

## 膝悦颗粒的定性定量方法

杜志谦<sup>1\*</sup>, 夏华玲<sup>1</sup>, 袁秀荣<sup>2</sup>, 冯怡<sup>2</sup>

(1. 河南省正骨研究院, 河南 洛阳 471000; 2. 上海中医药大学, 上海 201203)

[摘要] 目的: 建立膝悦颗粒的定性定量方法。方法: 采用薄层色谱(TLC)法对膝悦颗粒中的姜黄、当归、柴胡、续断进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法(HPLC)测定黄芪甲苷的含量。结果: TLC鉴别分离度好, 专属性强; 含量测定项中黄芪甲苷在 0.53 ~13.28  $\mu\text{g}$  间呈线性关系, 平均回收率为 99.12%, RSD 为 0.78%。结论: 所建立的方法简便, 准确、精密度高、重复性好, 可作为膝悦颗粒的质量控制方法。

[关键词] 膝悦颗粒; 姜黄; 当归; 柴胡; 续断; 黄芪甲苷; 高效液相色谱法

[中图分类号] R 284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-0058-03

## Qualitative and Quantitative Methods for Xiyue Granule

DU Zhi-qian<sup>1\*</sup>, XIA Hua-ling<sup>1</sup>, YUAN Xiu-rong<sup>2</sup>, FENG Yi<sup>2</sup>

(1. Institute of Orthopedics and Traumatology of Henan Province, Luoyang 471000, China;

2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the qualitative and quantitative methods for Xiyue Granule. **Method:** Rhizoma Curcumae Longae, Radix Angelicae Sinensis, Radix Bupleuri and Radix Dipsaci in Xiyue Granule were identified by TLC. Astragaloside was determined by HPLC. **Result:** The characteristic identification by TLC was distinct and specific; Astragaloside was linear in the range of 0.53 ~13.28  $\mu\text{g}$ , and the average recovery was 99.1% (RSD 0.78%). **Conclusion:** The method can be used for the quality control of Xiyue Granule.

[Key words] Xiyue Granule; Rhizoma Curcumae Longae; Radix Angelicae Sinensis; Radix Bupleuri; Radix Dipsaci; astragaloside; HPLC

膝悦颗粒是由黄芪、当归、柴胡、续断、牡丹皮等 11 味中药组成的复方制剂, 具有益气活血, 通利关节, 化湿消肿之功效, 用于治疗膝关节滑膜炎所致的膝关节肿胀、疼痛、功能受限等症。为了有效控制产品质量, 该文采用薄层色谱法对姜黄、当归、柴胡、续断进行了定性鉴别, 用高效液相色谱法对黄芪中黄芪甲苷进行了含量测定。

### 1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪; VDW 检测器; HP 工作站; 色谱柱 Kromasil ODS(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )。硅胶 G 高效薄层板(烟台市化学研究所); 姜

黄素对照品(0823-9802), 当归对照药材(120927-200312), 柴胡对照药材(0992-0301), 续断对照药材(121033-200405), 川续断皂苷 VI 对照品(111685-200401), 黄芪甲苷对照品(110781-200412)(均购自中国药品生物制品检定所); 膝悦颗粒(批号为 060526, 060527, 060528)。所用试剂除乙腈为色谱纯外, 其余均为分析纯; 娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

### 2 薄层鉴别

**2.1 姜黄** 取本品 5 g, 研细, 加无水乙醇 20 mL, 摇匀, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加无水乙醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取不含姜黄的阴性制剂 5 g, 同法制备姜黄阴性对照溶液。再取姜黄素对照品, 加无水乙醇制成每 1 mL 含 10  $\mu\text{g}$  的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》

[收稿日期] 20100112(003)

[第一作者] 杜志谦, 研究员, 主要从事中药新药研究; Tel: (0379) 63546889

2005 年版一部附录 VIB) 试验, 吸取上述溶液各 5  $\mu\text{L}$ , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-甲酸(96 4 0.7) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰。

**2.2 当归** 取本品 10 g, 研细, 加水 50 mL, 微热使溶解, 用乙醚振摇提取 3 次, 每次 20 mL, 合并乙醚液(水液备用), 蒸干, 残渣加甲醇 0.5 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取不含当归的阴性制剂 10 g, 同法制成阴性对照溶液。再取当归对照药材 0.2 g, 加乙醚 20 mL, 超声处理 15 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 2 mL 使溶解, 作为对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 VIB) 试验, 吸取上述溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以环己烷-乙酸乙酯(4 1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 紫外光灯(365 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显 2 个相同的亮蓝色斑点, 阴性对照无干扰, 见图 1。

