

经典名方升陷汤基准样品质量标准的建立

Establishment of Quality Standards for Reference Sample of Classical Prescription Shengxian Decoction

高军¹ 程东岩^{1*} 王隶书¹ 陈昕² 王超楠²Gao Jun¹, Cheng Dongyan¹, Wang Lishu¹, Chen Xin², Wang Chaonan²

(1.吉林省中医药科学院 长春 130012 2.长春中医药大学 长春 130117)

(1.Jilin Province Academy of Chinese Medicine, Changchun 130012; 2.Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117)

摘要: 目的: 建立升陷汤基准样品的质量标准。方法: 采用薄层色谱法对组方中4味中药进行TLC鉴别; 采用HPLC法进行指纹图谱研究, 并对制剂中黄芪甲苷进行含量测定。结果: 薄层斑点清晰, 分离度好, 阴性无干扰; 建立了基准样品的指纹图谱检测方法, 确定了14个共有峰, 15批基准样品指纹图谱的相似度均大于0.95; 建立了黄芪甲苷的HPLC-ELSD含量测定方法, 并制订其限度。结论: 建立的质量标准方法准确可靠, 可为后续升陷汤复方制剂的研发提供参考依据。

Abstract Objective: To establish a quality standard for the reference sample of Shengxian Decoction. Method: Four traditional Chinese medicines in the formula were identified by TLC; HPLC method was used to study the fingerprint and determine the content of astragaloside IV in the preparation. Result: The thin layer spots are clear, with good separation and negative without interference. A fingerprint detection method for reference sample was established, and 14 common peaks were identified. The similarity of the fingerprint spectra of 15 batches of reference sample was greater than 0.95. A HPLC-ELSD method for determining the content of astragaloside IV were established and its limits were established. Conclusion: The established quality standard method is accurate and reliable, and can provide a reference basis for the subsequent development of Shengxian Decoction compound preparation.

关键词 升陷汤; 基准样品; 质量标准; TLC; 指纹图谱; 含量测定

Keywords Shengxian Decoction; Reference sample; Quality standard; TLC; Fingerprint; Content determination

升陷汤源自清代张锡纯所著的《医学衷中参西录》^[1], 系治疗大气下陷证的经典名方。该方由黄芪六钱、知母三钱、柴胡一钱五分、桔梗一钱五分、升麻一钱组成, 主要用于治疗大气下陷证。按照国家中药经典名方复方制剂的申报资料要求, 需先完成物质基础研究, 才能进行制剂研究。通过查阅文献可知, 现阶段关于升陷汤基准样品质量控制的相关研究报道较少^[2]且不够全面, 而本研究首次从多角度对升陷汤物质基准样品进行全方位的质量标准研究, 以期后续升陷汤复方制剂研发奠定基础。现将试验过程及结果报道如下:

1 仪器与试剂

1.1 仪器 LC-10AT VP 高效液相色谱仪(日本岛津公司); ELSD2000ES 蒸发光散

射检测器(美国奥泰公司); SECURA125-1CN 电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司); KQ-5200DE 液晶超声波清洗器(昆山洁力美超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与试剂

对照品及对照药材取自中国食品药品检定研究院、四川省维克奇生物科技有限公司。硅胶 G 铝箔板由德国 Merck 公司生产; 乙腈、甲酸均为色谱纯, 水为重蒸水, 其它试剂均为分析纯。

2. 方法与结果

2.1 升陷汤基准样品制备方法

取黄芪 111.90g、知母 55.95g、柴胡 28.00g、桔梗 28.00g、升麻 18.65g, 置于煎药壶中, 加 9 倍量水浸泡 30 分钟后, 煎煮 30 分钟, 滤过, 药渣继续加 6 倍量水煎煮 20 分钟, 滤过, 合并滤液, 浓缩至约 650ml, 冷冻干燥, 粉碎, 即得。

2.2 TLC 鉴别

2.2.1 黄芪取本品 4g, 置锥形瓶中, 加甲醇 40ml 超声处理 20 分钟, 滤过, 滤液平分二份, 取其中 1 份, 蒸干, 残渣加水 20ml 微热使溶解, 用三氯甲烷基金项目: 吉林省科技发展计划项目(项目编号: 20210401075YY)

