

中图分类号: R932; R284.1; R286.0
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.13.018

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2024)13-0077-04



淫芎颗粒质量标准研究*

曹丽萍, 林晓燕, 梅全喜, 冯晓婷, 李佳瑞, 梁 奇[△]

(广东省深圳市宝安区中医院, 广东 深圳 518133)

摘要:目的 建立淫芎颗粒的质量标准。方法 采用薄层色谱法对制剂中川芎、白芍进行定性鉴别;采用高效液相色谱法同时测定制剂中芍药苷、甘草苷、阿魏酸、柚皮苷、橙皮苷、淫羊藿苷、甘草酸铵的含量,色谱柱为 Agilent Zorbax SB - C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈 - 0.3% 磷酸溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 230 nm,柱温为 30 °C,进样量为 10 μL。结果 薄层色谱斑点清晰,分离度良好,且阴性对照无干扰。芍药苷、甘草苷、阿魏酸、柚皮苷、橙皮苷、淫羊藿苷、甘草酸铵的质量浓度分别在 8.886~222.156 μg/mL、3.935~98.385 μg/mL、3.805~95.118 μg/mL、4.457~111.416 μg/mL、4.574~114.360 μg/mL、3.512~87.794 μg/mL、4.274~106.850 μg/mL 范围内与各自峰面积线性关系良好($r \geq 0.9991$, $n = 7$);精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 3.0%;平均加样回收率分别为 99.68%, 99.19%, 100.31%, 100.70%, 99.74%, 98.77%, 98.99%, RSD 分别为 1.57%, 1.89%, 2.77%, 1.52%, 1.58%, 1.27%, 2.18% ($n = 9$);平均含量分别为 5.743, 0.547, 0.472, 1.426, 1.376, 1.982, 1.480 μg/mL ($n = 2$)。结论 该方法操作方便、结果准确、专属性和重复性好,可用于淫芎颗粒的质量控制。

关键词:淫芎颗粒;薄层色谱法;高效液相色谱法;定性鉴别;含量测定

Quality Standard of Yinxiong Granules

CAO Liping, LIN Xiaoyan, MEI Quanxi, FENG Xiaoting, LI Jiarui, LIANG Qi

(Shenzhen Bao'an Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen, Guangdong, China 518133)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Yinxiong Granules. **Methods** The thin-layer chromatography (TLC) method was used for the qualitative identification of Chuanxiong Rhizoma and Paeoniae Radix Alba in the preparation. The high-performance liquid chromatography (HPLC) method was used for the content determination of paeoniflorin, liquiritin, ferulic acid, naringin, hesperidin, icariin, and ammonium glycyrrhizinate in the preparation. The chromatographic column was Agilent Zorbax SB - C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.3% phosphoric acid solution with gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 230 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** TLC spots were clear, with good separation, and the negative control had no interference. The linear ranges of paeoniflorin, liquiritin, ferulic acid, naringin, hesperidin, icariin, and ammonium glycyrrhizinate were 8.886 - 222.156 μg/mL, 3.935 - 98.385 μg/mL, 3.805 - 95.118 μg/mL, 4.457 - 111.416 μg/mL, 4.574 - 114.360 μg/mL, 3.512 - 87.794 μg/mL, and 4.274 - 106.850 μg/mL ($r \geq 0.9991$, $n = 7$), respectively. The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 3.0%. The average recoveries of the above seven components were 99.68%, 99.19%, 100.31%, 100.70%, 99.74%, 98.77%, and 98.99%, with RSDs of 1.57%, 1.89%, 2.77%, 1.52%, 1.58%, 1.27%, and 2.18% ($n = 9$), respectively. The average contents of in samples were 5.743, 0.547, 0.472, 1.426, 1.376, 1.982, and 1.480 μg/mL ($n = 2$), respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, with good specificity and repeatability, which can be used for the quality control of Yinxiong Granules.

