

· 论著 ·

复方汉防己颗粒中野黄芩苷的定性鉴别和含量测定

张淑瑜, 徐建江, 于燕莉, 毕云生, 赵文静, 刘倩, 刘同琪 (济南军区总医院药剂科, 山东 济南 250031)

[摘要] 目的 建立对复方汉防己颗粒中来源于半枝莲的有效成分野黄芩苷的定性鉴别和含量测定方法。方法 采用薄层色谱法对野黄芩苷进行定性鉴别, 采用高效液相色谱法进行含量测定。结果 薄层色谱图斑点显色清晰, 阴性对照无干扰; 含量测定野黄芩苷在 22.4~156.8 μg/ml 质量浓度范围内与峰面积呈良好线性关系, $r=0.9996$ ($n=5$), 平均加样回收率为 97.79%, $RSD=0.32%$ ($n=6$)。结论 所建立方法专属性强、重现性好, 可作为复方汉防己颗粒的质量控制方法。

[关键词] 复方汉防己颗粒; 半枝莲; 野黄芩苷; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

[中图分类号] R975; R927

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2016)03-0245-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.03.013

Identification and determination of scutellarin in compound granule tetrandra

ZHANG Shuyu, XU Jianjiang, YU Yanli, BI Yunsheng, ZHAO Wenjing, LIU Qian, LIU Tongqi (Department of Pharmacy, Jinan Military General Hospital, Jinan 250031, China)

[Abstract] **Objective** To develop the methods for identification and determination of scutellarin in compound Granule Tetrandra. **Methods** A TLC method was used to identify quality for scutellarin, and a HPLC method was used to determine the content of scutellarin. **Results** The spot was clear in TLC identification without interference of negative control. The sample size of scutellarin had a good linear relationship with peak area $r=0.9996$ ($n=5$) when ranged from 22.4~156.8 μg/ml, with the average recovery rate 97.79% ($RSD=0.32%$, $n=6$). **Conclusion** The method is simple, with good specificity and reproducibility, which can be used as the quality control for this preparation.

[Key words] compound granule tetrandra; sculellaria barbata; scutellarin; TLC; HPLC

复方汉防己颗粒为济南军区总医院自制制剂 [批准文号: 济联制字(2000)BP01102(01)号], 由防己、丹参、半枝莲、茵陈等 8 味中药组成, 该药对急慢性肝炎、肝硬化、脂肪肝等病症有明显疗效。组方中臣药半枝莲为唇形科黄芩属植物, 该药味辛、苦、寒, 归肺、肝、肾经, 具有清热利湿、行气活血、平肝解毒、益气滋阴等功效^[1,2], 在临床上常与其它中药联合制成制剂或熬制成汤药用于肝病的治疗, 尤其对慢性乙型肝炎有明显治疗作用^[3]。半枝莲中主要有效成分为黄酮类化合物, 在目前已分离得到的 27 个黄酮类化合物中含量最多的是野黄芩苷, 达到 1%^[4]。野黄芩苷具有抗血小板凝集及改善血循环、增加血流量等作用, 是半枝莲抗菌消炎作用的主要活性成分之一^[5]。为了更好地对复方汉防己颗粒进行质量控制, 本文采用薄层色谱法对野黄芩苷进行定性鉴别, 用高效液相色谱法对其进行含量测定, 为保证该

制剂质量标准提供实验数据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 BS124S 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), AS3120 型超声波清洗仪(天津奥特赛思有限公司), ZF-A 型紫外透射反射分析仪(上海骥辉科学分析仪器有限公司), UV-2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司), Agilent-1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司, 四元泵、DAD 检测器)。

1.2 试剂 复方汉防己颗粒(济南军区总医院药剂科制剂室, 批号 20131012, 20140309, 20140526), 野黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110842-200605), 半枝莲对照药材(山东宏济堂医药有限公司中药厂, 批号 130903), 硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工分厂), 甲醇为一级色谱纯(天津市四友精细化学品有限公司), 水为二次反渗透纯化水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别^[6-8] 取本品适量, 研细, 称取粉末

