

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.05.025

# 参鹿补片质量标准研究

黄武军, 付向红, 邹国辉

(仁和<集团>发展有限公司, 江西 樟树 331200)

**摘要:**目的 建立参鹿补片的质量标准。方法 对参鹿补片中君药红参及臣药女贞子进行薄层色谱鉴别;采用高效液相色谱法测定臣药淫羊藿中活性成分淫羊藿苷的含量。结果 参鹿补片的薄层色谱图与相应对照品的色谱图均显相同斑点,且阴性对照无干扰;淫羊藿苷的质量浓度在2.092~18.828  $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好( $r=1.000$ ),平均加样回收率为99.06%,RSD为1.10%( $n=6$ )。结论 该方法简便易行,重复性好,可用于参鹿补片的质量控制。

**关键词:**参鹿补片;高效液相色谱法;薄层色谱法;质量标准

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)05-0099-03

## Study on the Quality Standard of Shenlubu Tablets

HUANG Wujun, FU Xianghong, ZOU Guohui

(Renhe <Group> Development Co., Ltd., Zhangshu, Jiangxi, China 331200)

**Abstract:** **Objective** To establish the quality standard of Shenlubu Tablets. **Methods** The principal drug (*Ginseng radix*) and the ministerial drug (*Ligustri lucidi*) in Shenlubu Tablets were identified by thin layer chromatography (TLC). The content of the active ingredient icariin in the ministerial drug (*Epimedii folium*) was measured by high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** The TLC of Shenlubu Tablets showed the same spots as those of the standard substances, and the negative control had no interference; icariin showed good linear relationship with the peak area in the range of 2.092–18.828  $\mu\text{g/mL}$  ( $r=1.000$ ), the average recovery was 99.06% and RSD was 1.10% ( $n=6$ ). **Conclusion** This method is simple, easy to implement, and has good reproducibility, which can be used for the quality control of Shenlubu Tablets.

**Key words:** Shenlubu Tablets; high performance liquid chromatography; thin layer chromatography; quality standard

参鹿补片组方为红参、鹿肉、淫羊藿、狗脊、墨旱莲、玉竹等14味中药材,原标准中已有齐墩果酸的薄层色谱(TLC)鉴别法<sup>[1]</sup>。采用乙醚作为提取溶剂,乙醚的穿透力低,不能充分提取出齐墩果酸,供试品色谱中齐墩果酸斑点淡,拖尾严重,且比对照品色谱中相应斑点偏高,此情况易出现对结果判定产生分歧,故对供试品的处理方法、展开剂及显色方法进行了修订。为了更有效地控制该品的质量,本研究中对参鹿补片进行了定性定量研究,不仅对齐墩果酸的TLC鉴别方法进行了修订,还采用TLC法对人参皂苷 $\text{Rg}_1$ 进行定性鉴别,高效液相色谱(HPLC)法测定淫羊藿苷含量,旨在为该制剂的质量控制提供参考。现报道如下。

### 1 仪器与试药

#### 1.1 仪器

高效液相色谱仪:Agilent 1200型(美国安捷伦公司);岛津LC-20AD型(日本岛津公司)。色谱柱:Diamonsil(钻石1代) $\text{C}_{18}$ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );Diamonsil(2) $\text{C}_{18}$ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), Spurisil  $\text{C}_{18}$ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )。CP224S型电子天平( $d=0.1\text{ mg}$ ), CP225D型电子天平( $d=0.01\text{ mg}$ , 0.1 mg),均购自赛多利斯公司。

#### 1.2 试药

齐墩果酸对照品(批号为110709-200505),人参

皂苷 $\text{Rg}_1$ 对照品(批号为110703-201027,含量以97.7%计),淫羊藿苷对照品(批号为110737-200415),均购自中国食品药品检定研究院;参鹿补片(批号分别为150301, 150302, 150303),不含红参、女贞子、淫羊藿的阴性样品,均由江西药都仁和制药有限公司提供;硅胶G薄层板(批号为20161014,青岛海洋化工厂);乙腈、甲醇均为色谱纯(购自美国天地公司);水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

