

益气开胃膏质量标准研究

廖伟中¹, 李养学²

(1. 广东省广州市番禺区中医院, 广东 广州, 511400;

2. 广东省中医药工程技术研究院, 广东 广州, 510095)

[摘要] 目的:对益气开胃膏的质量标准进行提高研究。方法:采用TLC薄层色谱技术对益气开胃膏中黄芪、山楂、陈皮等中药进行薄层鉴别,同时采用HPLC高效液相色谱技术对方中黄芪甲苷的含量进行测定。结果:所建立的TLC法能较好地鉴别方中所含的黄芪、山楂、陈皮,斑点对应清晰,阴性无干扰;黄芪甲苷在1.0472~20.9440 μg 范围内呈良好的线性关系,黄芪甲苷平均回收率为99.50%,RSD为1.32%。结论:所建立的质量控制方法准确、专属性好,能较好地对益气开胃膏进行定性、定量检测,可用于益气开胃膏的质量控制。

[关键词] 益气开胃膏;黄芪甲苷;高效液相色谱法;薄层色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **DOI:**10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.08.083

Study on quality standard of Yiqi appetizer ointment

LIAO Wei-zhong¹, LI Yang-xue²

(1. Panyu Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 511400, Guangdong, China;

2. Guangdong Provincial Institute of TCM, Guangzhou 510095, Guangdong China)

Abstract: objective: To develop improved quality standard of Yiqi Kaiwei ointment. Methods: identification of Radix Astragali Mongolici, Fructus Crataegi Pinnatifidae and Pericarpium Citri Reticulatae in Yi TLC method. The contents of astragaloside in the formula were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Results: The proposed TLC method was capable of identifying the three ingredients mentioned above, in which clear characteristic spots were obtained with no negative interferences. Astragaloside showed a good linearity in the range of 1.0472~20.9440 μg , the average recovery of astragaloside was 99.50%, RSD was 1.32%. Conclusion: The established quality control method was accurate and specific and can be used for qualitative and quantitative analysis of Yiqi Kaiwei ointment, as well as its quality control.

Key words: Yiqi Kaiwei ointment; astragaloside; TLC; HPLC

益气开胃膏是由广东省广州市番禺区中医院自主研发的中医膏方,主要由黄芪、山楂、鸡内金、党参、陈皮、稻芽、山药、红枣等12味中药经过煎煮、浓缩、收膏等工艺制备而

成,已在本院广泛使用,具有益气补血、开胃消食等功效。主要用于手术后失血过多、脾胃虚弱、不思饮食或倦怠乏力等症。目前益气开胃膏的质量控制仅有常规检查项,没有

- [3] 尚德师,李乐军,邵祖燕. 五磨饮子促进大鼠胃液分泌及保护胃黏膜等作用的实验研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(3): 588-589.
- [4] 尚德师,李乐军,邵祖燕. 五磨饮子调节大鼠胃运动的实验研究[J]. 陕西中医,2006,27(11):1436-1437.
- [5] 陆融. 五丹胃福冲剂治疗幽门螺杆菌相关性慢性萎缩性胃炎临床及试验研究[D]. 天津:天津中医学院,1996.
- [6] 李慧臻,刘琳,王兴章,等. 半夏泻心汤对胃癌前病变大鼠胃黏膜组织中的NF- κ B/STAT3信号通路的影响研究[J]. 中国中西医结合消化杂志,2017,25(4):284-288.
- [7] 谢晶日,王业莉,张扬,等. 复合造模法建立大鼠胃癌前病变模型的实验研究[J]. 新中医,2013,45(2):139-141.
- [8] 陈焕朝,冯觉平,魏少忠,等. IL-1基因多态性对胃黏膜TNF- α /NF- κ B的表达和活性的影响[J]. 肿瘤防治研究,2009,36(20):130-133.
- [9] 周海存,刘宏斌,苏琳. 胃癌患者血清VEGF、COX-2表达的检测

