

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.22.012

黄芪补气养血合剂质量标准研究

唐斌斌¹, 杜书君^{1△}, 郝保华²

(1. 山东省聊城市阳谷县人民医院, 山东 聊城 252300; 2. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069)

摘要:目的 建立黄芪补气养血合剂的质量标准。方法 采用薄层色谱法对制剂中的主要药味黄芪、白芍和补骨脂进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定当归中主要活性成分阿魏酸的含量,色谱柱为 Thermo C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.085%磷酸溶液(15:85),检测波长为 316 nm,流速为 1.0 mL/min,柱温为 35℃。结果 3种药材的薄层鉴别方法专属性强;阿魏酸进样量在 0.015~0.180 μg 范围内与峰面积线性关系良好, $r=0.999\ 9$ ($n=5$),平均回收率为 99.76%, RSD 为 0.81% ($n=6$)。结论 该方法操作简单,灵敏度高,重复性好,专属性强,可用于黄芪补气养血合剂的质量控制。

关键词:黄芪补气养血合剂;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法;阿魏酸;黄芪;白芍;补骨脂

中图分类号:R932;R284.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)22-0040-03

Study on Quality Standard of Huangqi Buqiyangxue Mixture

Tang Binbin¹, Du Shujun¹, Hao Baohua²

(1. The People's Hospital of Yanggu County, Liaocheng, Shandong, China 252300; 2. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an, Shaanxi, China 710069)

Abstract: **Objective** To establish the quality standard of Huangqi Buqiyangxue Mixture. **Methods** The *Astragali Radix*, *Paeoniae Radix Alba* and *Psoraleae Fructus* in the Mixture were identified by TLC. The content of main active components(ferulic acid) of *Angelica sinensis* was determined by HPLC with Thermo C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.085% phosphoric acid solution(15:85), the detection wavelength was 316 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, and the column temperature was 35℃. **Results** The TLC identification method for 3 kinds of Chinese medicinal herbs was highly specific. The sample size of ferulic acid was linear in the range of 0.015 - 0.180 μg, $r=0.999\ 9$ ($n=5$), the average recovery rate was 99.76%, RSD was 0.81% ($n=6$). **Conclusion** The method is simple, highly sensitive, reproducible and specific, which can be used for the quality control of Huangqi Buqiyangxue Mixture.

Key words: Huangqi Buqiyangxue Mixture; quality standard; TLC; HPLC; ferulic acid; *Astragali Radix*; *Paeoniae Radix Alba*; *Psoraleae Fructus*

黄芪补气养血合剂是阳谷县人民医院经过 20 余年临床实践总结的有效方剂,由黄芪、当归、补骨脂、白芍、女贞子、白术等 10 余味中药组方,有补气养血、健脾补肾功效,用于治疗气血亏虚、脾肾不足证引起的白细胞减少症及术后气血虚弱等症效果良好。两症属中医“虚劳”“气血虚”等范畴^[1],治疗多采用扶正固本之法。为了确保黄芪补气养血的质量稳定性和临床有效性,本研究中建立了制剂中黄芪、白芍和补骨脂的薄层鉴别方法,以及当归中阿魏酸含量的测定方法。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器:Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);YP-5001 型电子精密天平(上海良平仪器仪表有限公司);YFX20/3+1 型常压循环 3+1 一体煎药机(北京东华原医疗设备有限责任公司);QH-2 夹层锅(郭店前中不锈钢制品厂);BSA224S 型电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司)。

试药:黄芪甲苷对照品(批号为 110781-201616),芍药苷对照品(批号为 110736-201438),补骨脂素对照品(批号为 110739-201310),异补骨脂素对照品(批

号为 110738-201313),阿魏酸对照品(批号为 110773-201614),均购自中国食品药品检定研究院;黄芪补气养血合剂(批号分别为 20170515,20170518,20170522,阳谷县人民医院制剂室自制);乙腈和磷酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯;试验用水为双蒸水。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

