

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.15.019

健脾益气合剂质量标准提升研究*

陈朝, 陈小媛, 黄敏, 黄晓燕, 韦家欢, 杨正腾[△]

(广西中医药大学第一附属医院, 广西南宁 530023)

摘要:目的 完善健脾益气合剂的质量标准。方法 采用薄层色谱法定性鉴别黄芪、制何首乌、白术和陈皮4味药材。采用高效液相色谱法测定陈皮主要成分橙皮苷的含量, 色谱柱为 WondaCract ODS-2 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液(20:80, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 10 μL, 柱温为 30℃, 检测波长为 285 nm。结果 黄芪、制何首乌、白术和陈皮的图谱清晰, 与杂质斑点分离较好, 阴性对照无干扰; 橙皮苷质量浓度在 7.6~121.6 μg/mL($r=1.0000$)范围内与峰面积线性关系良好, 平均加样回收率为 100.99%, RSD 为 1.45%($n=8$)。结论 该方法简便、重复性好、专属性强, 可用于健脾益气合剂的质量控制。

关键词:健脾益气合剂; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 橙皮苷; 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)15-0070-04

Improvment of the Quality Standard of Jianpiyiqi Mixture

CHEN Chao, CHEN Xiaoyuan, HUANG Min, HUANG Xiaoyan, WEI Jiahuan, YANG Zhengteng

(The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China 530023)

Abstract: Objective To improve the quality standard of Jianpiyiqi Mixture. **Methods** Thin layer chromatography(TLC) was used to qualitatively identify the four herbs including *Astragali Radix*, *Polygoni Multiflori Radix Preparata*, *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*, and dried orange peel. High performance liquid chromatography(HPLC) was used for the quantitative analysis of the main component of hesperidin in dried orange peel. The chromatographic column was a WondaCract ODS-2 column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution(20:80, V/V), and the flow rate was 1.0 mL/min, the injection volume was 10 μL, the column temperature was 30℃, and the detection wavelength was 285 nm. **Results** The TLC spots of *Astragali Radix*, *Polygoni Multiflori Radix Preparata*, *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*, and dried orange peel were clear; the spots were well separated and the

*基金项目: 广西创新驱动发展专项资金项目[桂科 AA17202031]; 全国中药特色技术传承人才培养项目[T20194828003]。

第一作者: 陈朝, 男, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为中药制剂研发与质量标准, (电子信箱)32605734@qq.com。

[△]通信作者: 杨正腾, 男, 硕士研究生, 主任药师, 研究方向为中药制剂研发与质量标准, (电子信箱)674632459@qq.com。

3.2 提取溶剂考察

取本品粉末约 1.0 g, 共 4 份, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入无水甲醇、无水乙醇、30% 甲醇、60% 甲醇各 10 mL, 密塞, 称定质量, 浸泡 0.5 h, 超声处理 60 min, 放冷, 再称定质量, 用各自溶剂补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。按拟定色谱条件进样测定, 结果 60% 甲醇对供试品溶液中沉香四醇的提取效果较好, 故以 60% 甲醇作为提取溶剂。

3.3 流动相考察

参考相关质量标准方法^[5], 分别考察了乙腈-0.1% 甲酸溶液(梯度洗脱)、甲醇-0.1% 甲酸(30:70, V/V)、甲醇-水(25:75, V/V)、甲醇-水(28:72, V/V)等流动相, 结果以甲醇-水(28:72, V/V)为流动相时, 沉香四醇峰形对称、尖锐, 理论板数达 6 000 以上, 分离度 R 大于 1.5。

3.4 柱温考察

分别考察了 30, 38, 40℃ 3 个柱温下供试品溶液的色谱峰情况, 结果在 3 个柱温条件下, 其色谱峰分离均良好, 但随柱温的升高, 其色谱峰的保留时间逐渐减小。从缩

短分析时间和节约能源的角度考虑, 选择柱温为 38℃。

3.5 色谱柱考察

分别考察了 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)及 Thermo C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)2 个品牌的色谱柱, 结果沉香四醇色谱峰在 Thermo C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)中分离效果较好。

参考文献:

- [1] 江白确吉, 丹增赤列. 《藏医秘诀宝源》[M]. 斗 嘎, 整理. 西宁: 青海民族出版社, 1997: 15.
- [2] 陈 亚. 沉香化学成分和质量评价研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2005.
- [3] 郑克敏, 张继全, 沈平壤, 等. 高速逆流色谱法分离制备沉香中的沉香四醇和 4'-甲氧基沉香四醇[J]. 中成药, 2011, 33(1): 96-99.
- [4] 李凯明, 马清温, 孙震晓. 中药沉香主要化学成分与质量评价研究进展[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(13): 1538-1545.
- [5] 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: 185.

