

# 复方土茯苓颗粒定性定量方法研究\*

刘志刚<sup>1,2</sup>, 邓伟杰<sup>1</sup>, 孙维峰<sup>1</sup>, 吴新荣<sup>1\*\*</sup>

(1. 广州军区广州总医院药剂科, 广州 510010 2 广州中医药大学, 广州 510405)

**摘要** 目的: 建立复方土茯苓颗粒的定性定量方法。方法: 采用 TLC 法对方中君药土茯苓、臣药牛膝进行定性鉴别; 采用 HPLC 法测定方中牛膝的蜕皮甾酮, 色谱柱为 Agilent TC-18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 柱, 以水(A) - 乙腈(B)为流动相梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长 243 nm。结果: 在 TLC 色谱中可检出土茯苓、牛膝; 在 HPLC 色谱中, 蜕皮甾酮可与其他成分分离, 且在 0.176~1.232 μg 范围内其峰面积与进样量呈良好的线性关系 ( $r = 0.9999$   $n = 7$ ), 平均回收率为 93.94% (RSD = 1.1%,  $n = 6$ )。结论: 所建立的方法对方中的药材可准确、快速地进行定性、定量检测, 可用于复方土茯苓颗粒的质量控制。

**关键词:** 复方土茯苓颗粒; 土茯苓; 牛膝; 落新妇苷; 蜕皮甾酮; 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)01-0119-05

## Studies on the quality and quantity analysis methods of compound Tufuling granules\*

LIU Zhi-gang<sup>1,2</sup>, DENG Wei-jie<sup>1</sup>, SUN Wei-feng<sup>1</sup>, WU Xin-rong<sup>1\*\*</sup>

(1. Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China

2. Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

**Abstract Objective** To establish the quality and quantity analysis methods of compound Tufuling granules. **Methods** Rhizoma Smilacis Glabrae and Radix Achyranthis Bidentatae in compound Tufuling granules were identified by TLC; Ecdysterone in Radix Achyranthis Bidentatae of compound Tufuling granules was determined by HPLC, the determination was performed on an Agilent TC-18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with a gradient elution using water(A) - acetonitrile(B) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, and detection wavelength was 243 nm. **Results** The TLC spots were fairly clear in the developed system, and the blank test showed that other medicines has not interfere with the main one; Ecdysterone showed a good linear relationship in the range of 0.176 - 1.232 μg ( $r = 0.9999$   $n = 7$ ); The average recovery of ecdysterone was 93.94% (RSD = 1.1%,  $n = 6$ ). **Conclusion** The quality and quantity analysis methods are suitable for quality control of compound Tufuling granules, which can be used exactly and fleetly to identify and determine related medicinal material.

**Key words** compound Tufuling granules; Rhizoma Smilacis Glabrae; Radix Achyranthis Bidentatae; astibin; ecdysterone; TLC; HPLC

复方土茯苓颗粒为广州军区广州总医院院内制剂, 由土茯苓、牛膝、王不留行、山慈菇、牛膝共 5 味药材制成, 具有泄浊祛邪、化湿清热的功效, 主要用于高尿酸血症、痛风病的治疗。方中君药土茯苓为百合科植物光叶菝葜 *Smilax glabra* Roxb 的干燥根

茎, 具有除湿、解毒、通利关节之功效, 含有薯蓣皂苷、二氢黄酮等成分。文献有报道采用 HPLC 法测定土茯苓中落新妇苷的含量<sup>[1-3]</sup>, 但由于该成分非中国药品生物制品检定所对照品目录品种, 市场购买困难, 因此本研究未能测定君药土茯苓中有效成

\* 全军“十一五”军队中医药研发推广专项课题, 项目编号为 2006062004 广东省科技计划项目, 项目编号为 2009B030801277 广东省中医药局建设中医药强省立项课题, 项目编号为 2009287

\*\* 通讯作者 Tel (020) 36653476 E-mail gwxxrong@yahoo.com

分。牛膝为方中臣药,含有蜕皮甾酮、齐墩果酸、牛膝皂苷 I 等成分。蜕皮甾酮均具有较强的生物活性,如有文献报道蜕皮甾酮具有调节糖、脂类成分代谢,促进蛋白质、核酸等物质合成,免疫调节等作用<sup>[4]</sup>。近年来很多相关文献通常以蜕皮甾酮作为药材、制剂质量控制的指标性成分<sup>[5~8]</sup>。因此本研究采用 TLC 法对方中君药土茯苓、臣药牛膝进行定性鉴别;采用 HPLC 法测定蜕皮甾酮的含量。经方法学验证,该方法分析快速、准确、灵敏度高、重现性好,且样品稳定,可用于复方土茯苓颗粒质量控制。

