

## · 论 著 ·

## 健脾补肾颗粒的质量标准研究

许绍兰, 赵丹, 毛峻琴 (解放军 85 医院, 上海 200052)

**[摘要]** 目的 建立健脾补肾颗粒的质量标准。方法 采用薄层色谱法(TLC)鉴别制剂中黄芪、丹参、党参、陈皮和白芍五味药材。用高效液相色谱法(HPLC)测定白芍中芍药苷的含量;色谱柱:Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub>柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸水溶液梯度洗脱;流速:1.0 ml/min;柱温:25℃;检测波长:230 nm。结果 5种药材的TLC图谱斑点清晰,无阴性对照干扰;芍药苷在8.676~277.632 μg/ml范围内线性关系良好,( $r=0.9999$ )。结论 该法操作简单、重复性好,能够有效控制健脾补肾颗粒的质量。

**[关键词]** 健脾补肾颗粒;质量标准;芍药苷;薄层色谱法;高效液相色谱法

**[中图分类号]** R927.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2016)06-0530-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.06.012

## Study on quality control of Jianpibushen granules

XU Shaolan, ZHAO Dan, MAO Junqin (Department of Pharmacy, No.85 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a quality standard for Jianpibushen granules. **Methods** The five main ingredients of the formulation: *Astragalus membranaceus*, *Salvia miltiorrhiza Bunge*, *Codonopsis pilosula*, *Citrus reticulata* Blanco and *Paeonia lactiflora* Pall., were identified by thin layer chromatography (TLC) respectively. The content of peoniflorin in *Paeonia lactiflora* was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The separation was performed on Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> column(4.6 mm×250 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile and 0.1% potassium dihydrogen phosphate solution for gradient elution. The flow rate was 1 ml/min, the column temperature was 25℃, the UV detection was performed at 230 nm. **Results** The spots in TLC were clear without interference in negative control. A good linear relationship was shown within the range of 8.676-277.632 μg/ml for peoniflorin ( $r=0.9999$ ). **Conclusion** This method is simple, accurate and reproducible, and can be used as an effective quality control of Jianpibushen granules.

**[Key words]** Jianpibushen granules; quality standard; peoniflorin; TLC; HPLC

健脾补肾颗粒是解放军 105 医院研制的复方制剂,由 13 味中药配制而成,具有健脾补肾、活血化瘀、疏肝理气的功能。为了提高健脾补肾颗粒的质量标准,根据军队医疗机构提高制剂标准新要求,修订丹参、黄芪的薄层鉴别方法,新增白芍和陈皮的薄层鉴别。白芍为方中君药,芍药苷是其主要成分,对芍药苷的定量测定将为健脾补肾颗粒的质量控制标准提供更完善的依据。

## 1 仪器与试药

**1.1 仪器** Agilent 1260 高效液相色谱仪(安捷伦公司,四元泵,DAD 检测器);BT25S 型电子分析天

平(德国 Sartorius 公司);KQ2200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);WD-9403 型紫外分析仪(北京市六一仪器厂);硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂分厂)。

**1.2 试药** 健脾补肾颗粒(规格:10 g/袋,解放军 105 医院制剂,批号:140707、141015、141103),芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110736-201436,含量 96.4%),黄芪对照药材(批号:120974-201311)、丹参对照药材(批号:120923-201414)、陈皮对照药材(批号:120969-201109)、党参对照药材(批号:121057-201206),均购自中国食品药品检定研究院。按处方依次配制缺黄芪、丹参、白芍、陈皮和党参的阴性试液;甲醇、乙腈为色谱纯;水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 黄芪的鉴别** 取本品 3.0 g,研细,加乙醇