- 及临床意义[J]. 现代肿瘤医学,2013,21(9):2019-2021.
- [10] Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, et al. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(11): 759-771.
- [11] Lyons JG, Patel V, Rous NC, et al. Snail upregulates proinflammatory mediators and inhibits differentiation in oral keratinocytes[J]. Cancer Res, 2008, 68(12): 4525-4530.
- [12] 李伟,王媛,熊正文,等. 环氧化酶-2与恶性肿瘤关系的研究进展[J]. 华国防医药,2010,22(3):277-280.
- [13] 刘丽华,吴汉平,张方信,等. 叶酸治疗萎缩性胃炎并改变P16蛋白表达[J]. 世界华人消化杂志,2006,14(6):630-633.
- [14] 朱舜时,夏书军,陈晓宇,等. 叶酸治疗萎缩性胃炎并干预胃癌生成的分子生物学机制[J]. 胃肠病学,2002,7(2):86-89.
- [15] 李伟群,谢建群,龚雨萍,等. 叶酸治疗幽门螺杆菌感染慢性萎缩性胃炎疗效[J]. 中国临床医学,2014,21(5):523-525.

(收稿日期:2018-01-29)

鉴别及含量测定控制等相关内容,为更好地控制益气开胃膏的质量,保证临床用药,本研究通过对方中各药味进行薄层色谱鉴别研究以及对君药黄芪进行含量测定研究,增加了益气开胃膏的鉴别项和含量测定项,从而进一步制订和完善了益气开胃膏的质量标准。

1 实验材料及仪器

1.1 实验材料 黄芪对照药材(蒙古黄芪,批号:120974-201612),陈皮对照药材(批号:120969-201510),山楂对照药材(批号:121626-201402),黄芪甲苷对照品(批号:110781-201616)均由中国食品药品检定研究院提供;益气开胃膏(批号:20170901、20170902、20170903)由广东省广州市番禺区中医院制剂室提供。色谱纯乙腈由默克提供;液相用水为超纯水,自制;乙酸乙酯、乙醚、三氯甲烷、正己烷、甲苯、甲醇、冰乙酸等分析纯试剂均由广州市化学试剂厂提供;硅胶 G 薄层板为自制^[1]。

1.2 仪器 数控超声波清洗器(KQ5204 DE,昆山);数控恒温可控水浴锅(XMTX2112 电热型,北京);十万分之一电子分析天平(METTLER XS205DU,瑞士);薄层自动铺板仪(PBQ-II型,重庆);薄层点样仪(CAMAG ATS 4,瑞士);薄层成像系统(CAMAG-Reprostar 3,瑞士);高效液相色谱仪(Agilent 1200,美国);Alltech ELSD 3300 检测器(美国)。

2 薄层鉴别

2.1 黄芪的薄层鉴别 取益气开胃膏 10g,加入甲醇 30mL,加热回流 1h,过滤,滤液加于中性氧化铝柱(粒度 100~200 目,内径 10~15mm,5g)上,以甲醇-水(40:60)溶液 100mL 洗脱,洗脱液于蒸发皿中蒸干,残渣加 30mL 水,搅拌使溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取 2 次,每次 30mL,水液弃去,正丁醇液合并,继续用水分 2 次洗涤,每次用水 30mL,水液弃去,正丁醇液蒸干,用 0.5mL 甲醇溶解,即得供试品溶液。取黄芪(蒙古黄芪,批号:120974-201612)对照药材 1g,按照上述供试品溶液的制备方法制备,即得黄芪对照药材溶液。另取黄芪甲苷(批号:110781-201616)对照品 1mg,加甲醇 1mL 使溶解,作为对照品溶液。再取按益气开胃膏工艺制得的缺黄芪药材的阴性对照品 10g,按照上述供试品溶液的制备方法制备,即得黄芪阴性对照品溶液。照 2015 年版《中国药典》四部通则 0502 薄层色谱法试验,吸取 4 种溶液各 10 μ L,分别于同一硅胶 G 薄层板上点样,以正丁醇-乙酸乙酯-稀氨水(4:1:5)的上层溶液为展开剂,另在展开缸中槽加等量浓氨水,压紧,饱和 30min 以上,展开,取出并晾干,薄层板均匀喷以硫酸乙醇(10 $\rightarrow$ 100)溶液,持续在 105 $^{\circ}$ C 烘箱中加热,至斑点清晰,置 365nm 紫外光灯下检视^[2-5]。结果黄芪甲苷和黄芪对照药材薄层色谱相对应的位置上,益气开胃膏供试品有相同颜色的荧光斑点,各斑点清晰、对应良好,且阴性对照品在相同的位置无斑点干扰。(见图 1)

