

醒脑颗粒质量标准研究

姜燕, 马冬云

(江苏省连云港市食品药品检验检测中心, 江苏 连云港 222006)

摘要:目的 完善醒脑颗粒质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的黄芩、冰片、大黄、玄参进行定性鉴别,采用高效液相色谱(HPLC)法测定制剂中黄芩苷、大黄素及大黄酚含量。结果 黄芩、冰片、大黄、玄参的 TLC 特征性斑点清晰,分离度好,专属性强,阴性对照无干扰;黄芩苷、大黄素及大黄酚质量浓度分别在 $10.36 \sim 82.88 \mu\text{g/mL}$ ($r=0.9999$)、 $3.350 \sim 26.80 \mu\text{g/mL}$ ($r=0.9999$)、 $3.354 \sim 26.830 \mu\text{g/mL}$ ($r=0.9999$) 范围内与峰面积线性关系良好,平均加样回收率分别为 98.87%, 97.42%, 98.91%, RSD 分别为 1.23%, 1.08%, 1.27% ($n=6$)。结论 该方法操作简便、精确度高、结果可靠,可用于醒脑颗粒的质量控制。

关键词:醒脑颗粒;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量控制;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(2020)05-0123-05

Study on the Quality Standard for Xingnao Granules

JIANG Yan, MA Dongyun

(Lianyungang Food and Drug Control Center, Lianyungang, Jiangsu, China 222006)

Abstract: Objective To improve the quality standard for Xingnao Granules. **Methods** *Radix scutellariae*, *Borneolum syntheticum*, *Rheum officinale* and *Radix scrophulariae* in the preparation were qualitatively identified by thin layer chromatography(TLC). The contents of baicalin, emodin and chrysophanol in the preparation were determined by high performance liquid chromatography(HPLC). **Results** TLC spots of *Radix scutellariae*, *Borneolum syntheticum*, *Rheum officinale* and *Radix scrophulariae* in the preparation were clear, the separation degree was good, the specificity was strong, and were negative without interference. Baicalin, emodin, and chrysophanol had good linear relationships in the range of $10.36 \sim 82.88 \mu\text{g/mL}$ ($r=0.9999$), $3.350 \sim 26.80 \mu\text{g/mL}$ ($r=0.9999$), and $3.354 \sim 26.830 \mu\text{g/mL}$ ($r=0.9999$), respectively; the average recoveries were 98.87%, 97.42%, and 98.91%, and the RSDs were 1.23%, 1.08%, 1.27% ($n=6$). **Conclusion** This method is simple, accurate, and reliable, and can be used for the quality control of Xingnao Granules.

Key words: Xingnao Granules; thin layer chromatography; high performance liquid chromatography; quality control; content determination

醒脑颗粒为江苏省连云港市中医院制备的医院制剂,主要由胆南星、石菖蒲、白蒺藜、玄参、黄芩、生大黄、玉竹、冰片等中药组方,临床用于治疗中风(中脏腑)急性期、风痰火壅于清窍所致神昏、痰涌、腹实不通等,收载于《江苏省食品药品监督管理局医疗机构制剂标准》^[1]。本研究中采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的黄芩、冰片、大黄、玄参进行定性鉴别^[2-5],采用高效液相色谱(HPLC)法测定制剂中黄芩苷、大黄素、大黄酚含量^[6-9],为其质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);BP211D 型电子分析天平(北京赛多利斯天平有限公司,十万分之一);KQ-500TDB 型高频数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司,功率为 120 W,频率为 40 kHz);Linomat 型薄层点样仪(瑞士卡玛公司)。

1.2 试药

黄芩苷对照品(批号为 110715-201720,纯度为

93.5%),冰片对照品(批号为 110743-200905,纯度为 98.0%),哈巴俄苷对照品(批号为 111730-201106,纯度为 96.0%),大黄素对照品(批号为 110756-201512,纯度为 98.7%),大黄酚对照品(批号为 110796-201621,纯度为 99.2%),大黄对照药材(批号为 120902-201010),均购自中国食品药品检定研究院;醒脑颗粒(江苏省连云港市中医院制剂室自制,批号分别为 20180319,20180110,20180523);乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

