quality standard of monomer combination drug of Shenqi Yizhi, which could be applicable to establishing the foundation of its quality standards. **Method:** Due to different kinds of components in the drug, different extraction methods for sample preparation was adopted herein, several developer systems were investigated in this TLC study. A HPLC method was established for the determination of four flavonoids of this monomer combination drug. **Result:** TLC indentification methods of ferulaic acid, gastrodine, epimedium total flavonoids, ginseng total saponins and astragalus total saponins in monomer combination drug of Shenqi Yizhi were finally established respectively. Linear equations, sensitivities, precisions, stabilities, etc of four flavonoids of this drug under the HPLC were all in line with requirements of HPLC assay. **Conclusion:** The reported methods are simple, practical, sensitive, accurate, specific and reproducible, which can be used as quality control method of monomer combination drug of Shenqi Yizhi.

**[Key words]** monomer combination drug; ginseng total saponins; astragalus total saponins; quality standard; TLC; HPLC

参芪益智组分中药是以治疗老年痴呆临床经验方为蓝本,将阿魏酸<sup>[1]</sup>、天麻素<sup>[2]</sup>、淫羊藿总黄酮<sup>[3]</sup>、黄芪总皂苷、人参总皂苷<sup>[4-6]</sup> 5 种对老年痴呆治疗确有疗效而作用机制不同的中药成分按统计学设计整合而成的一种新颖的组分中药。我们初步药

效学研究表明其对痴呆大鼠学习记忆能力有明显的改善作用,对胆碱能功能减退有较好的保护和治疗作用,可显著降低老年痴呆大鼠海马和皮质中兴奋性谷氨酸含量,拮抗谷氨酸介导的神经毒性作用,延缓衰老和防治老年痴呆<sup>[7-8]</sup>。旨在为更好地控制该

**[收稿日期]** 20130701(003)

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81360681);贵州省中药现代化基金(黔科合中药字[2010]5005号);贵阳市科技局基金([2010]筑科农合同字第1-中06号);贵州省科学技术基金(黔科合丁字[2013]2052号)

**[第一作者]** 周威,副教授,理学博士,从事药物分析研究,Tel:0851-6908568,E-mail:drwzhou@126.com

**[通讯作者]** \*郝小燕,教授,硕士生导师,从事天然产物成分分析及质量标准研究,Tel:0851-6908508,E-mail:haoxiaoyan@vip.163.com

组分中药的质量标准,现在对其进行薄层色谱鉴别和含量测定的方法研究。

## 1 材料

**1.1 仪器** EYELA SB-2000 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司),KQ-250B 型超声波提取器(昆山市超声仪器有限公司),QY-20 型三用紫外分析仪(上海市闻天仪器设备有限公司),Agilent1200 型高效液相色谱仪(配备光二极管阵列检测器),AUY220 型分析天平(日本岛津),电热恒温水浴锅(北京中西集团公司)。

**1.2 试药** 阿魏酸、天麻素、淫羊藿苷、黄芪甲苷、人参皂苷  $Rb_1$ ,  $Re$ ,  $Rg_1$  和朝藿定 A, B, C 对照品(均由成都曼思特生物科技有限公司提供,纯度  $\geq 98\%$ ),参芪益智组分中药为实验室自制。氧化铝(200~300 目,上海新诚精细化工有限公司),D101 型大孔吸附树脂,试验用水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 参芪益智组分中药中阿魏酸的薄层鉴别** 称取 0.53 g 参芪益智组分中药,加适量甲醇溶解,超声提取 30 min,滤过,滤液用旋转蒸发仪挥干,残渣用甲醇定容至 5 mL,即得供试品溶液,依次制得 3 批供试品溶液。同法制备缺阿魏酸的阴性样品。称取阿魏酸对照品,用甲醇溶解制成  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品溶液。分别吸取上述溶液各 5  $\mu\text{L}$ ,点于同一硅胶  $GF_{254}$  板上,以正己烷-氯仿-冰醋酸(8:8:1)为展开剂,展开,取出,晾干。置紫外灯(365 nm 和 254 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性样品无干扰。

