

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.01.016

抗痫颗粒质量标准研究

卫向锋¹, 张艳¹, 牛春玲¹, 王卫峰², 王海峰^{3△}

(1. 陕西省西安中医脑病医院, 陕西 西安 710032; 2. 陕西省中医药研究院中药研究所, 陕西 西安 710031; 3. 武警陕西总队医院, 陕西 西安 710054)

摘要:目的 建立抗痫颗粒的质量标准。方法 采用薄层色谱法定性鉴别抗痫颗粒中的天麻、羌活、丹参、陈皮和枳实, 采用超高效液相色谱法测定天麻中的天麻素和对羟基苯甲醇含量。结果 建立的薄层鉴别法重复性好, 阴性对照无干扰。天麻素和对羟基苯甲醇进样量分别在 0.016 8~0.336 0 μg ($r=1$) 和 0.004 78~0.095 60 μg ($r=1$) 范围内与峰面积线性关系良好; 平均回收率分别为 98.34% 和 95.68%, RSD 分别为 1.05% 和 0.77% ($n=6$)。结论 该方法专属性强, 可用于抗痫颗粒的质量控制。

关键词: 抗痫颗粒; 质量控制; 天麻素; 对羟基苯甲醇; 超高效液相色谱法; 薄层色谱法

中图分类号: R932; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)01-0063-04

Quality Standard of Kangxian Granules

WEI Xiangfeng¹, ZHANG Yan¹, NIU Chunling¹, WANG Weifeng², WANG Haifeng³

(1. Xi'an Traditional Chinese Medicine Brain Disease Hospital, Xi'an, Shaanxi, China 710032; 2. Chinese Medicine Research Institute of Shaanxi Institute of Traditional Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi, China 710031; 3. Shaanxi Armed Police Corps Hospital, Xi'an, Shaanxi, China 710054)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Kangxian Granules. **Methods** *Gastrodiae Rhizoma*, *Notopterygii Rhizoma* et *Radix, Salvia Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma, Pericarpium Citri Reticulatae* and *Aurantii Fructus Immaturus* in Kangxian Granules were qualitatively identified by thin layer chromatography(TLC) method, and the contents of gastrodin and *p*-hydroxybenzenyl methanol of *Gastrodiae Rhizoma* in Kangxian Granules were determined by the ultra performance liquid chromatography(UPLC) method. **Results** The established TLC method had good repeatability, and the negative control had no interference. The linear range was 0.016 8-0.336 0 μg ($r=1$) for gastrodin and 0.004 78-0.095 60 μg ($r=1$) for *p*-hydroxybenzenyl methanol. The average recoveries were 98.34% and 95.68%, and the RSD s were 1.05% and 0.77% ($n=6$), respectively. **Conclusion** The method is specific, which can be used for the quality control of Kangxian Granules.

Key words: Kangxian Granules; quality control; gastrodin; *p*-hydroxybenzenyl methanol; UPLC; TLC

抗痫颗粒由石菖蒲、天麻、羌活、丹参等 16 味中药材组方, 具有健脾豁痰、熄风止痉之功效, 主要用于治疗癫痫、风痰痫(痰蒙心窍、气逆风动证), 在陕西省西安中医脑病医院多年临床经验方的基础上开发而成。本研究中采用薄层色谱(TLC)法定性鉴别处方中的天麻、羌活、丹参、陈皮和枳实, 采用超高效液相色谱(UPLC)法测定天麻中天麻素和对羟基苯甲醇的含量, 为该产品的质量控制提供客观的定性定量评价方法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters Acquity H-CLASS 型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); BS210S 型电子分析天平(精度为 0.1 mg), BT25S 型电子分析天平(精度为 0.01 mg), 均购自北京赛多利斯天平有限公司; FOEA26810D 型纯水机(德国 Millipore 公司); KH-300DE 型数控超声波清洗机(昆山禾创超声仪器有限公司, 功率为 150 W, 频率为 40 kHz);

HH-4A 型四孔水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司); WS70-1 型红外快速干燥箱(上海市吴淞五金厂); 101 型电热鼓风干燥箱(北京市永光明医疗仪器厂); HCTP11B10 型托盘药物天平(北京市宣武区天平厂); WFH-201B 型三用紫外分析仪(上海精科实业有限公司, 含 WFH-201B 型紫外透射反射仪)。