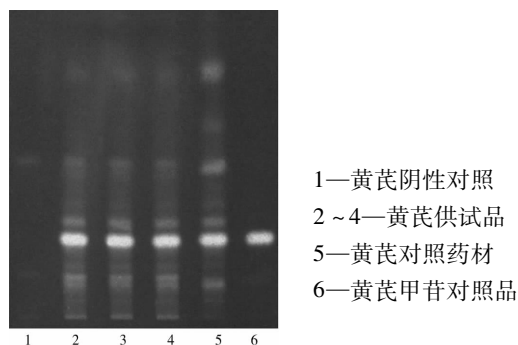


图1 黄芪的薄层鉴别图

2.2 山楂的薄层鉴别 取益气开胃膏 30g,加入甲醇 30mL,加热回流 1h,过滤,滤液于蒸发皿中蒸干,残渣加水 30mL,搅拌使溶解,用 60mL 乙酸乙酯分 2 次振摇提取,每次 30mL,乙酸乙酯液合并后于蒸发皿中蒸干,用 0.5mL 甲醇溶解,即得供试品溶液。取山楂(批号:121626-201402)对照药材 0.5g,按照上述供试品溶液制备方法制备,即得山楂对照药材溶液。再取按益气开胃膏工艺制得的缺山楂药材的阴性对照品 30g,按照上述供试品溶液制备方法制备,即得山楂阴性对照品溶液。照 2015 年版《中国药典》四部通则 0502 薄层色谱法试验,吸取 3 种溶液各 10 μ L,分别于同一硅胶 G 薄层板上点样,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(20:4:0.5)为展开剂,展开,取出并晾干,薄层板均匀喷以硫酸乙醇(10 $\rightarrow$ 100)溶液,持续 105 $^{\circ}$ C 烘箱中加热,至斑点显色清晰,置 365nm 紫外光灯下检视^[6-8]。结果山楂对照药材色谱相对应的位置上,益气开胃膏供试品有相同颜色的荧光斑点,各斑点清晰、对应良好,且阴性对照品在相同位置无斑点干扰。(见图 2)

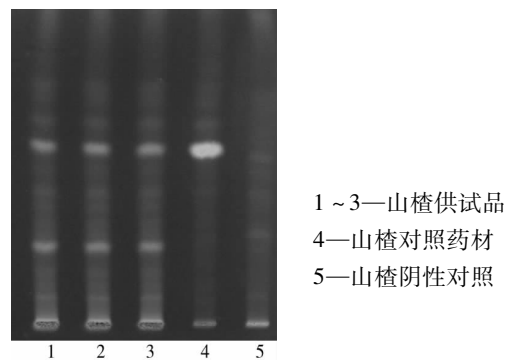


图2 山楂的薄层鉴别图

2.3 陈皮的薄层鉴别 取本品 20g,加入甲醇 30mL,加热回流 1h,过滤,滤液于蒸发皿中蒸干,残渣加水 30mL,搅拌使溶解,用 60mL 甲苯分 2 次振摇提取,每次 30mL,甲苯液合并后于蒸发皿中蒸干,用甲醇 1mL 溶解,即得供试品溶液。取陈皮(批号:120969-201510)对照药材 1g,按照上述供试品溶液制备方法制备,即得陈皮对照药材溶液。再取按益气开胃膏工艺制得的缺陈皮药材的阴性对照品 20g,按照上述供试品溶液制备方法制备,即得陈皮阴性对照品溶液。照 2015 年版《中国药典》四部通则 0502 薄层色谱法试验,吸取 3 种溶液各 10 μ L,分别于同一用 1% 氢氧化钠溶液

制备的硅胶 G 薄层板上点样,以甲苯-乙酸乙酯(3:2)为展开剂,展开,取出并晾干,置 365nm 紫外光灯下检视^[9-12]。结果陈皮对照药材色谱相对应的位置上,益气开胃膏供试品有相同颜色的荧光斑点,各斑点清晰,对应良好,且阴性对照品在相同位置无斑点干扰。(见图 3)

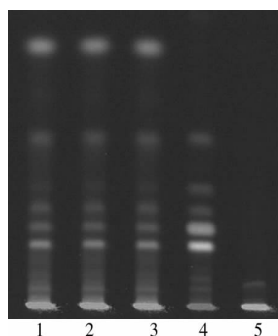


图3 陈皮的薄层鉴别图

3 黄芪甲苷含量测定

3.1 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX SB C₁₈柱(规格 5μm,4.6mm×250mm);柱温:30℃;流动相:乙腈-水(30:70);流速:1mL/min;ELSD 3300 检测器;漂移管温度 40℃;载气流速:1.5L/min;理论塔板数按黄芪甲苷峰计算应≥4000。

