

· 研究报告 ·

复方黑参颗粒质量标准研究

钟桂香, 严佳, 檀巧婷, 宋洪涛, 周欣 (福州总医院, 福建福州 350025)

[摘要] **目的** 建立复方黑参颗粒的质量标准。**方法** 采用 TLC 法对复方黑参颗粒中玄参和射干进行定性鉴别, 应用 HPLC 法同时测定肉桂酸、射干苷和次野鸢尾黄素的含量, 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A)-0.1% 磷酸 (B) 水溶液, 进行梯度洗脱; 柱温 30 ℃, 检测波长 270 nm; 流速 1.0 ml/min。**结果** 采用 TLC 法对玄参和射干进行定性鉴别具有良好的专属性, 阴性对照无干扰。肉桂酸、射干苷、次野鸢尾黄素分别在 16.22~113.57 μg/ml ($r=0.9998$)、48.19~337.34 μg/ml ($r=0.9998$)、16.40~114.80 μg/ml ($r=0.9999$) 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 平均加样回收率分别为 99.23%、98.82%、99.17%。**结论** 本实验建立的方法快速、简便、重复性好, 可用于复方黑参颗粒的质量标准控制。

[关键词] 复方黑参颗粒; 肉桂酸; 射干苷; 次野鸢尾黄素; 高效液相色谱法; 薄层色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)06-0543-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.06.015

Study on quality standard of compound Heishen granules

ZHONG Guixiang, YAN Jia, TANG Qiaoting, SONG Hongtao, ZHOU Xin (Fuzhou General Hospital, Fuzhou 350025, China)

[Abstract] **Objective** To establish a quality standard for compound Heishen granules. **Methods** Scrophulariae Radix and Belamcandae Rhizoma were identified by TLC. HPLC was used to determine the content of cinnamic acid, tectoridin and irisfloreintin. The HPLC was performed on a column of Kromasil-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase of acetonitrile (A)-0.1% hydrochloric acid (B) at a temperature 30 ℃. The detection wavelength was set at 270 nm and the flow rate at 1 ml/min. **Results** The TLC method had good specificity without interference from negative control. The calibration curve showed a good linear relationship within the range of 16.22-113.57 μg/ml for cinnamic acid ($r=0.9998$), 48.19-337.34 μg/ml for tectoridin ($r=0.9998$) and 16.40-114.80 μg/ml for irisfloreintin ($r=0.9999$). The average recoveries were 99.23%, 98.82%, 99.17%. **Conclusion** The established method is rapid, accurate and reproducible. It can be used in the quality control of compound Heishen granules.

[Key words] compound Heishen granules; cinnamic acid; tectoridin; irisfloreintin; HPLC; TLC

复方黑参颗粒是在复方黑参丸基础上研制而成, 由玄参、山豆根、射干、天冬、麦冬等组成的中药复方制剂, 具有清热解毒、养阴润肺、利咽消肿等功效, 主要用于治疗慢性咽炎, 疗效确切。复方黑参丸收载于《中国人民解放军医疗机构制剂规范》(2002年版), 但由于复方黑参丸是以生药粉碎入药, 质量控制方面特别是在微生物限度检查上常难以达到标准要求, 且丸剂不易吞服。因此, 将其改为颗粒剂, 既保留了制剂的有效成分, 又克服了丸剂的上述缺点, 可提高患者的依从性, 便于临床使用。本研究采用薄层色谱 (TLC) 法对玄参和射干进行定性鉴别,

采用 HPLC 法同时测定肉桂酸、射干苷和次野鸢尾黄素的含量, 从而为复方黑参颗粒的质量控制提供实验数据和方法^[1-3]。

1 仪器与试剂

Agilent1200 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), KQ-600DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), AE240 精密电子天平 (瑞士 METTLER 公司), UV-2501PC 可见-紫外分光光度计 (岛津仪器有限公司)。

肉桂酸对照品 (批号: 110786-200503), 哈巴昔对照品 (批号: 111729-201506), 射干苷对照品 (批号: 111632-200602), 次野鸢尾黄素对照品 (批号: 111557-200602), 玄参对照药材 (批号: 120976-200503), 射干对照药材 (批号: 120977-201404) 均由中国食品药品检定研究院提供, 薄层色谱用硅胶 G、GF254 (青岛海洋

[作者简介] 钟桂香, 本科, 主管药师, 研究方向: 药物分析, Tel: (0591)22859963, Email: q18950808@126.com

[通讯作者] 周欣, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 药物分析, Tel: (0591)22859606, Email: 1395918838@163.com