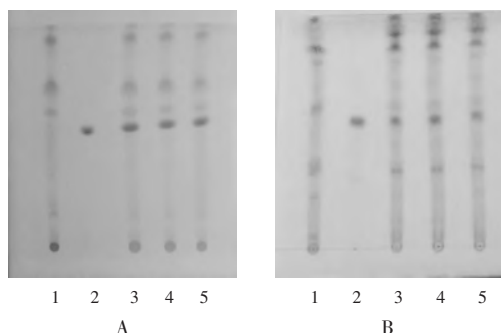
### 2 方法与结果

#### 2.1 薄层色谱鉴别

齐墩果酸<sup>[2]145-46, 429-430, 496-497, 526, 949-950, 1258, 1366[3-4]</sup>:取样品10片,研细,加2%的氢氧化钠溶液30 mL,超声处理30 min,离心(3 000 r/min, 5 min),上清液用盐酸调pH为2~3,用乙醚振摇提取2次,每次30 mL,合并乙醚提取液,蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。另按处方取除女贞子的其他药材制成阴性样品,再按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。取齐墩果酸对照品,加甲醇制成每1 mL含1 mg的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法[2015年版《中国药典(一部)》通则0502],吸取上述3种溶液各5  $\mu\text{L}$ ,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶G薄层板上,以环己烷-丙酮-乙酸乙酯(5:2:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105  $^{\circ}\text{C}$ 加热至

斑点显色清晰。供试品溶液色谱中,在与齐墩果酸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。

人参皂苷  $R_{g1}$  [2]440-442,446-447,864-865,868,1124-1126,1276-1278[5]: 取样品10片,研细,加甲醇40 mL,水浴回流1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加水30 mL使溶解,加水饱和正丁醇振荡提取2次,每次30 mL,合并正丁醇提取液,用正丁醇饱和的水50 mL洗涤,弃去水液,正丁醇蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。另按处方去除红参的其他药材制成阴性样品,再按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。再取人参皂苷  $R_{g1}$  对照品,加甲醇制成每1 mL中含1 mg的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法[2015年版《中国药典(一部)》通则0502],吸取上述3种溶液各5~10  $\mu$ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2)10  $^{\circ}$ C以下放置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  $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中,在与人参皂苷  $R_{g1}$  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1B。



1. 阴性对照品溶液 2. 对照品溶液  
3-5. 供试品溶液(批号分别为150301,150302,150303)  
A. 齐墩果酸 B. 人参皂苷  $R_{g1}$

图1 薄层色谱图

## 2.2 淫羊藿苷含量测定<sup>[2]327-328,1095-1096,1098,1369-1370[6-8]</sup>

### 2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:烷键合硅胶为填充剂;流动相:乙腈-水

(29:71);检测波长:270 nm;流速:1.0 mL/min;进样量:10  $\mu$ L;柱温:35  $^{\circ}$ C。在此条件下的色谱图见图2。理论板数按淫羊藿苷峰计算应不低于2000,且分离度大于1.5。

### 2.2.2 溶液制备

取淫羊藿苷对照品适量,精密称定,用稀乙醇制成每1 mL中含10  $\mu$ g的溶液,作为对照品溶液。取本品20片,精密称定,研细,取约2 g,精密称定,置50 mL容量瓶中,加入稀乙醇40 mL,超声处理(功率350 W,频率35 kHz)1 h,放冷,用稀乙醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。另按处方取不含淫羊藿的其他药材制成阴性样品,再按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

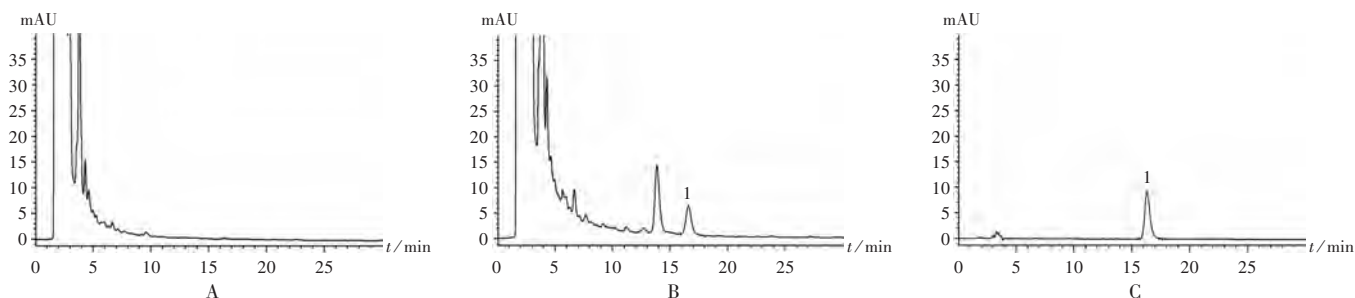
### 2.2.3 方法学考察

专属性试验:分别吸取2.2.2项下3种溶液各10  $\mu$ L,分别注入液相色谱仪,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图。结果淫羊藿苷峰能较好地分离,保留时间适中,阴性无干扰,专属性好。详见图2。

