

## 滋阴生发颗粒质量标准

喻明洁,陈青竹,戴青,廖勇,向荣凤,蔡永清,陈勇川\*

(第三军医大学西南医院药剂科,重庆 400038)

**[摘要]** 目的:建立滋阴生发颗粒的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)对方中制何首乌、枸杞子、丹参进行定性鉴别,采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)对方中二苯乙烯苷进行含量测定。结果:在 TLC 中能检出制何首乌、枸杞子、丹参的特征斑点,阴性样品无干扰。二苯乙烯苷在 0.190 5~1.143 2  $\mu\text{g}$  与峰面积积分呈良好线性关系( $r=0.999\ 9$ );平均加样回收率为 98.60%,RSD 2.28% ( $n=9$ )。结论:方法简单、快速、精密度高、重复性好,所建标准可用于滋阴生发颗粒质量控制。

**[关键词]** 滋阴生发颗粒;质量标准;薄层色谱;反相高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0143-03

**[doi]** 10.11653/syjf2013170143

## Quality Standard of Ziyin Shengfa Granules

YU Ming-jie, CHEN Qing-zhu, DAI Qing, LIAO Yong, XIANG Rong-feng, CAI Yong-qing, CHEN Yong-chuan\*  
(Department of Pharmacy, Southwest Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the quality standard for Ziyinshengfa Granules. **Method:** The thin-layer chromatograph (TLC) method was used to identify Radix Polygoni Multiflori Preparata, Fructus Lycii, Radix Salviae Miltiorrhizae and the content of 2, 3, 4, 5'-tetahyd roxy stilbence-2-*O*- $\beta$ -*D*-glucoside was determined by RP-HPLC. **Result:** The characteristic spots of Radix Polygoni Multiflori Preparata, Fructus Lycii, Radix Salviae Miltiorrhizae appeared in the TLC, and there was no interference for the negative sample. The linear range of 2, 3, 4, 5'-tetahyd roxy stilbence-2-*O*- $\beta$ -*D*-glucoside was 0.190 5-1.143 2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $r=0.999\ 9$ ). The average recovery rates were 98.60% (RSD 2.28%) ( $n=9$ ). **Conclusion:** This method is simple, rapid, precise and reproducible, thus it can be used for the quality control of Ziyinshengfa Granules.

**[Key words]** Ziyinshengfa Granules; quality standard; TLC; RP-HPLC

滋阴生发颗粒由制何首乌、枸杞子、丹参等 7 味中药组成。经多年的临床实践证实,该药具有滋补肝肾、养血生发功效,临床上主要用于斑秃、脂秃等的治疗,疗效确切。方中药材均经水提后加入适量糊精制成颗粒。为了有效控制该制剂的质量,快速鉴别药材的真伪,笔者采用薄层色谱(TLC)对方中制何首乌、枸杞子、丹参等药材进行了定性鉴别。方中制何首乌为君药,且在方中占比例较大。制何首乌中的二苯乙烯苷,具有抗氧化清除自由基、

延缓衰老、增强免疫、造血和改善心血管等药理作用<sup>[1-2]</sup>,故本实验采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法对二苯乙烯苷进行含量测定,对滋阴生发颗粒制剂质量进行控制,保证制剂生产的稳定性和药品的临床有效性。

### 1 材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),ZF-1 型紫外分析仪(上海精科实业有限公司),BT124S 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司),KQ-400KDE 型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),电热恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司),98-1-B 型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司),硅胶 G 薄层板(青岛海浪硅胶干燥剂厂,规格 10~20 cm)。

2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷

**[收稿日期]** 20120709(013)

**[第一作者]** 喻明洁,中药师,硕士,从事药物分析研究, Tel: 13350321204, E-mail: jeanyz0829@yahoo. cn

**[通讯作者]** \*陈勇川,副主任药师,硕士,从事药物分析研究, Tel: 023-68765495, E-mail: zwmeyc@163. com

对照品(批号 110844-201109,以 95.4% 计算含量), 大黄素对照品(批号 110756-200110), 枸杞子对照药材(批号 1072-200002), 丹参对照药材(批号 120923-200610)均由中国药品生物制品检定所提供, 滋阴生发颗粒(批号 120112, 110915, 111010, 110914, 110809, 110716, 110525, 110323)由西南医院中药制剂室提供; 乙腈为色谱纯, 甲醇、乙酸乙酯、乙醚、乙醇等其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

## 2 定性鉴别

**2.1 制何首乌的 TLC 鉴别<sup>[3-4]</sup>** 取本品 5.0 g, 研细, 加甲醇 20 mL, 水浴上微沸回流 30 min, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 10 mL 使溶解, 加入乙醚 20 mL 萃取, 分取乙醚层, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取除制何首乌药材以外处方中其余药材制成阴性对照溶液。另取大黄素对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 溶液, 作为对照品溶液。吸取上述溶液各 10  $\mu$ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚(60~90  $^{\circ}$ C)-醋酸乙酯-甲酸(9:3:0.1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 氢氧化钾乙醇溶液。日光下检视, 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应位置上, 显相同颜色斑点, 阴性样品无干扰。