黄芩:取样品适量,研细,取约 4 g,加甲醇 15 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取黄芩苷对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。取阴性样品 4 g,同法制备阴性对照品溶液。精密吸取上述 3 种溶液各 6 μL ,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-甲酸-水(9:1:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾

第一作者:姜燕,女,大学本科,副主任中药师,研究方向为药物分析,(电子信箱)2733810315@qq.com。

[△]通信作者:马冬云,男,大学本科,主任药师,研究方向为中药药物分析,(电子信箱)05181yg@sian.com。

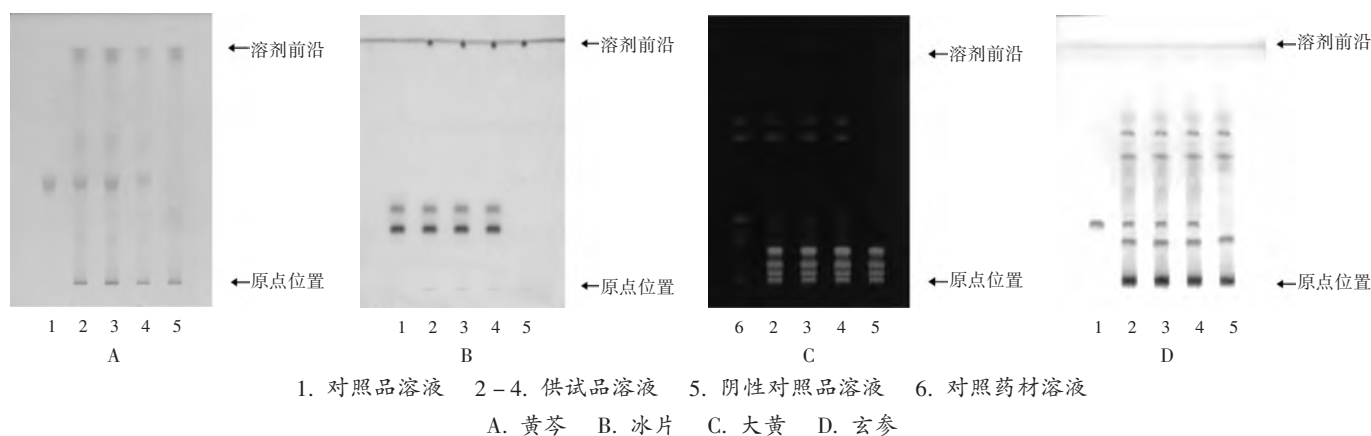


图1 薄层色谱图

干, 喷以 2% 三氯化铁乙醇溶液。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 1 A。

冰片: 取样品适量, 研细, 取约 0.3 g, 加石油醚 (30~60℃) 5 mL, 超声处理 10 min, 滤过, 取滤液作为供试品溶液。另取冰片对照品, 加石油醚 (30~60℃) 制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。取阴性样品 0.3 g, 精密称定, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。精密吸取对照品溶液 5 μL、供试品溶液及阴性对照品溶液各 15 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以二氯甲烷为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 在 100℃ 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 1 B。

大黄: 取样品适量, 研细, 取约 2 g, 加甲醇 20 mL, 超声处理 15 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 10 mL 使溶解, 再加盐酸溶液 1 mL, 置水浴中加热 30 min, 立即冷却, 用乙醚振摇提取 2 次, 每次 10 mL, 合并乙醚液, 蒸干, 残渣加三氯甲烷 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取大黄对照药材 0.1 g, 同法制成对照药材溶液。取阴性样品 2 g, 同法制成阴性对照品溶液。精密吸取上述 3 种溶液各 6 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚 (30~60℃) - 甲酸乙酯 - 甲酸 (15:5:1, V/V/V) 的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光 (365 nm) 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的 5 个橙黄色荧光主斑点, 阴性对照无干扰。详见图 1 C。

玄参: 取样品适量, 研细, 取约 3 g, 加甲醇 25 mL, 浸泡 1 h, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 25 mL 使溶解, 用水饱和的正丁醇振摇提取 2 次, 每次 30 mL, 合并正丁醇液, 蒸干, 残渣加甲醇 5 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取哈巴俄苷对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。取阴性样品 3 g, 同法

