

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.23.020

保儿宁颗粒质量标准研究

黄 玮

(江苏省徐州市食品药品监督检验中心, 江苏 徐州 221000)

摘要:目的 建立保儿宁颗粒的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法鉴别白术;采用高效液相色谱(HPLC)法测定保儿宁颗粒中升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量,色谱柱为Zobrax XDB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,柱温为32℃,检测波长为215 nm,进样量为10 μL。结果 TLC图中特征斑点清晰,且阴性无干扰;升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷进样量分别在0.342 2~2.053 2 μg, 0.151 3~0.907 8 μg, 0.304 1~1.824 6 μg范围内与峰面积线性关系良好($n=6$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD均低于2.0% ($n=6$);加样回收率分别为99.58%, 100.19%, 99.47%, RSD分别为0.87%, 0.80%, 1.16% ($n=6$)。结论 该方法操作简便快捷,结果准确可靠,稳定性和重复性均良好,可用于保儿宁颗粒的质量控制。

关键词:保儿宁颗粒;升麻素苷;毛蕊异黄酮葡萄糖苷;5-O-甲基维斯阿米醇苷;高效液相色谱法;薄层色谱法;含量测定;质量标准

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)23-0068-04

Quality Standard of Bao'erning Granules

HUANG Wei

(Xuzhou Food and Drug Administration and Inspection Center, Xuzhou, Jiangsu, China 221000)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Bao'erning Granules. **Methods** Thin-layer chromatography (TLC) method was used for the identification of Atractylodis Macrocephalae Rhizoma. High-performance liquid chromatography (HPLC) method was used for the content determination of prim-O-glucosylcimifugin, calycosin 7-O-glucoside and 5-O-methylvisammioside in Bao'erning Granules. The chromatographic column was Zobrax XDB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 32℃, the detection wavelength was 215 nm, and the injection volume was 10 μL. **Results** The characteristic spots in the TLC chromatogram were clear and negative had no interference. The linear ranges of prim-O-glucosylcimifugin, calycosin 7-O-glucoside and 5-O-methylvisammioside were 0.342 2~2.053 2 μg, 0.151 3~0.907 8 μg and 0.304 1~1.824 6 μg ($n=6$), respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were lower than 2.0% ($n=6$). The recoveries of prim-O-glucosylcimifugin, calycosin 7-O-glucoside and 5-O-methylvisammioside were 99.58%, 100.19% and 99.47% with RSDs of 0.87%, 0.80% and 1.16% ($n=6$), respectively. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate, reliable, stable and reproducible, which can be used for the quality control of Bao'erning Granules.

Key words: Bao'erning Granules; prim-O-glucosylcimifugin; calycosin 7-O-glucoside; 5-O-methylvisammioside; HPLC; TLC; content determination; quality standard

保儿宁颗粒由黄芪(炙)、白术、防风、芦根、鸡内金、茯苓和山药(炒)7味中药加工制成,具有益气固表、健脾醒脾功效,用于脾肺气虚所致的神倦纳呆、面黄肌瘦、烦躁不宁、表虚自汗、易感风邪等症。原质量标准收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第十五册)》,仅有理化鉴别项,无含量测定项^[1]。为了更好地控制制剂质量,本研究中增加了白术的薄层色谱(TLC)鉴别,并采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定黄芪中有效成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷、防风中有效成分升麻素苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷含量,旨在为完善保儿宁质量标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695型高效液相色谱仪(美国 Waters 公

司),配有 Waters 2998PDA 型检测器;XSR205 型电子天平(瑞士 Mettler 公司,精度为十万分之一);TL-360 型超声波检测仪(上海声彦超声波仪器有限公司,功率为 400 W,频率为 40 kHz)。

1.2 试药

白术对照药材(批号为 120925-201611),毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(批号为 111920-201606,纯度为 97.6%),升麻素苷对照品(批号为 111522-201913,纯度为 94.6%),5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品(批号为 111523-201208,纯度为 96.5%),均购于中国食品药品检定研究院;乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);水为超纯水,其他试剂均为分析纯,均购于国药集团化学试剂有限公司;保儿宁颗粒(江苏颐海药业有限责任公司,

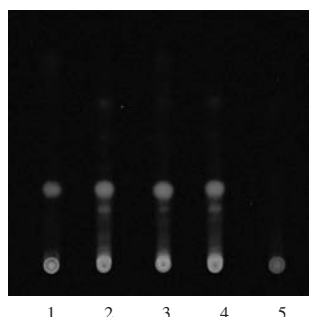
第一作者:黄玮,女,大学本科,副主任中药师,研究方向为药品检验,(电话)0516-80277126(电子信箱)316243060@qq.com。

