

· 论著 ·

芪黄扶正颗粒的质量控制方法研究

曾令军^a, 宋洪涛^a, 冯英力^a, 程惠华^b (福州总医院 :a. 药学科, b. 放疗科, 福建 福州 350025)

[摘要] **目的** 建立芪黄扶正颗粒的质量控制方法。**方法** 采用 TLC 法对方中黄芪、熟地黄、山茱萸、当归、川芎、赤芍、牡丹皮、麦门冬进行定性鉴别; 采用 HPLC 法对臣药山茱萸中马钱苷进行含量测定。**结果** 建立了主要药味的 TLC 鉴别方法, 斑点清晰, 阴性无干扰; 马钱苷在 4.02~80.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内线性关系良好 ($r=0.9999$), 平均加样回收率为 99.02%, RSD 为 0.64% ($n=9$)。**结论** 本研究建立的质量控制方法准确、可靠、专属性强, 为芪黄扶正颗粒的质量控制奠定了基础。

[关键词] 芪黄扶正颗粒; 质量控制; 马钱苷

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2017)06-0530-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.06.012

Quality control methods for Qihuang Fuzheng particle

ZENG Lingjun^a, SONG Hongtao^a, FENG Yingli^a, CHENG Huihua^b (a. Department of Pharmacy, b. Department of Radiation Oncology, Fuzhou General Hospital, Fuzhou 350025, China)

[Abstract] **Objective** To establish the quality control methods for Qihuang Fuzheng particle. **Methods** *Astragali Radix*, *Rehmanniae Radix Praeparata*, *Corni Fructus*, *Chuanxiong Rhizoma*, *Angelicae Sinensis Radix*, *Paeoniae Radix Rubra*, *Moutan Cortex*, and *Ophiopogonis Radix* were identified with TLC. HPLC method was used for loganin assay in *Corni Fructus*. **Results** TLC identification methods for the main components were established. The TLC spots were clear with good separation. No interference was detected from the negative samples. The peak response and concentration of loganin showed good linear relationship over the range of 4.02-80.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($r=0.9999$). The mean recovery of loganin was 99.02% (RSD=0.64%, $n=9$). **Conclusion** The established quality control methods are accurate, reliable, and specific, which lay a foundation for the quality control of Qihuang Fuzheng particle.

[Key words] Qihuang Fuzheng particle; quality control; loganin

芪黄扶正汤为福州总医院放疗科临床验方, 由黄芪、熟地黄、山茱萸、当归、川芎、赤芍、牡丹皮、麦门冬等十一味中药组成, 具有滋阴补肾、补中益气、活血化瘀之功效, 用于改善和减轻前列腺癌内分泌治疗过程中产生的潮热、乏力、盗汗、五心烦热、免疫功能低下等副作用, 临床疗效显著, 能明显提高前列腺癌患者的生活质量和治疗依从性。鉴于传统汤剂存在剂量大、使用和携带不便等问题, 本课题组对其进行了系列提取、纯化工艺研究, 并将其制备成了颗粒剂。为建立有效的质量控制方法, 本研究对芪黄扶正颗粒的主要药味进行 TLC 鉴别研究并建立指标性成分的 HPLC 含量测定方法, 同时为芪黄扶正

颗粒质量标准的制订提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1200 型快速液相色谱仪 (美国安捷伦公司); AL204 型分析天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); KQ-800KDE 型高功率数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司, 400 W, 40 000 Hz)。

1.2 试剂 黄芪甲苷对照品 (含量: 98%, 批号: 110781-201314)、黄芪对照药材 (批号: 120974-201311)、熟地黄对照药材 (批号: 121196-201105)、马钱苷对照品 (含量: 97%, 批号: 111640-201005)、山茱萸对照药材 (批号: 121495-201308)、阿魏酸对照品 (含量: 99.6%, 批号: 110773-201313)、当归对照药材 (批号: 120927-201014)、川芎对照药材 (批号: 120918-201411)、芍药苷对照品 (含量: 99%, 批号: 110736-201438)、赤芍对照药材 (批号: 121093-201403)、牡丹皮对照药材 (批号: 121490-201102)、

