

# 牦犀胶颗粒的质量标准<sup>①</sup>

姜建锋<sup>a,b</sup> 魏立新<sup>a</sup> 杜玉枝<sup>②a</sup> 肖远灿<sup>a</sup> 朱洪梅<sup>a,b</sup> 杨红霞<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>(中国科学院西北高原生物研究所 西宁市西关大街 59 号 810001)

<sup>b</sup>(中国科学院研究生院 北京市 100039)

**摘要** 建立牦犀胶颗粒的质量标准。利用薄层色谱法及 HPLC 分别对牦犀胶颗粒中的黄芪、熟地进行定性鉴别。运用 HPLC 测定阿魏酸的含量。采用 C<sub>18</sub>柱,流动相为甲醇-0.1%冰乙酸(30:70,V/V),检测波长为 321nm。结果表明,黄芪薄层色谱分离度较好,熟地 HPLC 淬醇色谱峰空白无干扰,阿魏酸的线性范围为 0.15—1.5 $\mu$ g( $r=0.9998, n=7$ ),平均回收率为 102.20%。所建立的定性、定量方法简单、准确、专属性强、重现性良好,可有效控制牦犀胶颗粒的质量。

**关键词** 牦犀胶颗粒;质量标准;阿魏酸;淬醇;高效液相色谱法

中图分类号:O657.7<sup>+2</sup>

文献标识码:A

文章编号:1004-8138(2013)02-0623-06

## 1 引言

牦犀胶颗粒是以牦牛皮胶粉为原料,辅以黄芪、大枣、熟地、当归等 6 种药材经特定工艺加工制成,具有气血双补、抗疲劳和增强免疫力的功能,主要用于补血,改善营养性贫血<sup>[1]</sup>。为使牦犀胶颗粒质量可控,保证其安全、有效,现采用薄层色谱法及 HPLC 分别定性鉴别所含黄芪、熟地;并对处方中当归的阿魏酸,利用 HPLC 进行含量测定研究,建立牦犀胶颗粒的质量标准。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);WFH-203B 型三用紫外分析仪(上海精科实业有限公司);KQ-250DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AL104 型万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);硅胶 G(青岛海洋化工有限公司)。

黄芪甲苷对照品(纯度 99%以上,批号:0781-200312)、阿魏酸对照品(纯度 99%以上,批号:0773-9910)、淬醇对照品(纯度 99%以上,批号:110808-200306)均购自中国药品生物制品检定所;甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司)。实验用水为三蒸去离子水。

### 2.2 鉴别

#### 2.2.1 黄芪的薄层鉴别<sup>[2-6]</sup>

将黄芪粉碎过 100 目,准确称取 5.0g,加 30mL 甲醇进行加热回流 30min,冷却后过滤,所得滤

① 牦犀胶关键技术开发研究(2009GJG20044)

② 联系人,手机:(0)13524796467;电话:(0971)6132480;E-mail:jif1025668@126.com;yzdu@nwipb.ac.cn

作者简介:姜建锋(1986—),男,江西省上饶县人,在读硕士,主要从事藏药药理学研究工作。

收稿日期:2012-05-10;接受日期:2012-07-22

液水浴蒸干。加入三蒸水 20mL 将蒸干后残留物溶解,转移至分液漏斗中用水饱和的正丁醇萃取两次,每次 20mL。合并两次萃取正丁醇部分,加入 20mL 体积分数 40%的氨液,保留正丁醇部分,重复两次。之后对正丁醇部分进行水洗两次,每次加入 20mL 水。将水洗后的正丁醇部分水浴蒸干,向残留物加入 0.5mL 甲醇配制成供试溶液。用甲醇将黄芪甲苷对照品配制成  $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品溶液。取未添加黄芪的阴性样品,按照供试溶液的制备方法制备阴性对照溶液。参照薄层色谱法(中国药典 2010 年版一部附录 VB)实验,分别吸取上述 3 种溶液各 5 $\mu\text{L}$ ,在同一硅胶 G 薄层板上点样,以三氯甲烷—甲醇—水(13:7:2,V/V/V)溶液 10℃以下放置 12h 的下层溶液为展开剂,展开结束后自然晾干,用 10%硫酸乙醇溶液对硅胶板进行均匀喷洒,105℃下加热至显现清晰斑点。结果在对照品色谱的相应位置上供试品色谱具有相同颜色的斑点,阴性对照色谱无此斑点。