## 1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪 (2487 型 DAD 检测器, Breeze 3.30 工作站, Agilent TC-18 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 德国 BP211D Sartorius 电子天平 (十万分之一)。

土茯苓对照药材 (批号 121439-200401)、牛膝对照药材 (批号 121066-200504) 均购自中国药品生物制品检定所;蜕皮甾酮对照品:上海同田生物技术有限公司提供,批号 E0039-0607061Q 经 HPLC 归一化法检测,纯度大于 99%;落新妇苷对照品:由广州医药工业研究所曾祥腾老师提供,纯度大于 99%。复方土茯苓颗粒 (批号:08091401, 08101601, 08101602, 08101603) 自制,每袋 10 g 装。乙腈 (SIGMA 公司) 为色谱纯,硅胶 G 薄层板自制 (硅胶 G 为青岛海洋化工有限公司产品),水为重蒸水,其他实验所用试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 薄层色谱鉴别

**2.1.1 土茯苓** 取样品约 5 g 加 95% 乙醇 50 mL, 加热回流 30 min 滤过,向滤液中加入聚酰胺颗粒 (30~60 目) 1 g 摇匀,静置 2 h 过滤,用适量水洗涤,取聚酰胺颗粒置具塞三角瓶,加入 95% 乙醇 50 mL,超声 (1.2 kW, 40 kHz) 30 min 过滤,滤液水浴蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,制成供试品溶液;取土茯苓对照药材约 1 g 加 95% 乙醇 50 mL,同法制成对照药材溶液;取落新妇苷对照品,用甲醇制成每 1 mL 含 0.2 mg 的对照品溶液。另按处方制备缺土茯苓的阴性样品,同供试品溶液制备方法制成缺土茯苓阴性样品溶液。照薄层色谱法 (中国药典 2005 年版一部附录 VI B) 试验,取上述 4 种溶液各 10 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以氯仿-乙酸乙酯-甲酸 (3.5:5.5:1) 为展开剂,展开,展距约 12 cm,取出,晾干,喷以盐酸酸性 5% 三氯化铁乙醇溶液<sup>[9]</sup>,热风吹干,检视。样品色谱中,在与对照药

材、对照品色谱相应位置上,显相同颜色的斑点,阴性样品无相应斑点。薄层色谱结果表明,其他药材对土茯苓鉴别无影响,见图 1。

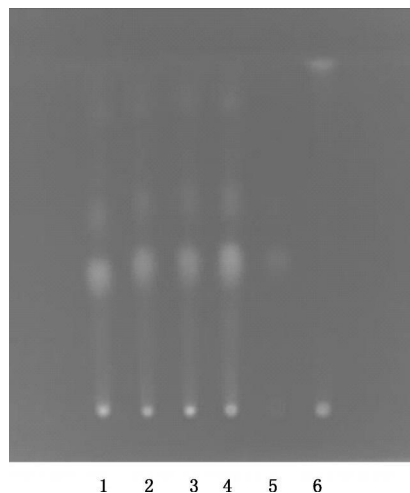


图 1 土茯苓样品 TLC 图

Fig 1 TLC chromatogram of Rhizoma Smilacis Glabrae

1. 样品 08101601 (sample 08101601) 2. 样品 08101602 (sample 08101602) 3. 样品 08101603 (sample 08101603) 4. 土茯苓对照药材 (reference medicinal material of Rhizoma Smilacis Glabrae) 5. 落新妇苷 (astilbin) 6. 阴性样品 (negative sample without Rhizoma Smilacis Glabrae)

**2.1.2 牛膝**<sup>[10]</sup> 取样品约 10 g 加 95% 乙醇 50 mL, 加热回流 40 min 过滤,滤液加盐酸 1 mL, 加热回流 60 min, 水浴上浓缩至约 10 mL, 加水 30 mL 分散, 放冷, 用石油醚 (60~90 °C) 萃取 3 次 (每次 30 mL), 合并石油醚层, 蒸干, 残渣加甲醇 0.5 mL 使溶解, 制成供试品溶液; 取牛膝对照药材约 1 g 加 95% 乙醇 30 mL, 同法制成对照药材溶液; 另按处方制备缺牛膝阴性样品, 同供试品溶液制备方法制成缺牛膝阴性样品溶液。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 薄层板上, 以氯仿-甲醇 (9.75:0.25) 为展开剂, 展开, 展距约 8 cm, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 加热至斑点清晰, 置 365 nm 紫外灯下检视。样品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 阴性样品无相应斑点。薄层色谱结果表明, 其他药材对牛膝鉴别无影响, 见图 2。

