

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)05-0088-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.05.020



定眩饮颗粒质量标准研究*

田欢¹, 祁庆瑞², 王可欣², 惠荣², 翟秉涛², 唐远山¹, 岳宝森^{1△}

(1. 陕西省西安市中医医院, 陕西 西安 710021; 2. 陕西中医药大学, 陕西 西安 712046)

摘要:目的 建立定眩饮颗粒的质量标准。方法 采用薄层色谱法定性鉴别制剂中的羌活、炙甘草、白芍、当归、熟地黄;采用高效液相色谱法测定制剂中芍药苷、阿魏酸、甘草苷的含量,色谱柱为 Agilent 5 TC - C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈 - 0.1% 醋酸水溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 245 nm,柱温为 30 ℃。结果 羌活、炙甘草、白芍、当归、熟地黄的薄层色谱图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。芍药苷、阿魏酸、甘草苷的进样量分别在 0.620 0~5.850 0 μg、0.112 0~1.008 0 μg、0.133 3~1.200 1 μg 范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.999 5, n = 6$);精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 4.0%;平均加样回收率分别为 93.24%, 90.83%, 94.54%, RSD 分别为 0.94%, 1.35%, 0.92% ($n = 6$)。样品中芍药苷、阿魏酸、甘草苷的平均含量分别为 0.881 7, 0.077 6, 0.261 3 mg/g ($n = 3$)。结论 该标准可用于定眩饮颗粒的质量控制。

关键词: 定眩饮颗粒;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准

Quality Standard of Dingxuanyin Granules

TIAN Huan¹, QI Qingrui², WANG Kexin², HUI Rong², ZHAI Bingtao², TANG Yuanshan¹, YUE Baosen¹

(1. Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi, China 710021; 2. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi, China 712046)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Dingxuanyin Granules. **Methods** *Notopterygii Rhizoma Et Radix*, *Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma Praeparata Cum Melle*, *Paeoniae Radix Alba*, *Angelicae Sinensis Radix* and *Rehmanniae Radix Praeparata* in the preparation were identified qualitatively by the thin-layer chromatography (TLC) method. The contents of paeoniflorin, ferulic acid and liquiritin were determined by the high-performance liquid chromatography (HPLC) method. The chromatographic column was Agilent 5 TC - C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.1% acetic acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 245 nm, and the column temperature 30 ℃. **Results** The TLC chromatograms of *Notopterygii Rhizoma Et Radix*, *Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma Praeparata Cum Melle*, *Paeoniae Radix Alba*, *Angelicae Sinensis Radix* and *Rehmanniae Radix Praeparata* had clear spots, good separation, and the negative reference had no interference. The linear ranges of paeoniflorin, ferulic acid and liquiritin were 0.620 0 - 5.850 0 μg, 0.112 0 - 1.008 0 μg and 0.133 3 - 1.200 1 μg ($r \geq 0.999 5, n = 6$) respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 4.0%. The average recoveries were 93.24%, 90.83% and 94.54% with RSDs of 0.94%, 1.35% and 0.92% respectively ($n = 6$). The average contents of paeoniflorin, ferulic acid and liquiritin in the samples were 0.881 7, 0.077 6 and 0.261 3 mg/g respectively ($n = 3$). **Conclusion** This standard can be used for the quality control of Dingxuanyin Granules.

Key words: Dingxuanyin Granules; TLC; HPLC; quality standard

定眩饮由熟地、当归、白芍、麦冬等12味中药材组方,具有疏风定眩、补血益精功效,主要用于治疗营血虚滞、风扰清窍所致眩晕病,以及颈项僵硬、肩背酸痛、神疲乏力、倦怠懒言等症,是国家级名老中医高上林主任的临床经验方。方中,熟地、当归、川芎、白芍共为君药,共奏补肝血、益肾精而通血痹之功效,体现了中医理论“风为百病之长,治风先治血,血行风自灭”的理论。陕西省名中医唐远山于2007年至2022年在陕西省西安市中医医院对此方的疗效进行临床观察,结果显示其缓解颈源性眩晕的疗效显著^[1-2]。但传统汤剂煎煮

工艺复杂,携带不便,且易变质,使其临床应用受到限制,故拟将其开发为院内制剂定眩饮颗粒。定眩饮全方仅12味药,药味更精,针对性强,且均不属贵重药品,继承了中医的“简、便、验、廉、效”特色。项目组前期已完成定眩饮颗粒的制备工艺研究^[3]。本研究中以薄层色谱(TLC)法定性鉴别定眩饮颗粒中的羌活、当归、炙甘草、白芍和熟地黄;以高效液相色谱(HPLC)法测定制剂中白芍、当归、川芎、羌活和甘草5味药材中的芍药苷、阿魏酸和甘草苷3种成分的含量,为其质量标准的建立提供参考。现报道如下。