黄芪^{[2]302,[3-5]}:取本品 20 mL,加水饱和的正丁醇提取 2 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,用氨试液 20 mL 洗涤,弃去氨溶液,再用正丁醇饱和的水洗涤 3 次,每次 20 mL,正丁醇液蒸干,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,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。取缺黄芪的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。照薄层色谱法[2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502,以下简称“通则 0502”]试验,精密吸取上述 3 种溶液各 2 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以 10℃ 以下放置分层的三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2)的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,在 105℃

第一作者:唐斌斌,硕士研究生,主管中药师,主要从事制剂的开发与研究,(电话)0635-6262143(电子信箱)tangbinbin515@163.com。

△通信作者:杜书君,硕士研究生,主管药师,主要从事制剂的开发与研究,(电子信箱)shujundu@163.com。

加热至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。详见图 1A。

白芍^{[2]105, [6-7]}:取本品 20 mL,加水饱和正丁醇提取 2 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,用氨试液 20 mL 洗涤,弃去氨溶液,再用正丁醇饱和的水洗涤 3 次,每次 20 mL,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。取芍药苷对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液,作为对照品溶液。取缺白芍的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。照薄层色谱法(通则 0502)试验,精密吸取上述 3 种溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 香草醛硫酸溶液,置 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色斑点,阴性对照无干扰。详见图 1B。

补骨脂^{[2]187, [8-9]}:取本品 20 mL,加乙醚 20 mL 振摇提取,取乙醚液,蒸干,残渣加乙酸乙酯 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取补骨脂素、异补骨脂素对照品,分别加乙酸乙酯制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液,作为对照品溶液。取缺补骨脂的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。照薄层色谱法(通则 0502)试验,吸取上述 4 种溶液各 2 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板,以正己烷-乙酸乙酯(4:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 氢氧化钾甲醇溶液,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色荧光斑点,阴性对照无干扰,详见图 1C。

2.2 阿魏酸含量测定

2.2.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱:Thermo C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);

流动相:乙腈-0.085% 磷酸溶液(15:85);检测波长:316 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:35 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。理论板数按阿魏酸峰计应不低于 2 000。

2.2.2 溶液制备

取阿魏酸对照品适量,精密称定,置棕色容量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 含 15 μ g 的溶液,即得对照品溶液。精密量取本品 3 mL,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,过滤,滤液经 0.22 μ m 滤膜滤过,即得供试品溶液。取缺当归药材的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备,即得阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:分别取 2.2.2 项下 3 种溶液,按拟订色谱条件进样,记录色谱峰。结果供试品溶液和对照品溶液色谱在相同保留时间处有色谱峰,阴性无干扰,且分离度较好,表明方法专属性好。详见图 2。

线性关系考察:精密吸取质量浓度为 15 μ g/mL 的阿魏酸对照品溶液 1, 2, 4, 8, 12 μ L,按拟订色谱条件分别进样测定,以阿魏酸进样量(X , μ g)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 24\,895X - 45.323$, $r = 0.999\,9$ ($n = 5$)。结果表明,阿魏酸进样量在 0.015 ~ 0.180 μ g 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取质量浓度为 15 μ g/mL 的阿魏酸对照品溶液 10 μ L,重复进样 6 次,测定峰面积。结果的 RSD 为 0.83% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液(批号为 20170515),分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时进样,测定阿魏酸的峰面积。结果的 RSD 为 1.02% ($n = 6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验:取同一批(批号为 20170515)样品,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液 6 份,按拟订色谱条件测定。结果阿魏酸的平均含量为 28.68 μ g/mL, RSD 为