### 2.2.2 熟地的 HPLC 鉴别

取本品粉末(过 4 号筛)1.0g,准确称定,加 50%甲醇 30mL,冷浸过夜,加热回流 1.5h,放冷,过滤,滤液蒸干,残渣加水 2mL 使溶解,放冷,通过 DA-201 型大孔吸附树脂(内径 1.5cm,长 15cm),以水 80mL 洗脱,弃去水液,再用 30%甲醇 80mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,用 70%乙腈溶解并转移至 5mL 容量瓶中,加 70%乙腈至刻度,摇匀,过滤,即得供试品溶液。准确称取对照品梓醇适量,加 70%乙腈制成每毫升含 0.5mg 的混合溶液,即为对照品溶液。准确称取未添加熟地的阴性样品粉末 0.5g,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。色谱条件为色谱柱:Inertsil NH<sub>2</sub>(250mm×4.6mm,5 $\mu\text{m}$ ,日本岛津公司);流动相:乙腈-水(75:25,V/V);流速:1mL·min<sup>-1</sup>。检测波长:203nm。以外标法计算含量,理论板数按梓醇峰计算,不低于 3000,色谱峰与相邻色谱峰的分度符合度符合要求。准确吸取 3 个批次的对照品、供试品、阴性对照品溶液各 10 $\mu\text{L}$ ,注入高效液相色谱仪,检测记录色谱图。结果表明,3 批供试品色谱中均有 1 个色谱峰与对照品溶液色谱图中的主色谱峰保留时间一致,而阴性对照品溶液的色谱图中没有这个色谱峰出现。图 1 为同一批次对照品、供试品、阴性对照溶液的色谱图。

## 2.3 阿魏酸含量的测定<sup>[5,7-11]</sup>

### 2.3.1 色谱条件和测定方法

色谱柱:Agilent C<sub>18</sub>(250mm×4.6mm,5 $\mu\text{m}$ ,美国安捷伦公司);流动相:甲醇-0.1%冰乙酸(30:70,V/V);流速:1.0mL/min;柱温:30℃;检测波长:321nm;进样量:10 $\mu\text{L}$ 。理论板数按阿魏酸峰计算,应不低于 5000。

### 2.3.2 对照品溶液的制备

准确称取阿魏酸对照品适量,加 70%甲醇制成每毫升含阿魏酸 0.05mg 的溶液,作为对照品溶液。

### 2.3.3 供试品溶液的制备

用分析天平准确称取牦犀胶颗粒样品 5g,置具塞锥形瓶中,准确加入 70%甲醇 20mL,密塞,称定重量,加热回流 30min,放冷,再称定重量,用 70%甲醇补足减失的重量,摇匀,静置,取上清液过滤,取续滤液,即得。