(收稿日期: 2019-12-08)

negative control had no interference. Hesperidin indicated good linearity in the range of 7.6–121.6 $\mu\text{g/mL}$ with the peak area ($r = 1.0000$); the average recovery rate ($n = 8$) were 100.99%, and RSD was 1.45% ($n = 8$). **Conclusion** This method is easy, reproducible, and specific, which can be used as the quality standard of Jianpiyiqi mixture.

Key words: Jianpiyiqi Mixture; thin layer chromatography; high performance liquid chromatography; hesperidin; quality standard

健脾益气合剂是我院研发的传统中药制剂(桂药制字 Z01060070),由黄芪、党参、陈皮、何首乌、白术、麦冬等中药组方,可有效改善反复呼吸道感染患儿的临床症状、体征及免疫状态,在防治小儿反复呼吸道感染及治疗脾虚型厌食症方面已取得满意疗效^[1-3]。健脾益气合剂现行质量标准仅有相对密度及合剂项下规定的检查项,无专属性鉴别项与含量测定项,对该制剂的质量控制较弱。本研究中增加了黄芪、何首乌、白术、陈皮的薄层色谱(TLC)法,以陈皮有效成分橙皮苷作为含量测定指标,建立了专属性较强的高效液相色谱(HPLC)法,可为完善和提高该制剂的质量标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪;美国 Waters 2998 型检测器(美国 Waters 公司);YOKO-CS 型紫外线透射反射成像仪(武汉药科新技术开发有限公司);GH-25 型电子分析天平(日本 A&D 公司,精度为万分之一);CD-UPT 型超纯水机(成都越纯科技有限公司);毛细管(国药控股有限公司);硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂,规格为 10 cm × 10 cm)。

1.2 试剂

健脾益气合剂(广西中医药大学第一附属医院制剂室,批号为 20170819,20180122,20180515);黄芪甲苷对照品(批号为 110781-200613),橙皮苷对照品(批号为 110721-201316),大黄素对照品(批号为 110756-201512),制何首乌对照药材(批号为 121454-201405),白术对照药材(批号为 120925-200708),陈皮对照药材(批号为 120969-201510),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

黄芪^[4]:取本品 20 mL,用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,用 1% 氢氧化钠溶液洗涤 3 次,每次 20 mL,弃去碱液,合并正丁醇液,再用正丁醇饱和的水洗至中性,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。按处方工艺取缺黄芪药材的阴性样品 20 mL,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。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。分别吸取上述对照品溶液 5 μL 、供试品溶液及阴性对照溶液各 10 μL ,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-三氯甲烷-甲醇-水(20:10:11:5, V/V/V/V)10 $^{\circ}\text{C}$ 以下放置 30 min 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 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰,置紫外光(365 nm)灯下检视。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的荧光斑点,阴性对照无干扰。结果见图 1 A(温度为 26 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 65%,展距为 7.0 cm)。

制何首乌^[5]:取本品 20 mL,用乙酸乙酯振摇提取 3 次,每次 20 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。按处方工艺取缺制何首乌药材阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。取制何首乌对照药材 0.5 g,加甲醇 30 mL,超声提取 30 min,滤过,蒸干,残渣加水 20 mL 使溶解,同法制备对照药材溶液。取大黄素对照品 0.5 g,加甲醇 1 mL,作为对照品溶液。分别吸取大黄素对照品溶液 2 μL 、供试品溶液及阴性对照品溶液各 10 μL 、制何首乌对照药材溶液 4 μL ,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(30~60 $^{\circ}\text{C}$)-甲酸乙酯-甲酸(14:2:1, V/V/V)

