

乌鳖颗粒定性定量方法研究^{*}

刘志辉, 陈武, 贾媛

(江苏省中医院, 南京 210036)

摘要 目的: 建立乌鳖颗粒的定性定量方法。**方法:** 采用薄层色谱法对方剂中的制何首乌、白术、续断和枸杞子进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法测定制剂中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷和川续断皂苷 VI 含量。HPLC 色谱条件: 采用 Heder ODS-3 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 212 nm, 柱温 30 °C; **结果:** 薄层色谱鉴别方法专属性强, 阴性对照无干扰; 含量测定结果表明, 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷进样量在 0.04462 ~ 0.4462 μg 范围内呈良好的线性关系 ($r = 1.000$), 平均回收率为 97.33% (RSD = 1.3%, $n = 6$); 川续断皂苷 VI 进样量在 0.6636 ~ 6.636 μg 范围内呈良好的线性关系 ($r = 1.000$), 平均回收率为 100.3% (RSD = 2.7%, $n = 6$)。**结论:** 本方法简便、准确, 重复性好, 可用于乌鳖颗粒的质量控制。

关键词: 乌鳖颗粒; 制何首乌; 白术; 续断; 枸杞子; 四羟基二苯乙烯; 葡萄糖苷; 川续断皂苷; 定性定量; 薄层色谱; 高效液相色谱
中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-1793(2011)09-1646-04

Qualitative and quantitative study of Wubie granules^{*}

LIU Zhi-hui, CHEN Wu, JIA Yuan

(Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210036, China)

Abstract Objective: To establish a qualitative and quantitative method for Wubie granules. **Methods:** Polygoni Multiflori Radix Praeparata, Atractylodis Macrocephalae Rhizoma, Dipsaci Radix and Lycii Fructus in this medicine were identified by TLC; HPLC method was used to determine the content of 2,3,5,4'-terahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside and asperosaponin VI. And the HPLC conditions were as follows: Heder ODS-3 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column served as analytical column; The mobile phase was acetonitrile-water with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹; The detection wavelength was 212 nm and column temperature was 30 °C. **Results:** The TLC spots were quite clear; The linear range of 2,3,5,4'-terahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside was in 0.04462-0.4462 μg ($r = 1.000$), the average recovery was 97.33% with RSD of 1.3% ($n = 6$); The linear range of asperosaponin VI was in 0.6636-6.636 μg ($r = 1.000$), the average recovery was 100.3% with RSD of 2.7% ($n = 6$). **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the quality control of Wubie granules.

Key words: Wubie granules; Polygoni Multiflori Radix Praeparata; Atractylodis Macrocephalae Rhizoma; Dipsaci Radix; Lycii Fructus; terahydroxystilbene; glucoside; asperosaponin; qualification and quantitation; TLC; HPLC

乌鳖颗粒来源于江苏省中医院临床经验方, 由制何首乌、续断、白术(麸炒)、鳖甲(炙)、茯苓、枸杞子以及黄狗肾共 7 味中药组成, 具有补肝肾、健脾胃、调冲任之功效, 临床上用于治疗卵巢功能早衰 (POF), 取得良好疗效。本实验采用薄层色谱法对方剂中的制何首乌、白术(麸炒)、续断和枸杞子进行定性鉴别; 并通过高效液相色谱法对制剂中的 2,

3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷和川续断皂苷 VI 2 种活性成分进行同时测定。为乌鳖颗粒的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

凝胶成像分析仪 (WD-9413A 型, 北京市六一仪器厂); 医用超声波清洗仪 (KQ-1000E 型, 昆山市超声仪器有限公司); Waters e2695-2998 高效液

^{*} 康缘中医药科技创新基金项目 (HZ0805KY)

第一作者 Tel: (025) 86529291; E-mail: liuzhi1008@126.com

相色谱仪(美国 Waters 公司);电子分析天平(BP-211D 型,德国赛多利斯公司)。

对照药材制何首乌(批号 121454-200703)、白术(批号 120925-200708)、续断(批号 121033-200608)、枸杞子(批号 121072-200806)及对照品 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷(含量测定用,批号 110844-200607)、川续断皂苷 VI(含量测定用,批号 111685-200401)均购自中国药品生物制品检定所;乌鳖颗粒样品(江苏省中医院制剂部,批号 20100712,20100716,20100718);阴性样品(按乌鳖颗粒制备工艺自制);硅胶 G(青岛海洋化工);硅胶 G 薄层板(自制);乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