### 2.3.4 阴性对照溶液的制备

按处方取除去当归的阴性样品,按照样品牦犀胶颗粒制备工艺制备阴性样品,根据 2.3.3 项的制备方法制备阴性对照溶液。

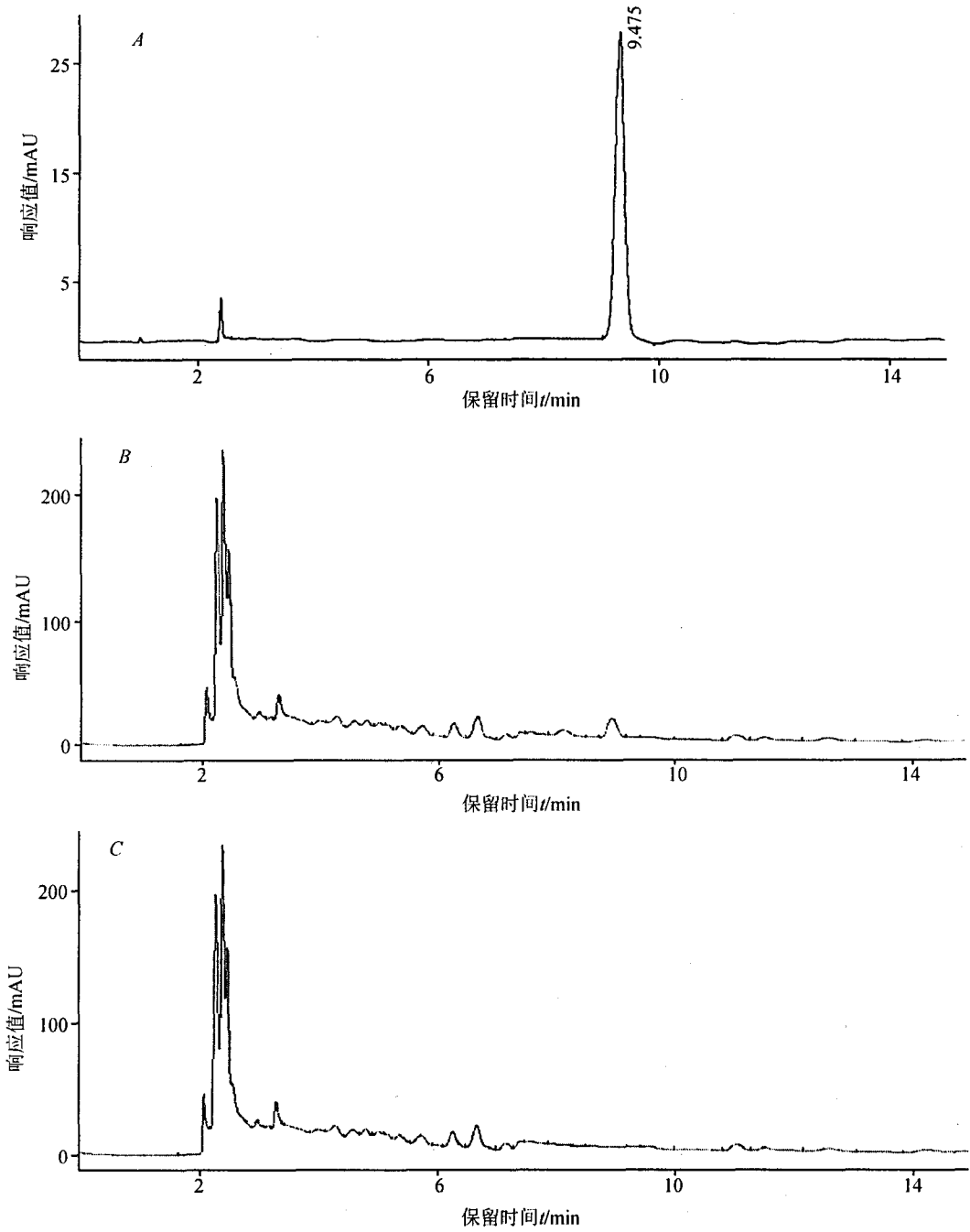


图 1 高效液相色谱图

A—对照品; B—供试品; C—缺熟地阴性样品。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 方法学验证