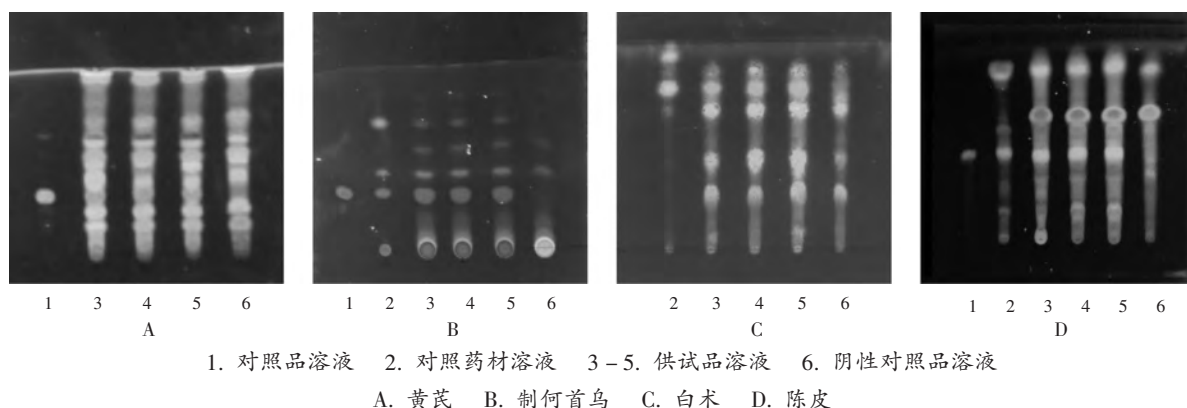


图1 薄层色谱图

V/V)为展开剂,展开,取出,晾干。供试品溶液色谱中,在与对照品及对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点。结果见图1B(温度为25℃,相对湿度为60%,展距为7.0cm)。

白术^[6]:取本品20mL,用乙酸乙酯振摇提取2次,每次25mL,合并乙酸乙酯液,30mL水洗涤,乙酸乙酯液蒸干,残渣加甲醇1mL使溶解,作为供试品溶液。按处方工艺取缺白术药材阴性样品20mL,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。取白术对照药材2g,加甲醇20mL,超声处理30min,同法制备对照药材溶液。照2015年版《中国药典(四部)》通则0502中TLC法试验,分别吸取供试品溶液、阴性对照品溶液各2μL、对照药材溶液1μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-丙酮-甲酸(10:1:0.1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以2%氢氧化钠溶液,于365nm波长下检视。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荧光斑点,阴性对照无干扰。结果见图1C(温度为27℃,相对湿度为55%,展距为7.5cm)。

陈皮^[7-8]:取本品20mL,用乙酸乙酯振摇提取3次,每次20mL,合并乙酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇1mL使溶解,作为供试品溶液。按处方工艺取缺陈皮药材的阳性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。取陈皮对照药材1g,加水60mL,煮沸30min,滤过,滤液浓缩成20mL,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。取橙皮苷对照品1.7mg,加甲醇1mL,振荡30s,4℃静置过夜,取上清液,即得橙皮苷对照品饱和溶液,作为对照品溶液。照2015年版《中国药典(四部)》通则0502中TLC法试验,分别吸取供试品溶液、阴性对照品溶液、对照品溶液、对照药材溶液各5μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-甲醇-水(100:17:13, V/V/V)为展开剂,展至约8cm,取出,晾干,喷以1%三氯化铝溶液,置紫外光(365nm)灯下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液、对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无干扰。结果见图1D(温度为26℃,相对湿度为60%,展距为8.0cm)。

2.2 橙皮苷含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:WondaCract ODS-2柱(250mm×4.6mm, 5μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(20:80, V/V);流速:1.0mL/min;进样量:10μL;柱温:30℃;检测波长:285nm。

2.2.2 溶液制备

取橙皮苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1mL含50μg的溶液,即得对照品溶液。精密量取本品1mL,置10mL容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,微孔滤膜过滤(0.45μm),即得供试品溶液。按处方工艺取除陈皮外的其他药味,依法制备阴性样品,并按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

