

苷 A、连翘酯苷 B、芦丁、连翘酯素)在 235 nm 波长附近均有明显吸收,且各待测成分色谱峰分离度良好,峰纯度符合含量测定要求,从整体结果分析选择 235 nm 作为检测波长。

实验过程中,分别对提取溶媒、溶媒用量、提取方法、提取温度与提取时间进行了单因素考察,确定了以 40 mL 甲醇,65 °C 加热回流 2.5 h 的提取方法;同时考察了流动相类型与梯度比例,确定以水-甲醇为流动相的梯度洗脱,结果各成分完全分离,且峰形较好。

实验选用连翘专属性成分连翘苷为内参物所得到的其他 5 种有效成分的相对校正因子较稳定,可用于连翘药材主要有效成分的同时定量。

REFERENCES

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010: 159-160.
- [2] 简永耀, 靳龙文. 连翘的化学成分及药理学研究[J]. 淮海医药, 2009, 27(4): 41-43.
- [3] 闫丽丽, 姜颖. 连翘药材主要化学成分及药理作用研究综

述[J]. 中国新技术新产品, 2011, 19(11): 11.

- [4] 王文丽, 王雪峰, 闫丽娟, 等. 银翘散主要药物体外抑制流感病毒作用比较研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(8): 1634-1636.
- [5] QIU Y, ZHANG W L, LIN Y Y, et al. Study on the chemical constituents from the fruits of *Forsythia suspensa* and the antioxidant activity of forsythoside A [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(10): 149-152.
- [6] 冯帅, 王晓燕, 李峰. 不同产地连翘的连翘苷及连翘酯苷 A 的含量比较[J]. 山东中医药大学学报, 2013, 37(6): 514-515.
- [7] 杨棣华, 黄兰, 郑显辉. 不同产地连翘叶中连翘苷和连翘酯苷 A 的含量测定[J]. 临床医学工程, 2013, 20(3): 288-289.
- [8] LIU R, ZHANG Z Q, LI W M, et al. Determination of four components in *Forsythia suspensa* from different habitats and different processed products by HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(14): 83-86.
- [9] JIN M L, ZHAO S H, WANG Y F, et al. UPLC Fingerprints and determination of active ingredients in leaves of *Forsythia suspensa* [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2013, 20(5): 52-54.
- [10] YAN Y, ZHANG S R, PEI X P, et al. Study on Fingerprints of Fructus Forsythiae from Shanxi province by HPLC-UV [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2010, 17(12): 41-43.

收稿日期: 2015-03-28

消白颗粒的质量标准提升研究

苏华, 廖欣, 江静怡, 陆崑, 乔立业^{*} (南京军区南京总医院制剂科, 南京 210002)

摘要: 目的 建立并提升消白颗粒制剂的质量标准。方法 采用 TLC 对消白颗粒中的黄芪、地黄、首乌、补骨脂进行定性鉴别; 采用 HPLC-ELSD 测定制剂中黄芪甲苷的含量。色谱条件: Lichrospher-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-水(32:68)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 蒸发光散射检测器检测。结果 消白颗粒中黄芪、地黄、首乌、补骨脂的 TLC 斑点清晰, 分离度良好, 阴性无干扰。黄芪甲苷在 0.311 5~2.803 9 μg(r=0.999 9)内呈良好的线性关系, 平均回收率为 99.4%(RSD=2.67%)。结论 该方法简便、准确、重复性好, 可作为消白颗粒的质量标准。

关键词: 消白颗粒; 薄层鉴别; 含量测定; 质量标准

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)03-0308-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.03.012

Study on Improved Quality Standard for Xiaobai Granules

SU Hua, LIAO Xin, JIANG Jingyi, LU Yin, QIAO Liye^{*} (Department of Preparation, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, Nanjing 210002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish and improve the quality standard of Xiaobai granules. **METHODS** TLC was used to identify *Astragali Radix*, *Rehmanniae Radix*, *Polygoni Multiflori Radix*, and *Psoralea* in Xiaobai granules. Astragloside IV in preparation was determination by HPLC-ELSD on Lichrospher-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) chromatographic column, the