##### 3.1.1 系统适用性试验

取上述对照品、供试品及阴性对照品溶液,按照 2.3.1 项下的色谱条件使用高效液相色谱仪进

行测定,记录色谱图,见图 2。从图中可以看出待测峰与其他峰分离度良好,在阴性对照品中阿魏酸保留时间 17.7min 相同的位置无吸收峰。说明阴性无干扰。

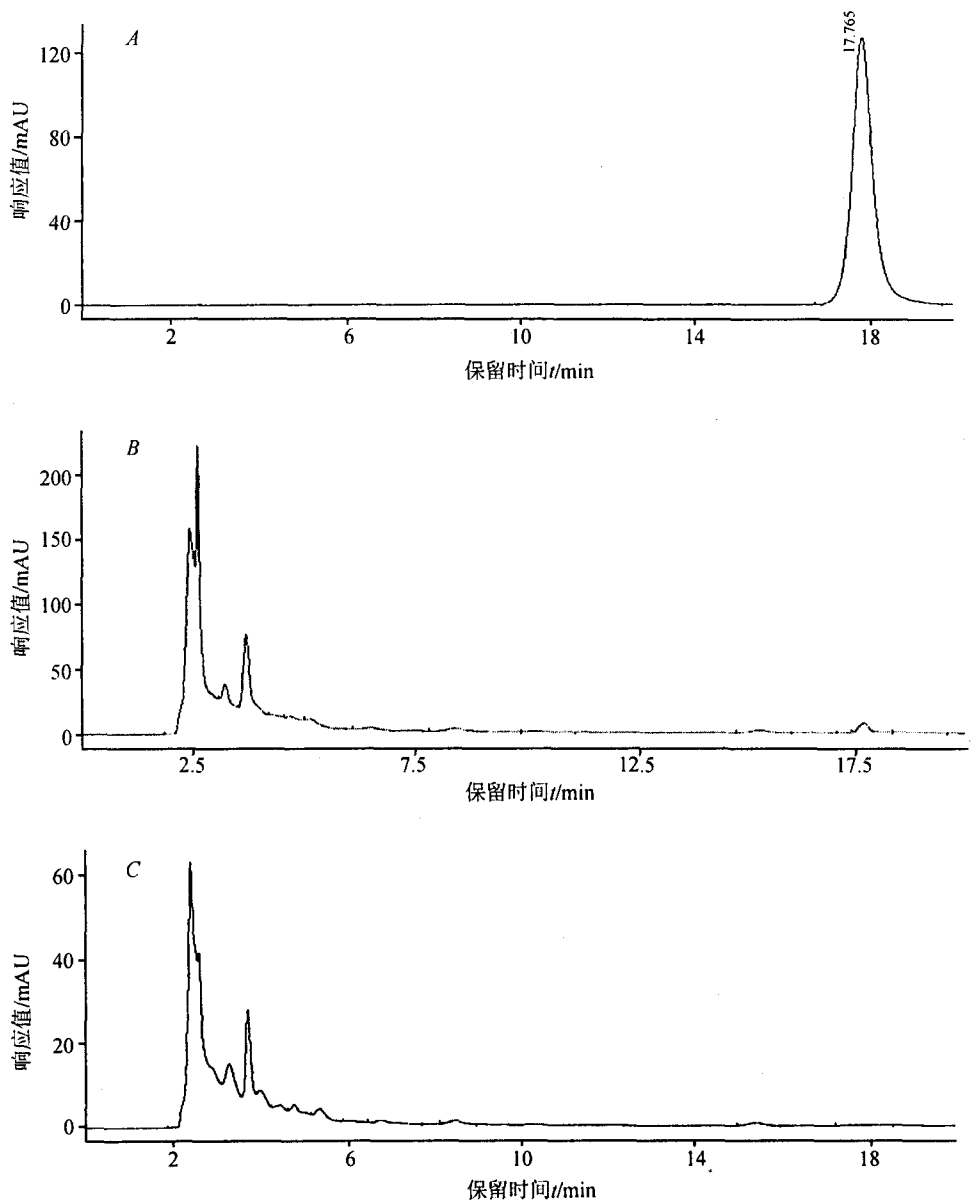


图 2 高效液相色谱图 A—对照品;B—供试品;C—缺当归阴性样品。

### 3.1.2 线性关系考察

准确吸取对照品溶液,分别进样 1、2、5、10、15、20、25 $\mu$ L 进行测定,记录峰面积。以阿魏酸的进样量为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制校准曲线,得回归方程为: $y = 2839.4x + 35.929$ ,  $r = 0.9998$  ( $n = 7$ ),结果表明阿魏酸进样量在 0.15—1.5 $\mu$ g 范围内线性关系良好,检出限为 0.06 $\mu$ g,测定次数为 11 次。

