

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.09.040

多动安颗粒质量标准研究

卫向锋¹, 孙婷婷², 张红^{2△}, 牛春玲¹

(1. 西安中医脑病医院制剂科, 陕西 西安 710032; 2. 陕西省中医药研究院, 陕西 西安 710003)

摘要:目的 建立多动安颗粒的质量标准。方法 对处方中黄连、佛手、熟地黄、麻黄药材进行薄层色谱(TLC)法鉴别。采用高效液相色谱(HPLC)法测定处方中盐酸小檗碱的含量, 色谱柱为 Agilent C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(50:50, V/V, 每100 mL中含十二烷基硫酸钠0.4 g, pH=4.0), 检测波长为345 nm, 柱温为35℃, 流速为1.0 mL/min, 进样量为10 μL。结果 TLC色谱图中斑点清晰, 阴性对照无干扰。盐酸小檗碱进样量在0.044~0.264 μg范围内与峰面积线性关系良好($r=0.9999$); 平均加样回收率为99.67%, RSD 为2.70% ($n=6$)。结论 该方法操作简便、专属性强、重复性好, 可作为多动安颗粒的质量控制方法。

关键词: 多动安颗粒; 质量标准; 盐酸小檗碱; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)09-0131-04

Study on the Quality Standard of Duodongan Granules

WEI Xiangfeng¹, SUN Tingting², ZHANG Hong², NIU Chunling¹

(1. Department of Preparation, Xi'an Chinese Medicine Encephalopathy Hospital, Xi'an, Shaanxi, China 710032; 2. Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi, China 710003)

Abstract: Objective To establish a quality control method for Duodongan Granules. **Methods** The prescriptions of *Coptidis rhizome*, *Bergamot*, *Rehmannia glutinosa* and *Ephedra sinica* were identified by thin layer chromatography(TLC). The content of berberine hydrochloride was determined by high-performance liquid chromatography(HPLC). The chromatographic column was Agilent C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm); the mobile phase was acetonitrile-0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution(50:50, V/V, 0.4 g sodium lauryl sulfate per 100 mL, pH=4.0); the detection wavelength was 345 nm; The column temperature was 35℃; the flow rate was 1.0 mL/min; the injection volume was 10 μL. **Results** The spots in the TLC chromatogram were clear and the negative control showed no interference. The berberine hydrochloride showed a good linear relationship with the peak area integral value in the range of 0.044-0.264 μg ($r=0.9999$). The average recovery rate was 99.67%, $RSD=2.70\%$ ($n=6$). **Conclusion** The method is simple, specific, and reproducible. It can be used as a quality control method for Duodongan granules.

Key words: Duodongan Granules; quality standard; berberine hydrochloride; thin-layer chromatography; high-performance liquid chromatography

多动安颗粒为医院制剂,由紫河车、熟地黄、石菖蒲、制远志、泽泻、黄连、生麻黄、佛手等11味中药组方,具有益肾填精、宁心安神、柔肝清火的功效,用于治疗缺陷障碍(多动症)之精亏肝亢证。多动安颗粒为医院协定处方,临床应用时间长,疗效显著,但药味种类繁多且成分复杂,尚无其质量控制方法。本研究中采用薄层色谱(TLC)法对处方中主要起作用的4味中药黄连、佛手、熟地黄、麻黄进行定性鉴别,采用高效液相色谱(HPLC)法对处方中盐酸小檗碱进行定量检测。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器:2010-AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司,包括UV检测器,LC-Solution工作站);UP3200H型超声波清洗器(熊猫集团南京电子计量有限公司,功率150 W,频率40 kHz);SQP型电子天平(赛多利斯科学仪器<北京>有限公司, $d=0.1$ mg);JM-B型电子天平(余姚市纪铭称重校验设备有限公司, $d=1$ mg);XMTD-6000