Key words: Yinxiong Granules; TLC; HPLC; qualitative identification; content determination

腰痛多因肝肾亏虚、筋脉失养,再加上外伤及风、寒、湿邪侵袭引起经脉闭阻、气血失和而发病^[1-5],治宜补肾强筋、温经通络。淫芎颗粒为医院制剂,由淫羊藿、川芎、白芍、陈皮等12味中药材组方,具有补肾强筋、温经通络等功效,临床主要用于治疗腰椎间盘突出症、腰肌劳损、腰扭伤、股骨头坏死、棘上棘间韧带损伤、腰椎管狭窄症、第三腰椎横突综合征等引起的腰、臀、腿部

疼痛、麻木等症状,疗效确切,安全性好。目前,该制剂的质量控制方法以薄层色谱(TLC)法为主,质量标准有待提高。TLC法和高效液相色谱(HPLC)法具有检测速度快、操作简便、灵敏度高等特点^[6-10]。为更好地控制该制剂的质量,本研究中采用TLC法对方中川芎、白芍进行定性鉴别,采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定淫芎颗粒中芍药苷、阿魏酸、甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、

*基金项目:广东省深圳市中药特色技术传承人才培养项目;广东省深圳市医疗卫生三名工程[SZZYSM202206005]。

第一作者:曹丽萍,女,硕士研究生,副主任中药师,研究方向为医院制剂,(电子信箱)279387596@qq.com。

[△]通信作者:梁奇,男,大学本科,主任中药师,研究方向为医院制剂,(电子信箱)450589616@qq.com。

淫羊藿苷、甘草酸铵7种成分的含量。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AT型高效液相色谱仪(配有SPD-M20A型二极管阵列检测器,CTO-10AS型柱温箱,LC-solution型色谱工作站),AUW220D型电子天平(精度为十万分之一),均购自日本Shimadzu公司;KQ-250E型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司,功率为250 W,频率为40 kHz)。

1.2 试药

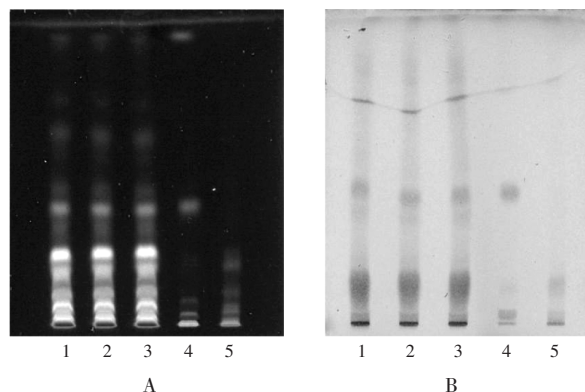
芍药苷对照品(批号为110736-202044,含量为96.8%),甘草苷对照品(批号为111610-201106,含量为93.7%),柚皮苷对照品(批号为110722-201815,含量为91.7%),橙皮苷对照品(批号为110721-201316,含量为95.3%),淫羊藿苷对照品(批号为110737-201516,含量为94.2%),甘草酸铵对照品(批号为110731-201418,含量为93.1%),川芎对照药材(批号为120918-201411),白芍对照药材(批号为120905-201610),均购自中国食品药品检定研究院;阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号为110773-201012,含量为99.6%,置五氧化二磷减压干燥12 h以上使用);水为超纯水(自制);甲醇、乙腈(色谱纯,硅胶G薄层板,均购自德国Merck公司);其余试剂均为分析纯;中药饮片购自我院中药房,经广东省深圳市宝安区中医院邱绿琴主任中药师鉴定为正品;淫芎颗粒(医院制剂,批号分别为20200701,20200702,20200703)。

2 方法与结果

2.1 TLC鉴别

川芎^{[11]42}:取样品1 g,加水20 mL使溶解,加乙醚振摇提取3次,每次10 mL,合并乙醚液,挥干,残渣加乙酸乙酯1 mL使溶解,作为供试品溶液。按淫芎颗粒制备方法制备缺川芎的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。取川芎对照药材0.5 g,加水100 mL,煮沸1 h,滤过,滤液加乙醚振摇提取3次,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验,吸取上述供试品溶液、阴性对照品溶液各15 μ L、对照药材溶液10 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以正己烷-乙酸乙酯(2:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的荧光斑点,且阴性对照无干扰。详见图1 A。

白芍^{[11]108}:取样品4 g,研细,加乙醇20 mL,振摇5 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。按淫芎颗粒制备方法制备缺白芍的阴性



A. 川芎 B. 白芍

1 - 3. 供试品溶液 4. 对照药材溶液 5. 阴性对照品溶液

图1 薄层色谱图

A. Chuanxiong Rhizoma B. Paeoniae Radix Alba

1 - 3. Test solution 4. Reference medicinal materials solution

5. Negative reference solution

Fig. 1 TLC chromatograms

样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。取白芍对照药材1 g,加适量水煮沸1 h,滤过,浓缩滤液,加适量硅藻土拌匀,蒸干,加乙醇20 mL,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。按2020年《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验,吸取上述供试品溶液、阴性对照品溶液各15 μ L、对照药材溶液10 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,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,晾干,喷以5%香草醛硫酸溶液,加热至斑点显色清晰。结果供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰。详见图1 B。