化工有限公司),复方黑参颗粒(福州总医院研制,批号:160305、160306、160307),甲醇、乙腈为色谱纯,水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 玄参的鉴别 取本品 10 g,研细,加水 60 ml,超声溶解,滤过,滤液用乙醚振摇提取 2 次,每次 80 ml,弃去乙醚层,水层用水饱和正丁醇提取 3 次,每次 40 ml,每次提取 10 min,合并正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇 1 ml 使之溶解,作为供试品溶液。取缺玄参的阴性样品 10 g,同法制成阴性样品溶液。取玄参对照药材 2 g,加甲醇 25 ml,浸泡 1 h,超声 30 min,滤过,蒸干,残渣加水 25 ml 溶解,用水饱和正丁醇提取 2 次,每次 30 ml,合并正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇 1 ml 使之溶解,作为对照药材溶液。再取哈巴苷对照品适量,加甲醇制成每 1 ml 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。吸取上述 4 种溶液适量,分别点于同一硅胶 G 板上,以二氯甲烷-甲醇(5:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 2% 香草醛溶液,在 105 °C 下加热至斑点清晰,日光下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱及对照品色谱相应的位置上,分别显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,结果见图 1。

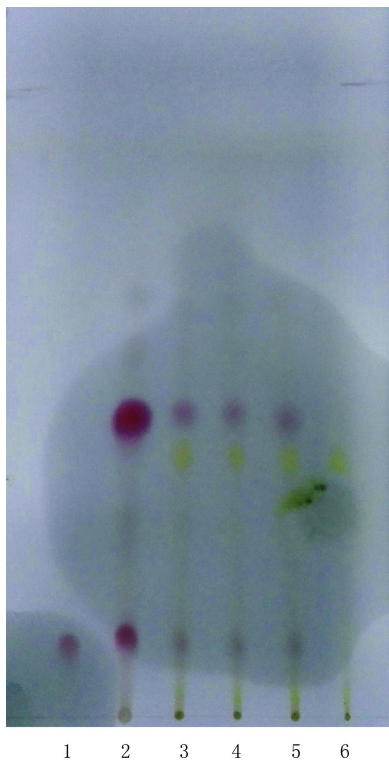


图 1 玄参 TLC 图

1.哈巴苷对照品溶液;2.玄参对照药材溶液;3~5.供试品溶液(批号:160305、160306、160307);6.缺玄参的阴性对照溶液

2.1.2 射干的鉴别 取本品 10 g,研细,加甲醇 50 ml,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1 ml 使之溶解,作为供试品溶液。取射干的阴性样品 10g,同法制成阴性样品溶液。取射干对照药材粉末 1.0 g,加甲醇 10 ml 超声处理 30 min,滤过,蒸干滤液,残渣加甲醇 1 ml 使之溶解,作为对照药材溶液。分别吸取上述 3 种溶液适量,点于同一硅胶 GF254 板上,以乙酸乙酯-甲醇-水(10:2:1)溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯(254 nm)下检视。供试品色谱与对照药材色谱在相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,结果见图 2。

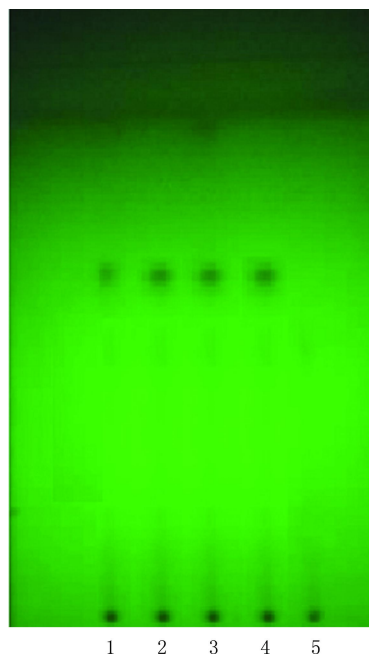


图 2 射干 TLC 图

1.射干对照药材溶液;2~4.供试品溶液(批号:160305、160306、160307);5.缺射干的阴性对照溶液

2.2 含量测定^[4]

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm,5 μm);以乙腈为流动相 A,以 0.1% 磷酸溶液为流动相 B,按表 1 进行梯度洗脱;检测波长 270 nm;柱温 30 °C;流速 1.0 ml/min;进样量 10 μl。