1.2 试药

天麻素对照品(批号为 110807-201809, 供含量测定用, 含量为 96.7%), 对羟基苯甲醇对照品(批号为 111970-201702, 供含量测定用, 含量为 99.4%), 丹酚酸 B 对照品(批号为 111562-201716, 供含量测定用, 含量为 94.1%), 橙皮苷对照品(批号为 110721-201818, 供含量测定用, 含量为 95.3%), 羌活对照药材(批号为 120935-201408), 丹参对照药材(批号为 120923-201615), 陈皮对照药材(批号为 120969-201510), 枳实对照药材(批号为 120936-201606), 均

*基金项目: 陕西省重点研发计划重点项目[2017ZDXM-SF-006]。

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与中药制剂, (电话)029-84366564(电子信箱)w478333954@163.com。

△通信作者: 王海峰, 男, 大学本科, 主管药师, 研究方向为医院药学, (电话)029-84563919(电子信箱)86092785@qq.com。

由中国食品药品检定研究院提供;液相用试剂(色谱纯,德国 Merck 公司);色谱用水为超纯水;其他试剂均为分析纯(天津富宇化学试剂厂);抗痢颗粒(医院制剂,批号分别为 20181101,20181102,20181103)。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别^[1-12]

天麻:取样品 5 g,研成细粉,置锥形瓶中,加 70% 甲醇 15 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液作为供试品溶液。同法制备缺天麻的阴性对照品溶液。取天麻素对照品适量,加甲醇,制得质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液。分别吸取上述 3 种溶液,点于同一硅胶 G 板上,点样量为 5 μ L,以乙酸乙酯-甲醇-水(9:1:0.1, V/V/V)为展开剂展开,显色剂用 10% 磷钼酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 加热显色。结果供试品溶液色谱中检出天麻素,阴性对照无干扰,详见图 1 A。

羌活:取样品 5 g,研成细粉,置锥形瓶中,加甲醇 15 mL,超声处理 20 min,取上清液作为供试品溶液。再同法制备缺羌活的阴性对照品溶液。取羌活对照药材 1 g,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。分别吸取上述 3 种溶液,点于同一硅胶 G 板上,点样量为 5 μ L,以三氯甲烷-甲醇-氨水(7:2:0.5, V/V/V)为展开剂展开,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱中检出羌活,阴性对照无干扰,详见图 1 B。

丹参:取样品 5 g,研成细粉,置锥形瓶中,加 75% 甲醇 25 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干后加水 20 mL 溶解,调 pH 至 1~2,再用乙酸乙酯提取 2 次,每次 25 mL,水浴蒸干,加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。再同法制备缺羌活的阴性对照品溶液。取丹参对

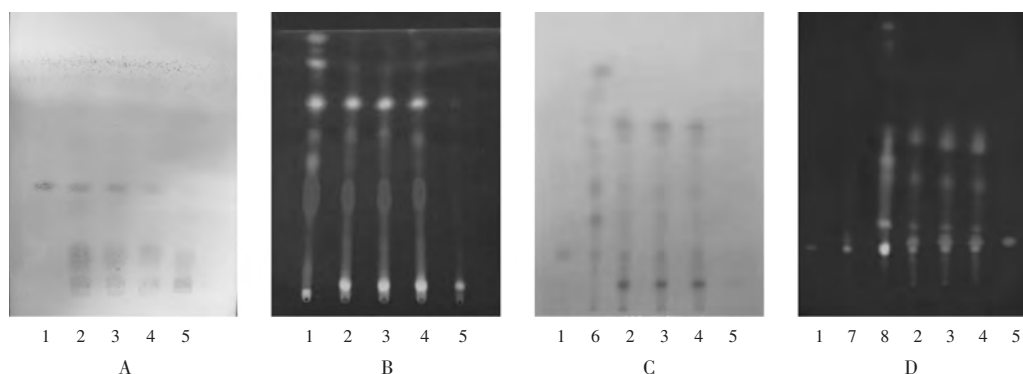
照药材 1 g,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。取丹酚酸 B 对照品适量,加乙醇制得质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液。分别吸取上述 4 种溶液,点于同一硅胶 G 板上,点样量为 5 μ L,以甲苯-三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(2:3:4:0.5:2, V/V/V/V/V)为展开剂展开,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液中检出丹参和丹酚酸 B,阴性对照无干扰,详见图 1 C。