* 基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划项目[2022JQ-932];陕西省教育厅重点科学研究计划项目[21JS009];陕西省西安市卫生健康委员会中医药科研项目[SZY202103]。

第一作者:田欢,女,硕士研究生,中药师,研究方向为中药复方物质基础,(电子信箱)18149412681@163.com。

△通信作者:岳宝森,男,硕士研究生,主任药师,研究方向为中药复方制剂及质量控制,(电子信箱)1057561423@qq.com。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司); XS105DU型分析天平(梅特勒-托利多公司,精度为0.01 mg); KQ-400E型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为500 W,频率为40 kHz)。

1.2 试药

定眩饮颗粒(医院制剂,批号分别为20211201, 20211202, 20211203); 熟地黄对照药材(批号为121196-202007), 当归对照药材(批号为120927-202118), 半夏对照药材(批号为121272-201806), 干姜对照药材(批号为120942-201911), 甘草对照药材(批号为120904-202021), 紫花前胡苷对照品(批号为111737-201910), 芍药苷对照品(批号为110736-201943, 纯度为96.5%), 阿魏酸对照品(批号为110773-201915, 纯度为99.4%), 甘草苷对照品(批号为111610-201908, 纯度为95.0%), 均购于中国食品药品检定研究院; 当归(批号为20200301), 白芍(批号为20191101), 麦冬(批号为20200201), 姜半夏(批号为20191101), 薄荷(批号为20200101), 羌活(批号为20191201), 天麻(批号为20200201), 麸炒山药(批号为20200202), 炙甘草(批号为20191101), 均购于陕西兴盛德药业有限责任公司; 熟地黄(批号为191102), 川芎(批号为200501), 砂仁(批号为180811), 均购于陕西康超康健药业有限公司; 上述药材均经陕西省西安市中医医院刘麦娥副主任中药师鉴定为正品。

2 方法与结果

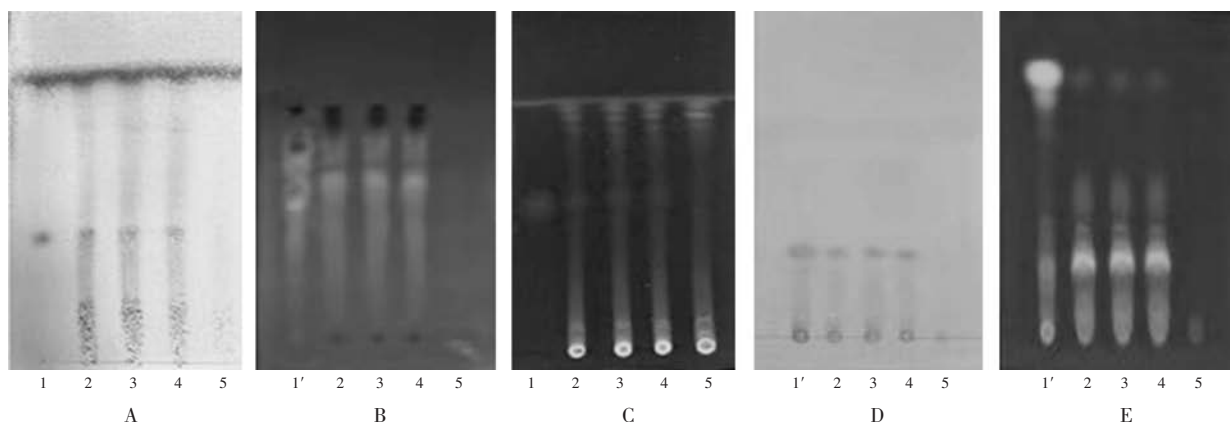
2.1 TLC鉴别

白芍: 取样品8 g, 50 mL乙醇超声5 min, 滤液蒸干,

加1 mL乙醇使溶解, 作为供试品溶液; 同法制备缺白芍的阴性对照品溶液; 另取芍药苷对照品, 加乙醇制成每1 mL含1 mg的溶液, 作为对照品溶液。照2020年版《中国药典(四部)》0502 TLC法试验, 取上述3种溶液分别点于同一硅胶G板上, 以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2, V/V/V/V)为展开剂, 展开, 取出, 喷以5%香草醛硫酸溶液显色, 105 °C加热至斑点显色清晰^{[4]109}。供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相应位置显相同的蓝紫色斑点, 且阴性对照无干扰。详见图1 A。