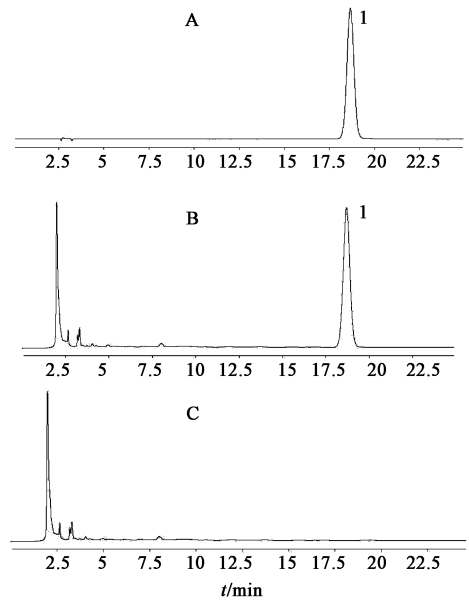
**2.2 枸杞子的 TLC 鉴别<sup>[5-6]</sup>** 取本品 5.0 g, 研细, 加热水 20 mL, 溶解, 放冷, 滤过, 滤液以乙酸乙酯萃取 2 次, 每次 25 mL, 合并乙酸乙酯液, 浓缩至 1 mL 作为供试品溶液。取枸杞子对照药材 0.2 g, 加水 20 mL, 煎煮 15 min, 放冷, 滤过, 滤液以乙酸乙酯萃取 2 次, 每次 25 mL, 合并乙酸乙酯萃取液, 浓缩至 1 mL 作为对照药材溶液。取除枸杞子药材以外处方中的其余药材制成阴性对照溶液。吸取上述溶液各 10  $\mu$ L, 分别点于同一高效硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-三氯甲烷-甲酸(4:1:0.5)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光下(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, 显相同颜色荧光斑点, 阴性样品无干扰。

**2.3 丹参的 TLC 鉴别<sup>[7-8]</sup>** 取本品 5.0 g, 研细, 加水 20 mL 溶解, 滤过, 滤液用乙酸乙酯提取 2 次, 每次 20 mL, 合并乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取丹参对照药材 0.5 g, 加水 30 mL 煎煮 30 min, 水煎液过滤, 滤液用乙酸乙酯提取 2 次, 每次 20 mL, 合并乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为对照药材溶液。取除丹参药材以外处方中其余药材制成阴性对照溶液。吸取上述溶液各 10  $\mu$ L, 分别点于同一硅胶 G

薄层板上, 以氯仿-丙酮-甲酸(6:2.5:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光下(365 nm)检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。阴性样品无干扰。

## 3 含量测定

**3.1 色谱条件<sup>[9-10]</sup>** Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相乙腈-水(16:84), 流速 1.2 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 检测波长 320 nm, 柱温 20  $^{\circ}$ C, 进样量 5  $\mu$ L, 见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 二苯乙烯苷

图 1 滋阴生发颗粒 HPLC

**3.2 对照品溶液制备** 精密称取经五氧化二磷真空减压干燥 36 h 二苯乙烯苷对照品适量, 加稀乙醇制得 1 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 摇匀, 即得。

**3.3 供试品溶液的制备** 取滋阴生发颗粒研细, 取约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入稀乙醇 30 mL, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用稀乙醇溶液补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

**3.4 阴性样品溶液制备** 按处方制备缺少制何首乌的阴性样品, 按 3.2 项下方法制备, 即得。

**3.5 线性关系考察** 精密称取二苯乙烯苷对照品 5.03 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加入稀乙醇溶液溶解并稀释至刻度, 密塞, 摇匀。从中精密移取 5 mL 置 10 mL 量瓶中, 用稀乙醇稀释定容至刻度, 密塞, 摇匀, 即得浓度为 1.006 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的二苯乙烯苷对照品溶液, 作为贮备液。分别吸取 2, 4, 6, 8, 10, 12  $\mu$ L 注入色谱仪, 记录色谱峰, 测定峰面积。以进样量( $\mu$ g) 为横坐标 X, 峰面积为纵坐标 Y, 得二苯乙烯苷的回

归方程为  $Y = 2\,952.806\,6X - 13.093\,3$  ( $r = 0.999\,9$ ), 表明二苯乙烯苷在  $0.190\,5 \sim 1.143\,2\ \mu\text{g}$  呈良好线性关系。

**3.6 精密度试验** 精密吸取同一对照品溶液  $5\ \mu\text{L}$ , 按上述色谱条件连续进样 6 次, 测定结果二苯乙烯苷峰面积 RSD  $0.28\%$ , 精密度良好。

**3.7 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液  $5\ \mu\text{L}$ , 于常温下放置 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 后进样, 测定二苯乙烯苷峰面积 RSD  $1.83\%$ , 结果表明供试品 24 h 内稳定。