制备阴性对照品溶液。精密吸取上述 3 种溶液各 10 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷 - 甲醇 - 水 (12:4:1, V/V/V) 的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 热风吹至斑点显色清晰。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 1 D。

2.2 黄芩苷含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 - 0.4% 磷酸溶液 (47:53, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30℃; 检测波长: 280 nm; 进样量: 10 μL。

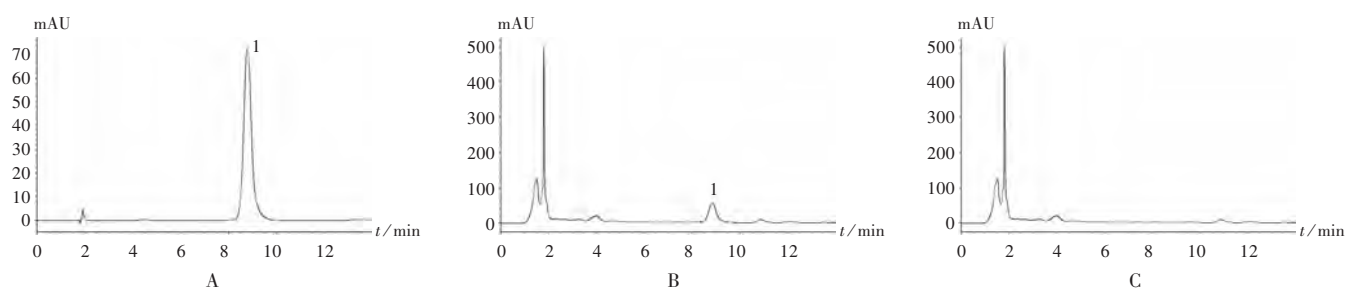
2.2.2 溶液制备

取黄芩苷对照品 20.72 mg, 精密称定, 加 70% 乙醇溶解制成质量浓度为 207.2 μg/mL 的对照品贮备液。精密量取贮备液适量, 加 70% 乙醇制成质量浓度为 51.8 μg/mL 的对照品溶液。取样品适量, 研细, 取约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 1 h, 放冷, 再称定质量, 用 70% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。按处方比例和工艺制备不含黄芩饮片的阴性样品, 并按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验: 取上述 3 种溶液各 10 μL, 按拟定色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果见图 2, 阴性对照无干扰, 表明方法专属性良好。

线性关系考察: 精密吸取对照品贮备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL, 分别置 10 mL 容量瓶中, 用 70% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 按拟定色谱条件进样测定。以对照品质量浓度 (X, μg/mL) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y = 20.825X + 629.5$, $r = 0.9999$ ($n = 5$)。结果表明, 黄芩苷质量浓度在 10.36 ~ 82.88 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。



1. 黄芩苷

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图2 黄芩苷高效液相色谱图

精密度试验:精密吸取上述对照品溶液,按拟订色谱条件连续进样6次测定。结果黄芩苷色谱峰面积的 RSD 为 1.10% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批(批号为 20180319)样品,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件,分别于 0, 4, 8, 10, 12, 24 h 时进样测定。结果黄芩苷峰面积的 RSD 为 1.90% ($n=6$),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 20180319)样品 6 份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果黄芩苷含量的 RSD 为 0.90% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的同一批(批号为 20180319)样品 6 份,各 0.5 g,精密称定,分别加入对照品贮备液 5 mL,再精密加入 70% 乙醇 45 mL。按拟订方法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表 1。

表1 黄芩苷加样回收试验结果($n=6$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得值(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.5032	0.9254	1.036	1.947	98.61	98.87	1.23
0.5044	0.9276	1.036	1.946	98.30		
0.5067	0.9318	1.036	1.935	96.83		
0.5082	0.9346	1.036	1.970	99.94		
0.5024	0.9239	1.036	1.955	99.52		
0.5063	0.9311	1.036	1.967	99.99		