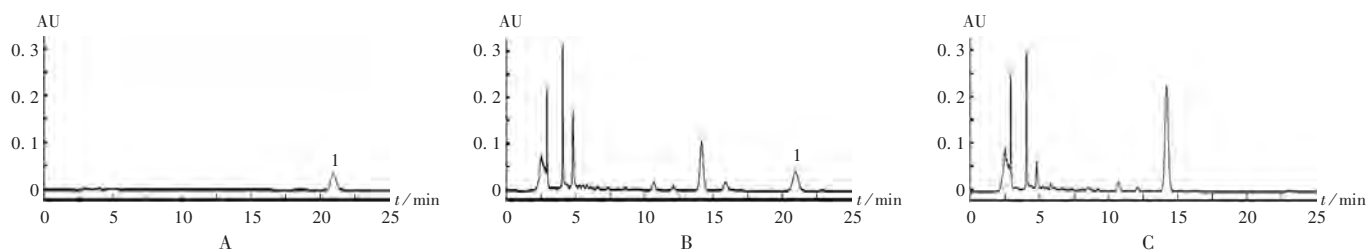
2.2.3 方法学考察

专属性试验:取橙皮苷对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液,分别进样测定,记录色谱图(见图2)。结果橙皮苷的保留时间约为21.45min,陈皮阴性对照品溶液的色谱图中在橙皮苷的位置无吸收峰,表明方法专属性强。

线性关系考察:取橙皮苷对照品3.8mg,精密称定,置25mL容量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀。精密吸取0.5,1.0,2.0,4.0,6.0,8.0mL,分别置10mL容量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得质量浓度为7.6,15.2,30.4,60.8,91.2,121.6μg/mL的对照品溶液。分别吸取10μL,按拟订色谱条件进样测定峰面积,每个样品测定2次,取平均值。以进样量(X,μg)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 1.5618 \times 10^4 X - 1.4863 \times 10^4$, $r = 1.0000$ ($n = 6$)。结果表明,橙皮苷质量浓度在7.6~121.6μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取橙皮苷对照品溶液,按拟订色谱条件重复进样6次,测定峰面积。结果橙皮苷峰面积的RSD为0.45% ($n = 6$),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20180515),室温放置,分别于0,1,5,12,24,48h时进样测定。结果橙皮苷峰面积的RSD为0.86% ($n = 6$),表明供试品溶



1. 橙皮苷

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

液在 48 h 内稳定。

重复性试验:取同一批(批号为 20180515)样品,依法制备供试品溶液共 6 份,每份进样测定 2 次。结果橙皮苷含量的 RSD 为 0.65% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密量取样品(批号为 20180515) 1 mL,共 8 份,分别精密加入 0.47 mg/mL 的橙皮苷对照品溶液各 1 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 1。

表 1 橙皮苷加样回收试验结果($n=8$)

样品编号	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
1	0.388 3	0.47	0.857 3	99.79	100.99	1.45
2	0.388 3	0.47	0.864 3	101.28		
3	0.388 3	0.47	0.850 6	98.36		
4	0.388 3	0.47	0.865 1	101.49		
5	0.388 3	0.47	0.861 9	100.77		
6	0.388 3	0.47	0.865 3	101.49		
7	0.388 3	0.47	0.864 4	101.30		
8	0.388 3	0.47	0.874 4	103.43		

2.2.4 样品含量测定

取 3 批(批号分别为 20170819, 20180122, 20180515)样品,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定橙皮苷含量,结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果(mg/mL, $n=3$)

批号	峰面积	含量	$\bar{X}$
20170819	732 075	0.478	0.434
20180122	656 446	0.430	
20180515	600 152	0.394	

3 讨论

多组分、多指标的质量控制体系的意义:民族药制剂现阶段整体质量标准水平较低,仍多集中于药材基源及鉴定的研究,并未充分利用现代分离分析技术和方法对其物质基础进行深入探讨,多数尚未建立多组分、多指标的质量控制体系,严重制约了民族医药的发展^[9]。2016 年,健脾益气合剂被确认为《广西医疗机构中药民族药制剂标准(第一卷)》拟收载质量标准提高的品种。本研究中对该制剂进行深入研究,提高并拟定了新的质量标准。