### 2.2 蜕皮甾酮含量测定

**2.2.1 溶液的制备** 对照品溶液: 称取蜕皮甾酮对照品适量, 精密称定, 加流动相溶解制成每 1 mL 含 0.05 mg 的蜕皮甾酮对照品溶液; 供试品溶液<sup>[8,11]</sup>:

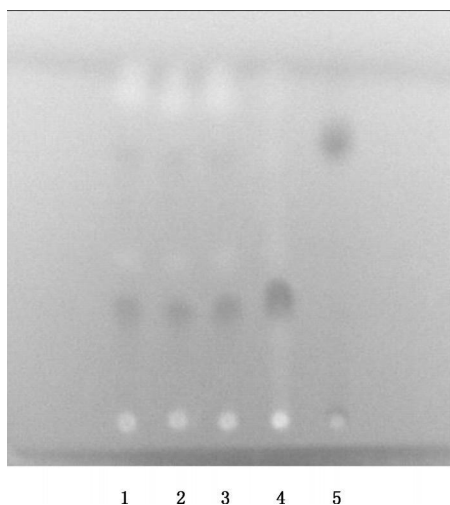


图 2 牛膝样品 TLC图

Fig 2 TLC chromatogram of Radix Achyranthis Bidentatae

1 样品 08101601 (sample 08101601) 2 样品 08101602 (sample 08101602) 3 样品 08101603 (sample 08101603) 4 牛膝对照药材 (reference medicinal material of Radix Achyranthis Bidentatae) 5 阴性样品 (negative sample without Radix Achyranthis Bidentatae)

取装量差异项下的本品内容物, 混匀, 研细, 取细粉约 1 g 精密称定, 置 50 mL 烧杯, 加 20 mL 水使溶解, 溶液以水饱和的正丁醇萃取 5 次, 每次 20 mL, 合并醇液层, 蒸干, 残渣以 10 mL 甲醇定量转移至已处理好的氧化铝小柱 (3 g f 1 cm), 以 30 mL 甲醇洗脱, 洗脱液蒸干, 以水 - 乙腈 (83: 17) 定量转移至 5 mL 量瓶中定容, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液; 阴性样品溶液: 按复方土茯苓颗粒生产工艺制备缺牛膝阴性样品, 同供试品溶液制备方法制备阴性样品溶液。

**2.2.2 色谱条件**<sup>[10]</sup> 色谱柱: Agilent TC-18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为水 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~25 min, 83% A; 25~40 min, 83% A → 70% A); 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 243 nm。在上述色谱条件下, 取对照品溶液、阴性样品溶液、供试品溶液分别进样 10 μL, 记录色谱图, 见图 3。从图 3 可见蜕皮甾酮的保留时间约为 20.7 min, 其可与样品中其他成分基线分离。在本色谱条件下, 样品中其他成分对蜕皮甾酮的测定无干扰, 理论塔板数以蜕皮甾酮计不低于 4000。