3.2 黄芪甲苷对照品溶液的制备 取黄芪甲苷(批号:110781-201616)对照品适量,在内置五氧化二磷的减压干燥器中减压干燥至恒重,精密称定,置棕色量瓶,加甲醇适量,制成黄芪甲苷含量为 1.0472mg/mL 的溶液,即得^[13-16]。

3.3 益气开胃膏供试品溶液的制备 取益气开胃膏约 40g,置 100mL 具塞锥形瓶中,精密称定,用移液管精密量取甲醇 50mL,准确加入,称定锥形瓶总重量,水浴回流 1h,取出锥形瓶,盖塞,放冷,擦干锥形瓶外壁,再次称定总重量,用甲醇补足其减失的重量,摇匀,过滤,收集续滤液,精密量取 25mL,置水浴锅蒸干,残渣分次加水约 20mL,使溶解完全,合并水液,置分液漏斗中,用 160 mL 水饱和的正丁醇分 4 次振摇提取,每次 40mL,正丁醇液合并,置分液漏斗中,用 80mL 氨试液分 2 次充分洗涤,每次 40mL,氨液弃去,收集正丁醇液,水浴蒸干,残渣用 5mL 热水分次洗涤,使溶解,放冷,水液通过柱高为 12cm,内径为 1.5cm 的大孔吸附树脂柱(D101 型),先用 50mL 水洗脱,洗脱液弃去,再用 30mL 乙醇(40→100)溶液洗脱,洗脱液弃去,最后用 80mL 乙醇(70→100)溶液洗脱,洗脱液收集,水浴蒸干,残渣用甲醇分次溶解至 5mL 量瓶中,用甲醇定容,摇匀,即得益气开胃膏供试品溶液^[17]。

3.4 方法学考察

3.4.1 益气开胃膏缺黄芪的阴性对照试验 取益气开胃膏缺黄芪的阴性对照品约 40g,置 100mL 具塞锥形瓶中,精密称定,按照“3.3(益气开胃膏供试品的制备)”项下的制备方法制成缺黄芪药材的阴性对照品溶液,按照“3.1(色谱条件)”项下的 HPLC 色谱条件进行测定,结果在阴性对照品溶液的高效液相色谱图中,在黄芪甲苷色谱峰相同的保留

时间位置上无对应的液相色谱峰出现,说明在此条件下,益气开胃膏阴性对照品无干扰。(见图 4)

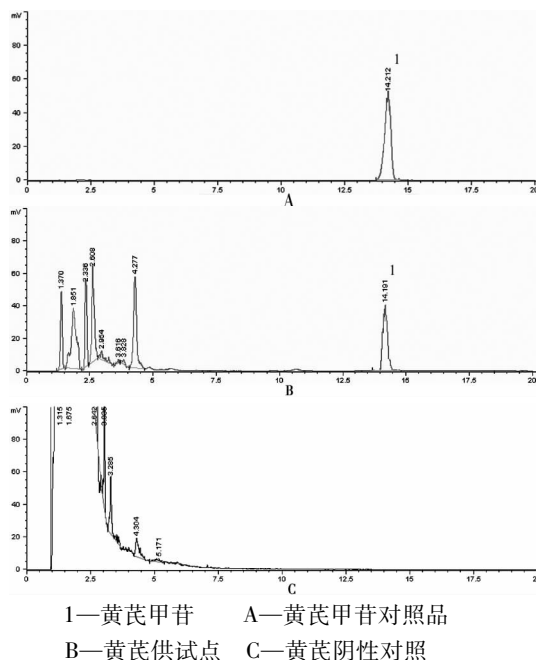


图4 HPLC 图

3.4.2 线性关系考察 取“3.2 项下”黄芪甲苷对照品溶液(1.0472mg/mL),分别精密吸取 0.5mL、1.0mL、2.0mL、4.0mL、8.0mL 于 10mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,精密吸取不同浓度的溶液各 20μL,注入高效液相色谱仪中进行测定,记录黄芪甲苷峰面积,以黄芪甲苷的色谱峰面积的对数为纵坐标,以其进样量的对数为横坐标,进行回归方程计算。结果,线性方程为 $Y = 0.8423X - 4.7459$ ($r = 0.9997$),表明黄芪甲苷在 1.0472μg~20.9440μg 范围内呈良好的线性关系。