2.2 HPLC法测定含量

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent Zorbax SB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)-0.3%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~8 min时19%A,8~35 min时19%A→50%A,35~40 min时50%A→5%A,40~46 min时5%A→19%A,46~53 min时19%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:230 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。理论板数按芍药苷峰计不低于2 000。

2.2.2 溶液制备

混合对照品溶液:取芍药苷、甘草苷、阿魏酸、柚皮苷、橙皮苷、淫羊藿苷、甘草酸铵对照品各适量,精密称定,分别置20 mL容量瓶中,加70%甲醇溶液,超声使溶解,制成含芍药苷、甘草苷、阿魏酸、柚皮苷、橙皮苷、淫羊藿苷、甘草酸铵质量浓度分别为4.443 1, 1.967 7, 1.902 4, 2.228 3, 2.287 2, 1.755 9, 2.137 0 mg/mL的对照品单标母液;分别精密吸取对照品单标母液各适量,置同一容量瓶中,加甲醇制成不同质量浓度的混合

对照品溶液,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得系列混合对照品溶液(编号为S1-S7),详见表1。

表1 系列混合对照品溶液的质量浓度(μg/mL)

Tab. 1 Mass concentration of S1-S7 series mixed reference solution (μg/mL)							
编号	芍药苷	甘草苷	阿魏酸	柚皮苷	橙皮苷	淫羊藿苷	甘草酸铵
S1	8.886	3.935	3.805	4.457	4.574	3.512	4.274
S2	22.216	9.839	9.512	11.142	11.436	8.779	10.685
S3	44.431	19.677	19.024	22.283	22.872	17.559	21.370
S4	88.862	39.354	38.047	44.566	45.744	35.118	42.740
S5	133.294	59.031	57.071	66.849	68.616	52.676	64.110
S6	177.725	78.708	76.094	89.132	91.488	70.235	85.480
S7	222.156	98.385	95.118	111.416	114.360	87.794	106.850

供试品溶液:取样品细粉2.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇25 mL,超声处理(功率为250 W,频率为33 kHz)30 min,放冷至室温,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密取续滤液1 mL,置5 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

阴性对照溶液:按样品制备工艺分别制备缺白芍、甘草、川芎、骨碎补、陈皮、淫羊藿的阴性样品,分别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2.2.2项下混合对照品溶液(编号为S4)、供试品溶液和阴性对照品溶液各10 μL,按2.2.1项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液色谱中,芍药苷、甘草苷、阿魏酸、柚皮苷、橙皮苷、淫羊藿苷、甘草酸铵色谱峰保留时间与混合对照品溶液一致,且阴性对照无干扰。详见图2。

线性关系考察:取2.2.2项下系列混合对照品溶液(编号为S1-S7),按2.2.1项下色谱条件进样测定,以各成分质量浓度(X, μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表2。

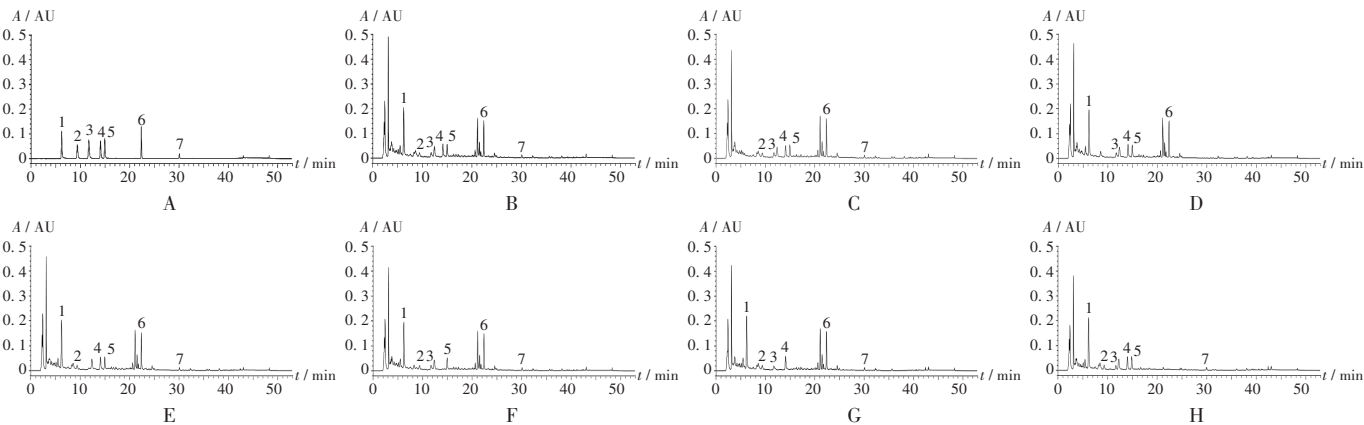
表2 7种成分线性关系考察结果(n=7)