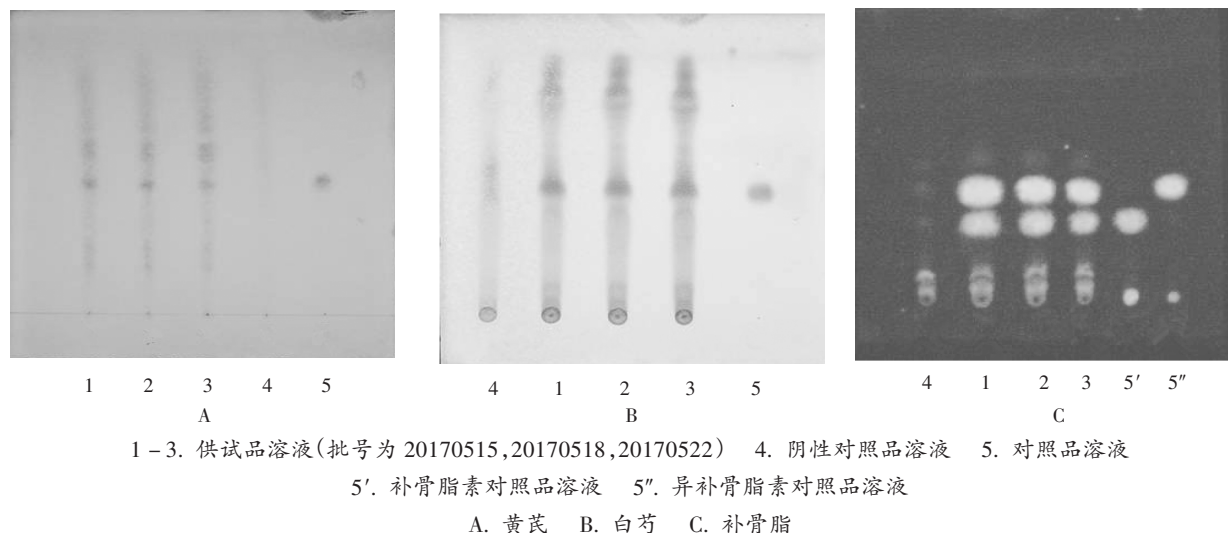
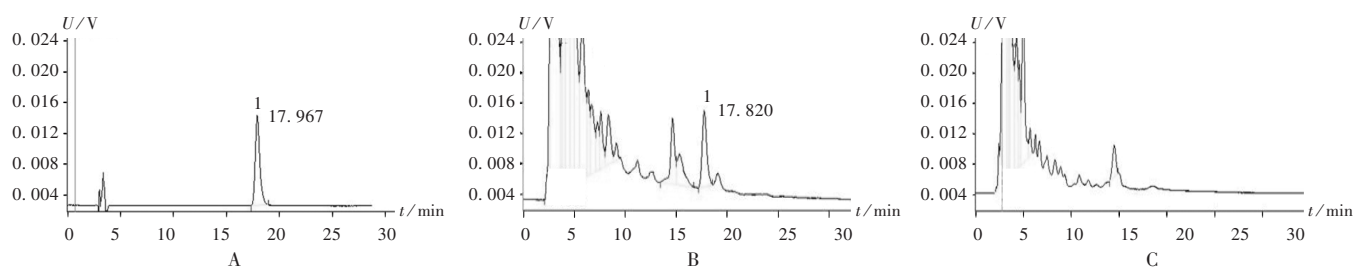


图 1 薄层色谱图



1. 阿魏酸

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图2 高效液相色谱图

0.98% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密量取已知含量(阿魏酸含量为 $28.72 \mu\text{g/mL}$)的样品6份,每份1 mL,分别精密加入质量浓度为 $15 \mu\text{g/mL}$ 的阿魏酸对照品溶液各2 mL,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,进样测定,计算回收率。结果见表1。

表1 阿魏酸加样回收试验结果 ($n=6$)

取样量 (mL)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
1.0	0.028 72	0.03	0.058 74	100.07	99.76	0.81
1.0	0.028 72	0.03	0.058 43	99.03		
1.0	0.028 72	0.03	0.059 06	101.13		
1.0	0.028 72	0.03	0.058 65	99.77		
1.0	0.028 72	0.03	0.058 39	98.90		
1.0	0.028 72	0.03	0.058 61	99.63		

2.2.4 样品含量测定

取3批样品,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,各精密吸取10 μL ,按拟订色谱条件进样测定。结果批号为20170515,20170518,20170522的3批样品中阿魏酸的含量分别为28.61,28.83,29.13 $\mu\text{g/mL}$ 。