表 1 梯度洗脱程序

时间(t/min)	乙腈(A,%)	0.1%磷酸溶液(B,%)
0	20	80
15	20	80
30	60	40
40	80	20
50	100	0

2.2.2 溶液的制备 对照品溶液:精密称取肉桂酸对照品 10.14 mg、射干苷对照品 30.12 mg、次野鸢尾黄素 10.25 mg,置 25 ml 容量瓶中,加入乙腈适量,溶解完全后稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品储备液。再精密量取对照品储备液 3 ml 置 25 ml 容量瓶中,得对照品溶液。

供试品溶液:称取本品内容物约 3.0 g 置 50 ml 容量瓶,加乙腈-0.1% 磷酸(1:1)溶液适量,超声至

完全溶解后,放冷至室温,再用上述溶液稀释至刻度,摇匀,即得。

阴性对照溶液:按处方量,取除玄参、射干外的其余药材,按照制备工艺和供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

2.2.3 专属性试验 在“2.2.1”项的色谱条件下,射干苷、肉桂酸、次野鸢尾黄素均完全分离且峰形良好,阴性对照溶液在相应的位置上并无干扰,结果见图 3。

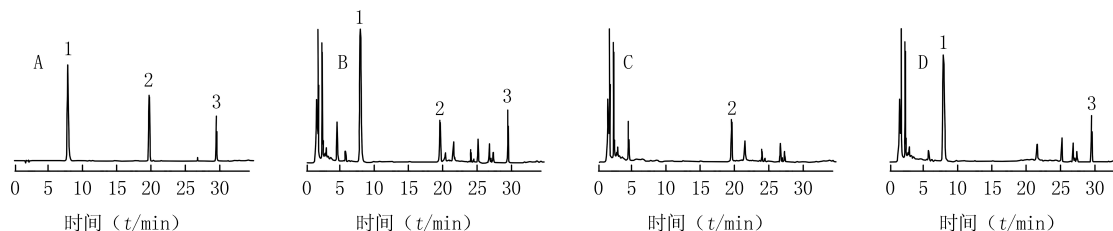


图3 复方黑参颗粒的HPLC图

A. 对照品溶液;B. 供试品溶液;C. 缺射干的阴性对照品溶液;
D. 缺玄参的阴性对照品溶液;1. 射干苷;2. 肉桂酸;3. 次野鸢尾黄素

2.2.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品储备液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 ml 置 25 ml 量瓶中,用乙腈-0.1% 磷酸(1:1)溶液稀释至刻度,摇匀。按“2.2.1”项下色谱条件进样,记录峰面积,以对照品溶液浓度($X, \mu\text{g/ml}$)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程。肉桂酸 $Y = 600.09 X - 7.22 (r = 0.999 8)$, 射干苷 $Y = 1 124.79 X - 8.07 (r = 0.999 8)$, 次野鸢尾黄素 $Y = 380.52 X + 0.64 (r = 0.999 9)$ 。结果表明肉桂酸、射干苷、次野鸢尾黄素分别在 16.22 ~ 113.57、48.19 ~ 337.34、16.40 ~ 114.80 $\mu\text{g/ml}$ 范围内线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 取混合对照品溶液,在上述色谱条件下,连续进样 6 次,测定峰面积,得肉桂酸、射干苷、次野鸢尾黄素的 RSD 分别为 0.68%、0.52%、0.72%,表明该仪器的精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取同一批次(批号:160305)样品 6 份,按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液,按“2.2.1”项下的色谱条件进样 6 次进行测定,得肉桂酸、射干苷、次野鸢尾黄素的 RSD 分别为 0.49%、1.05%、1.03%,表明该方法有较好的重复性。

2.2.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(批号:160305),在上述色谱条件下,分别在 0、1、2、4、8、12 h 进样测定,测得肉桂酸、射干苷、次野鸢尾黄素峰面积的 RSD 分别为 1.43%、1.89%、0.78%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.8 加样回收率试验 取已知含量的样品(批号:160305)3 g,共 6 份,精密称定,置 100 ml 容量瓶中,分别加入肉桂酸对照品溶液 1 ml (0.435 2 mg/ml)、射干苷对照品溶液 6 ml (1.204 8 mg/ml)、次野鸢尾黄素对照品溶液 2 ml (0.401 2 mg/ml),按供试品溶液的制备方法操作,测定其含量,计算回收率,结果见表 2。

2.2.9 样品含量的测定 取 3 批样品,按供试品溶液制备方法和色谱条件,进样测定,计算肉桂酸、射干苷、次野鸢尾黄素的含量,结果见表 3。本品以上述 3 种物质计算,每 1 g 复方黑参颗粒中应含肉桂酸不少于 0.1 mg、射干苷不少于 2.0 mg、次野鸢尾黄素不少于 0.2 mg。