Tab. 2 Results of the linear relation test of seven components (n=7)			
成分	回归方程	线性范围(μg/mL)	r
芍药苷	$Y = 12\,133.4X - 773.5$	8.886~222.156	0.999 1
甘草苷	$Y = 19\,880.3X - 1\,994.0$	3.935~98.385	0.999 3
阿魏酸	$Y = 28\,973.7X - 8\,327.6$	3.805~95.118	0.999 7
柚皮苷	$Y = 17\,630.4X + 3\,572.5$	4.457~111.416	0.999 3
橙皮苷	$Y = 18\,364.7X + 51.0$	4.574~114.360	0.999 6
淫羊藿苷	$Y = 25\,266.8X - 6\,669.0$	3.512~87.794	0.999 8
甘草酸铵	$Y = 3\,512.6X - 1\,304.4$	4.274~106.850	0.999 8

精密度试验:精密吸取2.2.2项下混合对照品溶液(编号为S4)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、甘草苷、阿魏酸、柚皮苷、橙皮苷、淫羊藿苷、甘草酸铵峰面积的RSD分别为0.60%, 2.68%, 2.74%, 2.32%, 1.10%, 1.01%, 2.17%(n=6),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批(批号为20200701)样品适量,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,分别于0, 2, 4, 8, 12 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、甘草苷、阿魏酸、柚皮苷、橙皮苷、淫羊藿苷、甘草酸铵峰面积的RSD分别为0.52%, 0.76%, 1.92%, 1.54%, 2.38%, 0.65%, 1.44%(n=5),表明供试品溶液在室温下放置12 h稳定性良好。

重复性试验:精密称取同一批(批号为20200701)



1. 芍药苷 2. 甘草苷 3. 阿魏酸 4. 柚皮苷 5. 橙皮苷 6. 淫羊藿苷 7. 甘草酸铵

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C-H. 阴性对照品溶液(分别缺白芍、甘草、川芎、骨碎补、陈皮、淫羊藿)

图2 高效液相色谱图

1. Paeoniflorin 2. Liquiritin 3. Ferulic Acid 4. Naringin 5. Hesperidin 6. Icaritin 7. Ammonium glycyrrhizinate

A. Mixed reference solution B. Test solution C-H. Negative reference solution (lacking Paeoniae Radix Alba, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, Chuanxiong Rhizoma, Drynariae Rhizoma, Citri Reticulatae Pericarpium, and Epimedii Folium, respectively)

Fig. 2 HPLC chromatograms

样品6份,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,并计算含量。结果芍药苷、甘草苷、阿魏酸、柚皮苷、橙皮苷、淫羊藿苷、甘草酸铵的平均含量分别为5.730 3,0.545 6,0.475 4,1.437 8,1.398 7,1.973 5,1.418 3 mg/g, RSD分别为0.87%,1.07%,1.36%,1.05%,0.54%,0.63%,0.95% ($n=6$),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20200701)9份,每份1.25 g,精密称定,分别精密加入2.2.2项下对照品单标母液(芍药苷、淫羊藿苷各加入1.2,1.5,1.8 mL,甘草苷加入0.25,0.35,0.45 mL,阿魏酸加入0.25,0.30,0.35 mL,其他对照品单标母液各加入0.60,0.80,1.00 mL),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,并计算回收率。结果见表3。

表3 7种成分加样回收试验结果(% , $n=9$)

Tab. 3 Results of the recovery test (% , $n=9$)

成分	$\bar{X}$	RSD	成分	$\bar{X}$	RSD
芍药苷	99.68	1.57	橙皮苷	99.74	1.58
甘草苷	99.19	1.89	淫羊藿苷	98.77	1.27
阿魏酸	100.31	2.77	甘草酸铵	98.99	2.18
柚皮苷	100.70	1.52			

2.2.4 样品含量测定

取3批(批号分别为20200701,20200702,20200703)样品,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2次,记录峰面积,计算样品中芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、淫羊藿苷、阿魏酸、甘草苷、甘草酸铵的含量。结果见表4。