**2.2 参芪益智组分中药中天麻素的薄层鉴别** 与 2.1 鉴别项下同法制备 3 批供试品溶液,同法制备缺天麻素的阴性样品。称取天麻素对照品,用甲醇溶解制成  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品溶液。分别吸取上述溶液各 5  $\mu\text{L}$ ,点于同一硅胶 G 板上,以乙酸乙酯-甲醇-水(9:1:0.2)为展开剂,展开,取出,晾干。喷 5% 磷钼酸乙醇溶液,晾干,105  $^{\circ}\text{C}$  烘至斑点清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的黑褐色斑点,阴性样品无干扰。

**2.3 参芪益智组分中药中淫羊藿总黄酮的薄层鉴别** 与 2.1 鉴别项下同法制备 3 批供试品溶液,同法制备缺淫羊藿总黄酮的阴性样品。称取淫羊藿苷对照品,用甲醇溶解制成  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品溶液。分别吸取上述溶液各 5  $\mu\text{L}$ ,点于同一硅胶 G 板上,

以氯仿-乙酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10) 2~10  $^{\circ}\text{C}$  放置的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干。喷 10% 硫酸乙醇溶液,晾干,105  $^{\circ}\text{C}$  烘至斑点清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的黄色斑点,阴性样品无干扰。

**2.4 参芪益智组分中药中人参总皂苷的鉴别** 与 2.1 鉴别项下同法制备 3 批供试品溶液,同法制备缺人参总皂苷的阴性样品。分别称取  $Rb_1$  和  $Re$  对照品,用甲醇溶解制成均为  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品溶液。分别吸取上述溶液各 5  $\mu\text{L}$ ,点于同一硅胶  $GF_{254}$  板上,以氯仿-乙酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10) 2~10  $^{\circ}\text{C}$  以下放置的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干。喷 10% 硫酸乙醇溶液,晾干,105  $^{\circ}\text{C}$  烘至斑点清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的紫红色斑点,阴性样品无干扰。

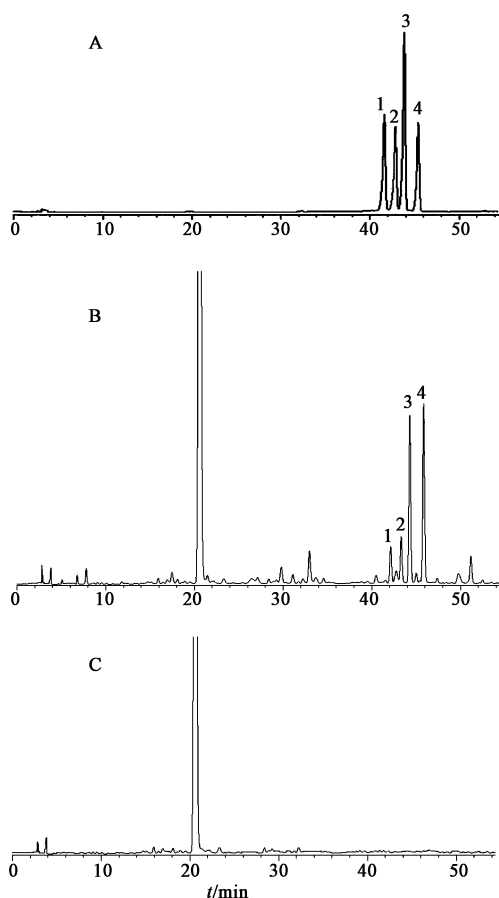
取组分中药 4 g,加蒸馏水 60 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液浓缩至适量,通过 D101 型大孔吸附树脂柱(内径 1.5 cm,长 10 cm),先以蒸馏水洗脱至无浑浊,弃去水液,再用 25% 的乙醇 300 mL 洗脱,弃去洗脱液,继续用 50% 的乙醇 300 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干。残渣加适量水使溶解,用水饱和的正丁醇提取 3 次,每次 20 mL,合并正丁醇提取液,用氨试液洗涤 2 次,每次 15 mL。取正丁醇提取液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品,依次制得 3 批供试品溶液。同法制备缺人参总皂苷的阴性样品。称取  $Rg_1$  对照品,用甲醇溶解制成  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品溶液。分别吸取上述溶液各 5  $\mu\text{L}$ ,点于同一硅胶  $GF_{254}$  板上,以氯仿-甲醇-水(20:7:2)的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干。喷 10% 硫酸乙醇溶液,晾干,105  $^{\circ}\text{C}$  烘至斑点清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的紫红色斑点,阴性样品无干扰。