2.2.4 样品含量测定

取 3 批(批号分别为 20180319, 20180110, 20180523)样品,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,计算黄芩苷含量。结果 3 批样品中黄芩苷含量分别为 1.839, 1.904, 1.780 mg/g。

2.3 大黄素和大黄酚含量测定

2.3.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Luna C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);**流动相:**甲醇(C) - 0.1% 磷酸溶液(D),梯度洗脱(0 ~ 20 min 时 60% C → 40% D, 20 ~ 35 min 时 60% C → 40% D, 35 ~ 55 min 时 80% C → 20% D);**流速:**1.0 mL/min;

柱温:30 °C; **检测波长:**254 nm; **进样量:**10 μL。

2.3.2 溶液制备

取大黄素对照品 16.75 mg,精密称定,大黄酚对照品 16.77 mg,置同一容量瓶中,加甲醇溶解制成质量浓度分别为 33.50, 33.54 μg/mL 的混合对照品贮备液;分别精密吸取混合对照品贮备液适量,加甲醇稀释成质量浓度分别为 8.375, 8.385 μg/mL 的混合对照品溶液。取样品适量,研细,取约 10 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加 8% 盐酸溶液 30 mL,超声处理 2 min,再加三氯甲烷 30 mL,加热回流 1 h,放冷,置分液漏斗中,用少量三氯甲烷洗涤容器,洗液并入分液漏斗中,分取三氯甲烷层,酸液再用三氯甲烷提取 5 次,每次 10 mL,合并三氯甲烷液,蒸干,残渣加甲醇使溶解,转移至 20 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,滤过,摇匀,即得供试品溶液。按处方比例和工艺制备不含大黄饮片的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

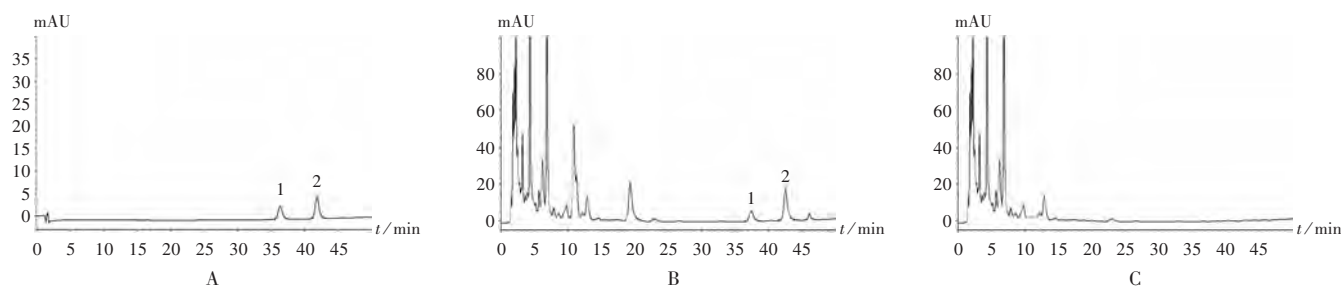
2.3.3 方法学考察

专属性试验:取上述 3 种溶液各 10 μL,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图。结果见图 3,阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。

线性关系考察:精密吸取混合对照品贮备液 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 mL,分别置 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀。按拟订色谱条件测定。以对照品质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_{\text{大黄素}} = 11.21X + 20.49$ ($r = 0.9999$), $Y_{\text{大黄酚}} = 11.27X + 22.93$ ($r = 0.9999$)。结果表明,大黄素、大黄酚质量浓度分别在 3.35 ~ 26.80 μg/mL 和 3.354 ~ 26.83 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取混合对照品溶液,按拟订色谱条件测定连续进样 6 次。结果大黄素峰面积的 RSD 为 1.50% ($n=6$),大黄酚峰面积的 RSD 为 1.70% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批(批号为 20180319)样品,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件,分别于 0, 3, 9, 12, 18, 24 h 时进样测定。结果大黄素峰面积的 RSD 为



1. 大黄素 2. 大黄酚
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图3 大黄高效液相色谱图

表2 加样回收试验结果 ($n=6$)