**2.3 柴胡** 取鉴别“2.2”项下的水液, 用水饱和的正丁醇萃取 3 次, 每次 20 mL, 合并正丁醇层, 用氨试液 60 mL 洗涤, 取正丁醇液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。同法制得柴胡阴性对照溶液。另取柴胡对照药材 0.5 g, 加甲醇 20 mL, 超声处理 10 min, 滤过, 滤液浓缩至约 2 mL, 作为对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 VIB) 试验, 吸取上述溶液各 1  $\mu\text{L}$ , 分别点于同一聚酰胺薄层板(需预先活化) 上, 以乙酸乙酯-水-乙醇(8 1 2) 为展开剂, 正向展开 2 次, 取出, 晾干, 喷以 2% 对二甲氨基苯甲醛的 40% 硫酸溶液, 在 60  $^{\circ}\text{C}$  加热至斑点显色清晰, 置紫外光灯(365 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同的橘红色斑点, 阴性对照无干扰。

**2.4 续断** 取本品 10 g, 研细, 加乙醚 20 mL, 超声处理 20 min, 滤过, 残渣再加乙醚 20 mL, 超声 20 min, 滤过, 残渣加甲醇 30 mL, 超声 1 h, 滤过, 滤液挥干, 残渣加水 40 mL 微热使溶解, 用水饱和的正丁醇萃取 3 次, 每次 20 mL, 合并正丁醇层, 再用正丁醇饱和的水洗涤 3 次, 每次 20 mL, 回收正丁醇液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。同法制得续断阴性对照溶液。取续断对照药材粉末 0.2 g, 加甲醇 15 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸

干, 残渣加甲醇 2 mL 使溶解, 作为对照药材溶液。取川续断皂苷 VI 对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 VIB) 试验, 吸取上述溶液各 2  $\mu\text{L}$ , 分别点于同一聚酰胺薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-水(13 7 2) 的下层溶液为展开剂, 正向展开 2 次, 取出, 晾干, 喷以 10% 的硫酸乙醇溶液, 加热至斑点显色清晰。日光下观察, 供试品色谱中, 在与对照药材、对照品色谱相应的位置上, 显相同的紫红色斑点, 空气中放置后变为深蓝色, 阴性对照无干扰。

### 3 含量测定

**3.1 对照品溶液的制备** 精密称取在 60  $^{\circ}\text{C}$  真空干燥 4 h 的黄芪甲苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含黄芪甲苷 0.2 mg 的溶液作为对照品溶液, 即得。

**3.2 供试品溶液的制备** 取本品 4 g, 精密称定, 加水 10 mL, 微热溶解, 转移至分液漏斗中, 水饱和正丁醇 40 mL, 萃取 4 次, 合并正丁醇层, 再取氨试液 40 mL, 反萃 2 次, 弃去氨水层。减压浓缩回收正丁醇至干, 残渣用甲醇溶解定容于 10 mL, 摇匀, 即得。

**3.3 色谱条件** 色谱柱十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 流动相乙腈-水(35 65); 流速 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$ ; 柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ; ELSD 检测器; 雾化器温度 80  $^{\circ}\text{C}$ ; 蒸发器温度 100  $^{\circ}\text{C}$ ; 载气流速 1.5 mL $\cdot$ min $^{-1}$ 。色谱柱的理论塔板数以黄芪甲苷峰计不低于 4 000。

**3.4 专属性试验** 取缺黄芪的阴性制剂 5 g, 照供试品溶液的制备方法制得阴性对照溶液。精密吸取上述空白对照溶液、供试品溶液以及对照品溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 按上述色谱条件进行测定, 结果阴性对照在黄芪甲苷保留时间内无干扰峰出现, 证明本品中其他药材对黄芪甲苷的测定无干扰, 见图 1。

**3.5 线性关系考察** 取黄芪甲苷对照品 13 mg, 精密称定, 置 10 mL 的棕色量瓶中, 加甲醇溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 作为浓度 1。分别精密吸取浓度 1 溶液 2.0, 1.0, 0.5 mL 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为浓度 2, 3, 4。精密吸取浓度 2 溶液 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为浓度 5。分别精密吸取浓度 1, 2, 3, 4, 5 溶液各 10  $\mu\text{L}$  进样, 按选定的色谱条件测定。以进样的黄芪甲苷浓度的对数为横坐标, 以峰面积的对数为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程  $Y=1.8491X-2.367$ ,  $r=0.9996$ 。黄芪甲苷进样量在 0.53 ~13.28  $\mu\text{g}$  间线性关系良好。