**[基金项目]** 军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题(14ZJZ03-1)

**[作者简介]** 许绍兰,学士,药师。研究方向:药物分析。Tel: 15900945215;E-mail:15900945215@163.com

**[通讯作者]** 毛峻琴,硕士,副主任药师。研究方向:药物分析。Tel: (021)81818310;E-mail:maojq204@163.com

40 ml。回流 20 min,放冷滤过,滤液蒸干后用 0.3% NaOH 15 ml 溶解,过滤,取滤液,加稀盐酸调 pH 值至 5~6。加 15 ml 乙酸乙酯振摇提取,留乙酸乙酯液。加无水硫酸钠适量,过滤,滤液蒸干,残渣加 1 ml 乙酸乙酯溶解,即为样品溶液。另各取 2.0 g 黄芪药材及其对照药材,按上述方法制成黄芪及其对照药材溶液。最后取阴性对照液。按文献[1]中薄层色谱(TLC)实验方法,将以上 4 种溶液分别吸取 5  $\mu$ l,点于同一薄层板上,展开剂用氯仿-甲醇(10:1),展开后晾干,放氨气中熏,于紫外线下(波长 365 nm)观察色谱图(图 1),在样品与对照药材对应位置上出现同样颜色的荧光斑点,阴性对照液无此斑点。

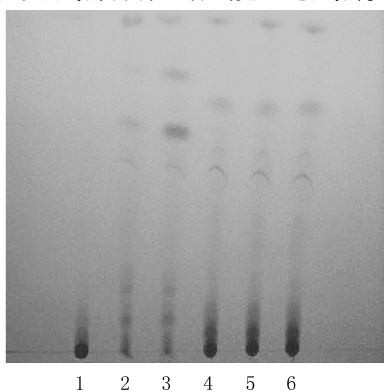


图 1 黄芪 TLC 图

1. 阴性对照; 2. 黄芪对照药材; 3. 黄芪; 4~6. 样品溶液

**2.2 丹参的鉴别**<sup>[2]</sup> 取本品 2.0 g,研细,加 10 ml 无水乙醚,超声 20 min,静置 30 min 滤过,挥干滤液,加乙酸乙酯 1 ml 溶解,即得样品溶液;分别取 1.0 g 丹参药材和对照药材,同法制成药材及其对照药材溶液。最后取阴性对照液。按文献[1]中 TLC 实验方法,以上 4 种溶液分别吸取 10  $\mu$ l,点于同一薄层板上,展开剂用石油醚(60~90  $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(4:1),展开后晾干。在紫外线(254 nm)下观察色谱图(图 2),在样品与对照药材对应位置上有同样颜色荧光斑点,阴性对照液无此斑点。

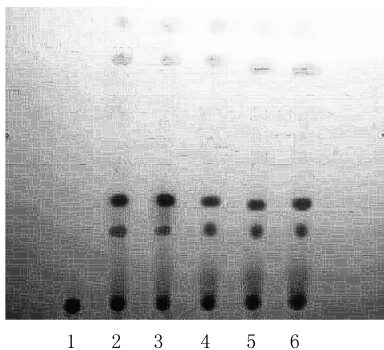


图 2 丹参 TLC 图

1. 阴性对照; 2. 丹参对照药材; 3. 丹参; 4~6. 样品溶液

**2.3 白芍的鉴别** 取本品 2.0 g,研粉,加乙醇 20 ml,振摇 5 min,过滤,蒸干滤液,用 1 ml 乙醇溶解,即为样品溶液;另取白芍药材 0.5 g,同法制成白芍药材溶液。再取芍药苷加乙醇配成每 1 ml 含 1 mg 的对照品溶液。最后取阴性对照液。按文献[1]中 TLC 实验方法,以上 4 种溶液分别吸取 5  $\mu$ l,点于同一薄层板上,展开剂为氯仿-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2),展开后晾干,喷以 5% 香草醛硫酸溶液作为显色剂,加热至斑点清晰。观察色谱图(图 3),在样品与对照药材相应位置上,出现同样颜色斑点,阴性对照液无此斑点。

