

健胃灵颗粒的质量控制项目研究*

傅应华¹, 徐宏祥²

(1. 嘉兴学院医学院, 嘉兴 314000; 2. 嘉兴市药品检验所, 嘉兴 314001)

摘要 目的:研究健胃灵颗粒的质量控制方法。**方法:**采用硅胶 G 薄层色谱法对健胃灵颗粒中 2 种主要成分黄芪和当归进行定性鉴别;用 RP-HPLC 法对芍药苷进行含量测定,以 Ultimate™ XB-C₁₈(5 μm, 4.6 mm × 250 mm) 为色谱柱, 甲醇-乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液(22:15:63) 为流动相;流速 0.6 mL·min⁻¹;检测波长为 230 nm;进样量为 10 μL。**结果:**芍药苷浓度在 9.64~96.4 μg·mL⁻¹ 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 相关系数 $r=1.000$, 日内、日间精密性 RSD 分别为 1.0% 和 1.8% ($n=3$)。高、中、低 3 个浓度平均加样回收率 ($n=3$) 分别为 101.2%, 100.8%, 101.1%; RSD 分别为 1.3%, 1.0%, 0.58% ($n=3$)。**结论:**方法重复性好, 操作简单, 结果准确可靠。

关键词:健胃灵颗粒;反相高效液相色谱法;薄层色谱法;芍药苷;黄芪;当归

中图分类号:R917 文献标识码:A 文章编号:0254-1793(2007)10-1582-04

Studies on the quality control method of Jianweiling granules*

FU Ying-hua¹, XU Hong-xiang²

(1. College of Medicine, Jiaxing University, Jiaxing 314000, China;

2. Jiaxing Institute for Drug Control, Jiaxing 314001, China)

Abstract Objective: To establish a quality control method for Jianweiling granules. **Methods:** The two main ingredient of Radix Astragali and Radix Angelicae Sinensis were identified by silical gel G thin layer chromatography and the paeoniflorin was determined by RP-HPLC with a Ultimate™ XB-C₁₈(5 μm, 4.6 mm × 250 mm) column. The mobile phase was methanol-acetonitrile-potassium dihydrogen phosphate(22:15:63). The flow rate was 0.6 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 230 nm. **Results:** The calibration curve was linear in the range of 9.64~96.4 μg·mL⁻¹ for paeoniflorin with $r=1.000$. Within-day RSD and between-day RSD were 1.0% and 1.8% ($n=3$). The average recoveries of high, middle and low concentrations of sample were 101.2%, 100.8%, 101.1% with RSD = 1.3%, 1.0%, 0.58% ($n=3$). **Conclusions:** The methods are simple, reproducible, accurate and reliable, which is used for the quality control of the Jianweiling granules.

Key words: Jianweiling granules; RP-HPLC; TLC; paeoniflorin; Radix Astragali; Radix Angelicae Sinensis

健胃灵颗粒是依据健胃灵合剂处方并经新工艺方法提取有效成分研制成的固体颗粒剂。原健胃灵合剂是杭州市红十字会医院中西医结合治疗胃癌癌前病变的首选药物, 该制剂生产并用于临床已有十多年时间, 并经临床验证本品对治疗慢性萎缩性胃炎或异型细胞增生的总有效率达 86% 以上^[1]。其处方由赤芍、白芍、猫人参、当归、白花蛇舌草、黄芪、山慈菇、三七粉等 10 味中药组成。原合剂制备工艺采用水煎煮静止沉淀除杂质后再分装, 规格每瓶 500 mL, 每次服用 50 mL。由于生产工艺不合理, 造

成大量醇溶性有效成分丢失, 且质量标准[(浙)卫制准字(1999)第 0262 号]中无定性、定量方法。为了更好地提高及控制本品的质量, 我们对原制备工艺进行了研究, 针对处方中各味药材所含有效成分的理化性质并结合有关文献资料, 确定对处方中赤芍、白芍、山慈菇、猫人参、白花蛇舌草、黄芪、三七粉 7 味中药进行乙醇提取浓缩制成浸膏, 水蒸气蒸馏法提取当归挥发油并制成 β-环糊精(β-CD)包合物, 其余药材连同醇提取药渣再进行水煎煮提取浓缩制成浸膏, 再配以适量辅料制成颗粒。有关芍药