型电子恒温不锈钢水浴锅(上海宜昌仪器筛筛厂);DFT-200A型高速粉碎机(温岭市林大机械有限公司)。

试剂:对照药材黄连(批号为120913-201310)、佛手(批号为120933-201004)、熟地黄(批号为121196-201105),对照品盐酸小檗碱(批号为713-9404)、盐酸麻黄碱(批号为0714-9903),购自中国食品药品检定研究院;多动安颗粒(医院制剂,批号为190101,190102,190103);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

黄连:取本品6 g,研细,加甲醇25 mL,超声处理30 min,滤过,滤液作为供试品溶液;另取黄连对照药材0.25 g,同法制备对照药材溶液;取盐酸小檗碱对照品适量,加甲醇制成每1 mL含0.5 mg的溶液,作为对照品溶液。按处方比例和制法制备缺黄连的阴性对照品溶液。照2015年版《中国药典(四部)》通则0502中薄层色

第一作者:卫向锋,男,大学本科,主管中药师,研究方向为医院中药学、中药制剂配制及质量,(电子信箱)w478333954@163.com。

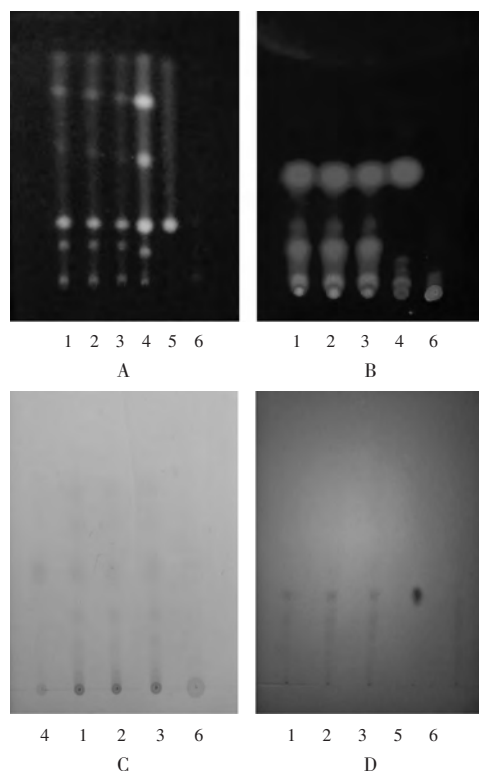
△通信作者:张红,女,博士研究生,研究员,研究方向为中药经典名方、中药大品种、中药质量控制及工艺规范化,(电子信箱)zhanghong919919@126.com。

谱法试验,分别精密吸取供试品溶液、对照药材溶液与阴性对照品溶液各 3 μ L,对照品溶液 1 μ 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-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-水-三乙胺(3:3.5:1:1.5:0.5:1, V/V/V/V/V)为展开剂,置用浓氨试液预饱和 20 min 的展开缸内,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视^[1]。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液和对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点,且阴性对照无干扰。结果见图 1 A。

佛手:取样品 12 g,研细,加甲醇 40 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。另取佛手对照药材 1 g,同法制得对照药材溶液。按处方比例依法制备阴性对照品溶液。照 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502 中薄层色谱法试验,吸取供试品溶液与阴性对照品溶液各 5 μ L、对照药材溶液 2 μ 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,以正己烷-乙酸乙酯(3:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视^[2]。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荧光斑点,且阴性对照无干扰。结果见图 1 B。

熟地黄:取样品 33 g,研细,加水 80 mL,煎煮 30 min,用脱脂棉滤过,滤液用乙酸乙酯振摇提取 3 次,每次 50 mL,合并乙酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取熟地黄对照药材 4 g,同法制得对照药材溶液。按处方比例依法制备缺熟地黄的阴性对照品溶液^[3]。照 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502 中薄层色谱法试验,精密吸取供试品溶液、阴性对照品溶液与对照药材溶液各 5 μ L,分别点于同一羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以二甲苯-乙酸乙酯(1:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 2,4-二硝基苯肼乙醇试液显色。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,且阴性对照无干扰。结果见图 1 C。