3.4.3 精密度考察试验 精密吸取“3.3 项下”已制备的益气开胃膏供试品溶液(批号:20170901)20μL,进行测定,重复 6 次,按“3.1(色谱条件)”项下的 HPLC 色谱条件进行测定,测定结果显示,黄芪甲苷的峰面积重复测定 6 次积分值 RSD 为 0.29%,RSD<2%,说明研究所用仪器精密度良好。

3.4.4 重复性考察试验结果 取同一批次益气开胃膏供试品(批号:20170901),按“3.3(益气开胃膏供试品溶液的制备)”项下方法分别制备 6 份供试液,再按“3.1(色谱条件)”项下的 HPLC 色谱条件进行测定,计算黄芪甲苷的含量,结果显示,黄芪甲苷的平均含量为 0.1326mg/g,RSD 为 1.35%,说明该测定方法重复性较好。

3.4.5 稳定性考察试验 取 20170901 批号的益气开胃膏供试品溶液 20μL,分别于 0h、3h、6h、9h、12h、15h、18h 进样,按“3.1(色谱条件)”项下的 HPLC 色谱条件进行测定,结果黄芪甲苷 RSD($n=7$)为 0.36%,表明益气开胃膏供试品溶液 18h 内稳定性良好。

3.4.6 黄芪甲苷加样回收率试验 取 20170901 批号的益气开胃膏样品(已知含量)9 份,分别精密加入一定量(按已知量的 50%、100%、150%)的黄芪甲苷对照品,按“3.3(益

气开胃膏供试品溶液的制备)”项下的制备方法制成9份供试品溶液,再按“3.1(色谱条件)”项下HPLC色谱条件测定,计算回收率。(见表1)

表1 黄芪甲苷加样回收率测定结果

序号	样重(g)	样品中黄芪甲苷的量(mg)	黄芪甲苷的加入量(mg)	黄芪甲苷的检出量(mg)	回收率(%)	平均值(%)	RSD(%)
1	20.3252	2.6951	1.2566	3.9251	97.88		
2	20.3865	2.7032	1.2566	3.9368	98.17		
3	20.0124	2.6536	1.2566	3.8924	98.58		
4	19.8658	2.6342	2.6180	5.2208	98.80		
5	20.3368	2.6967	2.6180	5.3077	99.73	99.50	1.32
6	20.5872	2.7299	2.6180	5.3997	101.98		
7	20.6993	2.7447	3.7938	6.5639	100.67		
8	21.0012	2.7848	3.7938	6.5623	99.57		
9	20.8568	2.7656	3.7938	6.5655	100.16		

3.4.7 供试品测定 取3批益气开胃膏(批号:20170901、20170902、20170903)约40g,置100mL具塞锥形瓶中,精密称定,按“3.3”项下益气开胃膏供试品溶液的制备方法制得供试品溶液,按“3.1(色谱条件)”项下HPLC色谱条件进行测定,益气开胃膏(批号:20170901、20170902、20170903)中黄芪甲苷测定结果见表2。

表2 黄芪甲苷含量测定结果(n=2)

批号	黄芪甲苷含量(mg/g)	平均(mg/g)
20170901	0.1332	
20170902	0.1386	0.1364
20170903	0.13754	

4 讨 论

本文对中医膏方益气开胃膏中黄芪、山楂、陈皮进行了薄层色谱鉴别,并列标准;曾参考2015年版《中国药典》(一部)对方中上述各药味进行了薄层鉴别,但阴性有较大干扰,根据相关参考文献项下薄层鉴别方法也进行了摸索研究,最后通过进一步对鉴别方法进行优化,结果薄层色谱斑点较明显,且阴性无干扰;同时,对方中其他剩余药味也进行了薄层鉴别研究^[18-24],结果阴性均干扰严重,故暂未列入本标准。