[基金项目] 福建中医药大学临床专项校管课题 (XB2016078)

[作者简介] 曾令军, 硕士, 药师, 研究方向: 中药活性成分研究, Tel: (0591)22859169, Email: 875276534@qq.com

[通讯作者] 宋洪涛, 博士, 主任药师, 教授, 博士生导师, Tel: (0591)22859459, Email: sohoto@vip.163.com

麦门冬对照药材(批号:121013-201310)均购自中国食品药品检定研究院;芪黄扶正颗粒(批号:160301、160315、160331,福州总医院制剂室自制);甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯。

2 TLC 鉴别

2.1 黄芪^[1] 取芪黄扶正颗粒 10 g,溶解于 50 ml 水中,过滤后取滤液,置分液漏斗中用水饱和正丁醇溶液萃取(50 ml×3),合并正丁醇部位,用氨试液洗涤(50 ml×3),弃去氨试液,再用正丁醇饱和的水洗涤(50 ml×3),合并正丁醇部位,蒸干,残渣溶解于 1 ml 甲醇,制得黄芪供试品溶液。取与芪黄扶正颗粒同法制备的缺黄芪阴性颗粒 10 g,按照供试品制备方法处理制得黄芪阴性对照溶液。另取黄芪对照药材约 1 g,用甲醇 30 ml 加热回流提取 1 h,趁热过滤,滤液蒸干,残渣加水 50 ml 使溶解,其余同供试品制备方法处理,制得黄芪对照药材溶液。再取适量黄芪甲苷对照品,溶解于甲醇中,制成每 1 ml 含 1 mg 的黄芪甲苷对照品溶液。参照《中华人民共和国药典(2015 年版)》^[2]方法试验,依次吸取上述黄芪甲苷对照品和黄芪对照药材各 5 μl、供试品和阴性对照溶液各 10 μl,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以二氯甲烷-甲醇-水(20:5:1)4℃放置过夜的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与黄芪甲苷对照品及黄芪对照药材色谱相应位置上,显相同的棕红色斑点,阴性对照无干扰,见图 1。

2.2 熟地黄^[3] 取“2.1”项下供试品作为熟地黄鉴别用供试品。取与芪黄扶正颗粒同法制备的缺熟地

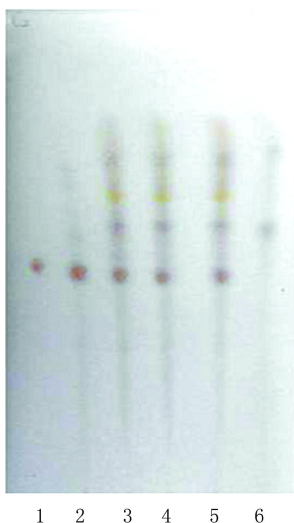


图 1 黄芪的 TLC 鉴别

1.对照品;2.对照药材;3~5.供试品;6.阴性对照

黄阴性颗粒 10 g,按照供试品制备方法处理,制得熟地黄阴性对照溶液。取熟地黄对照药材 2 g,加水 60 ml 回流提取 60 min,趁热过滤,滤液放冷后按照供试品制备方法处理制得熟地黄对照药材溶液。按照文献^[2]方法试验,依次吸取熟地黄对照药材、供试品和阴性对照溶液各 5 μl,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(10:1:1:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与熟地黄对照药材色谱相应位置上,显相同的蓝色斑点,阴性对照无干扰,见图 2。