炙甘草: 取样品6 g, 40 mL乙醚回流1 h, 滤过, 药渣加甲醇回流1 h, 滤液蒸干, 加适量水溶解, 正丁醇萃取3次, 合并滤液, 水洗3次, 挥干后残渣加甲醇使溶解, 作为供试品溶液; 同法制备甘草对照药材溶液及缺炙甘草阴性对照品溶液。照2020年版《中国药典(四部)》0502 TLC法试验, 取上述3种溶液分别点于同一硅胶G板上, 以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15:1:1:2, V/V/V/V)为展开剂, 展开, 取出, 喷以10%硫酸乙醇溶液, 105 °C加热至斑点显色清晰, 置紫外光灯(365 nm波长)下检视^{[4]88-89}。供试品溶液色谱中, 在与对照药材溶液色谱相应位置显相同的荧光斑点, 且阴性对照无干扰。详见图1 B。

羌活: 取样品10 g, 50 mL甲醇超声20 min, 取上清液作为供试品溶液; 同法制备缺羌活的阴性对照品溶液; 另取紫花前胡苷对照品, 加甲醇制成每1 mL含0.5 mg的溶液, 作为对照品溶液。照2020年版《中国药典(四部)》0502 TLC法试验, 取上述3种溶液分别点于同一3%醋酸钠制备的硅胶G板上, 以三氯甲烷-甲醇(8:2, V/V)为展开剂, 展开, 取出, 置紫外光灯(365 nm



1. 对照品溶液 1'. 对照药材溶液 2-4. 供试品溶液 5. 阴性对照品溶液

A. 白芍 B. 炙甘草 C. 羌活 D. 熟地黄 E. 当归

图1 定眩饮颗粒薄层色谱图

1. Reference solution 1'. Solution of reference medicinal materials 2-4. Test solution 5. Negative reference solution

A. Paeoniae Radix Alba B. Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma Praeparata Cum Melle C. Notopterygii Rhizoma Et Radix D. Rehmanniae Radix Praeparata E. Angelicae Sinensis Radix

Fig.1 TLC chromatograms of Dingxuan Yin Granules

波长)下检视^{[4]190}。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置显相同的蓝色荧光斑点,且阴性对照无干扰。色谱图见图1 C。

熟地黄:取样品 8 g,加水 100 mL,加热至沸,充分溶散,放冷,离心,取上清液,用乙酸乙酯振摇提取 3 次,每次 30 mL,合并乙酸乙酯液,回收溶剂至干,加 1 mL 甲醇使溶解,作为供试品溶液;同法制备缺熟地黄的阴性对照品溶液;另取熟地黄对照药材 1 g,同法制备对照药材溶液。照 2020 年版《中国药典(四部)》0502 TLC 法试验,取上述 3 种溶液分别点于同一硅胶 G 板上,以二甲苯-乙酸乙酯(1:1, V/V)为展开剂,展开,取出,喷以 2,4-二硝基苯肼乙醇试液,日光下检视^[5]。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置显相同的黄色斑点,且阴性对照无干扰。详见图 1 D。

当归:取样品 8 g, 30 mL 乙醚超声 10 min, 滤液挥干,加 1 mL 乙醇使溶解,作为供试品溶液;同法制备当归对照药材溶液及缺当归的阴性对照品溶液。照 2020 年版《中国药典(四部)》0502 TLC 法试验,取上述 3 种溶液分别点于同一硅胶 G 板上,以正己烷-乙酸乙酯(4:1, V/V)为展开剂,展开,取出,置紫外光灯(365 nm 波长)下检视^{[4]139}。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置显相同的荧光斑点,且阴性对照无干扰。详见图 1 E。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件