* 浙江省教育厅立项资助课题(No. 20051853)

第一作者 Tel: (0573) 83643848; E-mail: yaoji6217@sohu.com

苷含量测定方法主要有高效液相色谱法^[2-4]；黄芪、当归的鉴别主要有薄层色谱法^[5]。本文以处方中有效成分之一的芍药苷为定量指标，建立了反相高效液相色谱测定健胃灵颗粒中芍药苷含量的方法；并以黄芪、当归为对照药材，建立了 TLC 法鉴别颗粒剂中黄芪、当归的方法。

1 仪器与试药

美国 Dionex 高效液相色谱仪由 P680 四元低压梯度泵, UVD170U 紫外-可见检测器, ASI-100 自动进样器, Chromeleon 色谱数据工作站组成; Mettler Toledo 电子天平(精度 ±0.01 mg); USC502 型超声波清洗器(上海波龙电子设备有限公司, 工作频率: 56 KHz, 功率 160 W), ZF-2 型三用紫外仪(上海市安定电子仪器厂)。

芍药苷对照品(供含量测定用)、黄芪和当归对照药材均由中国药品生物制品检定所提供, 批号分别为 110736-200321, 974-200106, 927-200512; 各种阴性对照样品(自制); 健胃灵颗粒样品 3 批(自制), 规格为每袋 18 g, 每次服用剂量 2 袋, 批号分别为 060619, 060704, 060706; 薄层层析硅胶 G(浙江雁荡山试剂厂), 甲醇(色谱纯), 磷酸二氢钾、氯仿、乙酸乙酯、乙醇及石油醚均为分析纯, 水为纯化水。

2 黄芪的薄层色谱法鉴别

2.1 供试品溶液和阴性对照溶液的制备 取本品细粉 2.5 g, 加无水乙醇 20 mL, 超声提取 20 min, 滤过, 取滤液置水浴上浓缩至约 5 mL, 作为供试品溶液。另取缺黄芪的阴性对照样品 2.5 g, 同法制成阴性对照溶液。

2.2 对照药材溶液的制备 取黄芪对照药材 1 g, 加无水乙醇 20 mL, 超声提取 20 min, 同法制成对照药材溶液。

2.3 鉴别 照薄层色谱法(中国药典 2005 年版一部附录 VI B)试验, 吸取上述 3 种溶液各 10 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板(自制)上, 以氯仿-甲醇(8.5:0.5)为展开剂, 展开 15 cm, 取出, 晾干, 喷碳酸钠试液, 置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品色谱图中, 在与对照药材色谱相对应的位置上, 呈现 2 个相同颜色的亮蓝色荧光斑点, R_f 分别为 0.50 和 0.35, 阴性样品对照无此斑点。结果见图 1。

3 当归的薄层色谱法鉴别

3.1 供试品溶液和阴性对照溶液的制备 取本品细粉 2.5 g, 加乙醇 20 mL, 水浴加热回流 1.5 h, 放冷, 滤过, 取滤液置水浴上浓缩至约 4 mL, 作为供试

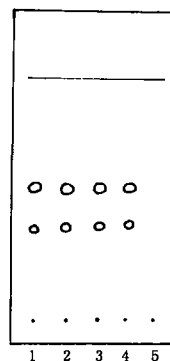


图 1 黄芪的薄层色谱图

Fig 1 TLC chromatogram of Radix Astragali

1. 黄芪对照药材 (Radix Astragali reference medicinal material) 2~4. 3 批健胃灵颗粒样品 (Jianweiling granules samples) 5. 缺黄芪的阴性对照样品 (blank reference without Radix Astragali)