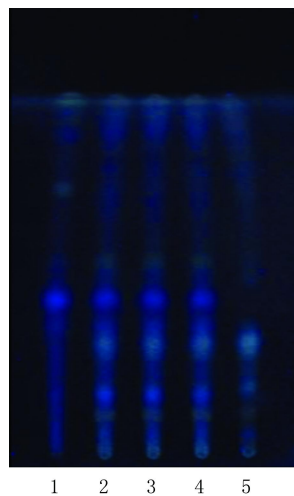


图 2 熟地黄的 TLC 鉴别

1.对照药材;2~4.供试品;5.阴性对照

2.3 山茱萸^[4] 取“2.1”项下供试品作为山茱萸鉴别用供试品。取与芪黄扶正颗粒同法制备的山茱萸阴性颗粒 10 g,按照供试品制备方法处理制得山茱萸阴性对照溶液。另取山茱萸对照药材约 1 g,用甲醇 30 ml 回流提取 30 min,趁热过滤,滤液蒸干,残渣溶于 50 ml 水中,其余同供试品制备方法处理,制得山茱萸对照药材溶液。再取马钱苷对照品适量,溶解于甲醇中,制成每 1 ml 含 1 mg 的马钱苷对照品溶液。按照文献^[2]方法试验,依次吸取上述马钱苷对照品溶液和山茱萸对照药材溶液各 2 μl、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μl,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-95%乙醇-冰醋酸(50:10:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 香草醛硫酸溶液,加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与马钱苷对照品及山茱萸对照药材色谱相应的位置上,显相同的紫红色斑点,阴性对照无干扰,见图 3。

2.4 当归和川芎^[5] 取芪黄扶正颗粒 3 g,加水溶解至 30 ml,过滤,以稀盐酸调节滤液 pH 至 2~3,置分液漏斗中,用乙醚振摇提取(30 ml×3),合并乙

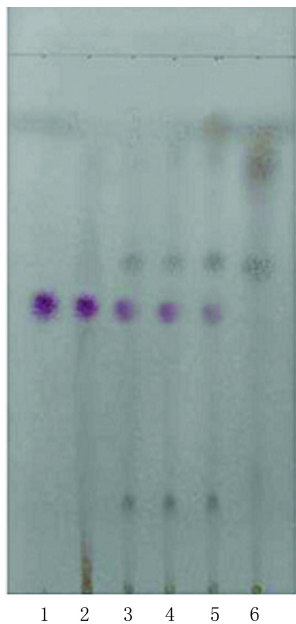


图3 山茱萸的 TLC 鉴别

1.马钱苷对照品;2.山茱萸对照药材;
3~5.供试品;6.阴性对照

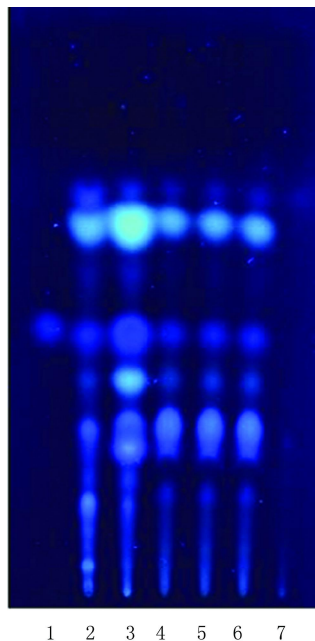


图4 当归和川芎的 TLC 鉴别

1.对照品;2.当归对照药材;3.川芎对照药材;
4~6.供试品;7.阴性对照

醚部位,蒸干,残渣溶解于1 ml 甲醇,即得供试品溶液。取与芪黄扶正颗粒同法制备的缺当归和川芎的阴性颗粒3 g,按照供试品溶液制备方法处理,制得阴性对照溶液。分别取当归、川芎对照药材各1 g,以水30 ml 回流提取60 min,趁热过滤,以稀盐酸调节滤液 pH 至2~3,其余按照供试品溶液制备方法处理,分别制得当归和川芎对照药材溶液。再称取适量阿魏酸对照品,用甲醇溶解制成每1 ml 含1 mg 的阿魏酸对照品溶液。按照文献[2]方法试验,依次吸取阿魏酸对照品、当归对照药材、川芎对照药材、供试品和阴性对照溶液各5 μ l,分别点于同一硅胶G 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-冰乙酸(9:4:1)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,在与阿魏酸对照品及当归和川芎对照药材色谱相应位置上,显相同的蓝色荧光斑点,阴性对照无干扰,见图4。

