

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.01.008

胃炎颗粒中3种活性成分的定性鉴别及芍药苷含量测定*

胡婧, 胡斌, 邓莉, 马攀

(陆军军医大学西南医院药学部, 重庆 400038)

摘要:目的 建立胃炎颗粒中3种主要中药成分的定性鉴别和芍药苷含量测定的方法。方法 采用薄层色谱(TLC)法对方中黄芪、白芍、白芷进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定芍药苷的含量,色谱柱为Agilent-TC C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-甲醇-0.1%磷酸溶液(7:13:80),流速为1.0 mL/min,检测波长为230 nm,柱温为30℃。结果 TLC鉴别法专属性强,色谱斑点清晰,阴性对照无干扰。芍药苷色谱峰与其他色谱峰分离良好,进样质量浓度在20~120 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 9$);平均加样回收率为101.44%,RSD为1.00%($n=6$);3批次9个样品每10 g中芍药苷的含量平均值为14.62 mg。结论 该方法可用于制剂中黄芪、白芍、白芷的成分鉴别及芍药苷的含量测定。

关键词:胃炎颗粒;质量标准;芍药苷;薄层色谱法;高效液相色谱法;定性鉴别;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)01-0031-04

Qualitative Identification of Three Active Ingredients and Content Determination of Paeoniflorin in Weiyan Granules

HU Jing, HU Bin, DENG Li, MA Pan

(Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Army Medical University, Chongqing, China 400038)

Abstract: Objective To establish a method for qualitative identification and content determination of paeoniflorin in Weiyan Granules.

Methods TLC method was adopted to qualitatively identify *Astragali Radix*, *Paenoniae Radix Alba* and *Angelicae Dahuricae Radix* in Weiyan Granules, and HPLC method was adopted to determine the content of paeoniflorin in Weiyan Granules, the chromatographic column was Agilent-TC C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-methanol-0.1% phosphoric acid(7:13:80), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 230 nm, and the column temperature was 30℃. **Results** TLC identification method had strong specificity, clear chromatographic spots, and no interference from negative control. The chromatographic peaks of paeoniflorin were well separated from other chromatographic peaks. The linear relationship between the concentration of paeoniflorin and the peak area was good in the range of 20-120 μg/mL($r=0.999\ 9$). The average recovery of paeoniflorin was 101.44%, RSD was 1.00% ($n=6$). The average paeoniflorin content of nine samples(three from each batch) was 14.62 mg/10 g. **Conclusion** The method can be used for qualitative identification of *Astragali Radix*, *Paenoniae Radix Alba* and *Angelicae Dahuricae Radix* and content determination of paeoniflorin in Weiyan Granules.

Key words: Weiyan Granules; quality standard; paeoniflorin; TLC; HPLC; qualitative identification; content determination

胃炎颗粒系我院中医科的经验方,在古方芍药甘草汤、黄芪建中汤的基础上筛选优化而来^[1-2],是由蒲公英、黄芪、白芍、白芷、陈皮、建曲、甘草、佛手等8味中药材组方的复方制剂,具有健脾益气、舒肝和胃、止呕降逆、清热消炎的功效。主药白芍的主要成分为芍药苷,也是本品的有效指标成分之一^[3]。为了有效地控制胃炎颗粒的质量,本研究中对胃炎颗粒进行了定性、定量研究,运用薄层色谱(TLC)法对3种主药成分进行鉴别,采用高效液相色谱(HPLC)法测定指标性成分芍药苷的含量,旨在为其质量控制和临床应用提供参考,保障用药

安全。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);AS2060B 型超声清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工有限公司)。

1.2 试剂

芍药苷对照品(批号为110736-201337,含量为94.9%),黄芪甲苷对照品(批号为110781-200512),白芷对照药材(批号为120945-201309),均由中国食

*基金项目:2014年度军队医疗机构制剂标准提高科研专项[14ZJZ02-2]。

第一作者:胡婧,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为药物制剂与分析,(电话)023-68765490(电子信箱)18219797@qq.com。

品药品检定研究院提供;胃炎颗粒(3批,自制,规格为每包10g);甲醇(色谱纯,美国Tedia公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