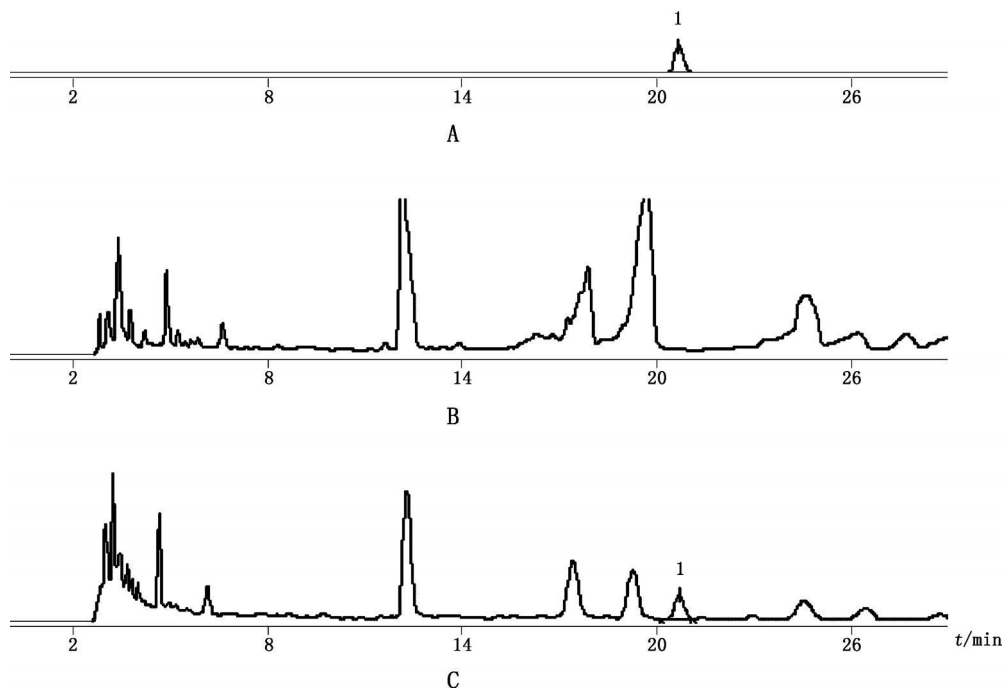


图 3 对照品 (A)、阴性样品 (B) 及样品 (C) 色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of reference substance (A), negative sample without Radix Achyranthis Bidentatae (B), and sample (C)

1 蜕皮甾酮 (ecdysterone)

**2.2.3 线性关系考察** 称取蜕皮甾酮对照品适量, 精密称定, 加流动相溶解并稀释制得每 1 mL 含 0.044 mg 的蜕皮甾酮对照品溶液。精密吸取上述溶液 4.8, 12, 16, 20, 24, 28 μL, 注入液相色谱仪, 记

录峰面积, 以峰面积 Y 为纵坐标, 蜕皮甾酮进样量 X (μg) 为横坐标, 进行线性回归, 回归方程为:  $Y = 1.327 \times 10^6 X - 1.901 \times 10^4$   $r = 0.9999$  结果表明蜕皮甾酮进样量在 0.176~1.232 μg 范围

内呈良好的线性关系。

**2.2.4 精密度试验** 精密吸取“2.2.1”项下供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 在上述色谱条件下, 连续进样 6 次, 以峰面积计算 RSD 为 1.4%, 表明本实验精密度良好。

**2.2.5 稳定性试验** 精密吸取“2.2.1”项下供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 分别在 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 h 进样, 按上述色谱条件测定峰面积, 以峰面积计算 RSD 为 2.4%, 说明供试品溶液中的蜕皮甾酮在 12 h 内稳定, 可满足测定的需要。

**2.2.6 重复性试验** 取同一批号样品 (08091401) 6 份, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 在本文色谱条件下进样 10  $\mu\text{L}$ , 外标法计算。蜕皮甾酮平均含量为 0.204  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD = 1.2%, 结果表明本方法具有较好的重现性。

**2.2.7 加样回收率试验** 取已知含量 (蜕皮甾酮平均含量为 0.204  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 的样品粉末约 0.8 g 共 6 份, 精密称定, 分别精密加入浓度为 0.044  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的蜕皮甾酮对照品溶液 3.5 mL, 加水 16.5 mL 使溶解, 按“2.2.1”项下方法自“溶液以水饱和的正丁醇萃取 5 次”起依法制备, 进样 10  $\mu\text{L}$ , 测定, 外标法计算。结果蜕皮甾酮平均加样回收率 ( $n = 6$ ) 为 93.94%, RSD = 1.1%, 表明本法具有较好的加样回收率。

**2.2.8 样品含量测定** 取不同批号样品各 3 份, 分别按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液; 取对照品, 按“2.2.1”项下方法制备对照品溶液。分别取上述

2 种溶液各进样 10  $\mu\text{L}$ , 记录峰面积, 外标两点法计算蜕皮甾酮的含量, 结果见表 1。

表 1 样品含量测定结果 ( $n = 3$ )

Tab 1 Determination results of ecdysterone in samples

批号 (Lot No.)	平均含量 (average content) / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD / %
08101601	0.227	1.6
08101602	0.249	2.7
08101603	0.220	1.9