陈皮和枳实:取本品 5 g,研成细粉,置锥形瓶中,加甲醇 30 mL,超声处理 20 min,滤过,取滤液 15 mL,浓缩至 1 mL,作为供试品溶液。再按供试品溶液制备方法制备缺枳实和陈皮的阴性对照品溶液。取橙皮苷对照品适量,加甲醇制得质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液。再取陈皮和枳实对照药材各 1 g,同法制成对照药材溶液。分别吸取上述 4 种溶液,点于同一硅胶 G 板上,点样量为 5 μ L,以乙酸乙酯-甲醇-水(100:17:13, V/V/V)为展开剂展开约 4 cm,取出晾干,再以甲苯-乙酸乙酯-甲酸-水(20:10:1:1, V/V/V/V)的上层溶液为展开剂展至 10 cm,以三氯化铝试液为显色剂,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱中检出橙皮苷,阴性对照无干扰,详见图 1 D。

2.2 含量测定^[13-15]

2.2.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱:BEH C₁₈ 柱(50 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m);流动相:乙腈-0.05% 磷酸溶液(3:97, V/V);流速:0.3 mL/min;检测波长:220 nm;柱温:室温;进样量:天麻素对照品溶液 2 μ L,对羟基苯甲醇对照品溶液 1 μ L,供试品溶液及空白对照溶液各 2 μ L。理论板数按天麻

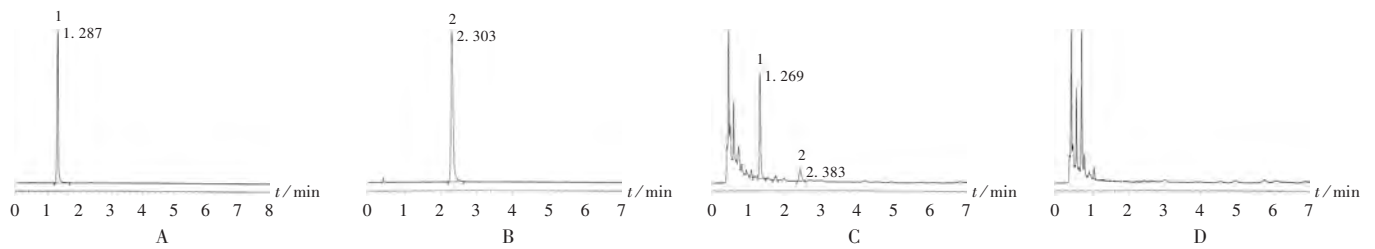


1. 对照品溶液 2-4. 供试品溶液 5. 阴性对照品溶液 6-8. 对照药材溶液(分别为丹参、陈皮、枳实)
A. 天麻 B. 羌活 C. 丹参 D. 陈皮和枳实

图 1 薄层色谱图

1. reference solution 2-4. test solution 5. negative reference solution
6-8. reference material solution(*Salvia Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, *Pericarpium Citri Reticulatae* and *Aurantii Fructus Immaturus*)
A. *Gastrodiae Rhizoma* B. *Notopterygii Rhizoma et Radix* C. *Salvia Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*
D. *Pericarpium Citri Reticulatae* and *Aurantii Fructus Immaturus*

Fig. 1 TLC chromatograms



1. 天麻素 2. 对羟基苯甲醇
A, B. 对照品溶液 C. 供试品溶液 D. 阴性对照品溶液

图2 超高效液相色谱图

1. gastrodin 2. *p*-hydroxybenzenyl methanol

A, B. Reference solution C. Test solution D. Negative reference solution

Fig. 2 UPLC chromatograms

素峰计大于5 000, UPLC图谱中,天麻素色谱峰分离良好,阴性对照无干扰。详见图2。

2.2.2 溶液制备

取天麻素对照品适量,精密称定,溶于100 mL乙腈-水(3:97, V/V)混合溶液(质量浓度为0.042 mg/mL),即得。取对羟基苯甲醇对照品适量,精密称定,溶于250 mL乙腈-水(3:97, V/V)混合溶液(质量浓度为0.023 9 mg/mL),即得对照品溶液。取抗痫颗粒5 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入稀乙醇25 mL,超声提取30 min,放冷,用溶剂补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液10 mL,浓缩至干,加乙腈-水(3:97, V/V)混合溶液,转移至25 mL容量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。同法制备缺丹参的阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