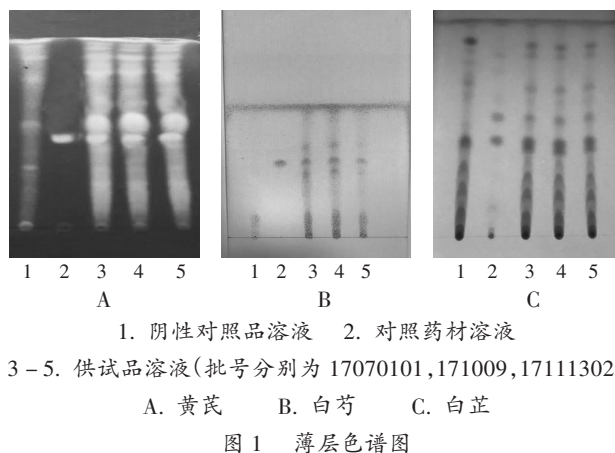
2.1 薄层色谱鉴别

黄芪:取样品适量,研细,称取10g置具塞锥形瓶中,加甲醇50mL,在温水(40~50℃)中超声(60kHz)处理30min,滤过,滤液水浴蒸干,残渣加温水(40~50℃)20mL溶解,用水饱和的正丁醇萃取2次,每次30mL,合并正丁醇液,用氨试液洗2次,每次30mL,弃去氨试液,水洗2次,每次30mL,弃去水液,将正丁醇液水浴蒸干,残渣加甲醇1mL使溶解,作为供试品溶液^[4]。另取黄芪甲苷对照品,加甲醇制成每1mL含0.5mg的溶液,作为对照品溶液^[5]。按处方比例取缺黄芪的各药材,加水煎煮,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,分别取上述溶液各10μL,点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2)10℃以下放置分层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℃加热至斑点显色清晰,日光下检视。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上,日光下显相同颜色斑点^[6],紫外光灯(365nm)下显相同颜色荧光斑点^[7]^[302],阴性对照无干扰,详见图1A。

白芍:取样品适量,研细,称取10g置具塞烧瓶中,加无水乙醇50mL,振摇,密塞,超声(60kHz)处理10min,静置分层,滤过,收集滤液,蒸干,残渣加无水乙醇1mL溶解,即得供试品溶液。另取芍药苷对照品,加无水乙醇制成每1mL含1mg的溶液,作为对照品溶液^[7]^[105]。按处方比例取缺白芍的各药材,加水煎煮,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。照2015年版《中国药典(四部)》薄层色谱法(通则0502)试验,吸取上述溶液各10μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-甲酸(20:4:0.05)为展开剂^[8],展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,105℃加热至斑点显色清晰,日光下检视。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斑点,阴性对照无干扰,详见图1B。

白芷:取样品适量,研细,称取粉末5g置烧杯中,加水30mL溶解,超声30min,离心5min,取上清液,溶液转至分液漏斗中,用石油醚(60~90℃)30mL萃取,静置10min,弃去石油醚层,剩余水层再用30mL乙酸乙酯萃取,静置10min,取乙酸乙酯层水浴蒸干至1mL。另取白芷对照药材1g,同法制得对照药材溶液。按处方

比例取缺白芷的各药材,加水煎煮,同法制成阴性样品溶液。照2015年版《中国药典(四部)》薄层色谱法(通则0502)试验,吸取上述3种溶液各20μL,分别点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板,以二氯甲烷-甲醇(20:1)为展开剂,在20℃下展开,取出,晾干,置紫外光灯(254nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材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1C。



2.2 含量测定^[9]