表4 样品含量测定结果($\mu\text{g/mL}$, $n=2$)

Tab. 4 Results of the content determination of seven components in samples ($\mu\text{g/mL}$, $n=2$)

批号	芍药苷	甘草苷	阿魏酸	柚皮苷	橙皮苷	淫羊藿苷	甘草酸铵
20200701	5.730	0.546	0.475	1.438	1.400	1.987	1.418
20200702	5.837	0.527	0.480	1.424	1.382	2.004	1.530
20200703	5.662	0.568	0.462	1.417	1.346	1.955	1.492
$\bar{X}$	5.743	0.547	0.472	1.426	1.376	1.982	1.480

3 讨论

3.1 TLC鉴别条件选择

本研究中对淫苧颗粒方中川芎、白芍进行了TLC定性鉴别,参考2020年版《中国药典(一部)》中TLC鉴别方法^{[11]42,108},调整展开剂比例,分离效果更佳。分别考察了在高湿(32%硫酸溶液预饱和)和低湿(88%硫酸溶液预饱和)、低温(4℃)和室温(25℃),以及2种不同厂家薄层板条件下的展开效果,结果均能有效分离,斑点清晰,故最终选择2.1项下川芎、白芍TLC鉴别方法。

参照2020年版《中国药典(一部)》中牛膝、伸筋草、鸡血藤、杜仲的TLC鉴别方法,以及查伟凡等^[12]关于淫羊藿的TLC鉴别方法,对上述药材开展定性研究,结果斑点不清晰、分离效果差,故未纳入质量标准。

3.2 流动相选择

淫苧颗粒方中12味中药均为2020年版《中国药典》收载品种,白芍、川芎、骨碎补、陈皮、淫羊藿、甘草等中药饮片的HPLC法含量测定条件有一定相似性,故本研究中采用HPLC法同时测定多种成分。本研究中参考文献^[13-14],选择乙腈-0.3%磷酸溶液为流动相,经过洗脱程序的优化,确定梯度洗脱方法,能较好地分离淫苧颗粒中芍药苷、甘草苷、阿魏酸、柚皮苷、橙皮苷、淫羊藿苷、甘草酸铵7种成分,方法学考察结果良好,故选择2.2.1项下流动相。

3.3 方法评价

本研究中建立的方法操作方便、结果准确、专属性和重复性好,可用于淫苧颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] 傅景华. 黄帝内经素问译注[M]. 北京:中国人民大学出版社,2003:84.
- [2] 巢元方. 诸病源候论[M]. 刘晓峰,点校. 北京:人民军医出版社,2006:57.
- [3] 张仲景. 金匱要略[M]. 何任,何若平,整理. 北京:人民卫生出版社,2005:65.
- [4] 李文豪. 中医对腰椎间盘突出症的认识[J]. 甘肃中医,2009,22(11):10-11.
- [5] 张兆振,杨豪,郭会卿,等. 腰椎间盘突出症的国内外研究进展[J]. 风湿病与关节炎,2013,2(6):70-73.
- [6] 孙冬梅,林晓燕,李素梅,等. 复方芪麻胶囊的质量标准研究[J]. 中国药房,2017,28(18):2553-2556.
- [7] 林晓燕,孙冬梅,陈雪,等. HPLC-PAD法同时测定复方芪麻胶囊中8种成分的含量[J]. 中药材,2017,40(1):138-142.
- [8] 张子龙,梁奇,晓燕,等. 健脾消食颗粒制备工艺的优化[J]. 现代中药研究与实践,2020,34(1):54-59.
- [9] 李养学,曾文雪,陈秋谷,等. 远氏口服液质量标准研究[J]. 江西中医药,2016,47(12):60-63.
- [10] 闵会,徐斌,郑亚纯,等. 经典名方苓桂术甘汤物质基准质量控制标准研究[J]. 中国药品标准,2022,23(6):587-595.
- [11] 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,2020.
- [12] 查伟凡,聂黎行,于健东,等. 骨刺片高效薄层色谱法鉴别方法研究[J]. 中国药业,2018,27(8):18-21.
- [13] 孙桐. 高效液相色谱法同时测定骨松宝丸中5种成分含量[J]. 中国药业,2023,32(8):69-73.
- [14] 李钦青,柴金苗,贺文彬,等. 高效液相色谱法同时测定复方藿枝颗粒中淫羊藿苷、宝藿苷I、甘草苷和甘草酸铵的含量[J]. 中药新药与临床药理,2020,31(6):714-717.

(收稿日期:2023-08-24;修回日期:2024-03-09)