基金项目: 军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题重点项目(14ZJZ08)

作者简介: 苏华, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (025)80860166 E-mail: suhuash@sina.com *通信作者: 乔立业, 男, 硕士, 药师 Tel: (025)80860166 E-mail: qlynjutcm@sina.com

mobile phase was acetonitrile-water(32 : 68) at a flow rate of $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, and column temperature was 25°C . **RESULTS** TLC spots were clear and well-separated without negative interference. The calibration curves of astragaloside IV demonstrated linear relationship in the range of $0.3115\text{--}2.8039 \mu\text{g}$ ($r=0.9999$), average recovery rate was 99.4% ($\text{RSD}=2.67\%$). **CONCLUSION** The method established is simple, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Xiaobai granules.

KEY WORDS: Xiaobai granules; TLC; content determination; quality standard

消白颗粒是南京军区南京总医院的医院制剂,由黄芪、当归、玄参、首乌、蒺藜等13味中药组成,具有养血祛风、滋补肝肾的功能^[1-2],临床上主要用于稳定期虚证型白癜风,疗效显著。

方中黄芪为君药,具有补气固表,托疮生肌的功效,有效成分黄芪甲苷能够增强机体的免疫力,提高机体的抗病及抗病毒能力;首乌和补骨脂均为方中佐药,首乌具有补肝、益肾、养血、祛风等功效^[3-4],补骨脂有效成分补骨脂素为光敏性化合物,白癜风是一种后天色素脱失的皮肤病,用药后能够作用于受损细胞邻近尚未完全破坏或正常的黑素细胞,使酪氨酸酶活性增加,促进黑色素合成。

地黄为方中臣药,具有滋阴补肾、养血补血的功效,主要含萜类、苷类、糖类等。文献报道,地黄中的一些成分可以通过提高机体细胞免疫,激活络氨酸的活性从而催化黑色素的生成,促进黑色素细胞分裂及移动,使白斑色素逐渐消退。因此本实验在原有标准的基础上对黄芪、何首乌、补骨脂的薄层鉴别进行了改进,同时增加地黄的薄层色谱鉴别,并采用 HPLC 对制剂中君药黄芪有效成分进行定量研究,以提高制剂的质量标准。

1 仪器与试剂

WFH-203B 三用紫外分析仪(上海精科实业有限公司);FA1604S 电子天平(上海天平仪器厂);HH-6 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);Waters1525-2424 高效液相色谱仪,ELSD 检测器(美国 Waters 公司);薄层层析硅胶 G(青岛海洋化工)。

黄芪、地黄、补骨脂均购自安徽亳州芍花堂药业有限公司(批号:130801),经检验鉴定均符合中国药典 2010 年版一部各项要求。黄芪甲苷对照品(批号:110781-200613,纯度:95.8%)、大黄素对照品(批号:110756-200110,纯度:100%)、补骨脂素对照品(批号:110739-200310,纯度:100%)和地黄对照药材(批号:121180-201005)均由中国药品生物制品检验所提供;消白颗粒(规格:每袋装

10 g,本院自制,批号:140120、141006、141211、150210);乙腈、甲醇为色谱纯其余所用试剂均为分析纯。

2 定性鉴别

2.1 黄芪

取本品 60 g,研细,加无水乙醇 150 mL,加热回流 2 h,提取液滤过,蒸干,残渣加水 30 mL 使溶解,用乙醚振摇提取 3 次(30, 30, 20 mL),弃去乙醚,水层挥尽乙醚,再用正丁醇振摇提取 3 次(30, 30, 20 mL),合并提取液,用 1%氢氧化钾溶液洗涤 3 次,每次 20 mL,再用水洗 3 次至中性,每次 30 mL,挥去正丁醇,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液;另取黄芪甲苷对照品,加甲醇制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,作为对照品溶液;按处方比例称取除黄芪以外的其余药材,研碎,按本品的制备工艺及供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法(中国药典 2010 年版一部附录 VI B)试验,吸取上述 3 种溶液各 $20 \mu\text{L}$,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正丁醇-乙酸异戊酯-水(4 : 1 : 5)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10%硫酸乙醇溶液, 105°C 下烘约 5 min 至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性未见干扰,结果见图 1。