线性关系考察:分别精密量取上述天麻素对照品溶液(0.4, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 μL)及对羟基苯甲醇对照品溶液(0.4, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 μL),按拟订色谱条件进样测定,以进样量(*X*)为横坐标、峰面积(*Y*)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_{\text{天}} = 8\,010\,660.31 X_{\text{天}} - 11\,907.30$ ($r = 1$)及 $Y_{\text{羟}} = 8\,542\,598.13 X_{\text{羟}} - 3\,976.08$

($r = 1$)。结果表明,天麻素和对羟基苯甲醇进样量分别在0.016 8~0.336 0 μg和0.004 78~0.095 60 μg范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:分别精密吸取天麻素对照品溶液(质量浓度为0.042 mg/mL)及对羟基苯甲醇对照品溶液(质量浓度为0.023 9 mg/mL),按拟订色谱条件连续进样6次。结果天麻素和对羟基苯甲醇峰面积的RSD分别为0.14%和0.24% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取新制备的同一供试品溶液,在室温下测定10 h内的稳定性(每隔2 h测1次)。结果天麻素和对羟基苯甲醇峰面积的RSD分别为0.83%和2.58% ($n = 6$),表明供试品溶液在10 h内基本稳定。

重复性试验:取同一批(批号为20181101)样品6份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定天麻素和对羟基苯甲醇含量。结果天麻素平均含量为0.954 6 mg/g, RSD为1.75% ($n = 6$),对羟基苯甲醇平均含量为0.1853 mg/g, RSD为1.50% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的抗痫颗粒样品细粉6份,每份约0.5 g,精密称定,分别加入一定量的天麻素和对羟基苯甲醇对照品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果见表1。

表1 加样回收试验结果($n = 6$)
Tab.1 Results of recovery tests($n = 6$)

样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		\bar{X} (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
2.398 9	0.465 7	2.435 2	0.480 8	4.753 7	0.928 8	96.70	96.32				
2.386 9	0.463 3	2.435 2	0.480 8	4.798 1	0.923 6	99.01	95.74				
2.379 1	0.461 8	2.435 2	0.480 8	4.783 9	0.920 0	98.75	95.30				
2.394 1	0.464 7	2.435 2	0.480 8	4.817 9	0.929 8	99.53	96.73	98.34	95.68	1.05	0.77
2.378 6	0.461 7	2.435 2	0.480 8	4.777 2	0.919 8	98.50	95.28				
2.373 3	0.460 7	2.435 2	0.480 8	4.749 1	0.916 2	97.56	94.74				

注:A为天麻素,B为对羟基苯甲醇。

Note:A is gastrodin, B is *p*-hydroxybenzenyl methanol.

2.2.4 样品含量测定

取3批样品各适量,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果见表2。

表2 3批样品中天麻素和对羟基苯甲醇的含量测定结果(mg/g)
Tab.2 Results of content determination of gastrodin and p-hydroxybenzyl methanol in 3 batches of samples(mg/g)

批号	天麻素	对羟基苯甲醇	总量	\bar{X}
20181101	0.953 6	0.188 2	1.141 8	
20181102	0.926 8	0.183 5	1.110 3	1.127 9
20181103	0.946 5	0.185 2	1.131 7	

3 讨论

3.1 薄层鉴别指标选择及色谱条件优化

处方中天麻、羌活、丹参、陈皮和枳实5味药材为主药,且药效成分清楚,可建立稳定可行的薄层色谱鉴别法,因此建立了5味药材的质量标准。考虑到抗痫颗粒提取工艺为水煎煮,因此鉴别指标主要选择水溶性有效成分,其中天麻鉴别指标选择其主要水溶性有效成分天麻素^[16-18];羌活鉴别指标选择羌活对照药材^[19];丹参鉴别指标选择丹参对照药材和水溶性有效成分丹酚酸B^[20];橙皮苷为陈皮和枳实中共有水溶性有效成分^[21-23],故选择橙皮苷为两者的鉴别指标。根据研究结果,所建立的5味药材的薄层色谱鉴别法有较强专属性,阴性对照均无干扰,可有效控制抗痫颗粒的质量。