**2.5 参芪益智组分中药中黄芪总皂苷的薄层鉴别** 取组分中药 4 g,加无水乙醇 60 mL,超声提取 30 min,滤过。滤液用旋转蒸发仪挥干,残渣用 0.3% 氢氧化钠溶液 20 mL 使溶解,再用稀盐酸调 pH 6.0,用乙酸乙酯振摇提取 2 次,分别为 15 mL 和 10 mL,分取乙酸乙酯层液,滤过。滤液水浴挥干,残渣用甲醇 1 mL 使溶解,加入 0.6 g 氧化铝拌样,加入中性氧化铝柱(200~300 目,6 g),用 40% 甲醇 100 mL 洗脱,收集洗脱液,用旋转蒸发仪挥干,残渣用甲醇 1 mL 溶解,作为供试品溶液。依次制得 3 批供试品溶液。同法制备缺黄芪总皂苷的阴性样品。称取黄芪甲苷对照品,用甲醇溶解制成  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照

品溶液。分别吸取上述溶液各 5  $\mu\text{L}$ , 点于同一硅胶 G 板上, 以氯仿-甲醇-水 (20:7:2) 的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干。喷 10% 硫酸乙醇溶液, 晾干, 105  $^{\circ}\text{C}$  烘至斑点清晰。供试品溶液色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同的褐色斑点, 阴性样品无干扰。

## 2.6 含量测定

**2.6.1 色谱条件** 色谱柱 Dikma ODS 十八烷基键合硅胶柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相乙腈 (A)-0.07%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (B), 梯度洗脱 (0 ~ 35 min, 15% ~ 27% A; 35 ~ 55 min, 27% ~ 35% A); 流速 1.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ , 紫外检测波长 270 nm, 进样量 10  $\mu\text{L}$ , 见图 1。



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性;

1. 朝藿定 A; 2. 朝藿定 B; 3. 朝藿定 C; 4. 淫羊藿苷

图 1 参芪益智组分工药的 HPLC

**2.6.2 对照品溶液的制备** 分别精密称定朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 与淫羊藿苷对照品适量, 加甲醇配制成 416.0, 400.0, 736.0, 320.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的混合对照溶液, 即得。

**2.6.3 供试品溶液的制备** 称取组分工药 (过五

号筛) 约 0.2 g, 置于 100 mL 量瓶中, 加适量 70% 甲醇, 超声助溶解, 定容至刻度。振摇, 过滤, 取续滤液过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 即得。

**2.6.4 阴性对照溶液的制备** 按组分工药处方比例制成不含淫羊藿总黄酮的阴性样品, 按供试品溶液制备的方法制备阴性对照溶液。

**2.6.5 标准曲线的制定** 称取朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 与淫羊藿苷对照品溶液适量, 加甲醇制成不同质量浓度的混合对照品溶液, 进行液相色谱测定, 按上述色谱条件测定峰面积, 并以峰面积 (Y) 对混合对照品溶液浓度 (X) 进行线性回归。结果如表 1, 表明它们的线性关系良好。

**2.6.6 精密度试验** 精密吸取混合对照品溶液, 重复进样 5 次, 测得朝藿定 A、B、C 与淫羊藿苷的峰面积 RSD 分别为 0.11%, 0.12%, 0.14%, 0.17%, 表明仪器精密度良好。

**2.6.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 分别在 0, 3, 6, 12, 24 h 进样, 结果测得样品中朝藿定 A、B、C 与淫羊藿苷的峰面积 RSD 分别为 1.4%, 1.7%, 2.0%, 1.9% ( $n=5$ ), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

表 1 线性回归方程

成分	回归方程	$r$	线性范围 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	检测限 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
朝藿定 A	$Y = 13.901X + 30.276$	0.999 7	5.2 ~ 416.0	2.6
朝藿定 B	$Y = 17.838X - 80.899$	0.999 5	5.0 ~ 400.0	3.3
朝藿定 C	$Y = 18.204X + 16.883$	0.999 9	9.2 ~ 736.0	3.0
淫羊藿苷	$Y = 21.627X - 49.101$	0.999 7	4.0 ~ 320.0	2.6

**2.6.8 重复性试验** 取同一批组分工药 5 份, 分别按供试品溶液的制备方法制备, 进样分析 4 种黄酮成分的含量, 测得朝藿定 A、B、C 以及淫羊藿苷的平均含量分别为 7.80, 9.42, 21.76, 26.21  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , RSD 均 < 2.0% ( $n=5$ )。结果表明该色谱方法的重复性良好。