3 讨论

3.1 波长的选择 肉桂酸的最大吸收波长在 270 nm 处,射干苷及次野鸢尾黄素的最大吸收波长在 266 nm 处,由于检测样品中肉桂酸的含量较低,为使肉桂酸的检测灵敏度较高,选择 270 nm 为检测波长。

3.2 提取溶剂的选择 采用 HPLC 法对肉桂酸、射干苷和次野鸢尾黄素的含量进行测定时,在流动相的选择上,考察乙腈-水、乙腈-磷酸、甲醇-磷酸等系统进行梯度洗脱,发现以乙腈-磷酸作为流动相时,肉桂酸、射干苷、次野鸢尾黄素的分离效果最好。

3.3 玄参和射干的 TLC 鉴别 通过 TLC 法鉴别处方中玄参和射干,均得到清晰的 TLC 图。玄参的

表2 加样回收率试验结果

成分	取样量 (m/g)	样品量 (m/mg)	加入量 (m/mg)	测得量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
肉桂酸	3.012 4	0.436 2	0.435 2	0.863 6	99.11	99.23	0.60
	3.024 5	0.437 9	0.435 2	0.862 9	98.83		
	3.005 9	0.435 3	0.435 2	0.859 4	98.73		
	3.015 2	0.436 6	0.435 2	0.870 6	99.86		
	3.016 4	0.436 8	0.435 2	0.861 1	98.75		
	3.017 3	0.436 9	0.435 2	0.872 8	100.08		
射干苷	3.012 4	7.460 2	7.228 8	14.432 7	98.26	98.82	0.76
	3.024 5	7.490 2	7.228 8	14.534 8	98.75		
	3.005 9	7.444 1	7.228 8	14.512 4	98.91		
	3.015 2	7.467 1	7.228 8	14.729 8	100.23		
	3.016 4	7.470 1	7.228 8	14.424 9	98.14		
	3.017 3	7.472 3	7.228 8	14.503 6	98.66		
次野鸢尾黄素	3.012 4	0.770 6	0.802 4	1.551 4	98.63	99.17	0.94
尾黄素	3.024 5	0.773 7	0.802 4	1.574 9	99.93		
	3.005 9	0.768 9	0.802 4	1.560 3	99.30		
	3.015 2	0.771 3	0.802 4	1.552 2	98.63		
	3.016 4	0.771 6	0.802 4	1.542 9	98.02		
	3.017 3	0.771 8	0.802 4	1.582 5	100.53		

表3 3批样品含量测定结果

批号	肉桂酸		射干苷		次野鸢尾黄素	
	含量 (mg/g)	RSD (%)	含量 (mg/g)	RSD (%)	含量 (mg/g)	RSD (%)
160305	0.144 8	0.89	2.476 5	0.94	0.255 8	0.69
160306	0.149 0	0.37	2.489 5	1.24	0.266 4	1.34
160307	0.145 4	1.21	2.465 3	0.67	0.257 4	0.55

定性鉴别曾参照2015年版《中华人民共和国药典》“玄参”药材项下哈巴俄苷鉴别,结果斑点分离不清晰,阴性有干扰。后经过笔者反复试验,改变样品的前处理,发现本研究方法专属性强,重复性好。在鉴别射干时,分别采用硅胶GF254板与聚酰胺薄层板进行鉴别,发现使用聚酰胺薄层板阴性对照有干扰,故采用硅胶GF254薄层板对射干进行鉴别。

3.4 其他 本实验采用HPLC法同时测定肉桂酸、射干苷、次野鸢尾黄素3种成分的含量,方法简便、快速、灵敏度高,但玄参中肉桂酸含量较低,考虑

是否增加哈巴昔或者哈巴俄苷作为其含量测定的指标性成分,并对山豆根中苦参碱和氧化苦参碱、麦门冬中麦门冬总皂苷进行含量检测,需在以后的实验中进一步研究。

【参考文献】

- [1] 张传辉,陈小川,傅亚,等.建立并利用一测多评法优化玄参饮片润透工艺的研究[J].中医药现代化,2015,17(1):254-260.
- [2] 卞晓霞,罗跃娥,闫利华,等.一测多评法同步测定玄参药材中两种环烯醚萜类成分的含量[J].天津中医药大学学报,2014,33(2):98-100.
- [3] 赵昕,王沈歌,许志军,等.胃纳欣颗粒的质量标准研究[J].药理学实践杂志,2016,34(2):167-170.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2015年版四部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:374-377.

[收稿日期] 2016-10-24 [修回日期] 2017-03-16

[本文编辑] 李睿旻