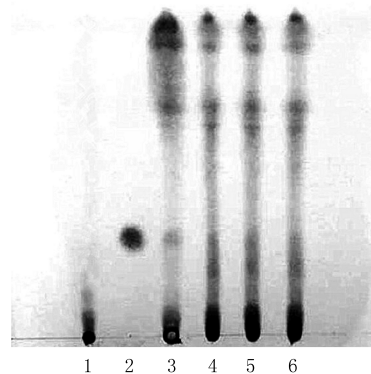


图 3 白芍 TLC 图

1. 阴性对照; 2. 芍药苷; 3. 白芍; 4~6. 样品溶液

**2.4 陈皮的鉴别** 取本品 1.5 g,研粉,加甲醇 30 ml,加热回流 20 min,放冷滤过,取滤液 5 ml 浓缩至 1 ml,作为样品溶液;另取陈皮药材、对照药材各 0.3 g,同法制成药材、对照药材溶液。最后取阴性对照液。按文献[1]中 TLC 实验方法,以上 4 种溶液分别吸取 5  $\mu$ l,点于同一薄层板上,展开剂为乙酸乙酯-甲醇-水(100:17:13),展至 3 cm,取出晾干,再以甲苯-乙酸乙酯-甲酸-水(20:10:1:1)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干。喷以三氯化铝溶液显色,置紫外线(254 nm)下观察色谱图(图 4),在样品与对照药材相应位置上,出现同样颜色荧光斑点,阴性对照液无此斑点。

**2.5 党参的鉴别** 取本品 20 g,研细,加甲醇超声提取 2 次(50, 50 ml),每次 30 min,滤过,滤液浓缩至干,加水 20 ml 使其溶解,加氯仿 50 ml 提取,弃去氯仿液,水溶液用水饱和正丁醇提取,提取液蒸干,残渣用 20 ml 含 7% 硫酸和 45% 乙醇的溶液溶解,加热回流 1 h,取出,蒸干,加氯仿提取后用水 50 ml 振摇洗涤,弃去水洗液,氯仿液蒸干,用 2 ml 乙醇溶解,即为样品溶液。另取党参药材、对照药材各 1 g,用相同方法制成药材、对照药材溶液。最后取阴性对照液。按文献[1]中 TLC 实验方法,以

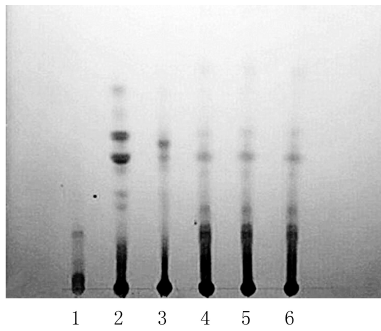


图4 陈皮 TLC图

1. 阴性对照; 2. 陈皮对照药材; 3. 陈皮; 4~6. 样品溶液

上4种溶液分别吸取5  $\mu\text{l}$ , 点于同一薄层板上, 展开剂为正己烷-乙酸乙酯(1:1), 展开后晾干, 喷以10% 硫酸乙醇溶液, 加热至斑点清晰。观察色谱图(图5), 在样品与对照药材相应位置上出现同样颜色斑点, 阴性对照液无此斑点。

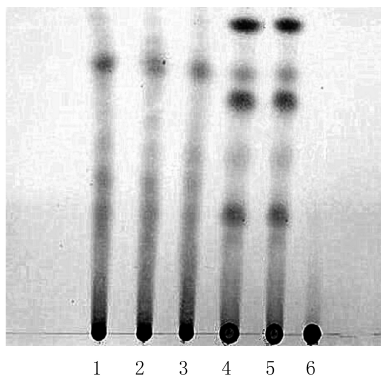


图5 党参 TLC图

1~3. 样品溶液; 4. 党参对照药材; 5. 党参; 6. 阴性对照

## 2.6 含量测定<sup>[3]</sup>

**2.6.1 色谱条件** 色谱柱: Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 见表1; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 25  $^{\circ}\text{C}$ ; 检测波长: 230 nm; 进样量: 10  $\mu\text{l}$ 。