取样量(g)		样品含量(mg)		加入量(mg)		测得值(mg)		回收率(%)		$\bar{X}(\%)$		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
5.012 7	5.012 7	0.016 5	0.026 5	0.016 8	0.027 5	0.032 7	0.053 5	96.43	98.18				
5.034 2	5.034 2	0.016 6	0.026 6	0.016 8	0.027 5	0.033 0	0.054 3	97.62	100.73				
5.067 7	5.067 7	0.016 7	0.026 8	0.016 8	0.027 5	0.032 9	0.053 5	96.43	97.09				
5.024 1	5.024 1	0.016 6	0.026 5	0.016 8	0.027 5	0.032 9	0.053 6	97.02	98.55	97.42	98.91	1.08	1.27
5.069 6	5.069 6	0.016 7	0.026 8	0.016 8	0.027 5	0.033 0	0.054 1	97.02	99.27				
5.074 2	5.074 2	0.016 7	0.026 8	0.016 8	0.027 5	0.033 0	0.054 2	97.02	99.64				

注:A为大黄素,B为大黄酚。

1.60% ($n=6$), 大黄酚峰面积的 RSD 为 1.40% ($n=6$), 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 20180319)样品 6 份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果大黄素含量的 RSD 为 1.60% ($n=6$), 大黄酚含量的 RSD 为 1.60% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的同一批(批号为 20180319)样品 6 份,每份约 5 g,精密称定,再取大黄素、大黄酚对照品适量,精密称定,加甲醇溶解制成每 1 mL 含大黄素 8.421 μ g、大黄酚 13.742 μ g 的对照品混合溶液,精密吸取对照品混合溶液 2 mL,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表 2。

2.3.4 样品含量测定

取 3 批(批号分别为 20180319, 20180110, 20180523)样品,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算大黄素和大黄酚含量。结果 3 批样品中大黄素含量分别为 0.0330, 0.0440, 0.0299 mg/g, 大黄酚含量分别为 0.0528, 0.0386, 0.0496 mg/g。

3 讨论

3.1 TLC 鉴别

黄芩:分别考察 50% 甲醇、75% 甲醇和甲醇作为提取溶剂,采用加热回流、超声方法提取,提取时间分别为 0.5, 1.0, 1.5 h, 考察乙酸乙酯-甲酸-水(9:1:1, V/V/V)、乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(5:3:1:1, V/V/V/V)、乙酸乙酯-丁酮-醋酸-水(10:7:5:3, V/V/V/V)

V/V/V)的上层溶液 3 种展开剂。结果以甲醇为溶剂,超声处理 30 min,乙酸乙酯-甲酸-水(9:1:1, V/V/V)为展开剂所得溶液的 TLC 图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。

冰片:分别采用正己烷、石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)作为提取溶剂,采用振摇、超声方法提取,提取时间分别为 5, 10, 30 min。结果以石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)超声 10 min 提取得到的 TLC 图斑点清晰,分离度好,结果稳定。

3.2 含量测定

黄芩苷:分别考察 50% 乙醇、70% 乙醇、乙醇作为提取溶剂,采用加热回流和超声方法提取,提取时间分别为 0.5, 1.0, 1.5 h, 考察甲醇-0.1% 磷酸溶液(47:53, V/V)、甲醇-用磷酸调节 pH 至 2.7 的 0.05 mol/L 磷酸二氢钠溶液(42:58, V/V)^[10]和乙腈-用三乙胺调节 pH 至 5.0 的 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液(14:86, V/V)^[11]3 种流动相。结果以 70% 乙醇超声处理 1 h, 甲醇-0.1% 磷酸溶液(47:53, V/V)为流动相得到的色谱图峰形对称,分离度大于 1.5。

大黄素和大黄酚:分别考察甲醇-0.1% 磷酸溶液和 0.05% 的磷酸水溶液-乙腈^[12]2 种流动相,选用等度和梯度 2 种洗脱方式。结果以甲醇-0.1% 磷酸为流动相的梯度洗脱,大黄素和大黄酚理论板数高,峰形对称,分离度大于 1.5。

参考文献:

- [1] JSZBZ20090606Z, 江苏省食品药品监督管理局医疗机构制剂标准[S].