[作者简介] 张淑瑜, 博士, 副主任药师. Tel: (0531)51666862; E-mail: zhangshuyu77@163.com

[通讯作者] 徐建江, 硕士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 医院药学. Tel: (0531)51666291; E-mail: xjj8605@163.com

1.0 g,用60 ml石油醚(60~90℃)置索氏提取器中,加热回流提取至提取液无色后弃去醚液,将样品吹干,再用80 ml甲醇继续提取至无色,将提取液放冷,转移至100 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,作为供试品溶液。另取半枝莲对照药材0.5 g,同法制得对照药材溶液。再取缺半枝莲药材的阴性样品0.5 g,同法制得阴性对照溶液。精密称定野黄芩苷对照品适量,加甲醇制成0.5 mg/ml的对照品溶液。吸取上述4种溶液各2 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-正丁醇-甲酸(4.5:4:2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%三氯化铁乙醇溶液。供试品色谱中,在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上,显相同颜色斑点,阴性对照色谱相应位置不出现斑点。见图1。

2.2 野黄芩苷含量测定^[9]

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Zorbax SB C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水-醋酸(32:63.5:4.5);流速:0.8 ml/min;柱温:30℃;检测波长:335 nm;进样量:10 μl。

2.2.2 溶液的制备

①对照品溶液 取野黄芩苷对照品适量,精密称定,加甲醇制得质量浓度为0.224 mg/ml的对照品储备溶液。②供试品溶液 取本品适量,研细,过三号筛,取约2.0 g,精密称定,置索氏提取器中,用60 ml石油醚(60~90℃)加热回流提取至提取液无色后,弃去醚液,将样品吹干,再用80 ml甲醇继续提取至无色后,将提取液放冷,转移至100 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。③阴性对照溶液 按处方比例(缺

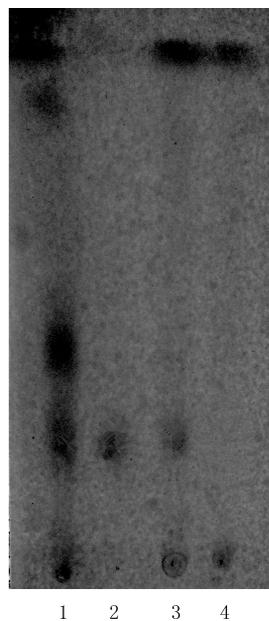


图1 野黄芩苷 TLC 图谱

1.半枝莲对照药材;2.野黄芩苷对照品;
3.供试品;4.阴性对照

半枝莲药材)制备阴性对照品,取约2.0 g,按供试品溶液制备方法,制成阴性对照溶液。

2.2.3 专属性试验

分别精密吸取上述3种溶液各10 μl,按“2.2.1”项下色谱条件测定,记录色谱图,见图2。野黄芩苷峰峰形良好,保留时间约为10 min,阴性对照溶液在与野黄芩苷峰相应位置上无吸收峰出现,表明其他组分对测定无干扰。以外标法计算含量,理论塔板数按野黄芩苷峰计算不低于3 000,分离度>1.5,符合要求。