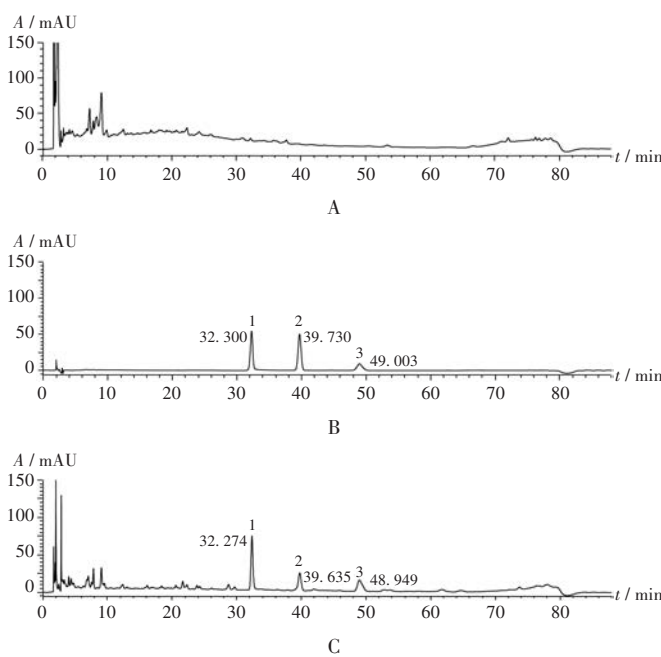
色谱柱: Agilent 5 TC - C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); **流动相:** 乙腈(A) - 0.1% 醋酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~15 min 时 3%A~10%A, 15~22 min 时 10%A~12%A, 22~30 min 时 12%A~13%A, 30~60 min 时 13%A, 60~70 min 时 13%A~18%A, 70~73 min 时 18%A~3%A, 73~88 min 时 3%A); **流速:** 1.0 mL/min; **柱温:** 30 °C; **检测波长:** 245 nm。

2.2.2 溶液制备

取芍药苷、阿魏酸、甘草苷对照品各适量,精密称定,置同一容量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 含芍药苷 310.00 μg、阿魏酸 56.00 μg、甘草苷 66.67 μg 的混合对照品溶液。取定眩饮颗粒及不含白芍、当归、川芎、羌活和甘草的阴性样品各 1.0 g,精密称定,置容量瓶中,精密加入 60% 甲醇 5 mL,密塞,称定质量,超声 30 min,放冷,再称定质量,用 60% 甲醇补足减失的质量,摇匀,静置,取上清液,滤过,取续滤液,即得供试品溶液和阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:取 2.2.2 项下混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照品溶液各适量,按 2.2.1 项下色谱条



1. 芍药苷 2. 阿魏酸 3. 甘草苷

A. 阴性对照品溶液 B. 混合对照品溶液 C. 供试品溶液

图 2 高效液相色谱图

1. Paeoniflorin 2. Ferulic acid 3. Liquiritin

A. Negative reference solution B. Mixed reference solution C. Test solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

件进样测定。结果混合对照品溶液和供试品溶液中,芍药苷、阿魏酸、甘草苷的分离良好,阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。详见图 2。

线性关系考察:精密量取 2.2.2 项下混合对照品溶液 2, 4, 8, 10, 14, 18 μL, 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,以峰面积(Y)为纵坐标、进样量(X, μg)为横坐标进行线性回归。结果见表 1。

表 1 定眩饮颗粒中 3 种成分线性关系考察结果 (n = 6)

Tab. 1 Results of the linear relation test of three components in Dingxuanyin Granules (n = 6)

成分	回归方程	r	线性范围(μg)
芍药苷	$Y = 482.881X - 15.840.0$	0.9999	0.6200 ~ 5.8500
阿魏酸	$Y = 3.014.340X - 22.888.0$	0.9999	0.1120 ~ 1.0080
甘草苷	$Y = 795.485X + 3.514.9$	0.9995	0.1333 ~ 1.2001

精密度试验:精密吸取 2.2.2 项下混合对照品溶液适量,按 2.2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果芍药苷、阿魏酸、甘草苷峰面积的 RSD 分别为 0.04%, 0.10%, 0.11% (n = 6), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为 20211201)适量,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,分别于制样后 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 时按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果芍药苷、阿魏酸、甘草苷峰面积的 RSD 分别为 0.61%, 0.91%, 0.80% (n = 7), 表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

表2 定眩饮颗粒中3种成分加样回收试验结果(n=6)

Tab. 2 Results of the recovery test of three components in Dingxuanyin Granules (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(%)		
	芍药苷	阿魏酸	甘草苷	芍药苷	阿魏酸	甘草苷	芍药苷	阿魏酸	甘草苷	芍药苷	阿魏酸	甘草苷	芍药苷	阿魏酸	甘草苷	芍药苷	阿魏酸	甘草苷
1.001	0.8505	0.0771	0.2472	0.8990	0.0840	0.2800	1.6746	0.1542	0.5079	91.67	91.79	93.11						
1.003	0.8522	0.0772	0.2477	0.8990	0.0840	0.2800	1.6944	0.1535	0.5145	93.68	90.83	95.29						
1.005	0.8539	0.0774	0.2482	0.8990	0.0840	0.2800	1.6900	0.1530	0.5137	93.00	90.00	94.82	93.24	90.83	94.54	0.94	1.35	0.92
1.004	0.8531	0.0773	0.2480	0.8990	0.0840	0.2800	1.6943	0.1519	0.5115	93.57	88.81	94.11						
1.007	0.8556	0.0775	0.2487	0.8990	0.0840	0.2800	1.7027	0.1545	0.5131	94.23	91.67	94.43						
1.002	0.8514	0.0772	0.2475	0.8990	0.0840	0.2800	1.6901	0.1544	0.5148	93.29	91.90	95.46						

