

养精种玉颗粒的定性定量方法研究

王婴¹, 张婧², 王岩^{2*}, 马红霞³

(1. 广东药学院医药化工学院, 广东 中山 528458;

2. 广东药学院中药学院, 广州 510006; 3. 广州医学院第一附属医院, 广州 510120)

[摘要] 目的: 建立养精种玉颗粒的定性定量方法。方法: 采用薄层色谱法对制剂中的白芍、当归、山茱萸进行鉴别; 采用 HPLC 法测定芍药苷的含量。结果: 薄层色谱斑点清晰, 阴性对照无干扰; 芍药苷进样量在 60.56 ~ 605.6 ng 与峰面积的线性关系良好 ($r=0.9996$), 平均回收率 99.2% (RSD 1.5%)。结论: 建立的方法简便、准确、重复性好, 可用于该制剂的质量控制。

[关键词] 养精种玉颗粒; 鉴别; 含量测定; 芍药苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0076-03

[doi] 10.11653/syfyj2013150076

Study on Qualitative and Quantitative Methods of Yangjingzhongyu Granules

WANG Ying¹, ZHANG Jing², WANG Yan^{2*}, MA Hong-xia³

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering,

Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China;

2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

3. First Affiliated Hospital to Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the qualitative and quantitative methods for Yangjingzhongyu Granules. **Method:** Radix Paeoniae Alba, Angelica sinensis and Fructus corni in the preparation were identified by TLC, and the content of paeoniflorin was determined by HPLC. **Result:** The TLC spots were clear without interference of the other constituents in the preparation. The linear range of paeoniflorin was 60.56-605.6 ng ($r=0.9996$). The average recovery was 99.2% (RSD 1.5%). **Conclusion:** The method is easy, accurate and reproducible. It can be used for quality control of the preparation.

[Key words] Yangjingzhongyu Granules; identification; assay; paeoniflorin

养精种玉颗粒由白芍、熟地、当归、山茱萸 4 味药材组成, 处方来源于清代《傅青主女科》, 具有补肾壮水、养血填精、固阴补精、养血敛阴等功效, 用于

治疗不孕不育症, 为广州医学院第一附属医院的院内制剂^[1-2]。本文采用 TLC 法对制剂中白芍、当归、山茱萸进行了鉴别, 采用 HPLC 建立了芍药苷的含量测定方法, 为养精种玉颗粒的质量控制提供参考。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪、SPD-20A 紫外检测器(日本岛津), BP-211D 型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司), DL-120A 型超声波清洗器(上海之信仪器有限公司); 芍药苷(批号 110736-200732)、马钱苷(批号 111640-200503)、白芍(批号 120905-200508)、当归(批号 120927-200613)、山茱萸(批号 121495-200702)均购于中国药品生物制品检定所; 薄层层析硅胶 G(青岛海洋化

[收稿日期] 20121002(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273786); 广东省科技计划项目(粤科规划字[2011]97号); 中山市科技计划项目(2009H019)

[第一作者] 王婴, 硕士, 实验师, 从事药物新剂型与质量控制研究, Tel: 020-39352169, E-mail: 1248322680@qq.com

[通讯作者] *王岩, 博士, 教授, 从事药物新剂型与质量控制研究, Tel: 020-39352169, E-mail: gdpwuy@126.com

工有限公司),乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

2.1.1 白芍 取养精种玉颗粒 2 g,加水 20 mL 使溶解,用水饱和正丁醇振摇提取 3 次,每次 20 mL,合并正丁醇提取液,水洗 3 次,每次 10 mL,弃去水液,正丁醇液蒸干,残渣加乙醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液^[3],再取缺白芍的阴性样品,同法制成阴性对照溶液。取白芍对照药材 1 g,加乙醇 10 mL,超声处理 15 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 2 mL 使溶解,作为对照药材溶液。另取芍药苷对照品,加乙醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。吸取上述 4 种溶液各 4 μL ,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇(4:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 香草醛硫酸溶液,在 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品及对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。