批号分别为 190101, 190201, 190301)。

2 方法与结果

2.1 白术薄层鉴别^{[2]535}

取样品 5 g, 研细, 加水饱和的正丁醇 50 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液用水洗涤 3 次, 每次 20 mL, 弃去水洗液, 正丁醇液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取白术对照药材 0.5 g, 加水煎煮 2 h, 滤过, 滤液用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次, 每次 15 mL, 合并正丁醇液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为对照药材溶液。另取按处方工艺制备缺白术的阴性样品 5 g, 同法制备阴性对照品溶液。照 2015 年版《中国药典(一部)》通则 0502 薄层色谱法试验, 吸取上述 3 种溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-丙酮-甲酸(9.5:0.5:0.06, V/V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(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, 显相同的蓝色荧光斑点, 且阴性对照无干扰。详见图 1。



1. 对照药材溶液 2-4. 供试品溶液 5. 阴性对照品溶液

图 1 白术薄层色谱图(365 nm)

1. Reference medicinal material solution 2-4. Test solution
5. Negative reference solution

Fig. 1 TLC chromatogram of *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* (365 nm)

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 Zorbax Eclipse XDB C₁₈ 柱(250 mm ×

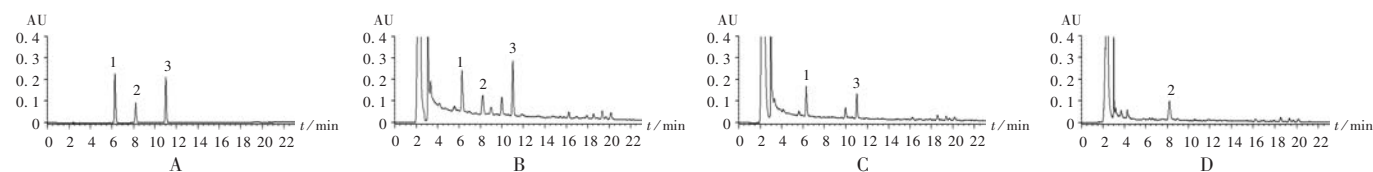
4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈(A)-0.2% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0 min→20 min→22 min 时 15% A→30% A→15% A); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 32 $^{\circ}$ C; 检测波长: 215 nm; 进样量: 10 μ L。在此色谱条件下, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷与各自相邻峰的分离度均大于 2.0, 理论板数均大于 6 000。色谱图见图 2。

2.2.2 溶液制备

取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品各适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 制成含毛蕊异黄酮葡萄糖苷 0.151 3 mg/mL、升麻素苷 0.342 2 mg/mL、5-O-甲基维斯阿米醇苷 0.304 1 mg/mL 的混合对照品贮备液。精密量取上述贮备液各 3 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 即得混合对照品溶液。取样品 6 g, 精密称定, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 25 mL, 回收溶剂至干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 5 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 用微孔滤膜(0.45 μ m)滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。分别按处方比例及制备工艺制备缺黄芪和防风药材的阴性样品, 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

线性关系考察: 分别配制系列质量浓度的升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以峰面积(A)对进样量(C, μ g)进行线性回归, 得回归方程 $A_{升}=3.5193 \times 10^7 C_{升}+2.6604 \times 10^4$ ($r=0.9999$, $n=6$), $A_{毛}=3.9049 \times 10^7 C_{毛}+1.2322 \times 10^4$ ($r=0.9998$, $n=6$), $A_{维}=2.9702 \times 10^7 C_{维}+3.2138 \times 10^4$ ($r=0.9999$, $n=6$)。结果表明, 升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷进样量分别在 0.342 2~2.053 2 μ g, 0.151 3~0.907 8 μ g, 0.304 1~1.824 6 μ g 范围内与峰面积线性关系良好。



1. 升麻素苷 2. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 3. 5-O-甲基维斯阿米醇苷

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 缺黄芪阴性样对照品溶液 D. 缺防风阴性对照品溶液

图 2 系统适用性试验高效液相色谱图

1. prim-O-glucosylcimifugin 2. calycosin 7-O-glucoside 3. 5-O-methylvisammioside

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution without *Astragali Radix* D. Negative reference solution without *Saposhnikovia Radix*