线性关系考察:取淫羊藿苷对照品10.46 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,加稀乙醇使溶解,并稀释至刻度,摇匀,得母液(104.6  $\mu$ g/mL),再分别精密吸取1.0,3.0,5.0,7.0,9.0 mL,分别置50 mL容量瓶中,用加稀乙醇稀释成不同质量浓度的对照品溶液。按拟订色谱条件进样10  $\mu$ L,记录峰面积。以淫羊藿苷的质量浓度( $X$ ,  $\mu$ g/mL)为横坐标、峰面积( $Y$ )为纵坐标进行线性回归,得回归方程  $Y = 46.214X - 1.720$ ,  $r^2 = 1.000$  ( $n = 6$ )。结果表明,淫羊藿苷质量浓度在2.092~18.828  $\mu$ g/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取同一对照品溶液(质量浓度为10.46  $\mu$ g/mL),连续进样6次,记录峰面积。结果的RSD为0.39% ( $n = 6$ ),表明仪器精密密度良好。

稳定性试验:取同一供试品(批号为150301)溶液,分别于放置0,2,4,6,8,10,12,24 h时进样测定,记录峰面积。结果的RSD为1.7% ( $n = 8$ ),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。



1. 淫羊藿苷  
A. 阴性对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 对照品溶液(批号为150301)

图2 高效液相色谱图

重复性试验:取供试品(批号为150301)6份,按含量测定项下方法试验,测定淫羊藿苷的含量。结果6份样品中淫羊藿苷平均含量为240.04  $\mu\text{g/g}$ ,  $RSD$  为1.3% ( $n=6$ ),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取本品(已知淫羊藿苷含量为240.04  $\mu\text{g/g}$ )1 g共6份,精密称定,分别定量加入淫羊藿苷对照品溶液,测定淫羊藿苷的含量,计算回收率。结果见表1。

表1 加样回收试验结果( $n=6$ )

| 取样量(g)  | 样品含量( $\mu\text{g}$ ) | 加入量( $\mu\text{g}$ ) | 测得量( $\mu\text{g}$ ) | 回收率(%) | $\bar{X}$ (%) | $RSD$ (%) |
|---------|-----------------------|----------------------|----------------------|--------|---------------|-----------|
| 1.012 6 | 243.1                 | 238.2                | 482.3                | 100.42 | 99.06         | 1.10      |
| 1.064 2 | 255.4                 | 238.2                | 488.4                | 97.80  |               |           |
| 1.043 6 | 250.5                 | 238.2                | 485.6                | 98.70  |               |           |
| 1.067 1 | 256.2                 | 238.2                | 493.2                | 99.50  |               |           |
| 1.034 4 | 248.3                 | 238.2                | 481.5                | 97.90  |               |           |
| 1.016 7 | 244.0                 | 238.2                | 482.2                | 100.00 |               |           |

耐用性试验:在不同时间、不同人员分别采用不同的高效液相色谱仪及不同的色谱柱,改变色谱条件,如温度( $35 \pm 5$ ) $^{\circ}\text{C}$ 、流速( $1.0 \pm 0.2$ ) $\text{mL/min}$ 、流动相比比例 $\pm 5\%$ 情况下,对同一批样品进行测定。结果淫羊藿苷峰均能达到基线分离, $RSD$ 为1.7% ( $n=5$ ),表明方法耐用性良好。

### 3 讨论

#### 3.1 TLC鉴别试验条件选择

齐墩果酸为三萜类皂苷元。本试验中,采用甲醇、氯仿、乙醚超声或回流提取,斑点不清晰;采用氢氧化钠溶液超声提取,可水解生成皂苷元(采用酸水解会发生脱水、环合、双键转移等),再用盐酸溶液调至酸性,用有机溶剂萃取,结果斑点清晰、圆整、分离好。比较了不同展开剂的分离效果,如环己烷-丙酮-乙酸乙酯(5:2:1)、三氯甲烷-甲醇-甲酸(40:1:1)、甲苯-乙酸乙酯-醋酸(5:1:1)上层溶液等,以环己烷-丙酮-乙酸乙酯(5:2:1)的分离效果为佳。