**2.6.9 加样回收率试验** 称定已知含量的同一批组分工药约 0.1 g, 6 份, 等比例 (1:1) 分别加入相应的朝藿定 A、B、C 以及淫羊藿苷对照品, 按供试品溶液制备与测定方法平行试验, 表 2 显示供试品溶液中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 与淫羊藿苷的平均回收率分别为 99.49%, 99.64%, 99.53%, 99.06%, RSD 均 < 3% ( $n=6$ )。

**2.6.10 样品含量测定** 取 6 批次组分工药, 按供试品溶液制备与测定方法平行试验, 结果测得样品

表 2 芪益智组分中药中 4 种成分加样回收率试验 (n=6)

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
朝藿定 A	0.792	0.810	1.602	100.10	99.49	1.93
	0.784	0.810	1.586	99.06		
	0.789	0.810	1.598	97.23		
	0.786	0.810	1.583	98.43		
	0.792	0.810	1.596	99.23		
	0.782	0.810	1.615	102.90		
朝藿定 B	0.954	0.975	1.915	98.58	99.64	1.69
	0.945	0.975	1.927	100.80		
	0.951	0.975	1.913	98.66		
	0.947	0.975	1.925	100.20		
	0.955	0.975	1.906	97.51		
朝藿定 C	0.942	0.975	1.911	102.10		
	2.213	2.220	4.494	102.70	99.53	2.38
	2.191	2.220	4.363	97.82		
	2.206	2.220	4.406	99.09		
	2.197	2.220	4.383	98.43		
	2.215	2.220	4.367	96.95		
淫羊藿苷	2.184	2.220	4.454	102.20		
	2.659	2.680	5.265	97.22	99.06	2.70
	2.633	2.680	5.353	101.50		
	2.651	2.680	5.258	97.27		
	2.641	2.680	5.376	102.10		
	2.662	2.680	5.225	95.65		
	2.625	2.680	5.322	100.60		

中朝藿定 A, B, C 与淫羊藿苷的平均含量分别为 7.82, 9.45, 21.81, 26.18 mg·g<sup>-1</sup>, RSD < 2.4% (n=6)。

### 3 讨论

虽然药典等记载了此次研究相关组分的薄层鉴别方法<sup>[9-10]</sup>, 但是那些并不是针对参芪益智组分中药。由于相关成分的干扰, 使得有些组分在相同条

件下不能被很好地鉴别, 尤其是黄芪总皂苷的鉴别, 阴性干扰较大。

在供试品溶液 TLC 色谱中, 与人参皂苷 Re 对照品相应位置处斑点清晰, 而与人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和 Rg<sub>1</sub> 对照品相应位置处斑点较浅, 这可能与它们在参芪益智组分中药中的含量有关。采用人参总皂苷 Rb<sub>1</sub>, Re 的鉴别方法不能把 Rg<sub>1</sub> 与供试品完全分离, 通过 D101 型大孔吸附树脂对皂苷类化合物吸附富集, 并梯度洗脱, 分离纯化样品。

### [参考文献]

[1] 林丽, 晋玲, 李应东, 等. 当归干、鲜品中游离阿魏酸和总阿魏酸含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 94.

[2] 傅希颀, 李守民, 王婷婷, 等. 天麻素对老年痴呆动物模型的抗氧化作用及其机制[J]. 解剖学报, 2010, 41(4): 485.

[3] 宋剑, 王超, 李知遥, 等. 淫羊藿总黄酮抗老年痴呆化学成分研究[J]. 中国现代中药, 2009, 11(8): 23.

[4] 李向高. 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的药理作用研究[J]. 吉林农业大学学报, 2004, 26(6): 649.

[5] 陈新梅. 抗老年痴呆药物研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2011, 20(3): 30.

[6] 宋志斌, 朱成琳, 师方园, 等. 人参皂苷 Re 体外抗氧化能力及其对血清剥夺神经细胞作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 225.

[7] 郝小燕, 肖海涛, 叶兰, 等. 一种治疗老年痴呆的药物及其制备方法: 中国, 201110321418.9 [P]. 2012-02-01.

[8] 郝小燕, 官志忠, 肖海涛, 等. 治疗老年痴呆的中药制剂及其制备方法: 中国, 200810300977.X [P]. 2008-09-24.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 8.

[10] 苗明三, 李振国. 现代实用中药质量控制技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 398.

[责任编辑 顾雪竹]