3.2 含量测定指标选择及色谱条件优化

天麻素是天麻中主要有效成分,具有抗癫痫作用^[17-18],主要作用机制为保护神经、胶质细胞和血管内皮损伤而发挥抗癫痫作用。通过对治疗癫痫的中医处方的考证发现,其核心药物均有天麻^[18]。本研究中以天麻素和天麻素昔元(对羟基苯甲醇)为含量测定指标,采用UPLC法测定,用以表征制剂质量,检测波长采用《中国药典》中“天麻”项下所用波长,流动相采用乙腈-0.05%磷酸溶液,反复调整比例,以拖尾因子、分离度、理论板数、基线作为评判标准,最终确定色谱条件,即流动相为乙腈-0.05%磷酸溶液(3:97, V/V),流速为0.3 mL/min。该方法精密性、重复性及回收率均良好,供试品溶液在10 h内稳定性良好,可用于抗痫颗粒的质量控制。

参考文献

[1] 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: 58-59.
[2] 张晓瑞, 王光函, 贾冬, 等. 癫痫清颗粒薄层定性鉴别研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(9): 57-59.
[3] 吴静澜, 张永萍, 刘莉, 等. 天麻灵芝颗粒的质量标准研究[J].

贵阳中医学院学报, 2016, 38(5): 13-18.

[4] 曹瑞, 曹林林, 郭东艳, 等. 天麻眩晕宁片的薄层色谱鉴别研究[J]. 云南中医学院学报, 2016, 39(4): 26-29.
[5] 李卢, 杜志谦. 羌归膝舒丸的质量标准研究[J]. 光明中医, 2018, 33(18): 2662-2664.
[6] 黄木土, 林兰兰, 谢新民, 等. 风湿痹痛胶囊质量标准[J]. 医药导报, 2017, 36(7): 786-789.
[7] 李青, 吾金卓玛, 戴涌, 等. 藤丹胶囊质量标准方法的改进[J]. 中国医药科学, 2018, 8(15): 47-54.
[8] 郑凤雅, 王世俊, 冯华, 等. 中风康复胶囊中丹参药材的定性定量分析[J]. 甘肃中医药大学学报, 2018, 35(2): 36-39.
[9] 梁志云, 张健民, 余香, 等. 复方新会陈皮含片的鉴别研究[J]. 蛇志, 2018, 30(3): 399-401.
[10] 廖伟中, 李养学. 益气开胃膏质量标准研究[J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(8): 187-190.
[11] 吴丹, 刘梅, 李晰, 等. 清胃理肠胶囊质量标准的建立[J]. 中国药师, 2018, 21(7): 1295-1299.
[12] 薛剑桥, 岳宁. 槐苓合剂质量标准研究[J]. 食品与药品, 2017, 19(3): 182-186.
[13] 相继芬, 邓辰辰, 刘圆, 等. HPLC测定天麻配方颗粒中天麻素和对羟基苯甲醇的含量[J]. 中国现代中药, 2018, 20(11): 1440-1443.
[14] 秦伟瀚, 师莹, 花雷, 等. UPLC-MS/MS法检测不同产地野生天麻中天麻素及对羟基苯甲醇含量[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(17): 143-145.
[15] 康传志, 吕朝耕, 杨健, 等. 基于UPLC-MS/MS的不同主产区天麻药材质量评价研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 2010-2015.
[16] 韩大荣. 天麻研究新进展[J]. 中国处方药, 2018, 16(4): 19-21.
[17] 郑丹丹. 天麻素在神经及精神系统疾病中的应用进展[J]. 中国临床药学杂志, 2018, 27(1): 68-72.
[18] 李燕, 谢森, 邵明莎, 等. 近10年来天麻的药理作用及化学成分研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(12): 2987-2993.
[19] 李石平, 沙龙, 赵祎武, 等. 近30年来中药羌活化学成分研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(15): 2952-2963.
[20] 代晓光, 苏长兰. 丹参化学成分及药理研究进展[J]. 中医药信息, 2018, 35(4): 126-128.
[21] 许姗姗, 许浚, 张笑敏, 等. 常用中药陈皮、枳实和枳壳的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中草药, 2018, 49(1): 35-44.
[22] 李欣然, 王静, 余晓燕, 等. 陈皮的研究进展[J]. 中国医药指南, 2016, 14(24): 31-32.
[23] 曲中原, 冯晓敏, 邹翔, 等. 枳实研究进展[J]. 食品与药品, 2017, 19(6): 453-456.

(收稿日期: 2020-03-10; 修回日期: 2020-09-12)