2.1.2 当归 取养精种玉颗粒 2 g,加水 10 mL 溶解,用乙酸乙酯振摇提取 2 次,每次 10 mL,合并乙酸乙酯液,蒸干,残渣加乙醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液;再取缺当归的阴性样品,同法制成阴性对照溶液;另取当归对照药材 0.5 g,加乙酸乙酯 10 mL,超声处理 15 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 2 mL 使溶解,作为对照药材溶液。吸取供试品溶液和阴性对照溶液 4 μL 、对照药材溶液 2 μL ,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 板上,以正己烷-乙酸乙酯(9:1)为展开剂,展开,取出,晾干,在紫外光灯 365 nm 下检视^[4]。结果在供试品色谱中,在与当归对照药材色谱相应的位置上显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无干扰。

2.1.3 山茱萸 取养精种玉颗粒 2 g,加乙醇 10 mL,超声处理 15 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液;取缺山茱萸的阴性样品,同法制成阴性对照溶液;取山茱萸对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液;另取马钱苷对照品,加乙醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液;吸取上述 4 种溶液各 4 μL ,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-乙醇-冰醋酸(50:10:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 香草醛硫酸溶液,在 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰^[5]。供试品色谱中,在与对照品及对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 Dikma Diamonsil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液(12:88),检测波长 230 nm,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,流速 1.0 mL \cdot min⁻¹^[6-8]。理论板数按芍药苷峰计算不低于 2 000。

2.2.2 线性关系考察 精密称取芍药苷对照品 7.57 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,精密量取 1 mL,置 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,配制成 30.28 mg \cdot L⁻¹ 的对照品溶液。精密量取 1,2,3,5 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。精密吸取 20 μL ,进样测定,以峰面积对进样量(ng)进行线性回归,得线性方程 $Y = 1200.6X (r = 0.9996)$,表明芍药苷在 60.56 ~ 605.6 ng 线性关系良好。

2.2.3 供试品溶液的制备 取养精种玉颗粒 5 g,研细,取粉末 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加稀乙醇 25 mL,精密称定质量,超声处理(功率 100 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,加稀乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

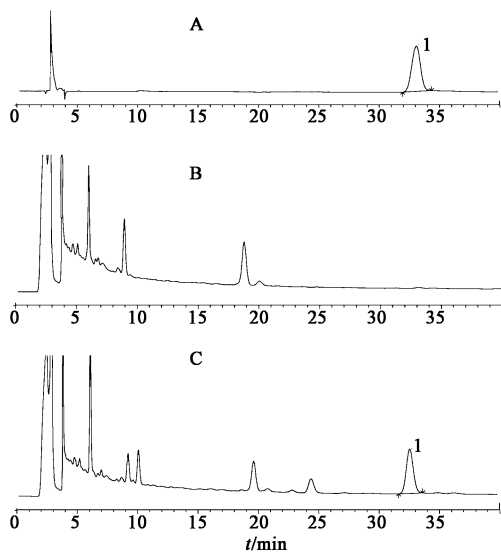
2.2.4 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 20 μL ,连续进样 6 次,记录峰面积,结果峰面积的 RSD 1.0%,表明本法精密度良好。

2.2.5 专属性试验 取缺白芍阴性样品,按 2.2.3 项下方法制备阴性对照溶液。分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液 20 μL ,进样测定,结果在与对照品色谱相应的位置上,无明显其他吸收峰出现,表明处方中其他药味对测定无干扰,见图 1。

2.2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,于 0,1,2,4,6,12 h 分别进样测定,记录峰面积,结果 RSD 1.0%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 取同一批样品(批号 110105),按 2.2.3 项下方法,平行制备 6 份供试品溶液,分别进样测定,记录峰面积并计算含量,结果芍药苷平均含量为 1.187 mg \cdot g⁻¹ (RSD 2.9%),表明重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取已知含量(批号 110105,芍药苷含量 1.187 mg \cdot g⁻¹)的样品 6 份,每份约 0.25 g,精密称定,精密加入 0.285 2 g \cdot L⁻¹ 芍药苷对照品溶液 1 mL。按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进样测定,计算回收率,结果平均回收率为 99.2% (RSD 1.5%),表明该法的准确度良好,见表 1。