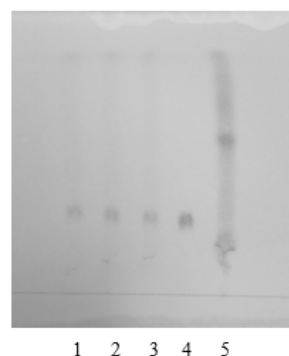


图 1 黄芪的薄层鉴别

1~3-样品; 4-黄芪甲苷对照品; 5-缺黄芪阴性样品。

Fig. 1 TLC chromatogram of Astragali Radix

1~3-sample; 4-astragaloside IV reference substance; 5-negative sample without Radix Astragali.

2.2 地黄

取本品 60 g, 研细, 加乙醇 150 mL, 回流 2 h, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液; 另取地黄对照药材 1 g, 加乙醇 50 mL, 同法制成对照药材溶液; 按处方比例称取除地黄以外的其余药材, 研碎, 按本品制备工艺及供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法(中国药典 2010 年版一部附录 VI B)试验, 吸取上述 3 种溶液各 10 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-丙酮-乙酸乙酯(10:2:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 105 $^{\circ}$ C 下烘约 5 min 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, 显相同颜色的斑点, 阴性未见干扰, 结果见图 2。

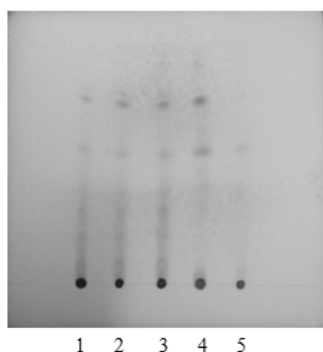


图 2 地黄的薄层鉴别

1~3-样品; 4-地黄对照药材; 5-缺地黄阴性样品。

Fig. 2 TLC chromatogram of Rehmanniae Radix

1-3-sample; 4-Rehmanniae Radix reference substance; 5-negative sample without Rehmanniae Radix.

2.3 首乌

取本品 30 g, 研细, 加乙醇 120 mL, 加热回流 1.5 h, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 30 mL, 盐酸 3 mL, 加热回流 30 min, 放冷, 用乙醚振摇提取 3 次, 每次 15 mL, 合并提取液, 蒸干, 残渣加 1 mL 甲醇使溶解, 作为供试品溶液; 取大黄素对照品, 加甲醇制成 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为对照品溶液; 按处方比例称取除首乌以外的其余药材, 研碎, 按本品制备工艺及供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法(中国药典 2010 年版一部附录 VI B)试验, 吸取供试品溶液和阴性对照溶液各 20 μ L, 对照品溶液 15 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-乙酸乙酯-二氯甲烷-甲酸(10:3:3:0.2)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 氢氧化钾乙醇溶液, 105 $^{\circ}$ C 烘约 5 min 至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照

品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 而阴性对照无此斑点, 结果见图 3。

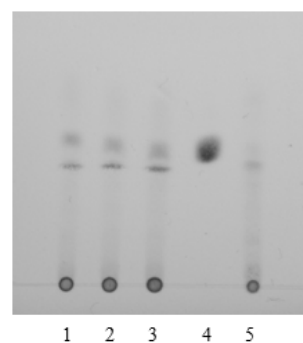


图 3 首乌的薄层鉴别

1~3-样品; 4-大黄素对照品; 5-缺首乌阴性样品。

Fig. 3 TLC chromatogram of Polygoni Multiflori Radix

1-3-sample; 4-emodin reference substance; 5-negative sample without Polygoni Multiflori Radix.