通讯作者: 程东岩

振摇提取 2 次, 每次 20ml, 弃去三氯甲烷液, 水液用水饱和和

正丁醇液, 每次 20ml, 合并正丁醇液, 用 1% 氢氧化钠溶液洗涤 2 次, 每次 20ml, 弃去氢氧化钠液, 正丁醇液继续用正丁醇饱和的水洗涤 2 次, 每次 20ml, 弃去水液, 正丁醇液蒸干, 残渣加甲醇 1ml 使溶解, 作为供试品溶液。另取缺黄芪阴性样品, 同法制得黄芪阴性液。再取黄芪甲苷对照品, 加甲醇制成每 1ml 含 0.5mg 的溶液, 作为对照品溶液。吸取上述三种溶液各 6 μ l, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-水(65: 35: 10)10 $^{\circ}$ C 以下放置的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 热风吹至斑点显色清晰。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, 且阴性无干扰, 结果见图 1。

2.2.2 知母 取 2.2.1 项下的样品溶液稀释 1 倍, 作为供试品溶液。另取缺知母阴性样品, 同法制得知母阴性液。再取知母皂苷 B II 对照品, 加甲醇制成每 1ml 含 3mg 的溶液, 作为对照品溶液。吸取上述三种溶液各 3 μ l, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正丁醇-冰醋酸-水(4: 1: 5)的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 吹干, 喷以含 5% 香草醛的 10% 硫酸乙醇溶液。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, 且阴性无干扰, 结果见图 1。

2.2.3 柴胡 取缺柴胡阴性样品, 按 2.2.1 项下供试品溶液制备方法操作, 制得柴胡阴性液。另取柴胡皂苷 a 对照品, 加甲醇制成每 1ml 含 0.6mg 的溶液, 作为对照品溶液。再取柴胡对照药材 0.5g, 加水 30ml 回流提取 20 分钟, 滤过, 滤液按 2.2.1 项下供试品溶液制备方法项下自“用三氯甲烷振摇提取 2 次……”起依法操作, 制成对照药材溶液。吸取 2.2.1 项下的供试品溶液、柴胡阴性液各 6 μ l, 上述对照品及对照药材溶液各 3 μ l, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以二氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(15: 25: 12: 2.5)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以含 2% 对二甲氨基苯甲醛的 10% 硫酸乙醇溶液, 热风吹至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 且阴性无干扰, 结果见图 1。

2.2.4 升麻 取 2.2.1 项下的另一份甲醇液, 蒸干, 残渣加水 20ml 微热使溶解, 用乙酸乙酯振摇提取 2 次, 每次 20ml, 合并乙酸乙酯

液, 蒸干, 残渣加甲醇 1ml 使溶解, 作为供试品溶液。另取升麻阴性样品, 同法制得升麻阴性液。再取异阿魏酸对照品, 加甲醇制成每 1ml 含 0.5mg 的溶液, 作为对照品溶液。吸取上述三种溶液各 8 μ l, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-二氯甲烷-冰醋酸(6:1:0.5)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 1%三氯化铁乙醇溶液, 热风吹至斑点显色清晰。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, 且阴性无干扰, 结果见图 1。

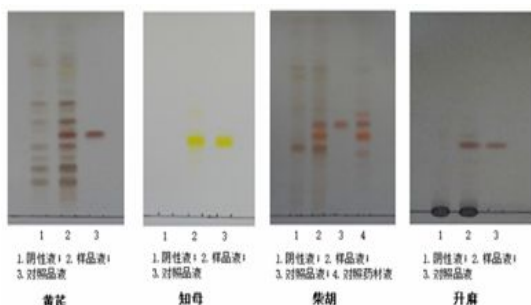


图 1 升陷汤基准样品 TLC 图谱

2.3 指纹图谱

2.3.1 色谱条件 色谱柱: Shim-pack VP-ODS 柱 (4.6mm \times 150mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈 (A) -0.2%甲酸溶液 (B) 梯度洗脱 (0~20min, 95%~78%B; 20~45min, 78%B;

45~80min, 78%~60%B; 80~95min, 60%B); 流速: 0.9ml \cdot min⁻¹; 柱温: 30 $^{\circ}$ C, 蒸发光检测器检测; 进样量: 10 μ l。

2.3.2 溶液的制备

2.3.2.1 参照物溶液的制备取知母皂苷 B II 对照品适量, 精密称定, 加 80%甲醇制成每 1ml 含 1.5mg 的溶液, 即得。

2.3.2.2 供试品溶液的制备取本品约 1g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入含 4%浓氨试液的 80%甲醇溶液 50ml, 密塞, 称定重量, 加热回流 1 小时, 放冷, 再称定重量, 用含 4%浓氨试液的 80%甲醇溶液补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 25ml, 蒸干, 残渣用 80%甲醇溶解, 转移至 5ml 量瓶中, 加 80%甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.3 方法学考察 分别进行了精密度、稳定性及重复性研究, 结果各共有峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 值均小于 3%, 说明所建立方法可行。