表1 流动相梯度洗脱

时间( $t/\text{min}$ )	乙腈(%)	1% 磷酸水溶液(%)
0~10	15~12	85~88
10~18	12	88
18~35	12~27	88~73
35~45	27~15	73~85

**2.6.2 溶液的配制** ①对照品溶液的制备: 分别精密称取芍药苷对照品适量, 加甲醇制成每1 ml 含

芍药苷 0.288 mg 的溶液, 即得。②样品溶液的制备: 取本品装量差异项下的颗粒, 研成细粉, 混匀, 取约1 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入稀乙醇15 ml, 密塞, 称重, 超声45 min, 放冷至室温, 用稀乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。③阴性对照液: 按处方比例配制缺白芍药材的阴性溶液, 按样品溶液的制备方法, 制成阴性对照液。

**2.6.3 专属性试验** 取上述对照品溶液、样品溶液及阴性对照液各10  $\mu\text{l}$ , 按“2.6.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图(图6)。结果显示, 阴性对照液在与对照品保留时间相同的位置上无色谱峰出现, 表明健脾补肾颗粒中其他成分对芍药苷的测定无干扰。

**2.6.4 线性关系考察** 精密吸取对照品溶液1 ml, 逐级稀释, 摇匀。制得浓度分别为8.676、17.352、34.704、69.408、138.816、277.632  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液系列, 各取10  $\mu\text{l}$ 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 以对照品浓度  $X(\mu\text{g}/\text{ml})$  为横坐标, 峰面积  $Y$  为纵坐标, 进行回归分析。回归方程为:  $Y = 11.725X + 22.57$ ,  $r = 0.9999$ 。结果表明, 芍药苷含量在8.676~277.632  $\mu\text{g}/\text{ml}$  范围内呈良好线性关系。

**2.6.5 精密度试验<sup>[4]</sup>** 精密吸取芍药苷对照品溶液10  $\mu\text{l}$ , 连续进样6次, 记录峰面积, 结果RSD为0.86%, 表明仪器有良好的精密度。

**2.6.6 稳定性试验** 精密称取同一样品溶液(批号: 140428), 分别于配制后0、2、4、6、8 h 测定峰面积, 芍药苷RSD为2.27% ( $n=5$ ), 结果表明, 供试品溶液在8 h 内稳定性良好。

**2.6.7 重复性试验** 精密称取同一批号(批号: 140428)的健脾补肾颗粒6份, 按“2.6.2”项下制备样品溶液6份, 连续进样6次, 分别记录峰面积, 结果样品中芍药苷的平均含量为0.995 mg/g, RSD为2.19%, 表明本方法有良好的重复性。

**2.6.8 回收率试验** 称取已知含量的9份同一批样品(批号: 140428)约0.5 g, 精密称定, 置量瓶中, 分别加入芍药苷对照品溶液(0.02776 mg/ml)3、5和7 ml, 按“2.6.2”项下样品溶液的制备方法, 依“2.6.1”项下色谱条件测定, 记录峰面积, 计算回收率。结果见表2。