2.5 赤芍和牡丹皮^[6] 取“2.1”项下供试品作为赤芍和牡丹皮鉴别用供试品。取与芪黄扶正颗粒同法制备的赤芍和牡丹皮阴性颗粒10 g,按照供试品溶液制备方法处理,制得阴性对照溶液。分别取赤芍、牡丹皮对照药材各0.5 g,加水60 ml 回流提取60 min,趁热过滤,放冷后按照供试品溶液制备方法处理,分别制得赤芍和牡丹皮对照药材溶液。再称取适量芍药苷对照品,加甲醇溶解制成每1 ml 含1 mg 的芍药苷对照品溶液。参照文献[2]方法试验,依次吸取上述芍药苷对照品溶液和赤芍、牡丹皮

对照药材溶液各5 μ l、供试品溶液和阴性对照溶液各10 μ l,分别点于同一硅胶G 薄层板上,以乙酸乙酯-甲醇-甲酸(10:2:0.1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5% 香草醛硫酸溶液,加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与芍药苷对照品及赤芍和牡丹皮对照药材色谱相应的位置上,显相同的褐色斑点,阴性对照无干扰,见图5。

2.6 麦门冬^[7] 取芪黄扶正颗粒10 g,加30 ml 水和2 ml 盐酸使溶解,水浴回流提取30 min,趁热过滤,滤液放冷至室温,置分液漏斗中用三氯甲烷振摇提取(30 ml \times 3),合并三氯甲烷部位,蒸干,残渣溶解于1 ml 甲醇,制得供试品。另取与芪黄扶正颗粒同法制备的麦门冬阴性颗粒10 g 及麦门冬对照药材1 g,按照供试品溶液制备方法处理,制得麦门冬阴性对照及麦门冬对照药材溶液。按照文献[2]方法试验,依次吸取麦门冬对照药材、供试品和阴性对照溶液各5 μ l,分别点于同一硅胶G 薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯(1:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10% 硫酸乙醇溶液,加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与麦门冬对照药材色谱相应位置上,显相同的黑色斑点,阴性对照无干扰,见图6。

3 含量测定

3.1 色谱条件 色谱柱:DIKMA Diamonsil C₁₈柱(4.6 mm \times 200 mm,5 μ m),检测波长:240 nm,柱温:25 $^{\circ}$ C,流速:1.0 ml/min,进样量:10 μ l,以乙腈-