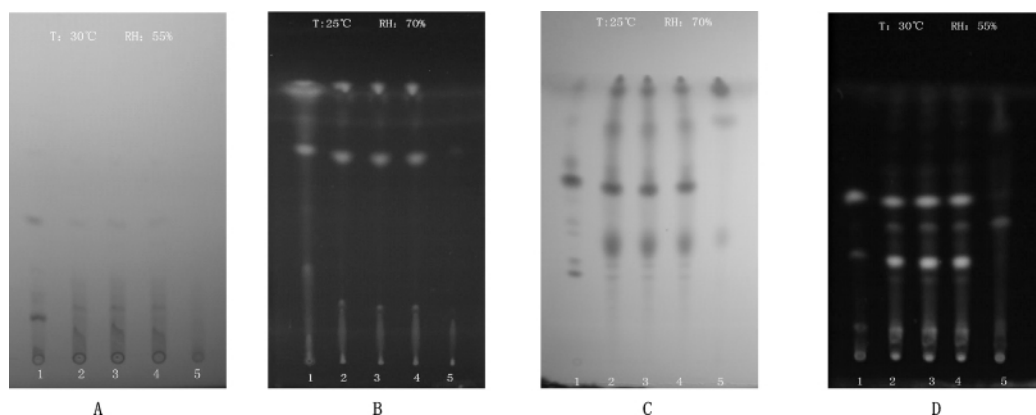


图 1 乌鳖颗粒中各药味薄层鉴别图

Fig 1 TLC of Wubie granules

A. 制何首乌 (Polygoni Multiflori Radix Praeparata) B. 白术(麸炒) (Atractylodis Macrocephalae Rhizoma) C. 续断 (Dipsaci Radix) D. 枸杞子 (Lycii Fructus)

1. 对照药材 (reference crude drug) 2~4. 3 批样品 (three samples) 5. 阴性样品 (negative sample)

2.1.2 白术(麸炒) 取样品 10 g,加正己烷 50 mL,超声 15 min,滤过,取续滤液,作为供试品溶液;取缺白术(麸炒)的阴性样品,同法制得缺白术(麸炒)的阴性样品溶液;取白术对照药材粉末 0.5 g,加正己烷 2 mL,超声 15 min,滤过,取续滤液,制得白术对照药材溶液^[9]。吸取上述 3 种溶液各 10 μ L,分别点于同一块硅胶 G 薄层板上,以环己烷-氯仿-乙酸乙酯(20:10:8)^[9]为展开剂,展开,取出,晾干。喷以 10% 硫酸乙醇液,105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰,置紫外光(365 nm)下检视。样品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性对照色谱中则无此斑点(无干扰),见图

2.1.1 制何首乌 取样品 10 g,加热水 50 mL,超声 30 min 使溶解,滤过,滤液用乙酸乙酯萃取 2 次,每次 30 mL,合并乙酸乙酯层,水浴蒸干,残渣加 2 mL 甲醇溶解,即得供试品溶液;取缺制何首乌的阴性样品,同法制得缺制何首乌的阴性样品溶液;取制何首乌对照药材 2 g,加水 50 mL 煎煮 1 h,滤过,按照供试品溶液的制备方法,从“滤液用乙酸乙酯萃取 2 次”起操作,制得制何首乌对照药材溶液。吸取上述 3 种溶液各 10 μ L,分别点于同一块硅胶 G 薄层板上,以甲苯-乙醇(2:1)^[10]为展开剂,展至 3.5 cm,取出,晾干,再以甲苯-乙醇(4:1)^[10]为展开剂,展至 7 cm,取出,晾干,氨蒸气显色,日光下检视。样品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照色谱中则无此斑点(无干扰),见图 1-A。

1-B。

2.1.3 续断 取样品 10 g,加热水 50 mL,超声 30 min 使溶解,滤过,滤液用水饱和的正丁醇萃取 2 次,每次 30 mL。合并正丁醇层,水浴蒸干,残渣加 2 mL 甲醇溶解,即得供试品溶液;取缺续断的阴性样品,同法制得缺续断的阴性样品溶液;取续断对照药材 2 g,加水 50 mL 煎煮 1 h,滤过,按照供试品溶液制备方法,从“滤液用水饱和的正丁醇萃取 2 次”起操作,制得续断对照药材溶液。吸取上述 3 种溶液各 3 μ L,分别点于同一块硅胶 G 薄层板上,以正丁醇-醋酸-水(4:1:5)^[9]的上层液为展开剂,展开,取出,晾干。喷以 10% 硫酸乙醇液,105 $^{\circ}$ C 加热至斑

点显色清晰,日光下检视。样品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照色谱中则无此斑点(无干扰),见图1-C。