### 3.1.3 精密度实验

准确吸取同一供试品溶液,连续进样 6 次(每次 10 $\mu$ L),按上述色谱条件测定峰面积。结果峰面

积的 RSD 为 1.03% ( $n=6$ ), 表明仪器精密度良好。

### 3.1.4 稳定性实验

准确吸取同一供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、10、12h 依次进样测定, 阿魏酸峰面积的 RSD 为 0.45% ( $n=6$ ), 表明供试品溶液在 12h 内稳定。

### 3.1.5 重复性实验

取同一批牦犀胶颗粒样品(实验室自制, 批号为 2010101), 按供试品溶液的制备方法平行制备 6 份供试品溶液, 并测定, 结果测得阿魏酸的平均含量为 4.40mg/100g, RSD 值为 1.79% ( $n=6$ )。

## 3.2 加标回收实验

准确量取已知含量的样品 0.84g(含阿魏酸 0.044mg/g), 共 6 份, 用 70% 甲醇超声溶解, 分别配制 15mL, 各加入对照品溶液 85、152、219 $\mu$ L, 每个体积的对照品 2 份。加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 按 2.3.1 色谱条件测定, 计算回收率。结果阿魏酸的平均回收率为 102.20%, RSD 值为 3.41% ( $n=6$ )。如表 1。

表 1 加标回收率实验结果 ( $n=6$ )

	取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均 (%)	RSD (%)
1	0.8403	0.0370	0.0255	0.0637	104.71	102.20	3.41
2	0.8411	0.0370	0.0255	0.0645	102.80		
3	0.8409	0.0370	0.0456	0.0831	101.10		
4	0.8416	0.0370	0.0456	0.0822	99.12		
5	0.8412	0.0370	0.0657	0.1019	98.78		
6	0.8407	0.0370	0.0657	0.1038	101.67		

## 3.3 样品测定

取牦犀胶颗粒样品共 3 批(实验室自制, 批号为 2010081、2010091、2010101), 按供试品溶液制备方法制备样品, 在 2.3.1 节色谱条件下进行测定, 测得阿魏酸含量如表 2。

表 2 犀胶颗粒样品测定结果 ( $n=2$ )

批号	阿魏酸含量(mg/g)		平均含量 (mg/g)
	1	2	
2010081	0.043	0.045	0.044
2010091	0.040	0.042	0.041
2010101	0.042	0.047	0.045

通过对 3 批样品中阿魏酸含量的测定可知, 牦犀胶中阿魏酸在不同批次样品中含量稳定, 均保持在 0.041—0.045mg/g 之间, 可作为建立牦犀胶颗粒质量标准控制指标。

## 4 结论

黄芪在各版《中国药典》均有收载, 含有黄芪的中成药标准也很多, 关于黄芪定性鉴别方法的文献报道主要有薄层色谱鉴别和 HPLC 鉴别<sup>[12-14]</sup>。经过比较分析, 本文选择了黄芪甲苷为对照品的薄层色谱定性鉴别方法, 经过多次尝试找到了本品的最佳鉴别条件, 实验结果表明斑点间有较好的分离度, 斑点清晰, 专属性强。

熟地作为一种常用药材, 其定性鉴别方法在《中国药典》及相关文献报道中主要是薄层色谱法, 未见熟地的 HPLC 鉴别方法。参考熟地中梓醇的 HPLC 测定方法<sup>[15]</sup>, 经过对参数的摸索, 得到适合对本品中熟地定性鉴别的 HPLC 方法。实验表明, 该方法分离度好, 灵敏度高, 阴性无干扰, 可作为熟地的鉴别。