麻黄:取样品 100 g,研细,加浓氨试液适量,加三氯甲烷 100 mL,超声处理 40 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取盐酸麻黄碱对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。按处方比例依法制备缺麻黄药材阴性对照品溶液^[4]。2015 年版《中国药典(四部)》通则中 0502 薄层色谱法试验,吸取供试品溶液与阴性对照品溶液各 25 μ L、对照品溶液 5 μ 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,以正丁醇-冰醋酸-水(8:2:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以茚三酮试液,在 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的斑点,且阴性对照无干扰。结果见图 1 D。



1-3. 供试品(批号分别为 190101, 190102, 190103)
4. 对照药材溶液 5. 对照品溶液 6. 阴性对照品溶液
A. 黄连 B. 佛手 C. 熟地黄 D. 麻黄
图 1 薄层色谱图

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(50:50, V/V, 每 100 mL 中含十二烷基硫酸钠 0.4 g, pH=4.0);检测波长:345 nm;柱温:35 $^{\circ}$ C;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μ L。理论板数按盐酸小檗碱峰计应不低于 5 000^[5]。

2.2.2 溶液制备

取盐酸小檗碱对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度为 22 μ g/mL 的对照品溶液。

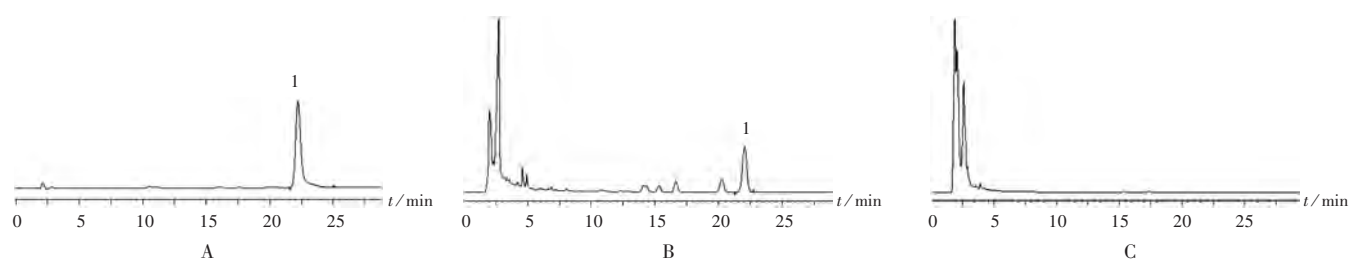
称取本品约 0.6 g,研细,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入甲醇-盐酸(100:1, V/V)25 mL,超声处理 30 min,补足减失的质量,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

按处方比例依法制备缺黄连的阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:精密吸取上述 3 种溶液各 10 μ L,按拟订色谱条件进样测定。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应保留时间处有相应色谱峰,而阴性对照无干扰。详见图 2。

线性关系考察:分别精密吸取上述对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12 μ L,注入液相色谱仪,测定峰面积,并以进样量(X)为横坐标,以峰面积(Y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程 $Y = 4E + 06X - 10797$, $r = 0.9999$ ($n = 6$)。结



1. 盐酸小檗碱
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

果表明,盐酸小檗碱进样量在 0.044 ~ 0.264 μg 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,精密吸取对照品溶液 10 μL ,按拟订色谱条件连续进样 6 次。结果的 RSD 为 0.061% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为 190101)样品适量,研细,约 0.6 g,共 6 份,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入甲醇-盐酸(100:1, V/V) 25 mL,超声提取 30 min,补足减失的质量,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,按拟订色谱条件测定。结果平均含量为 0.647 mg/g, RSD 为 2.27% ($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一批(批号为 190101)样品 0.6 g,研细,精密称定,依法制备供试品溶液,分别在放置 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 时测定。结果含量的 RSD 为 0.085% ($n=6$),表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品共 6 份,研细,每份约 0.3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,按供试品与对照品比例 1:1 加入盐酸小檗碱对照品溶液,再依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,计算加样加收率。结果见表 1。