2.1.4 枸杞子 取样品10 g,加热水50 mL,超声30 min使溶解,滤过,滤液用乙酸乙酯萃取2次,每次30 mL。合并乙酸乙酯层,水浴蒸干,残渣加2 mL甲醇溶解,即得供试品溶液;取缺枸杞子的阴性样品,同法制得缺枸杞子的阴性样品溶液;取枸杞子对照药材0.5 g,加水50 mL煎煮1 h,滤过,按照供试品溶液制备方法,从“滤液用乙酸乙酯萃取2次”起操作,制得枸杞子对照药材溶液。吸取上述3种溶液各10 μ L,分别点于同一块硅胶G薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(4:3:0.4:0.1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光(365 nm)下检视。样品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性对照色谱中则无此斑点(无干扰),见图1-D。

2.2 含量测定

2.2.1 溶液制备 混合对照品溶液:分别精密称取置五氧化二磷干燥器中干燥12 h的对照品2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷和川续断皂苷VI适量,置于25 mL棕色量瓶中,加稀乙醇适量,超声使溶解,定容,摇匀,即得混合对照品溶液(2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷14.87 μ g $\cdot$ mL⁻¹, 川续断皂苷VI 221.2 μ g $\cdot$ mL⁻¹)。供试品溶液:取样品约0.5 g,精密称定。精密加入70%乙醇25 mL,密塞,称重。超声(100 W, 40 kHz)提取30 min,放冷,以70%乙醇补足失重,摇匀,0.45 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。阴性样品溶液:取缺制何首乌和续断的阴性样品,按供试品溶液制备方法操作,即得。

2.2.2 色谱条件与系统适用性试验 采用Hedera ODS-3 C₁₈(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m)色谱柱,以乙腈(A)-水(B)为流动相,梯度洗脱(0~18 min: 18% A; 18~21 min: 18% A $\rightarrow$ 31% A; 21~40 min: 31% A)^[4,5],流速1.0 mL $\cdot$ min⁻¹,检测波长212 nm,柱温30 $^{\circ}$ C,进样量10 μ L。分别吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液各10 μ L,注入高效液相色谱仪,测定,样品与对照品在相同位置有吸收,分离度大于1.5,阴性样品无干扰,见图2。色谱柱的理论板数按2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷峰计应不低于2000;按川续断皂苷VI峰计应不低于3000。

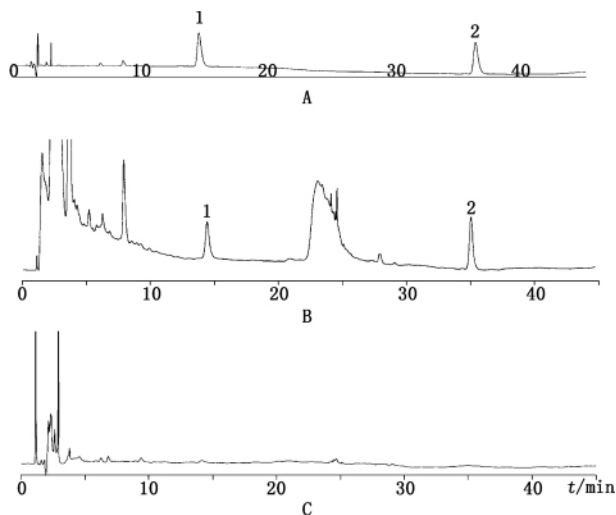


图2 乌整颗粒 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC of Wubie granules

A. 对照品(reference substances) B. 样品(sample) C. 阴性样品(negative sample without Polygoni Multiflori Radix Praeparata and Dipsaci Radix)

1. 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷(2, 3, 5, 4'-terahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside) 2. 川续断皂苷VI(asperosaponin VI)

2.2.3 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液3, 6, 10, 15, 20, 25, 30 μ L,按上述色谱条件进样测定。以进样量X(μ g)为横坐标,色谱峰面积Y为纵坐标,进行线性回归,得2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、川续断皂苷VI线性方程分别为:

$$Y = 3.000 \times 10^6 X - 1.668 \times 10^4 \quad r = 1.000$$

$$Y = 1.758 \times 10^5 X - 1.470 \times 10^4 \quad r = 1.000$$

线性范围分别为0.04462~0.4462 μ g和0.6636~6.636 μ g。

2.2.4 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液10 μ L,按上述色谱条件连续进样6次。结果2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、川续断皂苷VI峰面积的RSD(n=6)分别为0.60%和1.2%。

2.2.5 重复性试验 取同一批号乌整颗粒约0.5 g,共6份,精密称定,依法制备供试品溶液,进样测定,计算含量。结果2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、川续断皂苷VI含量平均值(n=6)分别为0.7180和14.64 mg $\cdot$ g⁻¹,RSD分别为1.1%和0.68%。