3 讨论

参考《中国药典》及有关文献,曾对该制剂中的主要药材进行薄层鉴别,其中黄芪、白芍、补骨脂的薄层鉴别斑点清晰,阴性对照无干扰。本研究中对党参进行薄层色谱鉴别,由于党参中主要成分为党参炔苷,极性较大,采用不同方法处理样品^{[2]281, [10-11]},均无法完全排除阴性干扰,故未建立党参的薄层色谱鉴别方法。

当归补血活血,为黄芪补气养血合剂的主要药味,对其指标成分阿魏酸进行了含量测定研究。阿魏酸极性较大,在热水、甲醇、乙醇、乙酸乙酯等溶剂中均有较好的溶解性,故供试品溶液制备方法可采用直接稀释法或萃取法^[12],本研究中采用甲醇直接稀释法,与药典所载70%甲醇提取法基本一致。测定阿魏酸含量时,考察了不同体系和不同比例的流动相[乙腈-0.1%磷酸溶液(17:83)^[13]、甲醇-0.1%磷酸溶液(30:70)^[14]、甲醇-0.8%冰醋酸液(22:78)^[15]],色谱峰分离程度均不理

想,经过多次试验,适当调整后,结果以乙腈-0.085%磷酸溶液(15:85)为流动相得到的色谱峰分离度较好,阴性对照无干扰。

本研究中确立了黄芪补气养血合剂中黄芪、白芍和补骨脂的薄层鉴别方法及当归中阿魏酸的含量测定方法,试验结果表明,该方法操作简单,灵敏度高,重复性好,专属性强,可用于黄芪补气养血合剂的质量控制。

参考文献:

- [1] 李君,王茂生,范华,等. 白细胞减少症中医诊疗经验辑要[J]. 天津中医药,2013,30(12):732-734.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [3] 罗峰. 采用TLC法鉴别参芪苓术合剂中黄芪和黄连[J]. 齐鲁药事,2012,31(1):23-24.
- [4] 王晓斌,郝素平,陈欢,等. 参芪益气散质量标准的研究[J]. 中成药,2016,38(10):2180-2183.
- [5] 徐小芳,陈文婷,刘敏,等. 复方附子口服液质量标准的研究[J]. 中成药,2016,38(4):815-819.
- [6] 徐勇. 双利通合剂质量标准的研究[J]. 黑龙江中医药,2011,40(1):48-49.
- [7] 袁加才,邹恺平,高晓君,等. 止汗灵冲剂的定性定量方法优化研究[J]. 江苏中医药,2016,48(11):65-68.
- [8] 盛国荣. 退白汤中当归、黄芪、丹参、首乌、补骨脂的TLC法鉴别[J]. 海峡药学,2012,24(1):62-64.
- [9] 李养学,李素梅,罗文汇,等. 丹陈化痰止咳颗粒的质量标准研究[J]. 江西中医药,2012,43(1):57-60.
- [10] 孙鑫,张伟,寇文龙,等. 秦岭党参质量控制标准研究[J]. 陕西中医学院学报,2013,36(2):98-100.
- [11] 陈国珍,黄慧,刘睿. 产复康泰胶囊的质量标准研究[J]. 中国药房,2013,24(47):4477-4479.
- [12] 刘俊,宋欣,王满媛,等. 不同提取方法测定当归芍药散中芍药苷和阿魏酸含量的比较研究[J]. 亚太传统医药,2010,6(3):20-22.
- [13] 林晓春,翁立东,郑锦坤,等. 高效液相色谱法测定气血宁口服液中阿魏酸含量[J]. 中国药业,2016,25(13):71-73.
- [14] 李英田,吴爱英. 高效液相色谱法测定珍母丸中阿魏酸含量[J]. 中国药业,2010,19(19):33.
- [15] 莫亚雄,杜利云. 高效液相色谱法测定柏子养心片中阿魏酸的含量[J]. 云南中医中药杂志,2011,32(1):58-59.

(收稿日期:2018-05-15)