### 3 讨论

**3.1 复方土茯苓颗粒由土茯苓、牛膝、王不留行等药材制成, 在溶剂提取蜕皮甾酮的同时, 也提取出大量的杂质和其他成分, 无法直接进行含量测定, 必须对提取物进行必要的前处理。本试验综合了相关文献<sup>[8, 11]</sup>的样品处理方法, 采用正丁醇萃取-氧化铝柱联用方法进行被测成分蜕皮甾酮的分离、纯化。根据相似相溶原理, 在氧化铝柱中以甲醇洗脱时, 蜕皮甾酮可完全洗脱, 与其他被吸附的杂质分离。曾比较了过柱前后样品的 HPLC 色谱行为, 过柱前样品 HPLC 色谱图见图 4, 比较图 3-C 与图 4 可知, 通过氧化铝柱除杂, 保留时间在 2~8 min 之间的杂质峰可大大降低, 利于延长色谱柱的寿命; 而蜕皮甾酮的富集程度得到提高, 且与前一组分的分离度得到改善, 降低干扰成分的影响。经试验确定用氧化铝柱进行净化处理步骤, 用 30 mL 甲醇洗脱, 蜕皮甾酮可基本完全洗脱, 在本文的色谱条件下, 蜕皮甾酮与其他成分能达到基线分离。**

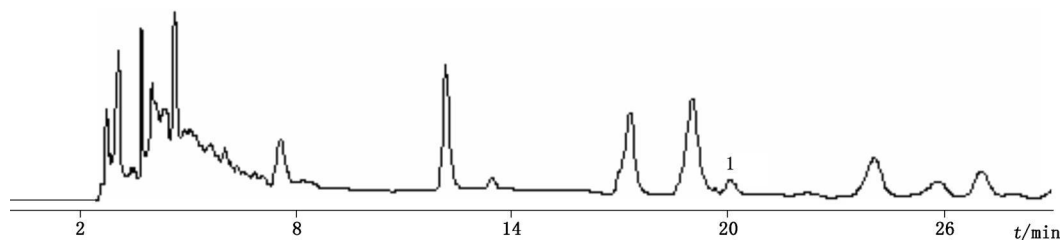


图 4 未过柱样品 HPLC 色谱图

Fig 4 HPLC chromatogram of sample before isolated by alumina

1 蜕皮甾酮 (ecdysterone)

**3.2 文献中采用 HPLC 法测定药材或制剂中蜕皮甾酮含量时, 流动相多采用水-甲醇<sup>[5-8]</sup>系统或水-乙腈<sup>[12]</sup>系统。如赵玉梅等采用水-甲醇 (35:45) 为流动相, 在 243 nm 处测定了牛膝“泛糖”前后蜕皮甾酮的含量变化<sup>[6]</sup>; 李文莉等<sup>[12]</sup>采用水-乙腈 (85:15) 为流动相, 在 243 nm 处测定了脉络宁注射液中蜕皮甾酮的含量。采用水-甲醇系统为流动相**

测定复方土茯苓颗粒中蜕皮甾酮时, 不明物质对蜕皮甾酮的干扰难以消除; 而采用水-乙腈系统梯度洗脱时, 样品中其他成分对蜕皮甾酮的测定无干扰。因此本试验采用水-乙腈系统进行梯度洗脱。

**3.3 方中君药土茯苓为百合科植物光叶菝葜 *Smilax glabra* Roxb 的干燥根茎, 具有除湿、解毒、通利关节之功效, 主要含有落新妇苷、异落新妇苷、薯蓣**

皂苷等成分,其中落新妇苷含量可达 1% ~ 2%<sup>[2]</sup>。二氢黄酮类成分落新妇苷分子中有 4 个酚羟基,可被聚酰胺颗粒选择性吸附<sup>[3]</sup>,因此可采用聚酰胺吸附-水醇洗脱法与其他不被吸附的成分分离,用于落新妇苷的富集,本试验即将该法应用于君药土茯苓的薄层色谱鉴别。且分子中的酚羟基可与三氯化铁络合,在自然光下产生蓝褐色斑点,用于落新妇苷的检视。因此本试验以盐酸酸性三氯化铁乙醇溶液为显色剂,自然光下即可得到显色稳定的斑点,经室温放置 1 周后,显色斑点依然清晰可辨。

