

· 化学与分析 ·

## 射干地龙颗粒质量标准

辛蕊华\*, 谢家声, 郑继方, 罗永江

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所/农业部兽药创制重点实验室  
/甘肃省新兽药工程重点实验室/甘肃省中兽药工程技术研究中心, 兰州 730050)

**[摘要]** 目的:建立射干地龙颗粒的质量标准,为其质控提供依据。方法:采用薄层色谱法对组方中药材进行定性鉴别,采用高效液相色谱法测定组方中次野鸢尾黄素的含量。结果:确定了制剂中射干、地龙、北豆根及五味子的薄层鉴别方法,在选定的薄层色谱条件下,色谱斑点分离较好;采用  $C_{18}$  反相柱,以乙腈-0.2% 磷酸水为流动相,检测波长为 266 nm,建立了本制剂中次野鸢尾黄素的含量测定方法,得到其线性为  $0.3422 \sim 86.60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 回归方程为  $A = 51639C + 7222$  ( $R^2 = 0.9995$ ,  $n = 10$ )。平均回收率为 99.04%, RSD 1.27%。结论:所建立的方法简便、准确、专属性强、重复性好,可有效地控制射干地龙颗粒的质量。

**[关键词]** 射干地龙颗粒; 薄层鉴别; 高效液相色谱法; 质量标准; 次野鸢尾黄素

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0057-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013130057

## Quality Standard of Shegan Dilong Granules

XIN Rui-hua\*, XIE Jia-sheng, ZHENG Ji-fang, LUO Yong-jiang

(Key Laboratory of New Animal Drug Project, Gansu Province/Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutical Development, Ministry of Agriculture/Engineering & Technology Research Center of Traditional Chinese Veterinary Medicine of Gansu Province/Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences, Lanzhou 730050, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a quality standard of Shegan Dilong Granules for scientific evaluation and effective control of its quality to provide a reliable basis. **Method:** TLC was used for identifying the herbs in the formula and the content determination of irisfloreantin by HPLC was also revised. **Result:** The method was established to distinguish *Belamcanda sinensis*, pberetima, rhizome Menispermi and *Schisandra chinensis*. The spots in the TLC were clear, and with no interference from negative control. The HPLC separation was performed on  $C_{18}$  column, the mixture of acetonitrile-0.2% phosphoric acid water was used as mobile phase. The detection wavelength was set at 266 nm, irisfloreantin was linear in the range of  $0.3422 \sim 86.60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; regression equation was  $A = 51639C + 7222$  ( $R^2 = 0.9995$ ,  $n = 10$ ); the average recovery was 99.8%, RSD 1.50%. **Conclusion:** The method was simple and accurate with a good reproducibility, and can be used for the control of Shegan Dilong Granules.

**[Key words]** Shegan Dilong Granules; TLC; HPLC; quality standard; irisfloreantin

**[收稿日期]** 20130129(018)

**[基金项目]** “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD34B03);公益性行业(农业)科研专项(201303040-18)

**[通讯作者]** \*辛蕊华, 硕士, 助理研究员, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel: 0931-2115263, E-mail: xinruihuamys@126.com

射干地龙颗粒由射干、地龙、北豆根、五味子、桔梗、乌梅与甘草 7 味中药组成,是在《金匱要略》射干麻黄汤的基础上<sup>[1]</sup>,从中医整体观出发,辨证加减并通过临床疗效试验筛选后研制成的具有镇咳化痰、宣肺平喘的新药,现已申报国家三类新药。为了更好的控制产品的质量,本研究采用薄层鉴别法对

处方中射干、地龙、北豆根、五味子进行了鉴别。由于射干是本方的主要药物,次野鸢尾黄素是射干中的主要标示性成分。<sup>[2]</sup>采用高效液相色谱法建立了次野鸢尾黄素的含量测定方法,作为检测和控制射干地龙颗粒的含量指标,为该制剂的质量控制提供依据。

## 1 材料

Waters 2695 型高效液相色谱仪,Waters 2995 型二极管阵列检测器, GL Sciences Inertsil ODS-3 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),赛多利斯 ALC110.4 型分析天平,DESAGE AS30 型全自动薄层色谱点样仪,KQ5200DE 型超声波清洗仪(上海昆山超声波仪器有限公司)。