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

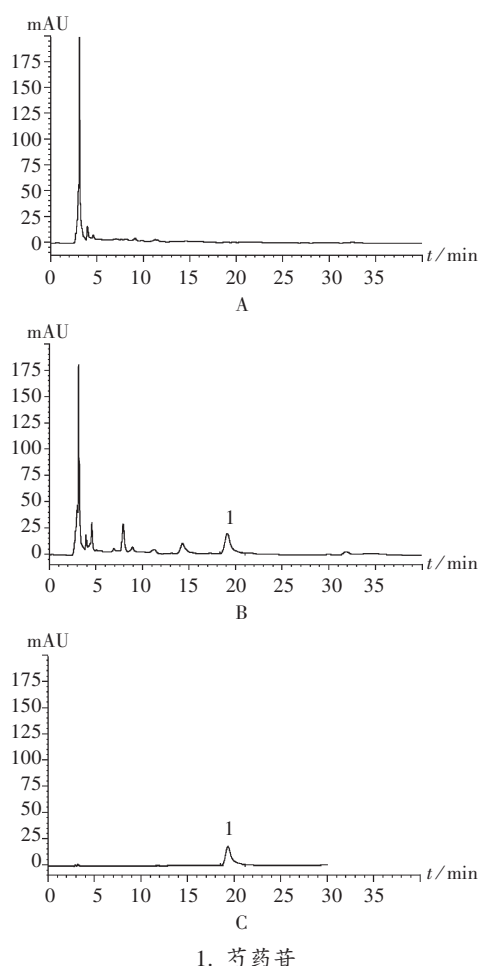
色谱柱:Agilent-TC C₁₈柱(250mm×4.6mm,5μm);柱温:30℃;流动相:乙腈-甲醇-0.1%磷酸溶液(7:13:80)^[10];检测波长:230nm;流速:1.0mL/min;进样量:10μL;柱温:30℃。理论板数以芍药苷峰计大于3000,且分离度大于1.5。

2.2.2 溶液制备

取芍药苷对照品10.29mg,精密称定,置50mL容量瓶中,用甲醇溶解,并定容至刻度,密塞,摇匀,制成质量浓度为0.1953g/L的芍药苷对照品溶液,再精密移取3mL,置10mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度,密塞,摇匀,即得对照品溶液。取胃炎颗粒适量,研细,称取1g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50mL,密塞,称定质量,超声(60kHz)处理30min,冷却,擦干外部,称定质量,用甲醇补足减失的质量^[11],摇匀,滤过,取滤液离心(13000r/min,5min),取上清液,即得。按处方比例取缺白芍的各药材,加水煎煮,依法制备阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性考察:分别精密吸取2.2.2项下3种溶液各10μL,注入液相色谱仪,按拟订色谱条件测定,记录色谱图。在此色谱条件下,芍药苷能较好地分离,且峰形良好,保留时间适中,阴性对照无干扰。色谱图见图2。



1. 芍药苷
A. 阴性对照品溶液 B. 供试品溶液(批号为 17111302)
C. 芍药苷对照品溶液(批号为 110736-201337)
图2 高效液相色谱图

线性关系考察:取芍药苷对照品 26.62 mg,置 25 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,制成质量浓度为 1 010.49 $\mu\text{g/mL}$ 的芍药苷对照品溶液,分别取 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2 mL 稀释至 10 mL,制成质量浓度为 11.72, 23.44, 35.15, 46.87, 58.59, 70.31 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,进样 10 μL ,测定,记录色谱图,以进样质量浓度(X , C)为横坐标、峰面积(Y , A)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 13.083X - 1.268$, $r = 0.9999$ ($n = 6$)。结果表明,芍药苷进样质量浓度在 20 ~ 120 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取样品(批号为 17111302),精密称定,依法制备供试品溶液,连续进样 6 次,记录峰面积。结果的 RSD 为 0.26% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为 17111302),精密称定,依法制备供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 时进样,测定峰面积,结果的 RSD 为 0.57% ($n = 6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验:取样品(批号为 17111302)6 份,精密称定,依法制备供试品溶液,进样,记录色谱图。结果样品中芍药苷的平均含量为 1.066 9 mg/g, RSD 为 0.36% ($n = 6$),表明方法重复性好。

加样回收试验:取样品(批号 17111302,含量为 1.066 7 mg/g)0.5 g,精密称定,共 6 份,分别加入芍药苷对照品溶液[取芍药苷对照品(批号为 110736-201337,含量为 94.9%)13.82 mg],精密称定,依法制备,用甲醇稀释至 50 mL,摇匀,精密吸取上述溶液各 2 mL,分别加入上述 6 份样品中,依法测定,计算回收率。结果见表 1。由于中药的成分复杂,杂质峰较多,且样品颜色较深,加样回收范围从 98% ~ 102% 扩大至 95% ~ 105%, RSD 小于 2.0% ($n = 6$),准确度符合要求。