品溶液。另取缺当归的阴性对照样品 2.5 g, 同法制成阴性对照溶液。

3.2 对照药材溶液的制备 取当归对照药材 1 g, 加乙醇 20 mL, 加热回流 1.5 h, 同法制成对照药材溶液。

3.3 鉴别 照薄层色谱法(中国药典 2000 年版一部附录 VI B)试验, 吸取上述 3 种溶液各 10 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板(自制)上, 以石油醚(30~60 °C)-乙醚-醋酸(10:10:0.5)为展开剂, 展开 15 cm, 取出, 晾干, 喷 8% 磷钼酸乙醇溶液, 于 105 °C 烘约 10 min。结果供试品色谱图中, 在与对照药材色谱相对应的位置上, 呈现 3 个相同颜色的蓝黑色斑点, 阴性对照无此斑点。结果见图 2。

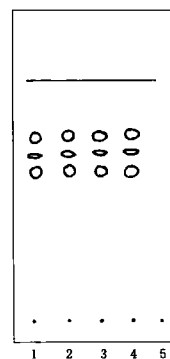


图 2 当归的薄层色谱图

Fig 2 TLC chromatogram of Radix Angelicae Sinensis

1. 当归对照药材 (Radix Angelicae Sinensis reference medicinal material) 2~4. 3 批健胃灵颗粒样品 (Jianweiling granules samples) 5. 缺当归的阴性对照样品 (blank reference without Radix Angelicae Sinensis)

4 芍药苷含量测定

4.1 色谱条件 以 Welch Materials Ultimate™ XB-

C_{18} (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm) 为色谱柱, XB- C_{18} (5 μm , 4.6 mm \times 10 mm) 为保护柱, 甲醇-乙腈-0.05 mol \cdot L $^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液 (22:15:63) 为流动相, 柱温为室温, 流速 0.6 mL \cdot min $^{-1}$, 检测波长为 230 nm, 进样量为 10 μL 。

4.2 提取条件选择

4.2.1 提取溶剂选择 文献报道^[2,3] 多用甲醇水或乙醇水提取芍药苷, 本文采用乙醇水并考察不同乙醇浓度对提取的影响。精密称取样品 5 份, 每份 0.35 g, 置 25 mL 量瓶中, 分别加体积分数 50%, 60%, 70%, 80% 乙醇约 20 mL, 超声处理 30 min, 按“4.9”项下方法进样测定含量, 根据测定结果, 确定用 70% 乙醇作溶剂。

4.2.2 提取时间的选择 精密称取本品 5 份, 每份 0.35 g, 置 25 mL 量瓶中, 各加入 70% 乙醇约 20 mL, 分别超声溶解 5, 10, 15, 30 min, 按“4.9”项下方法进样测定含量, 结果表明, 超声处理 15 min 含量已不再增加, 故确定超声时间为 15 min。

4.2.3 溶剂体积选择 精密称取本品 3 份, 每份 0.35 g, 置 25 mL 量瓶中, 分别加 70% 乙醇 10, 15, 20 mL, 摇匀, 超声溶解 15 min, 按“4.9”项下方法进样测定含量, 根据测定结果, 本法确定加入溶剂体积约 20 mL 为宜。

4.3 专属性试验 取缺赤芍、白芍的双空阴性对照样品约 0.42 g, 按“4.9”项下方法制备双空阴性对照溶液并进样测定, 记录色谱图。结果表明, 供试品溶液中出现与对照品相同保留时间的芍药苷色谱峰, 与相邻杂质峰达到基线分离; 双空阴性对照溶液在芍药苷峰保留时间处无干扰峰出现, 表明阴性对照溶液不干扰测定。结果见图 3。

4.4 线性关系考察 精密称取芍药苷对照品 6.02 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。再分别精密量取 0.4, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL, 分置 10 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇至刻度, 摇匀。再分别精密量取 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以 2 次进样峰面积的平均值 (Y) 对芍药苷对照品浓度 (X) 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程为:

$$Y = 0.4110X - 0.209 \quad r = 1.000$$

结果表明: 芍药苷对照品浓度在 9.64 ~ 96.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积具有良好的线性关系。因此, 在线性范围内可采用外标一点法定量。