**3.8 重复性试验** 精密称取精密称取滋阴生发颗粒(批号 110323)共 6 份, 按 3.3 项下方法制成供试品溶液。按上述色谱条件进行测定, 测得二苯乙烯苷含量平均值为  $3.162\ \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD  $0.83\%$ , 表明重复性良好。

**3.9 加样回收率试验** 分别精密称取滋阴生发颗粒(批号 110525), 研细, 取约  $0.5\ \text{g}$ , 精密称定, 共 9 份, 精密加入二苯乙烯苷对照品, 使成高、中、低 3 浓度, 按供试品的制备与测定方法, 在上述色谱条件下, 进行含量测定, 并计算回收率。结果详见表 1。

表 1 二苯乙烯苷加样回收率

样品质量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.500 3	1.461 6	0.76	2.239 7	102.38		
0.500 7	1.462 7	0.76	2.232 4	101.27		
0.500 0	1.460 7	0.76	2.202 2	97.56		
0.501 2	1.818 2	0.95	2.740 1	97.04		
0.500 4	1.815 3	0.95	2.751 8	98.58	98.60	2.28
0.499 4	1.811 7	0.95	2.720 5	95.67		
0.499 7	2.184 3	1.14	3.322 2	99.82		
0.500 4	2.187 3	1.14	3.313 1	98.75		
0.500 2	2.186 5	1.14	3.284 4	96.31		

**3.10 样品含量测定** 分别精密称取 6 个不同批号滋阴生发颗粒, 按 3.3 项下方法制成供试品, 按 3.1 的色谱条件下进行测定, 分别进样对照品溶液和供试品溶液, 按外标法计算供试品中二苯乙烯苷含量, 见表 2。

表 2 二苯乙烯苷含量测定 mg/袋

批号	含量	平均含量
120112	26.78	34.52
110915	36.28	
111010	33.23	
110914	34.91	
110809	32.73	
110716	43.21	

## 4 讨论

曾采用《中国药典》方法对制何首乌进行 TLC 鉴别, 但分离效果不佳; 查阅文献且经过反复实验, 发现用甲醇提取干扰物质要少些; 当展开剂为石油醚( $60 \sim 90\ ^\circ\text{C}$ )-乙酸乙酯, 且发现薄层板上物质有些拖尾故加点甲酸防止拖尾。最后确定展开剂为石油醚( $60 \sim 90\ ^\circ\text{C}$ )-乙酸乙酯-甲酸( $9:3:0.1$ )。结果令人满意, 可操作性强、重复性较好。

枸杞子的鉴别方法, 笔者参考《中国药典》, 只是根据实验的实际情况将展开剂的比例做了适当调整最后确定展开剂为乙酸乙酯-三氯甲烷-甲酸( $4:1:0.5$ ), 结果理想。

在初试过程中, 参考了《中国药典》何首乌、制何首乌的测定二苯乙烯苷的条件但效果不是很好, 峰型不好, 有拖尾现象, 且阴性有干扰; 后来通过查阅文献发现以乙腈-水( $16:84$ )为流动相时, 被测物分离好, 杂质干扰少, 故选择其为流动相, 保留时间也适宜, 且阴性无干扰。

以上方法简单、快速、精密度高、重复性好, 所建标准可用于滋阴生发颗粒的质量控制。

## [参考文献]

- [1] 苏玮, 郭群. 何首乌的现代药理研究概况[J]. 中草药, 1997, 28(2): 119.
- [2] 胡存华, 赵立波, 王晓敏, 等. 二苯乙烯苷增强正常血管内皮细胞抗氧化作用研究[J]. 医药导报, 2007, 26(2): 138.
- [3] 程新萍, 吉金燕, 杨悦. 乌贞胶囊质量标准研究[J]. 西北药学, 2011, 26(1): 33.
- [4] 高晓霞, 严寒静, 梁从庆. 同采集地制何首乌薄层色谱指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(5): 4.
- [5] 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: 232.
- [6] 肖新建. 芪参益智胶囊质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 80.
- [7] 曾振兴, 顾雪竹. 心安宁胶囊质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 87.
- [8] 陈登丰. 复方银杏通脉胶囊的制备及质量控制[J]. 光明中医, 2012, 27(3): 593.
- [9] 唐哲, 夏爱军, 刘莉, 等. 高效液相色谱法测定健脑胶囊中二苯乙烯苷含量[J]. 解放军药学学报, 2011, 279(1): 61.
- [10] 邢加慧, 汪勤双, 叶晶莹, 等. 不同产地何首乌有效成分的含量研究[J]. 海峡药学, 2012, 24(1): 29.

[责任编辑 顾雪竹]