2.4 补骨脂

取本品 30 g, 研细, 加乙醇 100 mL, 加热回流 1 h, 提取液滤过, 蒸干, 残渣加水 30 mL, 浓氨水 2 mL, 用二氯甲烷振摇提取 3 次(20, 20, 10 mL), 合并提取液, 蒸干, 残渣加甲醇 2 mL 使溶解, 作为供试品溶液; 取补骨脂素对照品, 加甲醇制成 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为对照品溶液; 按处方比例称取除补骨脂以外的其余药材, 研碎, 按本品制备工艺及供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。吸取上述 3 种溶液各 20 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-丙酮(12:5)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, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 阴性对照未见干扰, 结果见图 4。

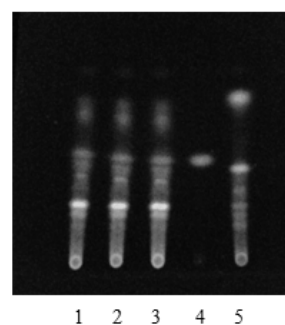


图 4 补骨脂的薄层鉴别

1~3-样品; 4-补骨脂素对照品; 5-缺补骨脂阴性样品。

Fig. 4 TLC chromatogram of Psoralea Fructus

1-3-sample; 4-psoralen reference substance; 5-negative sample without Psoralea Fructus.

3 含量测定

3.1 色谱条件

色谱柱: Lichrospher-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(32:68); 柱温: 25℃; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 喷雾器: 冷却; 漂移管温度: 75℃; 气体压力: 25 psi; 增益: 200; 进样量为 20 μL。

3.2 溶液的制备

3.2.1 对照品溶液 精密称取黄芪甲苷对照品 8.13 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。

精密吸取对照品储备液 5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

3.2.2 供试品溶液 精密称取本品 5 g, 置于锥形瓶中, 加水 50 mL, 60℃ 超声 2 h 至全部溶解, 摇匀, 全部转移至分液漏斗中, 用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次, 每次 20 mL, 合并提取液, 用氨水洗涤 3 次, 每次 20 mL, 将正丁醇提取液蒸干, 残渣加甲醇溶解至 5 mL 量瓶中, 摇匀, 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

3.2.3 阴性样品溶液 按处方比例不加黄芪饮片制成阴性样品, 按“3.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

3.3 系统适应性试验

精密吸取黄芪甲苷对照品溶液、供试品溶液与阴性对照各 20 μL, 按“3.1”项下色谱条件进行测定。结果表明, 样品与对照品在相同位置有吸收, 分离度良好, 且阴性样品在黄芪甲苷吸收峰处均无峰出现, 理论板数按黄芪甲苷峰计算不 <4 000。结果见图 5。

3.4 线性关系考察

分别精密吸取黄芪甲苷储备液 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 mL 至 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 按“3.1”项下色谱条件进样进行测定, 以峰面积的对数为纵坐标, 进样量的对数为横坐标绘制标准曲线, 计算回归方程, 相关系数及线性范围为 $Y=1.379X+5.6345$, $r=0.9999$ 。结果表明, 黄芪甲苷在 0.311 5~2.803 9 μg 内与峰面积呈良好的线性关系。