4.5 进样精密度和重复性试验 取同一对照品溶液, 重复进样 6 次, 求得芍药苷峰面积的 RSD 为

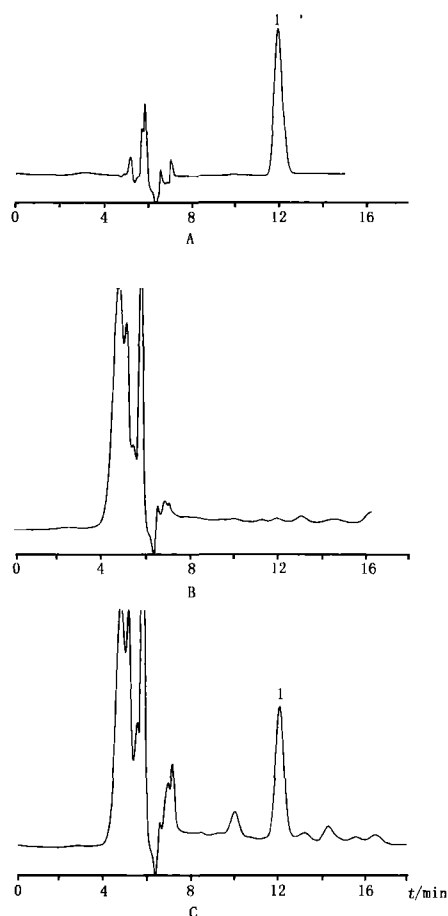


图 3 高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms

A. 芍药苷对照品 (reference substance of paeoniflorin) B. 缺赤芍、白芍的双空阴性对照样品 (the dual blank sample without Radix Paeoniae Rubra and Radix Paeoniae Alba) C. 健胃灵颗粒样品 (Jianweiling granules sample)

1. 芍药苷 (paeoniflorin, 12.5 min)

1.1%。另称取同一批号 (060619) 样品 5 份, 每份约 0.35 g, 分别按“4.9”项下方法制备供试品溶液测定含量, 求得芍药苷含量为 3.343 mg \cdot g $^{-1}$, RSD 为 1.3% ($n=5$)。

4.6 稳定性试验 取同一批号供试品溶液, 在室温放置 2, 8, 24, 48 h 分别按“4.9”项下方法测定含量, 结果表明在 48 h 内供试品溶液稳定。

4.7 日内和日间精密密度 取同一份对照品溶液, 在日内每隔 3 h 取样测定 1 次, 连续 3 次, 求得峰面积的 RSD 为 1.0% ($n=3$); 另取同一批号样品, 按“4.9”项下方法测定含量, 连续测定 3 d, 求得含量的 RSD 为 1.8% ($n=3$)。

4.8 加样回收率考察 精密称取已知含量健胃灵颗粒 (批号 060619, 含芍药苷量为 3.343 mg \cdot g $^{-1}$) 约 0.18 g, 置 25 mL 量瓶中, 共 9 份, 平分 3 组, 分

别精密加入对照品溶液(含芍药苷 $0.301 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3, 2, 1 mL, 各加入 70% 乙醇至 20 mL, 超声溶解 15 min, 按“4.9”项下方法进样测定含量, 计算回收率。高、中、低 3 个浓度平均加样回收率分别为 101.2%, 100.8%, 101.1%; RSD 分别为 1.3%, 1.0%, 0.58% ($n=3$)。

4.9 样品测定 取健胃灵颗粒各约 10 g, 研细, 再精密称取细粉约 0.35 g, 置 25 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇 20 mL, 超声提取 15 min, 放冷, 加 70% 乙醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。另取经五氧化二磷减压干燥至恒重的芍药苷对照品用 70% 乙醇配成浓度约为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 分别进样 10 μL , 按上述色谱条件测定, 记录色谱图, 按外标峰面积法计算芍药苷含量, 结果见表 1。

表 1 健胃灵颗粒样品含量测定结果 ($n=5$)

Tab 1 Determination of paeoniflorin in Jianweiling granules samples

批号 (Lot No.)	含量 (content)/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD /%
060619	3.343	1.3
060704	3.522	1.0
040706	3.426	1.0

