

益髓生血颗粒质量标准研究

沈蒙¹, 刘起华², 康玉玲¹, 徐静静¹, 韦灵玉¹, 王和东¹, 吴志奎², 张玉杰^{1*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

[摘要] 目的: 建立益髓生血颗粒的质量标准。方法: 采用 TLC 对方剂中的山茱萸, 制何首乌, 炙黄芪, 当归, 补骨脂和砂仁进行定性鉴别; 用 HPLC 测定益髓生血颗粒中马钱苷的含量。结果: 薄层图谱斑点清晰, 阴性对照无干扰; 马钱苷在 0.13 ~ 0.78 μg 呈良好的线性关系, 平均回收率为 101.3%, RSD 为 2.02%。结论: 建立的方法简便, 准确, 重复性好, 精密度高, 可用于益髓生血颗粒的质量控制。

[关键词] 益髓生血颗粒; 薄层鉴别; 马钱苷; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)22-0047-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110920.1431.007 [网络出版时间] 2011-09-20 14:31

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110920.1431.007.html>

Study on Quality Control Standard of Yisui Shenxue Granules

*SHEN Meng¹, LIU Qi-hua², KANG Yu-ling¹, XU Jing-jing¹,
WEI Ling-yu¹, WANG He-dong¹, WU Zhi-kui², ZHANG Yu-jie^{1*}*

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2. Guang'an Men Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method for quality control of Yisui Shenxue granules. **Method:** The herb medicines including medical dogwood, prepared fleecflower root, milkvetch root, chinese angelica, malaytea scurfpea fruit and villous amomrum fruit were identified by TLC and the content of loganin in Yisui Shenxue granules was determined by RP-HPLC. **Result:** The herbs can be effectly identified by TLC. Loganin was linear in the range of 0.13-0.78 μg , and the average recovery was 101.3% (RSD 2.02%). **Conclusion:** The method is simple and rapid which can be used for the quality control of Yisui Shenxue granules.

[Key words] Yisui Shenxue granules; TLC; loganin; HPLC

益髓生血颗粒来源于临床的有效方剂, 由山茱萸、制何首乌、熟地黄、炙黄芪、党参、当归等 11 味药物组成, 具滋阴补肾、益髓生血、补气健脾的功效, 用

于地中海贫血症的治疗^[1]。在保证疗效的前提下, 为了便于患者服用, 对药材提取工艺进行研究, 制备成颗粒剂。为了有效地控制制剂的内在质量, 确保其临床疗效, 对其进行质量标准的研究。由于该处方中药味较多, 干扰较大, 定性鉴别和含量测定的干扰因素较多。经试验选择方中的山茱萸、制何首乌、炙黄芪、当归、补骨脂和砂仁 6 味进行了薄层定性鉴别, 并建立了用 HPLC 测定君药山茱萸主要标志成分马钱苷含量方法。

1 仪器与试剂

LC-20AT 型高效液相色谱仪(四元泵、自动进样

[收稿日期] 20110616(001)

[基金项目] 国家重大新药创制科技重大专项(2009ZX09301-005-2-7)

[第一作者] 沈蒙, 助理实验师, 从事中药质控研究, Tel: 010-84738639, E-mail: shme44@sohu.com

[通讯作者] * 张玉杰, 博士, 教授, 博士生导师, 从事药物制剂新技术及体内外评价研究, Tel: 010-84738618, E-mail: zhyj227@126.com

器、UV 检测器和色谱工作站,日本岛津公司);H660 25 型超声提取器(功率 100 W,频率 40 kHz,无锡电器设备厂),熊果酸(110742-200517)、大黄素(110756-200110)、黄芪甲苷(110781-200613)、补骨脂素(110739-200814)、异补骨脂素(110738-200511)、乙酸龙脑酯(110759-200604)、马钱苷(111640-200604,供含量测定用)对照品均购自中国药品生物制品检定所,益髓生血颗粒自制。中性氧化铝(100~200 目,国药集团化学试剂有限公司),四氢呋喃、乙腈、甲醇为色谱醇,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 定性鉴别

2.1 山茱萸的 TLC 鉴别 取本品 10 g,研细,加乙醚 20 mL,超声处理 10 min,滤过,滤液挥干,残渣加石油醚(30~60℃)浸泡 2 次,每次 15 mL,倾出石油醚,残渣加无水乙醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。按处方配比称取缺山茱萸的其他药材,制备阴性对照样品,并按供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。另取熊果酸对照品,加无水乙醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VIB)试验,吸取上述 2 种溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-冰醋酸(12:4:0.5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸-乙醇溶液,热风吹至斑点显色清晰。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。