Fig. 2 HPLC chromatograms of the system suitability test

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

样品含量(mg)			加入量(mg)			测得量(mg)			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD(%)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0.350 2	0.147 0	0.308 9	0.342 2	0.151 3	0.304 1	0.691 3	0.298 9	0.607 7	99.68	100.40	98.26						
0.349 0	0.146 5	0.307 9	0.342 2	0.151 3	0.304 1	0.693 5	0.296 8	0.609 1	100.67	99.34	99.05						
0.352 2	0.147 9	0.310 7	0.342 2	0.151 3	0.304 1	0.691 8	0.300 1	0.612 9	99.24	100.59	99.38						
0.350 3	0.147 1	0.309 0	0.342 2	0.151 3	0.304 1	0.693 5	0.298 8	0.610 8	100.29	100.26	99.24	99.58	100.19	99.47	0.87	0.80	1.16
0.361 6	0.151 8	0.319 0	0.342 2	0.151 3	0.304 1	0.697 7	0.301 9	0.628 2	98.22	99.21	101.68						
0.352 0	0.147 8	0.310 5	0.342 2	0.151 3	0.304 1	0.692 1	0.301 1	0.612 3	99.39	101.32	99.24						

注: A 为升麻素苷, B 为毛蕊异黄酮葡萄糖苷, C 为 5-O-甲基维斯阿米醇苷。表 2 同。

Note: A is prim-O-glucosylcimifugin, B is calycosin 7-O-glucoside, and C is 5-O-methylvisammioside, as well as Tab. 2.

精密度试验: 取同一混合对照品溶液(升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷)质量浓度分别为 0.076 93, 0.039 58, 0.079 71 mg/mL, 按 2.2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷峰面积的 RSD 分别为 0.69%, 0.42%, 0.39% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取同一批(批号为 190301)样品, 依法制备供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 10, 24 h 时按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷峰面积的 RSD 分别为 1.01%, 1.17%, 0.88% ($n=6$), 表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

重复性试验: 取同一批(批号为 190301)样品 6 份, 依法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷的平均含量为分别 0.116 30, 0.048 82, 0.102 60 mg/g, RSD 分别为 0.97%, 1.19%, 0.77% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 取已知含量的样品(批号为 190301, 升麻素苷的平均含量为 0.116 30 mg/g, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷的平均含量为 0.048 82 mg/g, 5-O-甲基维斯阿米醇苷的平均含量为 0.102 60 mg/g) 3 g, 共 6 份, 精密称定, 置 50 mL 容量瓶中, 分别精密加入 2.2.2 项下混合对照品贮备液 1 mL, 依法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算加样回收率。结果见表 1。

2.2.4 样品含量测定

精密吸取对照品溶液和 3 批(批号分别为 190101, 190201, 190301)样品溶液各 10 μ L, 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 按外标法(峰面积)计算含量。结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 (mg/g, $n=3$)

Tab. 2 Content determination of prim-O-glucosylcimifugin, calycosin 7-O-glucoside and 5-O-methylvisammioside in the samples (mg/g, $n=3$)

批号	A	B	C
190301	0.116 3	0.048 82	0.102 6
190101	0.107 1	0.046 29	0.100 3
190201	0.132 0	0.049 18	0.123 9

3 讨论

3.1 TLC 法中供试品溶液制备方法选择

加甲醇超声处理后, 取滤液点样, TLC 图斑点较多, 分离不好; 水饱和的正丁醇超声处理后, 滤液水洗后蒸干正丁醇液, 用甲醇溶解, 点样, TLC 斑点干扰少, 主斑点显色清晰。故选择甲醇和水饱和正丁醇超声处理。

3.2 HPLC 法色谱条件选择

波长选择: 文献[3-7]报道, 采用 HPLC 法测定升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量, 测定波长为 254 nm, 而供试品溶液在检测波长为 254 nm 时各成分峰面积较小。通过紫外分光光度法于 210~400 nm 波长范围内进行扫描, 升麻素苷对照品溶液和 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品溶液分别在 214.6 nm 和 213.4 nm 波长处有最大吸收, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液在 215 nm 波长处有较大吸收。故选择测定波长为 215 nm。

流动相选择: 分别以甲醇-水(40:60, V/V)^{[21]49}, 乙腈(A)-0.05% 磷酸水溶液(B)^[8], 乙腈-水溶液为流动相进行梯度洗脱^[9], 比较不同流动相对峰形的影响, 经调整最终确定流动相为乙腈-0.2% 磷酸水溶液, 梯度洗脱程度为 0 min→20 min→22 min 时 15% A→30% A→15% A, 所得各色谱峰的分离度、理论板数及对称性均较好。故确定流动相为乙腈(A)-0.2% 磷酸水溶液(B)进行梯度洗脱。