表1 芍药苷加样回收试验结果($n = 6$)

取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.500 8	0.534 2	0.524 6	1.066	101.37	101.44	1.00
0.501 2	0.534 6	0.524 6	1.064	100.92		
0.503 4	0.536 9	0.524 6	1.073	102.19		
0.503 9	0.537 5	0.524 6	1.070	101.51		
0.504 2	0.537 8	0.524 6	1.077	102.78		
0.502 7	0.536 2	0.524 6	1.060	99.85		

2.2.4 样品含量测定

取样品(批号分别为 17070101, 171009, 17111302)各 3 份,依法制备供试品溶液,进样,测定峰面积。结果,3 个批次 9 个样品中每 10 g 芍药苷的含量平均值为 14.62 mg。考虑到中药材原料含量的波动,以平均值下浮 20% 作为本品含量的下限^[9],即 14.62 mg/10 g $\times$ 80% = 11.69 mg/10 g,故暂订本品每袋(10 g)含芍药苷($\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$)总量不得少于 11 mg。

3 讨论

胃炎颗粒成分复杂^[12-13],白芍为主药,芍药苷为白芍中含量较高且较稳定的成分^[14-15],故将其作为指标性成分进行含量控制,采用 HPLC 法测定其含量。在前期的研究中,采用 50% 的乙醇对胃炎颗粒进行提取,流动相采用的是乙腈-水(19:81)^[16]。本研究预试验中,发现在此条件下的色谱图出现了明显的杂质峰干扰,且目标峰芍药苷的峰面积较小,重复性差。根据芍药苷的理化性质,特别是溶解性,采用甲醇和乙醇作为提取溶剂进行比较,结果甲醇的提取率明显高于乙醇。样品处理时,采用不同比例含水量甲醇(20%, 50%, 80%, 100%)进行提取,发现 100% 甲醇的提取效率最高,且杂质也

最少。在流动相的选择上,在原有研究^[17]及2015年版《中国药典(一部)》白芍药材的含量测定方法^{[17]105}的基础上进行进一步优化,鉴于芍药苷在酸性环境下较为稳定,将原流动相中的水改为0.1%磷酸溶液,将乙腈改为乙腈-甲醇(7:13)的混合溶剂,结果芍药苷峰形对称,基线平稳,有很好的分离效果,方法学验证结果符合2015年版《中国药典》的相关规定,且减少了乙腈等有机溶剂的用量,减少对人的危害和对环境的污染,可用于胃炎颗粒中芍药苷的含量测定。

根据3批样品含量测定结果,考虑到本品含量随原料产地及部位的不同含量有一定波动,并考虑大生产实际,将本品的限度下浮20%,则每袋含芍药苷为11.69 mg。2015年版《中国药典(一部)》白芍药材项下规定饮片芍药苷含量不得少于1.6%,而每袋本制剂理论含2.667 g白芍。按此限度及正文拟订的药材限度计算,本品转移率为27.4% $[11.69 \text{ mg/袋} \div (16 \text{ mg/g} \times 2.667 \text{ g/袋}) \times 100\% = 27.4\%]$ 。故本品含量限度设定是合理可行的。故暂订本品每袋(10 g)含芍药苷($\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$)总量不得少于11 mg。