次野鸢尾黄素对照品(批号 111557-200602)、五味子甲素对照品(批号 110764-201010)、射干对照药材(批号 120994-201005)、地龙对照药材(批号 120987-200906)、北豆根对照药材(批号 120977-200303)、五味子对照药材(批号 120922-201108),以上对照品均购自中国食品药品检定研究院;射干地龙颗粒(自制,批号 100301,100302,100303),硅胶 G 板及 GF<sub>254</sub>板(10 cm × 20 cm,青岛海洋化工有限公司生产),乙腈为色谱纯试剂(德国默克),其余试剂均为分析纯(天津致远化工公司),水用去离子水。

## 2 方法和结果

### 2.1 薄层鉴别

**2.1.1 射干<sup>[2]</sup>** 取本品 10 g,研细,加甲醇 30 mL,加热回流 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 30 mL 使溶解,用三氯甲烷振摇提取 2 次,每次 25 mL,弃去三氯甲烷液,再用乙酸乙酯振摇提取 2 次,每次 30 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。取射干对照药材 1 g,加水 30 mL,煎煮 2 次,每次 15 min,合并煎煮液,浓缩至 30 mL,用三氯甲烷振摇提取 2 次,每次 25 mL,按供试品制备方法处理,制成对照药材溶液。照薄层色谱法(2010 年版《中国药典》一部附录 VIB)试验。吸取供试品溶液和对照药材溶液各 3 μL,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 GF<sub>254</sub>薄层板上,以三氯甲烷-丁酮-甲醇(3:1:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯(254 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显示相同颜色的斑点。

**2.1.2 地龙<sup>[2]</sup>** 取本品 10 g,研细,加水 30 mL,搅拌均匀,5 000 r·min<sup>-1</sup>离心,取上清液作为供试品溶

液。取地龙对照药材 1 g,加水 30 mL,加热至沸,放冷,5 000 r·min<sup>-1</sup>离心,取上清液作为对照药材溶液。照薄层色谱法(2010 年版《中国药典》一部附录 VIB)试验。吸取供试品溶液和对照药材溶液各 3 μL,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以正丁醇-冰醋酸-水(4:1:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以茚三酮试液,105 ℃加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显示相同颜色的紫红色斑点。

**2.1.3 北豆根<sup>[2]</sup>** 取本品 10 g,研细,加乙酸乙酯 30 mL 及浓氨试液 1.5 mL,回流 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙酸乙酯 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。取北豆根对照药材 1 g,加水 30 mL,煎煮 2 次,每次 15 min,合并煎煮液,浓缩至干,加乙酸乙酯 15 mL 及浓氨溶液 0.5 mL,按供试品制备方法处理,制成对照药材溶液。照薄层色谱法(2010 年版《中国药典》一部附录 VIB)试验。吸取供试品溶液和对照药材溶液各 4 μL,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-浓氨试液(9:1:1滴)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以碘化铯钾试液。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显示相同颜色的橙色斑点。

**2.1.4 五味子<sup>[2]</sup>** 取本品 10 g,研细,加三氯甲烷 30 mL,加热回流 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加三氯甲烷 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。取五味子甲素对照品,加三氯甲烷制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。另取五味子对照药材 1 g,加水 30 mL,煎煮 2 次,每次 15 min,合并煎煮液,浓缩至干,加三氯甲烷 30 mL,按供试品制备方法处理,制成对照药材溶液。照薄层色谱法(2010 年版《中国药典》一部附录 VIB)试验。吸取供试品溶液、对照品溶液及对照药材溶液各 4 μL,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 GF<sub>254</sub>薄层板上,以石油醚(30~60 ℃)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯(254 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品和对照药材色谱相应的位置上,显示相同颜色的斑点。

### 2.2 含量测定

**2.2.1 色谱条件的选择** GL Sciences Inertsil ODS-3 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.2% 磷酸溶液(39:61),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 266 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。理论塔板数按次野鸢尾黄素计算不低于 8 000。

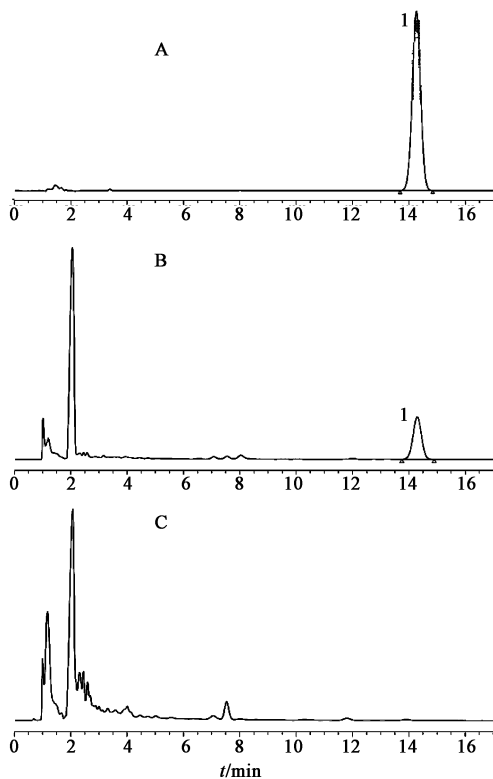
**2.2.2 对照品溶液的配制** 精密称取适量次野鸢

尾黄素对照品 10.95 mg,置于 50 mL 量瓶中加入甲醇充分溶解并定容,得质量浓度为  $219 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品储备溶液,摇匀,待用。