参鹿补片中红参为药材原粉入药,其中的人参皂苷 $R_g$ 易溶于醇,故用甲醇回流提取,更易穿透细胞壁,提取充分;但参鹿补片含有大量的水溶性成分,故甲醇提取液蒸干后,残渣加水使溶解,用正丁醇提取,再用水洗涤正丁醇提取液,进一步排除了杂质的干扰。比较了不同展开剂的分离效果,如三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2)10 $^{\circ}\text{C}$ 以下放置的下层溶液、三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10)10 $^{\circ}\text{C}$ 以下放置的下层溶液,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2)10 $^{\circ}\text{C}$ 以下放置的下层溶液的分离效果为佳。

#### 3.2 含量测定指标及HPLC条件选择

参鹿补片处方由14味中药材组成,红参为君药,主含人参皂苷 $R_g$ 、人参皂苷 $R_e$ 、人参皂苷 $R_b$ ,原药材已

有含量控制。同为君药的鹿肉,主要含有蛋白质、脂肪、无机盐、糖和一定量的维生素,选择此类成分作为含测指标无针对性。故选择臣药淫羊藿中淫羊藿苷作为含量测定指标。本试验中比较了不同体系和比例的流动相,如甲醇-水(60:40)、乙腈-水(30:70)等,结果采用乙腈-水(29:71)时淫羊藿苷峰形对称、基线平稳,分离效果良好;比较了不同提取溶剂,如甲醇、乙醇、50%甲醇溶液、稀乙醇制备供试品溶液,结果采用甲醇、乙醇时峰对称性差,兼顾环保考虑,选择稀乙醇作为提取溶剂;比较了超声处理及加热回流的处理方式,含量结果无明显差异,故选择简单、快捷、常温的超声处理方法。

由于不同产地、不同批次的淫羊藿中淫羊藿苷含量高低不同<sup>[9-15]</sup>,根据多批次样品检测结果统计,参鹿补片中淫羊藿苷的含量定为应不低于每片60  $\mu\text{g}$ 为佳。

### 参考文献:

- [1] WS3-B-2927-98. 卫生部药品标准·中药成方制剂(第十五册)[S].
- [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] 英志鹏. 更年灵胶囊中女贞子的薄层色谱鉴别[J]. 海峡药学, 2005,17(4):100.
- [4] 杨智慧,王婷婷. 高效液相色谱法测定全鹿丸中齐墩果酸含量[J]. 中国药业,2013,22(6):52-54.
- [5] 景冬樱,徐俊,任文艳,等. 活力胶囊的薄层色谱鉴别[J]. 中国药业,2006,15(16):30-31.
- [6] 谭苑芬,梁文能. 柔毛淫羊藿中淫羊藿苷含量测定及最佳采收期研究[J]. 中国药业,2019,28(8):8-10.
- [7] 熊水莲,袁秀红,侯莉. 高效液相色谱法测定肾宝合剂中淫羊藿苷的含量[J]. 实用临床医学,2012,13(12):26-27.
- [8] 刘灿辉,谭浩军. 高效液相色谱法测定老年咳喘片中淫羊藿苷含量[J]. 中国药业,2009,18(18):36.
- [9] 黄良永,雷震,郑江萍,等. 淫羊藿药材及其配方颗粒中淫羊藿苷的含量比较[J]. 中国药师,2012,15(3):376-378.
- [10] 吴文辉,冯健,耿媛媛,等. 十四个产地淫羊藿中淫羊藿苷含量测定[J]. 亚太传统医药,2014,10(18):8-10.
- [11] 左建平,安显辉. 不同采收季节的淫羊藿中朝藿定C和淫羊藿苷的含量比较[J]. 中国药业,2014,23(7):13-15.
- [12] 裴利宽,黄文华,何天谷,等. 对中药淫羊藿主要资源种类药材质量的系统研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(21):2217-2221.
- [13] 李昆峰,李晓龙,曹佩雪,等. 不同产地、不同成熟期淫羊藿叶中淫羊藿苷和朝藿定C含量变化[J]. 辽宁中医杂志, 2011,38(8):1627-1628.
- [14] 郭宝林,肖培根. 中药淫羊藿主要种类评述[J]. 中国中药杂志,2003,28(4):303-307.
- [15] 陈彦,赵艳红,贾晓斌,等. RP-HPLC法同时测定不同品种淫羊藿药材中5种主要黄酮类成分[J]. 中国药房,2008, 19(6):431-433.

(收稿日期:2020-01-22)