胃炎颗粒药味多,阴性干扰大,本试验中通过对提取溶剂和展开剂的优化筛选,对方中黄芪、白芍、白芷进行了薄层色谱鉴别。白芷薄层色谱鉴别中,先采用药典的方法及常规制剂,选取的提取方式和展开溶剂,阴性有干扰,分离度较差。考虑到白芷主要化学成分为香豆素和挥发油,挥发油类通常采用水蒸气蒸馏法进行提取,香豆素类则主要采取溶剂提取法^[10],因此,考察的成分基本为香豆素类。乙醚虽可溶解多数香豆素,但能溶出其他脂溶性成分也较多,即按药典方法进行提取后的斑点干扰较多;而石油醚虽对大多数含氧香豆素的溶解性并不好,但可除去其他脂溶性成分,利于减少阴性干扰^[18];选择石油醚(60~90℃)先进行萃取,再用乙酸乙酯提取剩余水层,取乙酸乙酯层。在采用药典规定展开剂石油醚(60~90℃)-乙醚进行展开时,由于乙醚易挥发,特征斑点重复性较差,选择极性略低于乙醚的二氯甲烷作为基础展开剂^[19],分别采用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、甲醇等溶剂进行配伍,发现以二氯甲烷-甲醇为展开剂,分离效果较理想;先后采用了二氯甲烷-甲醇(10:1,15:1,20:1)等比例调节。根据薄层色谱法所规定的方法学要求,最终确定展开剂为二氯甲烷-甲醇(20:1)。

综上所述,胃炎颗粒虽在临床应用多年,但现行质量标准制定已久,考察项目较少,标准不够完整,更无有效或指标成分的含量控制,本研究中建立了较为完善的

质量标准,可满足日常生产中的质量控制,从而保证制剂质量的稳定性和有效性。

参考文献:

- [1] 魏乙锋,高 岑,宋俊生. 黄芪建中汤治疗消化性溃疡随机对照试验的 Meta 分析[J]. 中国中医急症,2017,26(4): 572-576.
- [2] 周晓明. 黄芪建中汤治疗胃溃疡 55 例[J]. 中国中医药现代远程教育,2014,12(2):93-94.
- [3] 崔 虹,朱佳茜,冯秋芳,等. 中药白芍化学成分及生物活性研究进展[J]. 海峡药学,2017,29(9):1-5.
- [4] 张玉杰,李明春,梁延春,等. 参芪苓口服液的薄层色谱鉴别[J]. 云南中医学院学报,2015,38(3):21-24.
- [5] 孙安武. 黄芪薄层色谱法探讨[J]. 中国中医药现代远程教育,2007,5(8):40-41.
- [6] 蒋鹏娜,李 星,王雪慧,等. 平喘颗粒质量标准研究[J]. 中华中医药杂志,2017,32(5):2132-2136.
- [7] 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.
- [8] 蒋洁莹,刘 瑾,李世芳,等. 丹苓消郁合剂质量标准研究[J]. 四川中医,2016,34(3):103-106.
- [9] 胡 婧,易凡力,刘松青. 十五味黑药丸中 4 种活性成分的定性鉴别及芍药苷的含量测定[J]. 第三军医大学学报,2011,33(6):621-624.
- [10] 臧凯宏,吴建军,秦红岩,等. 黄芪多糖对溃疡性结肠炎大鼠肠道黏膜屏障的影响[J]. 中药材,2017,40(1):208-211.
- [11] 赵唯含,毛堂友,杨美娟,等. 黄芪、三七及其配伍对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜细胞凋亡及增殖的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志,2017,25(5):376-380.
- [12] 李乃谦. 探讨白芍的药理作用及现代研究进展[J]. 中医临床研究,2017,9(20):137-138.
- [13] 吴媛媛,蒋桂华,马逾英,等. 白芷的药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药,2009,20(3):325-627.
- [14] 贾福群,刘卫东,任建国. 通脉颗粒的质量标准研究[J]. 西北药学杂志,2017,32(2):130-133.
- [15] 何凤雷,郑华珠,石洪超,等. HPLC 法测定胃痛宁丸中芍药苷的含量[J]. 中国医药导报,2017,14(9):133-135.
- [16] 胡 斌,林 彩,赵映兰,等. 胃炎颗粒质量标准研究[J]. 中国药业,2009,18(23):28-29.
- [17] 朱艺欣,李宝莉,马宏胜,等. 白芷的有效成分提取、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国医药导报,2014,11(31):159-166.
- [18] 徐任生. 天然产物药物化学[M]. 北京:科学出版社,2005:596-597.
- [19] 周国华,傅小英. 医疗机构制剂检验基本操作指南[M]. 北京:人民军医出版社,2012:73.

(收稿日期:2018-06-11)