2.2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,按上述色谱条件,分别于0, 2, 4, 6, 8, 12 h进样测定。结果

2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、川续断皂苷 VI 峰面积的 RSD($n=6$) 分别为 1.7% 和 1.6%。

2.2.7 回收率试验 称取同一批号已知含量的乌桕颗粒约 0.25 g, 精密称定, 共 6 份。分别加入含 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷 0.1812 mg、川续断皂苷 VI 3.656 mg 的对照品溶液, 依法制备供试溶液。按上述色谱条件进样测定, 计算回收率, 结果 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、川续断皂苷 VI 回收率平均值($n=6$) 分别为 97.33% 和 100.3%, RSD 分别为 1.3% 和 2.7%。

2.2.8 样品含量测定 取乌桕颗粒样品 3 批, 依法制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 以外标法计算含量。结果 3 批样品中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷含量分别为 0.702, 0.710, 0.718 mg·g⁻¹; 川续断皂苷 VI 含量分别为 14.41, 14.54, 14.64 mg·g⁻¹。

3 讨论与结论

3.1 薄层鉴别 对制剂处方中的制何首乌、白术(麸炒)、续断、枸杞子 4 味药进行了薄层鉴别研究。方法简便, 重复性和专属性良好; 在白术(麸炒)的薄层鉴别中, 曾参考药典方法采用石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(50:1)为展开剂, 结果未获成功。可能是由于制备工艺中白术(麸炒)加水煎煮提取后苍术酮等挥发性成分损失较大, 未检出。后来在文献基础上进行了摸索、调整, 建立了其鉴别方法。

3.2 含量测定

3.2.1 指标成分的选择 乌桕颗粒是由制何首乌、续断等 7 味中药组成的复方制剂。处方中制何首乌为君药。2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷是何首乌中特有的生物活性成分, 具有抗氧化清除自由基、保护肝脏、调节机体免疫功能等作用^[8]。这与本制剂治疗卵巢功能早衰的一致, 所以测定制剂中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷含量; 处方中续断为臣药, 川续断皂苷 VI 是续断的主要有效成分之一, 有防

止骨质疏松、增强骨密度的作用, 与续断补肝肾、强筋骨、续折伤功效吻合^[9], 所以同时测定制剂中川续断皂苷 VI 含量。

3.2.2 检测波长的选择 由 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷和川续断皂苷 VI 光谱图可知: 川续断皂苷 VI 在 212 nm 处有最大吸收; 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷在 320 nm 处有最大吸收, 在 212 nm 处有较大吸收。为了同时测定制剂中的上述 2 种成分, 选择 212 nm 为检测波长, 方法学考察结果表明, 该方法可行。

3.2.3 供试品溶液制备方法的考察 比较了不同提取方法(加热回流提取、超声提取)、不同提取溶剂(甲醇; 50%, 60%, 70%, 80%, 95% 乙醇; 乙酸乙酯; 正丁醇)以及提取时间(15, 30, 45, 60 min)对提取效果的影响, 最终确定了供试品溶液的制备方法。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005. Vol I (一部): 122
- 2 ChP(中国药典). 2010. Vol I (一部): 95, 309
- 3 CHEN Jian-zhen(陈建真), SONG Yu-liang(宋玉良), LÜ Gui-yuan(吕圭源). Study on quality specification of Shangning oral liquid(伤宁口服液质量标准的研究). *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*(中药新药与临床药理), 2003, 14(4): 263
- 4 LU Jing(鲁静), SU Xiao-li(粟晓黎), DONG Hai-rong(董海荣), et al. HPLC determination of stilbene derivative in Radix Polygoni Multiflori(高效液相色谱法测定何首乌及制首乌中羟芪衍生物的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2000, 20(2): 104
- 5 ZHOU Dan-dan(周丹丹), ZHAO Yun-li(赵云丽), ZHANG Yan-li(张艳莉), et al. RP-HPLC simultaneous determination of polydatin and stilbene glycoside in Yigan Shukang capsules(RP-HPLC 法同时测定乙肝舒康胶囊中虎杖苷和二苯乙烯苷含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2008, 28(3): 411
- 6 LÜ Li-shuang(吕丽爽). Recent advances on stilbene glucoside from *Polygonum multiflorum* Thunb. (何首乌中二苯乙烯苷的研究进展). *Food Sci*(食品科学), 2006, 27(10): 608
- 7 WANG Yan(王岩), ZHOU Li-ling(周莉玲), LI Rui(李锐). The study progress in *Dipsacus asper* Wall. (川续断的研究进展). *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2002, 13(4): 233

(本文于 2010 年 9 月 20 日收到)