**2.6.9 样品含量测定** 对照品和供试品溶液各进样10  $\mu\text{l}$ , 每批样品分别测定3次, 依法测定3个批次样品中芍药苷含量。结果见表3。

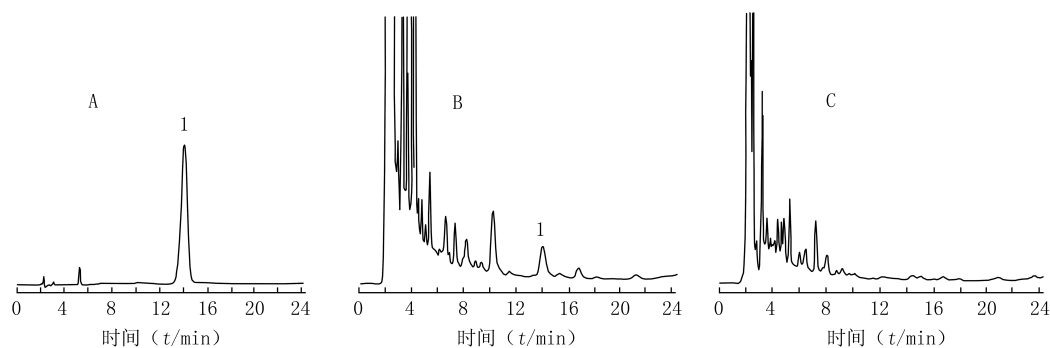


图6 专属性试验

A.对照品; B.样品; C.阴性对照; 1.芍药苷

表2 回收率试验结果(n=9)

样品含量 (m/mg)	加样量 (m/mg)	测得量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.123 1	0.083 3	0.203 7	96.72		
0.122 9	0.083 3	0.206 0	99.71		
0.126 9	0.083 3	0.207 8	97.15		
0.128 0	0.138 8	0.271 6	103.49		
0.128 6	0.138 8	0.273 3	104.27	100.76	2.89
0.129 3	0.138 8	0.273 0	103.57		
0.128 7	0.194 3	0.329 1	103.12		
0.129 3	0.194 3	0.323 3	99.87		
0.129 9	0.194 3	0.322 2	98.95		

表3 含量测定结果(n=3)

批号	芍药苷含量(mg/g)	平均含量(mg/g)
140428	0.232 9	
140729	0.285 5	0.268 0
141226	0.285 5	

### 3 讨论<sup>[5]</sup>

**3.1 提取方法的选择** ①提取溶剂的选择:分别选用乙醇、甲醇作为提取溶剂进行比较,提取方法及含量测定方法相同,结果表明,用乙醇提取时含量较高,故选用乙醇作为溶剂。②溶剂用量:称取同一批号:140428的样品1g,取稀乙醇溶剂用量分别为固液比1:10、1:15、1:20,按上述方法依次测定,芍

药苷含量分别为0.231 8、0.234 1、0.194 3 mg/g。结果表明,选择固液比1:15作为提取方法最佳。

**3.2 流动相的选择** 参照文献[1]中芍药苷的含量测定方法,对3种流动相进行比较:①乙腈-0.1%磷酸水溶液(14:86),目标峰基线不平,且制剂所含杂质过多;②乙腈-0.1%磷酸水溶液(12:88),目标峰与杂质峰分离良好,但制剂所含杂质过多,运行时间过长;③乙腈-0.1%磷酸水溶液梯度洗脱,目标峰与杂质峰分离良好,且制剂洗脱干净,运行时间较短。结果表明,用乙腈-0.1%磷酸水溶液梯度洗脱最为适宜。

### 【参考文献】

- [1] 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,2010:70,176,264,283-284,282-283.
- [2] 吴 笛,王德勤,李楚源.复方丹参片薄层色谱鉴别方法研究[J].药物分析杂志,2012,32(9):1658-1660.
- [3] 赵越平,张晓楠,张延凤,等.益胃胶囊中部分有效成分的薄层鉴别及芍药苷的HPLC测定[J].第四军医大学学报,2001,22(17):1583-1585.
- [4] 李伯军,付艳敏,李铁强,等.HPLC法测定荆必灵片中芍药苷的含量[J].中国药事,2007,21(2):110-112.
- [5] 尹宁宁,徐华玲,徐丽华.白芍中芍药苷含量测定影响因素的实验研究[J].中国医药导报,2009(11):43-44.

[收稿日期] 2015-09-01 [修回日期] 2015-10-21

[本文编辑] 李睿旻