3.5 仪器精密度试验

精密吸取同一供试品溶液, 连续进样 5 次, 记录色谱峰的峰面积, 计算黄芪甲苷对照品峰面

积的 RSD 为 1.14%。结果表明该方法的仪器精密度良好。

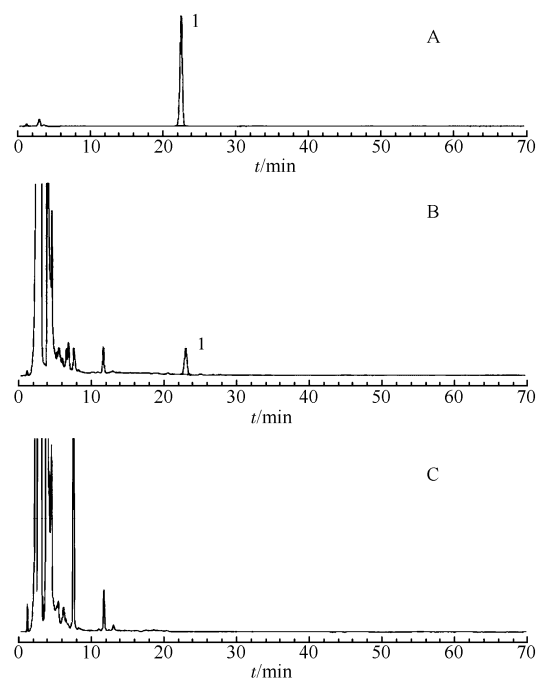


图5 消白颗粒 HPLC-ELSD 色谱图

A-对照品; B-样品; C-缺黄芪阴性样品; 1-黄芪甲苷。

Fig. 5 HPLC-ELSD chromatograms of Xiaobai granules

A-reference substance; B-sample; C-negative sample without Astragali Radix; 1-astragaloside IV.

3.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液, 在 0, 2, 4, 6, 8 h 测定, 记录色谱峰的峰面积, 结果黄芪甲苷峰面积对数的 RSD 为 2.73%, 试验结果表明, 供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

3.7 重复性试验

取同一批号下的样品 5 份, 精密称定, 按“3.2.2”项下方法进行制备, 测定, 结果测得黄芪甲苷的平均含量为 $0.0687 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 2.34%。表明方法重复性良好。

3.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品(批号: 140120) 2.5 g, 共 9 份, 分别按低、中、高 3 个浓度精密加入黄芪甲苷储备液 1.0, 1.5, 2.0 mL, 按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液。精密吸取上述供试液各 20 μL 注入色谱仪, 测定含量, 计算回收率。平均回收率为 99.4%, RSD 为 2.67%。结果见表 1。

3.9 样品的含量测定

取 3 批消白颗粒, 按照“3.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“3.1”项下色谱条件进行测定, 计算含量。结果见表 2。

表 1 加样回收率试验

Tab. 1 Results of recovery tests

取样量/g	测得含量/ mg	对照品 加入量/mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
2.502 6	0.321 5	0.155 8	96.03		
2.484 4	0.322 7	0.155 8	97.60		
2.503 8	0.331 1	0.155 8	102.14		
2.506 4	0.404 0	0.233 7	99.23		
2.508 8	0.412 1	0.233 7	102.61	99.4	2.67
2.509 5	0.410 3	0.233 7	101.84		
2.502 8	0.474 7	0.311 5	97.19		
2.500 8	0.472 5	0.311 5	96.52		
2.507 9	0.488 9	0.311 5	101.64		

表 2 含量测定结果($n=3$)Tab. 2 Results of content determination of samples($n=3$)

序号	批号	黄芪甲苷/mg·袋 ⁻¹
1	141006	0.719
2	141211	0.727
3	150210	0.718

4 讨论

4.1 薄层鉴别

原质量标准仅对黄芪, 首乌和补骨脂进行薄层色谱鉴别^[5], 此质量标准在原有的基础上拟增加臣药当归、玄参或地黄其中一项的薄层色谱鉴别, 经过实验研究, 发现当归薄层鉴别中供试品与对照药材在相应的位置不显斑点; 玄参薄层鉴别中供试品与对照药材及对照品哈巴俄苷的斑点颜色不一致, 另外, 此位置上出现的疑似阴性斑点, 颜色与供试品斑点颜色一致, 可能的原因是在制剂生产的前处理水提液中, 玄参中的哈巴俄苷未被提取, 而地黄的薄层色谱鉴别较好, 所以增加地黄的薄层色谱鉴别, 以便更好地控制制剂的质量。