3.4 由上述结果可知,3 批次复方土茯苓颗粒中蜕皮甾酮含量变化不大,说明复方土茯苓颗粒的原料性质、制备工艺均比较稳定,制剂质量可控性高。实验中曾观察到柱温的变化会影响不同谱图中同一色谱峰的保留时间,为获得重现性较好的色谱图及相应的峰面积,应保持柱温恒定。HPLC 法测定复方土茯苓颗粒中蜕皮甾酮的含量,可以排除干扰,得到较好分离效果,直接采用色谱峰面积定量,结果准确,且方法简单,重现性较好,便于推广。

参考文献

- 1 ZHANG Xiao-yan(张笑颜), ZHAN Li-yin(詹丽茵), ZENG Xiang-teng(曾祥腾). Content determination of astilbin in *Smilax glabra* Roxb from different provenances by HPLC(高效液相色谱法测定不同产地土茯苓药材中落新妇苷的含量). *China Med Her* (中国医药导报), 2010, 7(1): 90
- 2 WU Xin-rong(吴新荣), LIU Zhi-gang(刘志刚), YAN Ren-liang(颜仁梁), et al Content measurement of astilbin and engelitin in *Smilax glabra* Roxb by HPLC(高效液相色谱法同时测定土茯苓中落新妇苷、黄杞苷的含量). *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2010, 30(10): 886
- 3 ZHOU Jun(周军), QU Jia(曲佳), SHOU Guo-xiang(寿国香), et al Determination of astilbin and engelitin in *Smilax glabra* Roxb by RP-HPLC(HPLC 法测定土茯苓中落新妇苷及黄杞苷). *Drug Stand China*(中国药品标准), 2009, 10(5): 372

- 4 XU Nan-jie(徐楠杰), GUO Yue-ying(郭月英), LI Xian(李铣). Advances in pharmacological research on ecdysterone(蜕皮甾酮的药理作用研究进展). *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 1997, 14(4): 300
- 5 LIU Jiao(刘姣), ZHOU Ya-qiu(周亚球), PENG Chao(彭超). Determine the contents of ecdysterone in *Achyranthes bidentata*(怀牛膝蜕皮甾酮的含量测定). *J Anhui TCM Coll*(安徽中医学院学报), 2005, 24(3): 43
- 6 ZHAO Yu-mei(赵玉梅), WANG Jing(王静), LIANG Sheng-wang(梁生旺), et al Content changes of ecdysterone in *Achyranthes bidentata* pre and post floating sugar(牛膝“泛糖”前后蜕皮甾酮的含量变化研究). *J Chin Med Mater*(中药材), 2006, 29(1): 32
- 7 LI Jin-ting(李金亭), TENG Hong-mei(滕红梅), HU Zheng-hai(胡正海). Accumulation dynamic of ecdysterone in vegetative organs of *Achyranthes bidentata*(牛膝营养器官中蜕皮甾酮的积累动态研究). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2007, 38(10): 1570
- 8 ZHANG Cui-ying(张翠英), LIANG Sheng-wang(梁生旺), ZHANG Guang-qiang(张广强). Determination of ecdysterone in *Achyranthes bidentata* from different locations(不同产地牛膝中蜕皮甾酮的含量测定). *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2001, 36(10): 699
- 9 ChP(中国药典). 2010. Vol I (一部): 980
- 10 ChP(中国药典). 2005. Vol I (一部): 49
- 11 SHUAIQin(帅琴), QIN Yong-chao(秦永超), JIANG Zu-cheng(江祖成), et al Study on the determination of ecdysterone in Chinese proprietary medicine Jinsuiqing by high performance liquid chromatography(高效液相色谱法测定中成药金水清中蜕皮甾酮的研究). *J Anal Sci*(分析科学学报), 1999, 15(4): 293
- 12 LI Wen-li(李文莉), WANG Wen-tao(汪文涛), LEI Yu-ping(雷玉萍), et al Determination of ecdysterone in Maitong injection by HPLC(RP-HPLC 测定脉络宁注射液中蜕皮甾酮的含量). *West China J Pharm Sci*(华西药学杂志), 2001, 16(4): 382
- 13 WU Xin-rong(吴新荣), LIU Zhi-gang(刘志刚), YAN Ren-liang(颜仁梁), et al Separation and purification of total flavonoids in *Smilax glabra* by polyamide resins(聚酰胺颗粒分离纯化土茯苓总黄酮研究). *J Chin Med Mater*(中药材), 2009, 32(10): 1606

(本文于 2010 年 11 月 9 日修改回)