表1 盐酸小檗碱加样回收试验结果($n=6$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.341 4	0.220 9	0.2	0.417 7	98.40	99.67	2.70
0.329 8	0.213 3	0.2	0.415 4	101.05		
0.320 9	0.207 6	0.2	0.413 6	103.00		
0.326 6	0.211 3	0.2	0.413 2	100.95		
0.347 5	0.224 8	0.2	0.415 2	95.20		
0.335 3	0.216 9	0.2	0.415 7	99.40		

2.2.4 样品含量测定

取 3 批样品(批号分别为 190101, 190102, 190103),依法制备供试品溶液,各精密吸取 10 μL ,注入液相色谱仪。结果 3 批样品中盐酸小檗碱含量分别为 0.644, 0.652, 0.644 mg/g。

3 讨论

3.1 薄层鉴别条件选择

初期对方中各药材进行定性鉴别考察。2015 年版《中国药典》中暂未收载紫河车薄层色谱鉴别标准,故

未将紫河车列入薄层色谱鉴别项。因本处方提取方法为水煎煮法,石菖蒲、制远志及泽泻药材中成分大多为脂溶性成分,薄层色谱法不能鉴别其相应成分斑点,故最终选择黄连、佛手、麻黄、熟地黄作为薄层鉴别项。本试验中对麻黄药材薄层展开剂进行选择,分别比较了三氯甲烷-甲醇-浓氨试液(20:5:0.5, $V/V/V$)和丙酮-甲醇-浓氨试液(20:5:0.5, $V/V/V$)^[6-7]。结果表明麻黄薄层鉴别中展开剂的极性应偏大,更换为正丁醇-冰醋酸-水(8:2:1, $V/V/V$),所得薄层色谱斑点集中,分离度良好。

3.2 含量测定指标选择

指标选择:初期根据处方中药材的化学成分及药理作用对含量测定指标进行选择。由于远志药材中的远志皂苷在制剂中质量不稳定,泽泻药材中乙酰泽泻醇 B 在水中溶解度低,故远志和泽泻中成分不适合作为该制剂的质控指标。熟地黄药材和佛手药材中有效成分含量较低,缺少对照品,故未将其作为质量控制指标。盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱为麻黄药材中主要有效成分^[8],但由于该制剂中这 2 种生物碱保留时间和含量均不稳定,难以控制质量,故未将其作为质控指标。黄连中含生物碱类成分,具有清热燥湿、泻火解毒功效^[9]。现代药理学研究表明,黄连具有降血糖、抗菌、抗氧化、抗肿瘤、抗心律失常等活性,其中盐酸小檗碱为发挥药效的主要有效成分^[10]。黄连具有广泛的药理活性,用于诸多中药制剂如黄连上清丸、一清胶囊、人参再造丸等中,故选择黄连中盐酸小檗碱含量作为该制剂的质量控制指标。

提取溶剂考察:取同一批(批号为 190101)样品适量,研细,分别加入甲醇、甲醇-盐酸(100:1, V/V)、甲醇-盐酸(100:3, V/V)和甲醇-盐酸(100:5, V/V) 25 mL,超声处理 30 min,用上述溶液补足减失的质量,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液。按拟订色谱条件测定盐酸小檗碱含量结果分别为 0.638 0, 0.637 8, 0.583 6 mg/g。可见,采用甲醇-盐酸(100:1, V/V)比例的溶剂提取的盐酸小檗碱含量最高,故选择用甲醇-盐酸(100:1, V/V)作为样品提取溶剂。

提取时间考察:取同一批(批号为 190101)样品适量,精密加入甲醇-盐酸(100:1, V/V) 25 mL,分别超