含量测定指标中,当归具有补血益气功效,用于气血两虚,是牦犀胶颗粒中不可或缺的成分。在本研究中以当归中阿魏酸作为含量测定的对照品,在参考 2010 版《中国药典》及相关文献基础上,经过反复实验,得到测定本品中阿魏酸含量各参数。结果样品中的阿魏酸得到很好的分离,含量测定方法稳定性高,阴性无干扰,该方法可用于牦犀胶颗粒的质量控制。

## 参考文献

- [1] 宁春兰,陈来同. 牦犀胶改善缺铁性贫血的研究[J]. 中国生化药物杂志,2006,27(2):107—109.
- [2] 吴宗耀,任非,张兰桐等. 增强力颗粒薄层色谱鉴别方法分析[J]. 中医学报,2011,26(152):62—64.
- [3] 申欣,查妮妮. 复方黄芪颗粒中 4 味药材的薄层色谱鉴别[J]. 药物鉴定,2007,16(20):41—42.
- [4] 刘同祥,王勇. 玉泉胶囊质量标准研究[J]. 中国药房,2010,21(30):2937—2939.
- [5] 欧国灯,杨立伟,蒋志军等. 补血当归调经合剂质量标准研究[J]. 中成药,2008,30(8):附 1—2.
- [6] 徐长根,郝武常,李涛. 利肝隆片质量标准研究[J]. 中成药,2006,28(3):357—360.
- [7] 高展,孙玉侠,阙红玉. 养血清脑颗粒质量标准研究[J]. 广东药学院学报,2011,27(5):483—488.
- [8] 蔡俊安. 当归养血丸中阿魏酸的 HPLC 测定[J]. 中国中医药信息杂志,2011,18(4):47—48.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2010 版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010. 124—125.
- [10] 孔铭,朱玲英,王佩娟等. HPLC 测定补肾活血颗粒中芍药苷、阿魏酸、淫羊藿苷的含量[J]. 中成药,2010,32(4):600—603.
- [11] 刘秋琼,刘伟祥,李苗盛. 高效液相色谱法测定中药饮片混煎剂中阿魏酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,1999,5(4):15—16.
- [12] 朱平,陈庆,杨广文. 河车补益胶囊质量标准研究[J]. 中国药物与临床,2011,11(9):1099—1101.
- [13] 申欣,查妮妮. 复方黄芪颗粒中 4 味药材的薄层色谱鉴别[J]. 药物鉴定,2007,16(20):41—42.
- [14] 范晓庆. 祛风通络胶囊中黄芪、炮山甲的薄层色谱鉴别[J]. 齐鲁药事,2008,27(3):158—159.
- [15] 邱建国,贾正平,张汝学等. 生地与熟地中糖类和梓醇的比较研究[J]. 中草药,2010,41(7):1117—1119.

## Quality Standard of Maoxijiao Granules

JIANG Jian-Feng<sup>a,b</sup> WEI Li-Xin<sup>a</sup> DU Yu-Zhi<sup>a</sup> XIAO Yuan-Can<sup>a</sup>  
ZHU Hong-Mei<sup>a,b</sup> YANG Hong-Xia<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>(Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, P. R. China)

<sup>b</sup>(Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, P. R. China)

**Abstract** To establish the quality standard for Maoxijiao granules, TLC and HPLC were used respectively to identify Astragali Radix and Radix Rehmanniae Praeparata in them. HPLC was also used to determine ferulic acid on a column of C<sub>18</sub> with the mobile phase of methanol-0.1% acetic acid (30:70), the detection wavelength was 321nm. The results showed that Astragali Radix could be identified by TLC with high specificity. The peak of catalpol chromatography of Radix Rehmanniae Praeparata was clear without the interference of the blank control. The linear range of ferulic acid was 0.15—1.5 μg ( $r=0.9998$ ,  $n=7$ ), and the average recovery was 100.9%. The established qualitative and quantitative methods are simple, accurate and exclusive with good reproducibility, which can be used to control the quality of Maoxijiao granules effectively.

**Key words** Maoxijiao Granule; Quality Standard; Ferulic Acid; Catalpol; HPLC