指标成分选择:陈皮理气健脾,为健脾益气合剂的主药,而橙皮苷是陈皮的主要活性成分,故选择橙皮苷作为含量测定指标成分。橙皮苷为醇溶性成分^[10],且在甲醇中的溶解性优于乙醇^[11]。健脾益气合剂为液体制剂,故供试品溶液制备方法采用甲醇直接稀释法,待测峰无杂质干扰,分离度好,加样回收率高。

展开剂选择:2015 年版《中国药典(一部)》中陈皮^[6]的薄层色谱法采用二次展开方法且含用甲苯,操作较复杂。因此,考察了三氯甲烷-甲醇-水(65:35:10, V/V)

V/V)^[7]和三氯甲烷-丙酮-甲醇-冰醋酸(5:1:1:0.02, $V/V/V/V$)^[8]2 种展开系统,发现斑点均不够清晰。以乙酸乙酯-甲醇-水(100:7:13, $V/V/V$)为展开剂后,最终斑点清晰,操作简单,且避免了甲苯和氯仿有害试剂的使用。

流动相选择:多采用乙腈(甲醇)-磷酸(醋酸)-水系统。本研究中经对比考察,最终筛选出分离效果好、基线平稳、保留时间适中的乙腈-水(含 0.1% 磷酸溶液)系统作为流动相。曾考察不同仪器(岛津 LC-20A、Waters 2695)、不同色谱柱(Wonda Sil C₁₈ Super, WondaCract ODS-2)、不同柱温(25, 30, 35 °C)和不同流速(0.8, 1.0, 1.2 mL/min)对橙皮苷含量测定的影响,结果各色谱条件下的 RSD 均小于 3.00%,分离效果理想,表明方法耐用性好。

吸收波长选择:取橙皮苷对照品溶液适量,在波长 210~400 nm 范围内扫描,结果显示,橙皮苷于 285 nm 波长处有最大吸收,因此选择 285 nm 作为检测波长。

综上所述,在健脾益气合剂现行质量标准基础上,增加了黄芪、制何首乌、白术、陈皮的 TLC 鉴别及有效成分指标橙皮苷的含量测定,方法简单易行,高效快速,质量可控,为完善和提升其质量标准提供了依据。

参考文献:

- [1] 王力宁,王振熹,张晓春,等. 系列抗复感合剂防治小儿反复呼吸道感染的临床研究[J]. 广西中医药,1998,21(6):4-8.
- [2] 张晓春,朱树丽,王力宁. 健脾益气合剂治疗小儿下呼吸道感染 60 例[J]. 河南中医,2015,35(4):776-778.
- [3] 张晓春,张惠霞,王力宁,等. 健脾益气合剂改善抗生素脱污染小鼠肠道菌群失调及细菌易位的实验研究[J]. 中国儿科杂志,2012,8(6):7-10.
- [4] 张小强,李英,吴云,等. 芪桂痛风片的质量标准研究[J]. 中国新药杂志,2017,26(2):169-173.
- [5] 刘静,谈瑛忠,陆兔林,等. 复方化痰明目口服液的质量控制[J]. 中国医院药学杂志,2014,34(21):1838-1842.
- [6] 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,2015:1375.
- [7] 周雪芳. 金果饮的质量控制研究[J]. 北方药学,2015,12(9):3-5.
- [8] 陈恩生,崔明珠,赵晓峰,等. 三水白虎颗粒质量标准研究[J]. 时珍国医国药,2016,27(5):1104-1106.
- [9] 戎晓娟,康丽彤,贺金华,等. 西帕依麦孜彼子口服液的质量标准提高研究[J]. 中国药房,2018,29(16):2238-2242.
- [10] 陈丽津,汤浩,石磊,等. 基于信息熵理论的正交设计优化消乳增胶囊的提取工艺[J]. 中草药,2019,50(14):3345-3350.
- [11] 沈婷婷,李世芳,刘瑾,等. 乐胃颗粒的薄层色谱鉴别[J]. 华西药理学杂志,2016,31(2):218-219.

(收稿日期:2019-11-18;修回日期:2020-01-09)