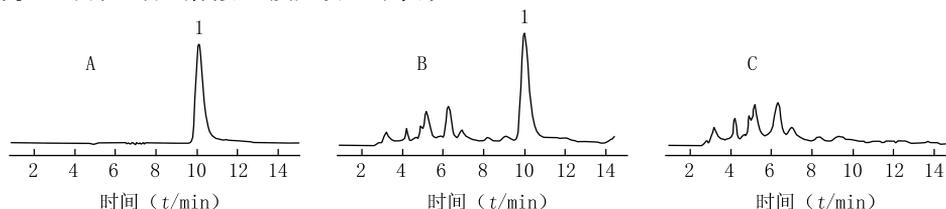


图2 野黄芩苷 HPLC 色谱图

A.野黄芩苷对照品溶液;B.供试品溶液;C.阴性对照溶液;1.野黄芩苷

2.2.4 线性关系考察

精密量取野黄芩苷对照品储备溶液各1.0、3.0、5.0、7.0、9.0 ml,分别置10 ml量瓶中,用甲醇定容至刻度,0.45 μm微孔滤膜过滤,分别精密吸取10 μl,注入液相色谱仪,按“2.2.1”项下色谱条件测定峰面积。以野黄芩苷峰峰面积(Y)为纵坐标,质量浓度(X, μg/ml)为横坐标,绘制标准曲线。得线性方程为:Y=10 840.1 X-201.72, r=0.999 6 (n=5),结果表明野黄芩苷在22.4~156.8 μg/ml质量浓度范围内与峰面积呈良

好线性关系。

2.2.5 精密度试验

精密量取野黄芩苷对照品溶液10 μl,连续进样5次,记录峰面积,结果野黄芩苷峰峰面积的RSD=0.49% (n=5),表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(批号20140526)各10 μl,分别在0、2、4、6、8、12 h测定峰面积,野黄芩苷峰峰面积的RSD=0.65% (n=6),表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批样品(批号20140526)6份,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取10 μ l进样,测定峰面积,计算野黄芩苷的平均含量为0.355 0 mg/g, RSD=0.69% ($n=6$),结果表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 称取已知含量样品(批号:20140526,野黄芩苷含量为0.355 0 mg/g)6份,每份约1 g,精密加入浓度为224 μ g/ml的对照品储备溶液各1.5 ml,按“2.2.2”项下方法制得供试品溶液,进样测定并计算平均加样回收率为97.79%, RSD=0.32%。结果见表1。

表1 复方汉防己颗粒中野黄芩苷的加样回收率试验结果($n=6$)

| 取样量(m/g) | 样品含量(m/mg) | 加入量(m/mg) | 测得量(m/mg) | 回收率(%) | 平均回收率(%) | RSD(%) |
|----------|------------|-----------|-----------|--------|----------|--------|
| 1.014 1 | 0.360 0 | 0.336 0 | 0.682 2 | 98.02 | | |
| 1.032 3 | 0.366 5 | 0.336 0 | 0.686 2 | 97.68 | | |
| 1.025 2 | 0.363 9 | 0.336 0 | 0.680 7 | 97.25 | 97.79 | 0.32 |
| 1.056 3 | 0.375 0 | 0.336 0 | 0.697 1 | 98.04 | | |
| 1.061 8 | 0.376 9 | 0.336 0 | 0.696 4 | 97.69 | | |
| 1.040 5 | 0.369 4 | 0.336 0 | 0.691 5 | 98.03 | | |

2.2.9 样品含量测定 取3批次的样品,按“2.2.2”项下方法制得供试品溶液,分别精密吸取该溶液各10 μ l,进样,测定,计算平均含量为0.349 9 mg/g。结果见表2。

表2 复方汉防己颗粒中野黄芩苷含量测定结果($n=3$)

| 批号 | 含量(mg/g) | RSD(%) | 平均含量(mg/g) |
|----------|----------|--------|------------|
| 20131012 | 0.341 7 | 0.71 | |
| 20140309 | 0.352 9 | 0.83 | 0.349 9 |
| 20140526 | 0.355 0 | 0.69 | |

2.2.10 耐用性试验 取同一供试品溶液(批号:20140526)分别通过采用不同品牌色谱柱:①Zorbax SB C₁₈柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m);②SUNTEK C₁₈柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m);③SHIMAOZU C₁₈柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m)进行试验,三者色谱峰形均分离良好,含量测定结果基本一致,表明该法耐用性良好,比较择优后选择Zorbax SB C₁₈柱作为系统条件色谱柱。