A. 对照品; B. 阴性对照; C. 供试品; 1. 芍药苷

图 1 芍药苷含量测定 HPLC 图谱

表 1 芍药苷加样回收率试验

样品含量 /mg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
0.293 3	0.285 2	0.573 1	98.11		
0.294 2	0.285 2	0.580 3	100.3		
0.296 9	0.285 2	0.576 8	98.14	99.2	1.5
0.292 7	0.285 2	0.571 1	97.62		
0.293 0	0.285 2	0.576 7	99.47		
0.294 1	0.285 2	0.583 0	101.3		

2.2.9 样品测定 取养精种玉颗粒 3 批(批号分别为 110323, 110324, 110325), 按 2.2.3 项下方法制成供试品溶液, 依上述色谱条件测定, 测得芍药苷含量分别为 1.25, 1.22, 1.21 mg·g⁻¹。

3 讨论

在供试品的前处理考察中, 比较了不同的提取溶剂(甲醇、50% 甲醇、稀乙醇)、溶剂用量(25, 50, 100 mL)、超声时间(15, 30, 60 min)对试验结果的影响, 结果表明, 加稀乙醇 25 mL、超声处理 30 min 时, 芍药苷含量最高。

在薄层色谱条件的确定时, 进行了影响因素研究^[9]。分别考察了不同温度(4, 25, 40 ℃)、湿度(32%, 65%, 88%)、点样量(2, 4, 6 μL)对分离效果

的影响。结果表明, 不同温度、湿度条件下主斑点均显色清晰、斑点集中无拖尾, 最佳点样量为 4 μL。

在含量测定方法的建立时, 比较了 Phenomenex Luna, Dikma Diamonsil (2), Dikma Platisil 不同色谱柱对结果的影响, 含量 RSD 2.7%; 比较了波长变化 ±5 nm 对结果的影响, RSD 1.5%; 比较了流速变化 ±20%, 即流速 0.8, 1.2, 1.0 mL·min⁻¹ 对结果的影响, RSD 2.7%; 比较了流动相比率的微小变化, 即乙腈-0.1% 磷酸溶液比例为 11.5: 88.5, 12.5: 87.5, 12: 88 对结果的影响, RSD 2.8%; 比较了柱温变化 ±5 ℃, 即柱温为 20, 30, 25 ℃ 对结果的影响, RSD 2.9%^[10]。上述结果表明本法具有良好的耐用性。

[参考文献]

- [1] 丁涛, 李晶, 马红霞. 养精种玉汤对过多雄激素诱导卵泡胰岛素抵抗的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 141.
- [2] 王岩, 马红霞, 黄妙嫦, 等. 养精种玉汤正丁醇部位的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药, 2010, 32(9): 1461.
- [3] 王朝宇, 白秀云, 白海玉, 等. 丹芪祛瘀止痛颗粒质量标准的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 76.
- [4] 李艳, 胡红艳, 黄秋明. 白术护肝合剂中当归、白术、芍药的薄层色谱鉴别[J]. 中医学报, 2012, 27(3): 343.
- [5] 王桂红, 周松迪, 张骏, 等. 苗山消渴康复颗粒质量标准研究[J]. 中药材, 2012, 35(3): 482.
- [6] 姜建民, 夏正燕, 冯瑛. 糖足颗粒质量标准研究[J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(8): 714.
- [7] 浦锦宝, 郑军献, 梁卫青, 等. 白芍提取物中芍药苷及总皂苷的含量测定[J]. 中国中医药科技, 2011, 18(4): 326.
- [8] 何建雄, 赖小平, 魏刚, 等. HPLC 测定银翘柴桂汤中绿原酸、芍药苷、黄芩苷[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 48.
- [9] 王岩, 陈沛玲, 白玉春, 等. 野牡丹止痢片的薄层鉴别研究[J]. 今日药学, 2011, 21(1): 30.
- [10] 田明, 李伟, 孙宏宇, 等. 高效液相色谱测定条件的耐用性试验研究[J]. 中医学报, 2010, 38(3): 77.

[责任编辑 顾雪竹]