**2.2.3 供试品溶液的配制**<sup>[3]</sup> 取颗粒约 5 g,研细,精密称取 1.00 g,加水 20 mL,混匀后 100 Hz 功率下超声 30 min,  $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清液置分液漏斗中,用 10% HCl 调 pH 2.0,用乙酸乙酯-三氯甲烷(2:1)提取 2 次,每次 15 mL,合并乙酸乙酯-三氯甲烷液,用 15 mL 5% 氨水洗涤,氨水洗涤液再用 15 mL 乙酸乙酯-三氯甲烷(2:1)提取 1 次,合并乙酸乙酯-三氯甲烷液,减压蒸干,残渣加甲醇适量溶解,定容至 2 mL,摇匀过  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜,取续滤液作为供试品溶液。

**2.2.4 阴性对照溶液的配制** 取不含射干的阴性颗粒约 5 g,研细,精密称取 1.00 g,按照 2.2.3 项处理样品,得阴性对照品溶液。

**2.2.5 系统适应性试验** 分别吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照品溶液各  $10 \mu\text{L}$ ,按 2.2.1 项色谱条件进行测定,记录色谱峰。结果样品中次野鸢尾黄素与相邻杂质峰分离良好,阴性样品在相应位置无吸收,不干扰本品的测定(图 1)。



A. 对照品; B. 射干地龙颗粒样品; C. 阴性对照

1. 次野鸢尾黄素

图 1 射干地龙 HPLC

**2.2.6 标准曲线的绘制** 精密称取次野鸢尾黄素对照品 10.95 mg,置于 50 mL 量瓶中,加入色谱甲醇稀释至刻度,制成  $219 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品储备溶液,进行梯度稀释,得到一系列浓度的对照品溶液,按照规定的色谱条件测定峰面积,每个浓度连续测定 3 次,求平均值,以峰面积(A)对次野鸢尾黄素质量浓度(C)进行线性回归,得到线性回归方程为  $A = 51\ 639C + 7\ 222$  ( $R^2 = 0.999\ 5, n = 10$ )。结果表明,次野鸢尾黄素在  $0.342\ 2 \sim 86.60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  有良好的线性关系。

**2.2.7 精密度试验** 精密吸取  $5.475 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的次野鸢尾黄素对照液  $10 \mu\text{L}$ ,按 2.2.1 项色谱条件重复进样 5 次,记录峰面积,结果 RSD 0.23%,表明此方法精密度较高。

**2.2.8 重复性试验** 取 100301 批次射干地龙颗粒约 20 g,研细,取 6 份,每份 1.00 g,精密称定,按供试品溶液制备方法处理,按照上述色谱条件测定,记录峰面积。结果平均值为  $0.837 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 1.27%,表明样品重复性良好。

**2.2.9 稳定性试验** 精密吸取新配制的样品溶液 ( $5.475 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 测定 1 次,结果 RSD 0.81%,表明样品溶液室温放置 24 h 内质量稳定。

**2.2.10 加样回收率试验** 取已知含量的同一批号射干地龙颗粒样品 9 份(批号 100303,含量为  $0.083\ 5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ),每份取约 0.5 g,研细,加水 20 mL,分别精密加入  $219 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的次野鸢尾黄素对照品溶液 0.15, 0.18, 0.225 mL,即加入次野鸢尾黄素分别为 0.032 9, 0.039 4, 0.049 3 mg,混匀后按供试品溶液处理方法处理样品,  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,取续滤液按照上述色谱条件测定,计算,测得次野鸢尾黄素的平均回收率为 99.04%, RSD 1.27%,说明该方法准确可信(表 1)。

### 3 讨论

根据《中国药典》中对各味药材的鉴别方法,通过试验,确定了射干、地龙、北豆根及五味子的薄层鉴别方法,这些方法专属性强,阴性无干扰,可以作为处方中药材的定性控制。在射干的鉴别中,起初参考《中国药典》2010 年版一部射干【鉴别】(2)项下方法试验,试验发现在射干阴性样品在射干对照药材色谱相应的位置有干扰,因此考虑采用其他处理方法。通过试验筛选,选择参考 2010 年版《中国药典》一部中小儿咽扁颗粒的质量标准<sup>[2]</sup>,先用三氯甲烷提取后再用乙酸乙酯萃取,点样于 GF<sub>254</sub> 板