2.2 制何首乌的 TLC 鉴别 取本品取本品 4 g,研细,加甲醇 50 mL,超声处理 30 min,放冷,滤过,取滤液 10 mL,蒸干,残渣加水 10 mL 使溶解,加盐酸 1 mL,置水浴中加热 20 min,立即冷却,加乙醚提取 3 次,每次 20 mL,分取乙醚液,挥干,残渣加甲醇 0.5 mL 使溶解,作为供试品溶液。按处方配比称取缺制何首乌的其他药材,制备阴性对照样品,并按供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。另取大黄素对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VIB)试验,吸取供试品溶液 10 μ L,对照品溶液 2 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲醇(10:1:0.1)为展开剂,展开,取出,晾干,分别置日光及紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品及对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点或荧光斑点。

2.3 灸黄芪的 TLC 鉴别^[2] 取本品 15 g,研细,加甲醇 50 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 25 mL 使溶解,用乙醚振摇提取 2 次,每次 20 mL,弃去乙醚液,用水饱和的正丁醇提取 2 次,每次 20 mL,合并正丁醇提取液,用氨试液提取 2 次,每次 40 mL,弃去氨液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,过中性氧化铝柱(100~200 目,5 g,内径 1 cm),用 40% 甲醇 50 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。按处方配比称取缺灸黄芪的其他药材,制备阴性对照样品,并按供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。另取黄芪甲苷对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VIB)试验,吸取供试品溶液 15 μ L,对照品溶液 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2)10℃以下放置的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸-乙醇溶液,热风吹至斑点显色清晰。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。

2.4 当归的 TLC 鉴别^[3] 取本品 5 g,研细,加石油醚(60~90℃)20 mL,超声处理 15 min,滤过,挥干,残渣加无水乙醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。按处方配比称取缺当归的其他药材,制备阴性对照样品,并按供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。另取当归对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VIB)试验,吸取上述各溶液 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚-乙酸乙酯-甲酸(15:2:1)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,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,显相同颜色的荧光斑点。

2.5 补骨脂的 TLC 鉴别 取 2.2 项下的药渣,挥去乙醚,加乙酸乙酯 50 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙酸乙酯 4 mL 使溶解,作为供试品溶液。按处方配比称取缺补骨脂药材的其他药材,制备阴性对照样品,并按供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。另取补骨脂素、异补骨脂素对照品,加乙酸乙酯制成每 1 mL 含 2 mg 的混合溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VIB)试验,吸取供试品溶液 5 μ L,对照品溶液 2 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石

油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(2:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%氢氧化钠乙醇溶液,热风吹至斑点显色清晰,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品及对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。

2.6 砂仁的TLC鉴别 取本品4 g,研细,加乙醇10 mL冷浸48 h,滤过,滤液作为供试品溶液。按处方配比称取缺砂仁的其他药材,制备阴性对照样品,并按供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。另取乙酸龙脑酯对照品加乙醇制成每1 mL含10 mg的溶液,作为对照品溶液。再取砂仁对照药材2 g,按供试品溶液制备方法制备成对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010年版一部附录VIB)试验,吸取对照品和对照药材溶液2 μL,供试品溶液10 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯(22:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸试液,105℃烘至斑点显色清晰。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。

3 含量测定^[4]

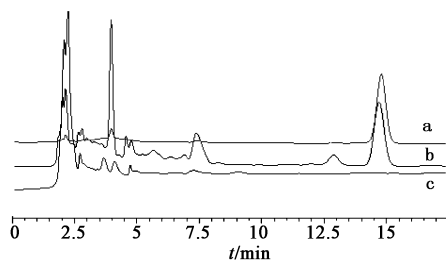
3.1 对照品溶液的制备 精密称取马钱苷对照品适量,加甲醇制成0.065 g·L⁻¹的溶液,作为对照品溶液。

3.2 供试品溶液的制备 取本品粉末1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率100 W 频率40 kHz)1 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过。精密量取续滤液10 mL,置中性氧化铝柱(100~200目,6 g,内径1 cm,干法装柱)上,用40%甲醇60 mL洗脱,收集流出液及洗脱液,蒸干,残渣加甲醇适量溶解,并转移至10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取滤液作为供试品溶液。

3.3 阴性对照溶液的制备 按处方配比称取缺山茱萸药材的其他药材,制备阴性对照样品,然后按3.2项下操作方法制备阴性对照溶液。

3.4 色谱条件和系统适用性 Agilent ZORBAX SB-C₁₈色谱柱(4.5 mm×150 mm,5 μm),流动相四氢呋喃-乙腈-甲醇-0.05%磷酸溶液(1:5:4:90),检测波长240 nm,柱温25℃,流速1.0 mL·min⁻¹,进样量10 μL,理论板数>3 000。在此条件下马钱苷与其他成分达到有效分离,分离度R>1.5,阴性对照无