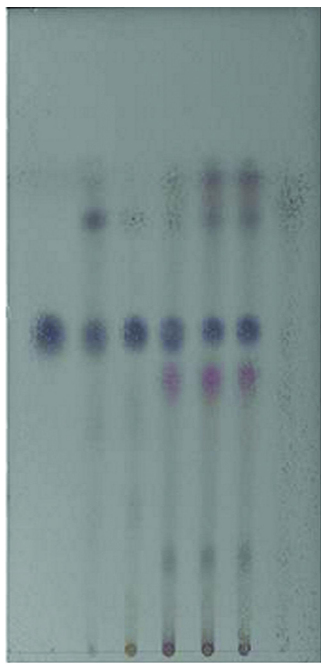


图5 赤芍和牡丹皮的 TLC 鉴别

1.对照品;2.赤芍对照药材;3.牡丹皮对照药材;4~6.供试品;7.阴性对照



图6 麦门冬的 TLC 鉴别

1.对照药材;2~4.供试品;5.阴性对照

0.1%磷酸溶液(10:90)为流动相。

3.2 溶液的制备

3.2.1 对照品溶液 精密称取马钱苷对照品约20 mg,置25 ml棕色量瓶,用70%甲醇溶解并稀释至刻度,制得804.0 μg/ml的对照品溶液。

3.2.2 供试品溶液 精密称取芪黄扶正颗粒约3 g,置25 ml棕色量瓶,加适量70%甲醇,超声处理

10 min,用70%甲醇稀释至刻度,即得供试品溶液。

3.2.3 阴性对照溶液 取山茱萸阴性颗粒,按照“3.2.2”项下同法处理,即得。

3.3 方法学考察

3.3.1 系统适用性与专属性试验 依次精密吸取对照品、供试品和阴性对照溶液各10 μl,按照“3.1”项下测定。结果阴性对照色谱图中,在与对照品色谱图相应位置无色谱峰,供试品色谱图中,马钱苷与相邻成分分离良好,分离度为6.72,理论塔板数为15 964,表明所建立的方法专属性较好,能用于马钱苷的定量测定,见图7。

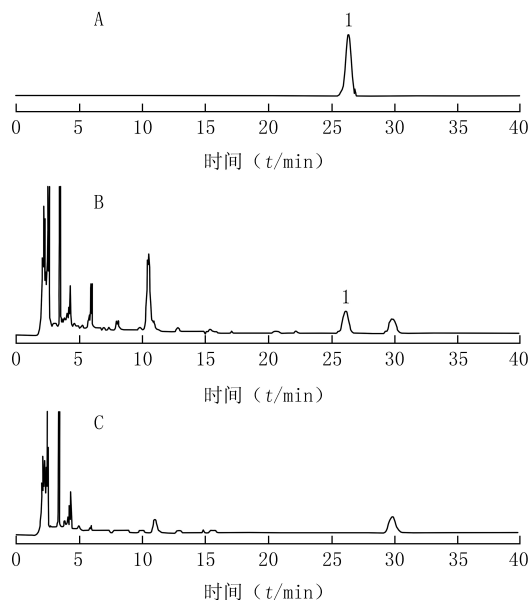


图7 芪黄扶正颗粒 HPLC 图

A.对照品溶液;B.供试品溶液;C.阴性对照溶液;1.马钱苷

3.3.2 线性关系 精密量取对照品溶液1.0 ml置10 ml棕色量瓶,用70%甲醇稀释至刻度,配制成浓度为80.40 μg/ml的对照品溶液;再从80.40 μg/ml的对照品溶液中分别精密吸取0.5、1.0、1.5、2.5、5.0 ml溶液置10 ml棕色量瓶,并用70%甲醇稀释至刻度,摇匀,得系列浓度的马钱苷对照品溶液。按照“3.1”项下测定。以峰面积为纵坐标(Y),对照品浓度为横坐标(X, μg/ml),进行线性回归,得线性方程: $Y = 18.50 X - 3.273$, $r = 0.9999$ 。结果表明,马钱苷浓度在4.02~80.40 μg/ml范围内呈现良好的线性关系。

3.3.3 精密度试验 取同一份对照品溶液(40.20 μg/ml)6份,按照“3.1”项下测定,计算峰面积RSD值。结果峰面积RSD为0.10%,表明本方法精密度良好。

3.3.4 重复性试验 从同一批样品中精密称取样

品6份,每份约3g,按照“3.1”和“3.2.2”项下同法操作,计算马钱苷含量和RSD值。结果马钱苷平均含量为347.51 $\mu\text{g/g}$,RSD为0.35%,表明本方法重复性良好。

3.3.5 稳定性试验 取同一份供试品溶液,室温下放置,分别于0、2、4、8、12 h后测定,计算马钱苷含量并计算RSD值。结果RSD为0.22%,表明供试品溶液在室温下放置12 h基本稳定。

3.3.6 加样回收率试验 称取已知含量的同一批芪黄扶正颗粒9份(批号:160301,马钱苷含量347.51 $\mu\text{g/g}$),依次精密加入样品含量80%、100%、120%的马钱苷对照品,按“2.2.3”和“2.2.1”项下方法同法操作,计算平均回收率,结果见表1。

表1 芪黄扶正颗粒加样回收率试验结果($n=9$)