重复性试验:取同一批(批号为20211202)样品6份,每份1.0g,精密称定,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定。结果芍药苷、阿魏酸、甘草苷的平均含量分别为0.85,0.08,0.25 mg/g, RSD分别为3.36%,2.56%,2.89%(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20211203)6份,每份1.0g,精密称定,分别加入一定质量浓度的待测成分,作为对照品溶液,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,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2。

2.2.4 样品含量测定

取3批(批号分别为20211201,20211202,20211203)样品各1.0g,精密称定,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定。结果见表3。

表3 定眩饮颗粒中3种成分含量测定结果(mg/g, n=3)

Tab. 3 Results of the content determination of three components in Dingxuanyin Granules (mg/g, n=3)

成分	20211201	20211202	20211203	\bar{X}
芍药苷	0.8976	0.8978	0.8497	0.8817
阿魏酸	0.0799	0.0760	0.0770	0.0776
甘草苷	0.2667	0.2701	0.2470	0.2613

3 讨论

3.1 TLC鉴别

熟地黄的TLC鉴别中,以2020年版《中国药典(一部)》熟地黄项下供试品制备方法制备,但TLC图分离度较差;参考文献[5]中熟地黄制备方法,加水后加热使样品溶散,升温至沸腾,取上清液,冷却后加乙酸乙酯提取3次,挥干,加甲醇溶解,以二甲苯-乙酸乙酯(1:1, V/V)为展开剂展开,以2,4-二硝基苯肼乙醇显色,效果更佳,斑点更清晰。

炙甘草的TLC鉴别中,参考2020年版《中国药典(一部)》,将供试品溶液点在1% NaOH处理的硅胶G板,但斑点模糊且不均匀,分离度差。本研究中将供试品溶液直接点于硅胶G板上,以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水

(15:1:1:2, V/V/V/V)为展开剂展开,以10%硫酸乙醇显色,105℃加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(365 nm波长)下检视,斑点显色清晰,分离效果较好。

以2020年版《中国药典(一部)》姜半夏项下方法进行TLC鉴别,可能由于定眩饮颗粒中姜半夏处方量较低,且有其他成分干扰,故干姜斑点有明显干扰,最终未将姜半夏纳入定眩饮颗粒的TLC鉴别中。参考川芎药材项下方法进行TLC鉴别,显示阴性对照有干扰,最终未将川芎纳入TLC鉴别中。

3.2 HPLC法测定含量

定眩饮方中,熟地黄、当归、白芍、川芎共为君药,麦冬、山药共为臣药,天麻、薄荷、羌活合为佐药;姜半夏、甘草、砂仁合为使药。诸药共用,合奏疏风定眩、补精益血之功效。选择指标性成分时,考虑白芍作为处方中的君药,主要化学物质为白芍总苷,而芍药苷又是白芍总苷中研究较多的主要活性成分,能发挥镇痛、保肝、促进造血功能、抗血栓、抗氧化、抗炎、免疫调节等多种药理作用^[6-8];阿魏酸作为君药当归、川芎和佐药羌活中的共有活性成分,具有抗血小板凝集、抗血栓、抗菌、消炎、增强免疫力等功效^[9-14];甘草苷是重要的黄酮类化合物,具有解痉、镇痛、抗抑郁、神经保护等作用^[15-17]。故本研究中测定了定眩饮颗粒中芍药苷、阿魏酸和甘草苷3种成分的含量,以更好地控制其质量。在含量测定方法的建立过程中,通过全波长扫描,显示245 nm波长下3个色谱峰峰形最好,故选择245 nm为检测波长;在样品制备中,分别考察了50%,60%,70%,80%甲醇为溶剂时样品中3种成分的含量,结果显示,以60%甲醇为溶剂时3种成分色谱峰峰面积最高;流动相分别考察了水-乙腈、0.1%磷酸水溶液-乙腈、0.1%醋酸水溶液-乙腈和0.1%醋酸水溶液-甲醇对各色谱峰峰形及分离度的影响,结果以0.1%醋酸水溶液-乙腈为流动相时,3个成分的色谱峰峰形和分离度均较好。

3.3 方法评价

所建立的定性、定量方法简便易行、专属性强、准确度高、重复性好,可用于定眩饮颗粒的质量控制。