干扰,见图1。



a. 马钱苷对照品; b. 供试品; c. 阴性对照

图1 益髓生血颗粒HPLC

3.5 线性关系的考察 分别精密吸取马钱苷对照品溶液(0.065 g·L⁻¹)2,4,6,8,10,12 μL,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积。以马钱苷进样量(μg)为横坐标(X),马钱苷峰面积积分为纵坐标(Y),得回归方程为 $Y = 1\ 602\ 300 X - 1\ 051.5$ ($r = 0.999\ 9$),马钱苷在0.13~0.78 μg与峰面积呈良好的线性关系。

3.6 精密度试验 精密吸取马钱苷对照品溶液10 μL,注入液相色谱仪,按上述条件试验,重复进样6次,测定峰面积,马钱苷峰面积RSD 0.09%,表明仪器精密度良好。

3.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于配制后0,1,2,4,6,8 h测定峰面积,计算其RSD 0.67%,表明供试品溶液在8 h内稳定。

3.8 重复性试验 取同一批号样品(批号101120),精密称定6份,按正文含量测定项下操作,测定峰面积积分值,计算马钱苷含量为2.27 mg·g⁻¹,RSD<3.00%,表明方法重复性良好。

3.9 回收率试验 采用加样回收试验方法,取已知含量样品(2.27 mg·g⁻¹,批号101120)0.5 g,共6份,精密称定,分别精密加入马钱苷对照品溶液5 mL,同3.2方法操作,测定峰面积积分值,计算回收率,结果平均回收率为101.3%,RSD 2.02%。

3.10 样品测定 分别取6个批次的样品,按3.2项下制备,按上述色谱条件测定,外标法计算马钱苷含量,结果见表1。

4 讨论

马钱苷最大吸收波长为236,274 nm^[5],此处方中干扰成分较多,马钱苷难以实现基线分离,故尝试采用420 nm波长处测定,虽失去了部分灵敏度,但分离效果良好。所建立的HPLC对益髓生血颗粒

桔梗的 HPLC-ELSD 指纹图谱研究

李文庭¹, 祝明^{2*}, 马临科², 程勇³

(1. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2. 浙江省食品药品检验所, 杭州 310004; 3. 浙江天草生物制品有限公司, 浙江安吉 313300)

[摘要] 目的: 建立桔梗高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)指纹图谱的分析方法, 研究不同产地桔梗药材的质量。方法: 采用 HPLC-ELSD, Welch Materials XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 甲酸溶液, 梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, ELSD 检测器漂移管温度 50 °C, 氮气流速 1.2 L·min⁻¹。结果: 建立了 12 批桔梗的 HPLC-ELSD 指纹图谱, 共找到 16 个共有峰, 并确定了桔梗皂苷 E, 桔梗皂苷 D3 和桔梗皂苷 D。结论: 该方法具有良好的重复性和稳定性, 为有效控制桔梗药材的质量提供了依据。

[关键词] 桔梗; 指纹图谱; 高效液相色谱-蒸发光检测法; 桔梗皂苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0050-04

Fingerprint Analysis of Platycodonis Radix by HPLC-ELSD

LI Wen-ting¹, ZHU Ming^{2*}, MA Lin-ke², CHENG Yong³

(1. College of Pharmacy, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China;
2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China;
3. Zhejiang Skyherb Ingredients Co., Ltd, Anji 313300, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method of fingerprint analysis for Platycodonis Radix by high performance liquid chromatography-evaporative light-scattering detector (HPLC-ELSD). **Method:** HPLC was performed on a Welch Materials XB-C₁₈ analytical column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with gradient elution of

[收稿日期] 20110525(006)

[第一作者] 李文庭, 硕士研究生, 从事中药有效成分及质量标准研究, Tel: 0571-86459414, E-mail: liwenting05@163.com

[通讯作者] * 祝明, 主任中药师, 研究生导师, 从事中药有效成分及质量标准研究, Tel: 0571-86459425, E-mail: zhumingd@hotmail.com

表 1 马钱苷含量测定 mg·g⁻¹

No	批号	马钱苷
1	100820	2.27
2	101120	1.89
3	101123	1.81
4	101125	1.90
5	110506	1.24
6	110519	1.71

中马钱苷含量控制方法, 重复性和准确性好, 经对多批中试产品检验, 结果表明可以有效的控制益髓生血颗粒的质量。

[参考文献]

[1] 柴立民, 陈惠民, 吴志奎. 益髓生血方对珠蛋白生成障

碍性贫血患者红系特异反式作用因子基因表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(3): 197.

[2] 冯筠, 毛春芹, 苏丹, 等. 三棱颗粒的质量标准研究[J]. 中成药, 2007, 29(5): 707.

[3] 施钧瀚, 牛晓静, 孙明明. 慢肝康丸的质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16): 42.

[4] 单玉荣. HPLC 法测定六味地黄口服液口中马钱苷的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20(6): 44.

[5] 赵洪芝, 孟宪生, 叶挺祥, 等. 双波长融合 HPLC 测定六味地黄丸中马钱苷、丹皮酚的含量[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(19): 2182.

[责任编辑 蔡仲德]