在研究地黄的薄层鉴别时^[6], 根据原有薄层条件进行展开, 发现以正己烷-丙酮-乙酸乙酯(5:2:1)为展开剂, 喷以 1% 香草醛乙醇溶液-3% 高氯酸水溶液(1:1)溶液显色后, 供试品与对照品的斑点不清晰且斑点的 R_f 值偏高。后改用正己烷-丙酮-乙酸乙酯(10:2:1)为展开剂, 5% 的香草醛硫酸溶液为显色剂, 结果供试品与对照品在相应位置上显相同颜色斑点, 阴性样品无干扰。

4.2 含量测定

4.2.1 提取条件的确定 本实验对黄芪的提取方法进行考察^[7-8], 分别采用直接溶解法、回流法、超声法进行提取, 结果发现回流法和超声法的提取含量较高, 两者无显著性差异且超声法较易操

作, 故选用超声法进行提取; 对提取溶剂甲醇、水、50% 甲醇进行考察, 发现以水作为溶剂提取效果较好; 在提取时间上考察超声 1, 2, 3 h 对成分的影响, 结果表明超声时间为 2 h 时, 成分即可被提取完全。因此, 选用水作为提取溶剂, 超声提取 2 h 作为供试品的制备方法。

4.2.2 检测器和流动相的选择 蒸发光散射检测器是通用型检测器, 可以检测没有紫外吸收的化合物, 不依赖于样品的光学特性, 任何挥发性低于流动相的样品均能被检测, 不受官能团的影响。根据文献报道, 黄芪有效成分黄芪甲苷的测定有采用紫外检测器和蒸发光散射检测器测定^[9-10], 因黄芪甲苷在紫外区存在末端吸收, 重现性较差且测定误差较大, 因此选择蒸发光散射检测器法进行测定。

本实验对甲醇-水、乙腈-水等流动相进行考察, 结果发现甲醇-水(20:80)对照品出峰时间较晚, 乙腈-水(80:20)对照品出峰太快且分离度不佳, 最终选择乙腈-水(32:68)为流动相, 结果所测目标成分出峰时间、分离度较好。

REFERENCES

- [1] SUN Z H, SHAO J, GUO M. A review on chemical components and pharmacological effects of Huangqi [J]. Clin J Chin Med(中医临床研究), 2015, 25(7): 22-24.
- [2] 中国药典. 二部[S]. 2010: 283-284.
- [3] 韦广辉. 何首乌质量控制的研究进展 [J]. 中国现代药物应用, 2015, 9(13): 270-271.
- [4] 高任龙, 王会肖, 李晓娜, 等. 何首乌的药理毒理研究进展 [J]. 河北医药, 2015, 37(2): 269-271.
- [5] AN J Y, QIN L, YANG L P, et al. Study on TLC and quantitative determination of Jinlida granule [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(2): 213-217.
- [6] DENG R W, RAN L, LI Y, et al. Identification of 6 kinds of crude drugs in Qiju Dihuang granules by TLC [J]. West China J Pharm Sci(华西药学杂志), 2005, 20(3): 266-267.
- [7] ZHANG X. Assay and extraction of Huangqi saponin [J]. China J Chin Med(中医学报), 2012, 27(174): 1454-1455.
- [8] WANG P P, XU D J, XIA Q. The extraction and determination the contents of astragaloside [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2010, 16(4): 27-30.
- [9] LIU H P, PENG Z H, ZHANG R R, et al. Optimization of determination of astragaloside IV in Astragali Radix [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学), 2015, 21(5): 92-94.
- [10] SONG C Y, FENG J F. Simultaneous determination of calycosin-7-O- β -D-glucoside and astragaloside IV in Astragali Radix by HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(11): 115-117.

收稿日期: 2015-12-25