2.3.4 样品测定 分别取 15 批物质基准粉末各约 1g, 按选定方法制成供试品溶液, 按选定色谱条件注入液相色谱仪进行分析。根据测定结果可知, 15 批样品有 14 个共有峰, 通过与对照品及对照药材比对, 指认出各色谱峰归属。将所得的 15 个色谱图分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”进行数据分析, 生成对照指纹图谱, 结果见图 2。进行相似度评价, 结果相似度均在 0.95 以上。

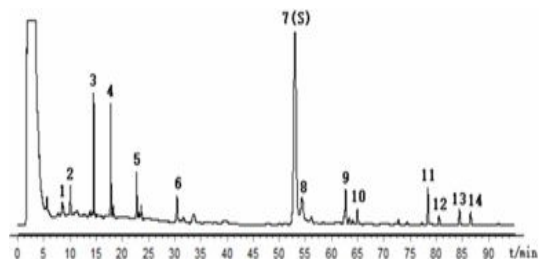


图 2 升陷汤物质基准 HPLC 对照指纹图谱

峰 1: 升麻药材; 峰 3: 新芒果苷; 峰 4: 芒果苷; 峰 5: 毛蕊异黄酮葡萄糖苷;

峰 6: 知母药材; 峰 7(S): 知母皂苷 B II; 峰 8: 知母药材; 峰 9: 桔梗皂苷 D; 峰 10: 桔梗药材

峰 11: 黄芪甲苷; 峰 12: 知母药材; 峰 13: 柴胡皂苷 a; 峰 14: 柴胡药材

2.4 黄芪甲苷含量测定^[3-4]

2.4.1 色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX 300SB C₁₈ 柱 (4.6mm \times 250mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-水 (36: 64); 流速: 0.8ml \cdot min⁻¹; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 蒸发光散射检测器检测; 进样量: 对照品溶液 5 μ l, 10 μ l, 样品液 10 μ l。

2.4.2 溶液的制备

2.4.2.1 对照品溶液的制备取黄芪甲苷对照品适量, 精密称定, 加 80%甲醇制成每 1ml 含 0.18mg 的溶液, 即得。

2.4.2.2 供试品溶液的制备同指纹图谱。

2.4.2.3 阴性样品溶液的制备 取不含黄芪的阴性制剂, 按 2.4.2.2 项下方法制成黄芪阴性样品液。

2.4.3 专属性实验 分别精密吸取阴性样品液、供试品溶液、黄芪甲苷对照品液各 10 μ l, 按 2.4.1 项下条件进样测定, 结果在黄芪甲苷对照品色谱峰相应的保留时间处, 阴性样品无色谱峰出现, 说明阴性样品不干扰检出。

2.4.4 方法学考察 分别进行了线性关系的考察、精密度、稳定性、重复性及加样回收率试验, 结果测定结果均符合相关规定, 说明所建立方法可行。

2.4.5 样品含量测定依选定方法, 对十五批样品中的黄芪甲苷含量进行测定, 结果含量分别为 1.285、1.252、1.123、1.254、1.210、1.167、1.169、1.141、1.269、1.271、1.268、1.259、1.232、1.173、1.219mg/g。根据实测结果并结合相关规定, 拟将物质基准中黄芪甲苷含量限度暂定为每 1g 含黄芪以黄芪甲苷计应为 0.854mg~1.585mg。

3 讨论

升陷汤组方中黄芪、知母、柴胡、桔梗中所含有效成分均为皂苷类物质, 此类物质紫外仅有末端吸收, 用紫外法进行指纹图谱及含量测定基线易漂移, 灵敏度及分离效果均较差, 而采用蒸发光散射检测器进行指纹图谱及含量测定基线稳定, 灵敏度高, 分离效果较好。

参考文献:

- [1]张锡纯. 医学衷中参西录:上册[M].北京:人民卫生出版社,2006:319-320.
- [2]杨婉,邹海英,邱智东,等.基于物理指纹图谱与多指标成分定量测定构建升陷汤标准煎液质量评价方法[J].中草药,2023,54(6):1804-1813.
- [3]钱叶飞,陆林玲,张超,等.黄蛭益肾胶囊质量标准的提升[J].中国药师,2022,25(10):1820-1825.
- [4]胡晨泽.养心氏片 HPLC-ELSD 指纹图谱的建立及 6 个成分的含量测定[J].中国药师,2022,25(6):1121-1125.