3 讨论

3.1 检测波长的选择 以甲醇为溶剂配制浓度为5 μ g/ml的野黄芩苷对照品溶液,在紫外光200~

400 nm范围内进行扫描,结果溶液在335 nm处有最大吸收,因此确定335 nm为含量检测波长。见图3。

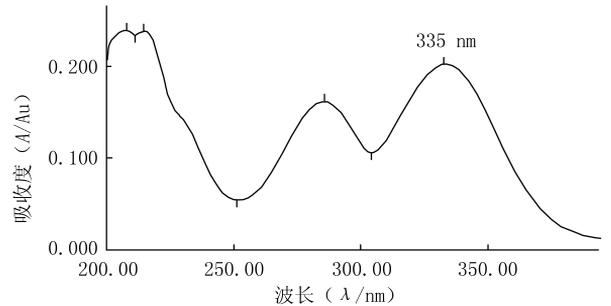


图3 野黄芩苷 UV 图

3.2 提取条件的优化 根据野黄芩苷的理化性质分别尝试了两种提取方法:①采用石油醚超声提取1 h后再用甲醇超声提取1 h;②采用索氏提取器先用石油醚除去脂溶性成分,再用甲醇提取1 h来制备供试品溶液。在相同色谱条件下分别进行含量测定,结果显示索氏回流提取样品测定色谱峰面积为3 070.8,而超声提取样品色谱峰面积为2 155.7,表明索氏提取效果优于超声提取。因此,为了能有效将样品中的野黄芩苷提取完全,故选择索氏提取方法进行样品的处理。

3.3 含量限度 含量测定是药物质量标准的关键质控指标。根据2010版《中国药典》,中药成方制剂含量限度应根据中药制剂实测结果与原料药材的含量情况确定。在半枝莲的现行质量标准中,规定按干燥品计野黄芩苷的含量应不得少于0.20%^[9]。本制剂处方中,半枝莲用量为125 g,制成1 000 g,按转移率为80%计算,可算出该制剂中野黄芩苷的理论折算含量限度为每1 g应不得少于0.2 mg。在本试验中,3批样品的野黄芩苷含量分别为0.341 7、0.352 9、0.355 0 mg/g,均高于理论折算值。这对复方汉防己颗粒中野黄芩苷含量限度的确定提供了数据支持,下一步需要进行大样本试验,从而确定其含量限度。

本试验建立的复方汉防己颗粒中野黄芩苷的定性鉴别和含量测定方法,操作简便,准确稳定,灵敏度高,专属性强,可为进一步完善复方汉防己颗粒的质量标准提供数据支持。

【参考文献】

[1] 彭献娜,刘艺华,刘亚林,等.半枝莲化学成分和药理活性研究进展[J].亚太传统医药,2014,10(17):63-64.
[2] 郑永红,韦晓瑜,龙继红.半枝莲的研究进展[J].中草药,2010,41(8):1406-1408.

- [3] 任 强. 半枝莲化学成分及药理作用研究进展[J]. 济宁医学院学报, 2014, 37(3): 157-159.
- [4] 栾连军, 王叶飞, 吴永江, 等. 半枝莲总黄酮中 4 种有效成分含量测定[J]. 浙江大学学报(医学版), 2011, 40(1): 23-26.
- [5] 高晓霞, 原红霞, 赵云丽, 等. HPLC 法测定半枝莲及其制剂热炎宁胶囊中野黄芩苷[J]. 中草药, 2007, 38(4): 56-57.
- [6] 唐 璐, 李 希, 易晓霞. 高效液相色谱法测定莲苓清热颗粒中野黄芩苷的含量[J]. 中药与临床, 2013, 4(3): 18-20.
- [7] 曾秋红. 半枝莲黄酮类化合物体外抗肿瘤活性的研究[J]. 海峡药学, 2011, 23(1): 137-139.
- [8] 鲁芹飞, 黄 松, 朱德全, 等. 仙慈丹的质量标准研究[J]. 中国药师, 2013, 16(11): 1644-1647.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 109-110.
- [收稿日期] 2014-12-01 [修回日期] 2015-03-23
[本文编辑] 顾文华