已知含量 ($m/\mu\text{g}$)	加入量 ($m/\mu\text{g}$)	测得量 ($m/\mu\text{g}$)	回收率 (%)	平均回 收率(%)	RSD (%)
521.68	410.04	931.52	99.95	99.02	0.64
522.13	410.04	932.26	100.02		
525.16	410.04	930.19	98.78		
521.20	522.60	1 037.02	98.70		
523.11	522.60	1 035.62	98.07		
521.82	522.60	1 038.23	98.82		
525.61	627.12	1 148.29	99.29		
520.50	627.12	1 140.56	98.87		
523.98	627.12	1 142.65	98.65		

3.3.7 样品含量测定 取3批芪黄扶正颗粒样品,按“2.2.1”和“2.2.3”项下方法,测定马钱苷含量,结果见表2。

表2 马钱苷含量测定结果($n=3$)

批号	含量($\mu\text{g/g}$)
160301	347.51
160315	320.25
160331	330.83

4 讨论

4.1 主要药味的鉴别 本研究采用TLC法建立了芪黄扶正颗粒中黄芪、熟地黄、山茱萸、当归、川芎等八味中药的定性鉴别方法,实现了对方中主要药味

的鉴别,能更全面地控制该制剂质量。其中,黄芪、熟地黄、山茱萸、赤芍、牡丹皮均采用相同的前处理方法,简化了芪黄扶正颗粒的鉴别操作。《中国药典》关于川芎的TLC鉴别采用脂溶性较强的成分欧当归内酯A为对照品,因欧当归内酯A水溶性较差,以水为提取溶剂的芪黄扶正颗粒未能鉴定出该成分;鉴于川芎和当归具有相同活性成分阿魏酸,故以其为对照同时鉴定两药。牡丹皮中虽有较高含量的丹皮酚,水提液可鉴定出该成分,但丹皮酚为挥发性成分,经颗粒制备、干燥后损失较大,未能在终产品颗粒剂中鉴定出,故以其另一主要成分芍药苷为对照,建立与赤芍的同时鉴定方法。

4.2 指标性成分的选择 芪黄扶正颗粒君药为黄芪和熟地黄,黄芪指标性成分为黄芪甲苷($\geq 0.04\%$)和毛蕊异黄酮葡萄糖苷($\geq 0.02\%$),熟地黄指标性成分为毛蕊花糖苷($\geq 0.02\%$),含量均较低,且蒸发光散射检测器不易于普及,经筛选,选择了具有较高含量马钱苷($\geq 0.6\%$)的臣药山茱萸作为含量测定药味。

本研究建立了芪黄扶正颗粒主要药味的TLC鉴别方法,并建立了山茱萸中马钱苷的HPLC含量测定方法,方法专属性、可靠性强,能有效用于芪黄扶正颗粒的质量控制,同时亦为芪黄扶正颗粒质量标准的制订奠定了实验基础。

【参考文献】

- [1] 曾令军,宋洪涛,陈惠华,等.前列丹颗粒的质量控制方法研究[J].中国药师,2016,19(3):474-477.
- [2] 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,2015:57.
- [3] 李霞,贾晓斌,陈彦,等.妇康宝颗粒质量标准研究[J].时珍国医国药,2006,17(4):601-602.
- [4] 唐勇琛,梁学政,吕建伟,等.益水生新饮颗粒的质量标准[J].中国药师,2014,17(5):737-740.
- [5] 曾令军,宋洪涛,李蔚,等.心脑血管口服液质量标准提高研究[J].解放军药学报,2016,32(5):417-419.
- [6] 童晓东,陈志军,杨水英,等.益视明目颗粒的质量标准研究[J].现代中药研究与实践,2016,30(1):42-45.
- [7] 江涛,雷健,邢茂,等.口炎清胶囊的质量控制和稳定性试验[J].中国药业,2014,23(11):17-20.

[收稿日期] 2017-03-03 [修回日期] 2017-06-30

[本文编辑] 李睿旻