表 1 次野鸢尾黄素加样回收率试验

| No. | 取样量<br>/g | 样品<br>含量<br>/mg | 加入量<br>/mg | 检出量<br>/mg | 回收率<br>/% | 平均值<br>/% | RSD<br>/% |
|-----|-----------|-----------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 1   | 0.506     | 0.042 3         | 0.032 9    | 0.075 0    | 99.39     |           |           |
| 2   | 0.503     | 0.042 0         | 0.032 9    | 0.074 6    | 99.09     |           |           |
| 3   | 0.502     | 0.041 9         | 0.032 9    | 0.074 8    | 100.00    |           |           |
| 4   | 0.507     | 0.042 3         | 0.039 4    | 0.081 2    | 98.73     |           |           |
| 5   | 0.509     | 0.042 5         | 0.039 4    | 0.081 3    | 98.48     | 99.04     | 1.27      |
| 6   | 0.504     | 0.042 1         | 0.039 4    | 0.082 2    | 101.78    |           |           |
| 7   | 0.504     | 0.042 1         | 0.049 3    | 0.090 5    | 98.17     |           |           |
| 8   | 0.500     | 0.041 8         | 0.049 3    | 0.090 2    | 98.17     |           |           |
| 9   | 0.501     | 0.041 8         | 0.049 3    | 0.089 9    | 97.57     |           |           |

上,样品分离较好且阴性样品无干扰,因此将其作为射干的鉴别方法,方中地龙、北豆根及五味子的薄层鉴定依据《中国药典》2010 版一部中对应的方法项下进行鉴别。

该方中射干为主药,其中含有大量的黄酮、异黄酮类化合物,包括野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素及鸢尾苷等<sup>[4-6]</sup>,其中黔产射干中还含有丰富的挥发油<sup>[7]</sup>。研究表明,射干提取物在体内与体外具有抑菌作用<sup>[8]</sup>,对豚鼠离体平滑肌具有解痉作用<sup>[9]</sup>,以及具有较好的镇咳、祛痰及治疗哮喘的功效<sup>[10-12]</sup>。次野鸢尾黄素是射干中的标示性成分,但通过实验,发现《中国药典》一部中射干项下含量测定方法并不适合射干地龙颗粒中次野鸢尾黄素的含量测定。因此通过试验摸索,采用反相高效液相色谱法,流动相为乙腈-0.2% 磷酸水(39:61),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 266 nm,样品在此色谱条件下系统适应性较好,精密度较高,结果准确可信,因此作为含量测定的色谱条件。

[参考文献]

[1] 刘鑫,邹中兰,梅全慧,等.射干麻黄汤对慢性哮喘大鼠缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 、血管内皮生长因子表达及气道重塑的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(8):190.

[2] 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,2010:61,92,113,267,488.

[3] 罗世榕,朱国理.高效液相色谱法测定咽速平喷雾剂中次野鸢尾黄素的含量[J].海峡药学,2010,22(6):70.

[4] 邱鹰昆,高玉白,徐碧霞,等.射干的化学成分研究[J].中国药学杂志,2006,41(15):1133.

[5] 李英娜,张国刚,毛德双,等.射干化学成分的研究[J].中南药学,2007,5(3):222.

[6] 冯传卫,沈刚,陈海生.中药射干的化学成分分析[J].第二军医大学学报,2010,31(10):1120.

[7] 杨胜杰,刘明川,梁娜,等.黔产射干挥发油化学成分的 GC-MS 分析[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(7):316.

[8] 秦文艳,赵金明,齐越,等.射干提取物体内体外抑菌作用的研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):147.

[9] 甘雨,乔敏,张宏,等.射干提取物含药血清对豚鼠离体气管平滑肌收缩功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(7):164.

[10] 李国信,齐越,秦文艳,等.射干提取物止咳祛痰药理实验研究[J].实用中医内科杂志,2008,22(2):3.

[11] 陈照南,惠萍,宋天云,等.射干麻黄汤治疗小儿咳嗽变异性哮喘的系统评价及 Meta 分析[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(19):1.

[12] 王红珊,李国豪,曹毅敏,等.射干麻黄汤联合孟鲁司特治疗咳嗽变异性哮喘 86 例[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(15):273.

[责任编辑 顾雪竹]