(上接第 240 页)

【参考文献】

- [1] Hulbert AJ. Thyroid hormones and their effects: a new perspective [J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2000, 75(4): 519-631.
- [2] Flynn RW, Bonellie SR, Jung RT, *et al.* Serum thyroid-stimulating hormone concentration and morbidity from cardiovascular disease and fractures in patients on long-term thyroxine therapy [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(1): 186-193.
- [3] La Vignera S, Vicari E, Tumino S, *et al.* L-thyroxin treatment and post-menopausal osteoporosis: relevance of the risk profile present in clinical history [J]. Minerva Ginecol, 2008, 60(6): 475-484.
- [4] 蔡定芳, 陈晓红, 刘彦芳, 等. 探讨阴中求阳与阳中求阴对谷氨酸单钠大鼠下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(7): 415-417.
- [5] Tan G, Zhu Z, Jing J, *et al.* Characterization of constituents in Sini decoction and rat plasma by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to time-of-flight mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr, 2011, 25(8): 913-924.
- [6] Guo L, Tan G, Liu P, *et al.* Three plasma metabolite signatures for diagnosing high altitude pulmonary edema [J]. Sci Rep, 2015, 5: 15126.
- [7] Wang M, Lamers RJ, Korthout HA, *et al.* Metabolomics in the context of systems biology: bridging traditional Chinese medicine and molecular pharmacology [J]. Phytother Res, 2005, 19(3): 173-182.
- [8] Wu S, Tan G, Dong X, *et al.* Metabolic profiling provides a system understanding of hypothyroidism in rats and its application [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55599.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 789.
- [10] Alzoubi KH, Gerges NZ, Aleisa AM, *et al.* Levothyroxin restores hypothyroidism-induced impairment of hippocampus-dependent learning and memory: Behavioral, electrophysiological, and molecular studies [J]. Hippocampus, 2009, 19(1): 66-78.
- [11] Tan G, Lou Z, Liao W, *et al.* Hydrophilic interaction and reversed-phase ultraperformance liquid chromatography TOF-MS for serum metabonomic analysis of myocardial infarction in rats and its applications [J]. Mol Biosyst, 2012, 8(2): 548-556.
- [12] Briere JJ, Favier J, Gimenez-Roqueplo AP, *et al.* Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 291(6): C1114-C1120.
- [13] Sjoberg S, Eriksson M, Nordin C. L-thyroxine treatment and neurotransmitter levels in the cerebrospinal fluid of hypothyroid patients: a pilot study [J]. Eur J Endocrinol, 1998, 139(5): 493-497.
- [14] Babenko NA. Long- and short-term effects of thyroxine on sphingolipid metabolism in rat liver [J]. Med Sci Monit, 2005, 11(5): Br131-138.
- [15] Xu Y. Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine: G protein-coupled receptors and receptor-mediated signal transduction [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1582(1-3): 81-88.
- [16] Wang L, Radu CG, Yang LV, *et al.* Lysophosphatidylcholine-induced surface redistribution regulates signaling of the murine G protein-coupled receptor G2A [J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(5): 2234-2247.
- [17] Zelinskaia NB. The significance of studying phospholipids in the diagnosis of hypothyroidism [J]. Vrach Delo, 1989, (5): 79-81.
- [18] Raffelt K, Moka D, Sullentrop F, *et al.* Systemic alterations in phospholipid concentrations of blood plasma in patients with thyroid carcinoma: an *in vitro* (31)P high-resolution NMR study [J]. NMR Biomed, 2000, 13(1): 8-13.
- [收稿日期] 2016-03-14 [修回日期] 2016-04-22
[本文编辑] 顾文华