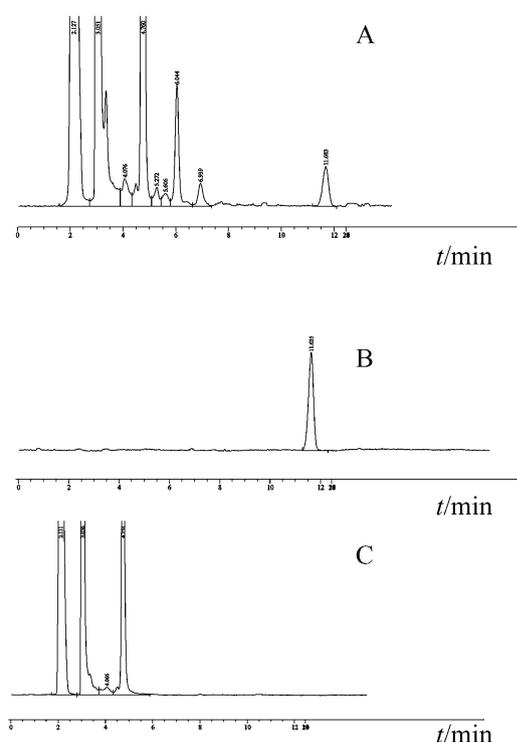


图 1 膝悦颗粒 HPLC 图谱

A. 膝悦颗粒; B. 黄芪甲苷对照品; C. 黄芪阴性

**3.6 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 分别于配制后 0, 1, 2, 4, 8 h, 精密吸取 10  $\mu\text{L}$ , 依法测定。结果黄芪甲苷峰面积 RSD 为 1.27%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

**3.7 精密度试验** 精密吸取同一对照品溶液样品 10  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 连续进样 5 次, 按上述色谱条件测定峰面积, 其 RSD 为 0.98%, 结果表明仪器精密度良好。

**3.8 重复性试验** 取同一批号样品 5 份, 按供试品溶液的制备方法制备, 分别精密吸取各供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 按上述色谱条件测定峰面积。结果黄芪甲苷峰面积 RSD 为 1.42%, 表明本方法重现性良好。

**3.9 加样回收率试验** 称取已知含量的同一批号的样品 2 g 精密称定, 共 6 份, 分别加入每 1 mL 含 0.609 mg 黄芪甲苷对照品的溶液 2.0, 2.0, 3.0, 3.0, 4.0, 4.0 mL, 按供试品溶液的制备方法制备, 分别精密吸取 10  $\mu\text{L}$ , 按上述色谱条件测定, 用外标法计算。结果见表 1。

**3.10 样品测定** 3 批样品按上述供试品溶液方法制备, 分别精密吸取黄芪甲苷对照品溶液与供试品溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 测定, 按外标法计

表 1 膝悦颗粒中黄芪甲苷加样回收率试验

称样量 /g	样品含量 /mg	加入对照品量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1.976 7	1.838 3	1.218 0	3.052 6	99.75	99.12	0.78
2.058 7	1.914 6	1.218 0	3.111 9	98.28		
1.963 4	1.826 0	1.827 0	3.654 9	100.11		
2.062 3	1.917 9	1.827 0	3.724 8	98.91		
1.972 9	1.834 8	2.436 0	4.227 0	98.19		
1.984 5	1.845 6	2.436 0	4.269 4	99.47		

算。结果 3 批膝悦颗粒中黄芪甲苷的质量分数依次为 0.94, 0.91, 0.93  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

#### 4 讨论

黄芪为方中君药, 故选择对黄芪甲苷进行含量测定。黄芪甲苷属于皂苷类成分, 紫外吸收为 205 nm 左右的末端吸收, 因末端吸收干扰大, 重现性差, 故选择蒸发光散射检测器。本试验还对流动相、柱温、流速、蒸发器、雾化器温度进行了优化选择, 结果发现以乙腈 - 水 (35 : 65) 为流动相, 柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ , 流速 1.0  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 雾化器温度 80  $^{\circ}\text{C}$ , 蒸发器温度 100  $^{\circ}\text{C}$ , 此时黄芪甲苷可达到较好分离, 且峰形好, 理论塔板数较大。另外, 通过对正丁醇、氨水的萃取用量及萃取次数研究后发现, 用正丁醇 (每次 40 mL) 萃取 4 次、氨水 (每次 40 mL) 反萃 2 次时, 黄芪甲苷峰面积积分值较大。

本法操作简便, 灵敏度高, 重现性好, 专属性强, 可作为膝悦颗粒的质量控制标准。

#### [参考文献]

- [1] 徐希科, 李慧梁, 柳润辉, 等. HPLC-ELSD 法测定黄芪药材中黄芪甲苷[J]. 中草药, 2005, 36(11): 1720.
- [2] 刘欢莲, 张中苏, 张娟丽, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定不同产地黄芪蜜黄芪的含量[J]. 山西医药杂志, 2006, 35(5): 461.

[责任编辑 顾雪竹]