5 讨论

5.1 参考文献[5],建立了健胃灵颗粒中黄芪、当归 2 味中药的薄层色谱鉴别方法, 对 3 批健胃灵颗粒的检测结果表明, 所建立的薄层色谱法具有简便、专属性好、阴性对照样品无干扰的优点。应用本法对原健胃灵合剂进行检验, 发现与颗粒浓度(折合成生药量)相当的合剂未检出与黄芪对照药材相同的斑点, 表明合剂制备工艺提取水溶性成分, 未将黄芪中的醇溶性有效成分提取。经试验, 采用氯仿-甲醇(8.5:0.5)作展开剂比正丁醇-冰醋酸-水(4:4:1)对黄芪的展开效果更好, 前者展开快, 斑点集中; 后者斑点拖尾严重, 时间长。采用无水乙醇作溶剂, 可增加黄芪中醇溶性成分的溶解度, 减少一些水溶性大的杂质干扰。当归的提取采用乙醇加热回流, 经考察回流提取 1.5 h 较适宜, 并以石油醚(30~60 $^{\circ}\text{C}$) - 乙醚 - 醋酸(10:10:0.5)为展开剂展开效果理想, 所显斑点集中、灵敏度高。

5.2 参考文献[4],建立了反相高效液相色谱法测

定健胃灵颗粒中芍药苷含量的方法, 用水煎煮法和乙醇分别提取制备的样品, 在反相色谱柱上可得到不同的色谱图, 主要原因是水煎煮提取水溶性成分, 用甲醇-0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液(37:63)为流动相能较好分离。70% 乙醇主要提取醇溶性成分, 经试验在上述流动相中须加入一定量的乙腈代替甲醇, 增加洗脱能力, 经过适当调整流动相各组分比例, 提高颗粒剂样品中各组分峰的理论板数, 使芍药苷与相关组分峰达到基线分离。本文针对用水煎煮和乙醇提取工艺制备的健胃灵颗粒样品, 建立的色谱条件能较好地分离样品中芍药苷与相关组分峰, 见图 3。

5.3 3 批健胃灵颗粒芍药苷含量在 3.343 ~ 3.522 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间, 平均含量为 3.430 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 原合剂中芍药苷平均含量^[4]为 1.9 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按每 1 g 或每 1 mL 折合成相同的药材计算, 用新工艺制备的健胃灵颗粒中芍药苷含量提高了 37%。考虑到中药产地不同带来赤芍、白芍中芍药苷含量的变化, 暂定健胃灵颗粒中芍药苷含量限度应不低于 2.7 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

参考文献

- 1 WU Dian(吴滇), YE Cheng-zhuo(叶诚焯), CHAI Ke-fu(柴可夫), et al. The clinical study of gastric mucosal precancerous treated by Jianweiling mistura(健胃灵合剂防治胃癌癌前病变的临床研究). *Chin J Integr Tradit West Med Gastropleen*(中国中西医结合脾胃杂志), 1997, 5(1): 20
- 2 ChP(中国药典). 2005. Vol I (一部): 68, 109
- 3 LI Wen-li(李文莉), JIANG Li(蒋丽), LEI Yu-ping(雷玉萍), et al. Determination of paeoniflorin in Jianweiyuyang granules by RP-HPLC (RP-HPLC 测定健胃愈疡颗粒中芍药苷的含量). *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2001, 23(7): 484
- 4 FU Ying-hua(傅应华), DU Jing(杜静). RP-HPLC determination of paeoniflorin in Jianweiling oral solution(反相高效液相色谱法测定健胃灵口服液中药芍药苷的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2006, 26(11): 1671
- 5 LÜ Wu-qing(吕武清), LONG Xin-hua(龙新华). *Medicine Material Thin Layer Chromatographic Identification of Chinese Traditional Patent Medicine*(中成药中的药材薄层色谱鉴别). Beijing(北京): People's Medical Publishing House(人民卫生出版社), 1997. 225, 473

(本文于 2007 年 1 月 15 日收到)