笔者曾参考相关文献^[25],试着在紫外(254nm)下检测,结果黄芪甲苷色谱峰峰形较差,调整相关色谱参数,效果仍不理想。最终参考相关文献及2015年版《中国药典》一部黄芪项下收载的方法,用HPLC-ELSD法对方中黄芪甲苷的含量进行测定,相对固定和优化了色谱条件,供试品中黄芪甲苷色谱峰峰形较好,阴性无干扰,经过对测定方法进行方法学考察,结果表明,上述所建含量测定方法结果准确、可靠,可重复性好,可将其作为益气开胃膏的含量测定方法。

本研究所建立的质量控制方法准确、专属性好,能较好地中医膏方益气开胃膏进行定性、定量检测,可用于益气开胃膏的质量控制。

参考文献

[1] 李养学,李素梅,罗文汇,等. 丹陈化痰止咳颗粒的质量标准

研究[J]. 江西中医药,2012,43(1):57-60.

[2] 李养学,曾文雪,陈秋谷,等. 远芪口服液质量标准研究[J]. 江西中医药,2016,47(12):60-63.

[3] 赵吉平,喻雄华,张琼光,等. 河车壮儿膏质量标准的研究[J]. 湖北中医药大学学报,2017,19(5):43-46.

[4] 刘潇,孟艳,刘志雯,等. 麻杏乳膏质量标准的研究[J]. 中成药,2017,39(2):323-328.

[5] 沈洁. 黄芪薄层鉴别方法改进分析[J]. 当代医学,2015,21(16):150-151.

[6] 莫冬. 降脂宁颗粒薄层鉴别研究[J]. 亚太传统医药,2014,10(12):29-31.

[7] 何慧,尹宁宁,郭东晓. 复方阿胶颗粒质量标准研究[J]. 中成药,2013,35(10):2182-2188.

[8] 李彩东,张伟,王信. 参芪心舒胶囊中6种药物的薄层鉴别[J]. 中国现代中药,2013,15(10):891-894.

[9] 闫雪,唐洪梅,李得堂,等. 肠激安制剂质量标准研究[J]. 西北药学杂志,2017,32(4):411-415.

[10] 许绍兰,赵丹,毛峻琴. 健脾补肾颗粒的质量标准研究[J]. 药学实践杂志,2016,34(6):530-533.

[11] 王晓斌,郝素平,陈欢,等. 参芪益气散质量标准的研究[J]. 中成药,2016,38(10):2180-2183.

[12] 李湘平,袁樾樾,李汶. 薄层色谱法定性鉴别胃可舒片中的陈皮、甘草、木香[J]. 中国医药指南,2014,12(10):51-53.

[13] 程正,王举涛. 芪冬养心胶囊质量标准研究[J]. 现代中药研究与实践,2017,31(5):45-47.

[14] 宋振民,李菁,徐田田,等. 高效液相色谱法测定肺痿颗粒中黄芪甲苷的含量[J]. 陕西中医药大学学报,2017,40(5):85-88.

[15] 谢紫薇,谭天林,王琰萍,等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器法测定健儿宝颗粒中黄芪甲苷含量[J]. 中国药业,2016,25(13):77-79.

[16] 刘和平,彭招华,张润容,等. 黄芪药材中黄芪甲苷UPLC-ELSD含量测定方法的优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(5):92-94.

[17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:302.

[18] 徐柳柳,王永欣. 健胃消食片质量标准研究[J]. 中成药,2006(4):506-509.

[19] 王银娟,廖欣,白汝,等. 通脉活络散的质量标准提升研究[J]. 北京中医药,2017,36(9):850-852.

[20] 兰杨,谯志文,唐桂英,等. 健脾止泻宁颗粒的质量标准提高研究[J]. 中国药房,2017,28(18):2568-2572.

[21] 王晓霞,庄鹏宇,陈金铭,等. 党参化学成分的研究[J]. 中草药,2017,48(9):1719-1723.

[22] 廖立英. 肾石颗粒中金钱草及鸡内金的薄层色谱法定性鉴别[J]. 中国医药指南,2013,11(1):470-471.

[23] 李虹,郭宏伟,沈书博. 肾石通丸质量标准的研究[J]. 中国药品标准,2012,13(4):268-271.

[24] 李霞霞,郭海波,戴卫红,等. 参麦软胶囊的薄层色谱鉴别[J]. 中医药导报,2010,16(8):97-98.

[25] 李秋琼,陈广斌,林坚涛. 高效液相色谱法测定玉屏风提取液中黄芪甲苷的含量[J]. 临床合理用药杂志,2012,5(22):106-107.

(收稿日期:2018-02-02)