

参茸天麻酒的质量标准研究和探讨

田国贺, 王坤, 韩晓红
(吉林省药品检验所, 长春 130033)

摘要 目的:完善参茸天麻酒的质量控制标准。**方法:**采用薄层色谱法对方中主要药味天麻、枸杞子、何首乌、人参和五味子展开鉴别考察,采用高效液相色谱法测定君药天麻中天麻素的含量。**结果:**经实验建立薄层色谱方法能清晰并有效的鉴别天麻、枸杞子、何首乌、人参和五味子药材,阴性无干扰;天麻素含量测定方法操作简单、准确,天麻素在 $9.76 \sim 97.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好,回归方程为 $Y = 5\,396X - 804.79$, $r = 0.999\,9$;精密度、稳定性、重复性试验的 $\text{RSD} < 1.0\%$;加标回收率为 100.2% , RSD 为 1.1% ($n = 9$)。**结论:**定性、定量方法准确、简单,能有效控制参茸天麻药酒的质量。

关键词:参茸天麻酒;天麻素;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法

中图分类号:R 921.2

文献标识码:A

文章编号:1009-3656(2020)-1-0000-0

doi:10.19778/j. chp. 2020. 01. 00?

Research and discussion on the quality standard of Shenrongtianma Medicinal Liquor

TIAN Guohe, WANG Kun, HAN Xiaohong
(Jilin Institute For Drug Control, Changchun 130033, China)

Abstract Objective: To improve the quality standard of Shenrongtianma Medicinal Liquor. **Methods:** TLC was applied for qualitative identification of *Gastrodiae Rhizoma*, *Lycii fructus*, *Polygoni multiflori Radix*, *Ginseng Radix et Rhizoma* and *Schisandrae Chinensis Fructus*. HPLC was used to determine the content of gastrodin. **Results:** *Gastrodiae Rhizoma*, *Lycii fructus*, *Polygoni multiflori Radix*, *Ginseng Radix et Rhizoma* and *Schisandrae Chinensis Fructus* could be identified clearly and effectively by TLC method without the blank interference. The HPLC method we established is simple and accurate. Gastrodin had good linearity ($r = 0.999\,9$) in the range of $9.76 \sim 97.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and the equation is $Y = 5\,396X - 804.79$. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1.0% , The spiked average recovery was 100.2% with RSD as 1.1% ($n = 9$). **Conclusion:** The qualitative and quantitative methods we established are easy and accurate. It can be used for the quality control of Shenrongtianma Medicinal Liquor.

Key words: Shenrongtianma Medicinal Liquor; Gastrodin; Quality Standard; TLC; HPLC

参茸天麻酒收载于《中华人民共和国卫生部部颁标准中药成方制剂第三册》^[1],由天麻、枸杞子、茯苓、鹿茸、何首乌、人参、五味子七味中药材制成的酒剂,具有补气益肾的功效,用于治疗气虚肾亏,神经衰弱,眩晕头痛^[2]。原标准自1991年颁布执行至

今未检索到关于本品的质量研究的相关报道。其质量标准项目仅收载了天麻和人参的鉴别,其方法专属性差,同时缺失重要的质量控制的检验项目。为全面有效控制该制剂质量,确保临床用药安全有效,笔者对天麻、枸杞子、何首乌、人参和五味子五种药

味展开了薄层鉴别研究,并采用 HPLC 法对方主主要药味天麻中天麻素的含量展开研究,为其质量标准提高提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Shimadzu LC-20A 型 HPLC 仪(二极管阵列检测器);梅特勒 AE160 型电子分析天平;CMAG RE-PROSTAR II 型号成像系统;深圳市洁盟清洗设备有限公司超声波清洗仪。

1.2 材料

对照品天麻素(批号:110807-201608)、人参皂苷 Rg1(批号:110703-201731)、人参皂苷 Re(批号:110754-201626)、人参皂苷 Rb1(批号:110704-201625)、五味子醇甲(批号:110857-201513)以及对照药材人参(批号:130917-201211)、天麻(批号:120944-201310)、枸杞子(批号:121072-201410)、何首乌(批号:120934-201410)、五味子(批号:120922-201309)均购自中国食品药品检定研究院。10 批参茸天麻酒来自广西禅方药业股份有限公司,批号为 160401、160402、160403、160404、160405、160406、160407、160408、160409、160410;3 批参茸天麻酒来自河南宛东药业有限公司,批号为 8150011、8120011、8130011。甲醇、乙腈为色谱纯(Merck 公司),磷酸等均为分析纯,水为超纯水。硅胶 G 薄层板、硅胶 G₂₅₄ 薄层板及硅胶 H 薄层板(默克化工技术有限公司,天津天光光学仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 TLC 定性鉴别

2.1.1 天麻

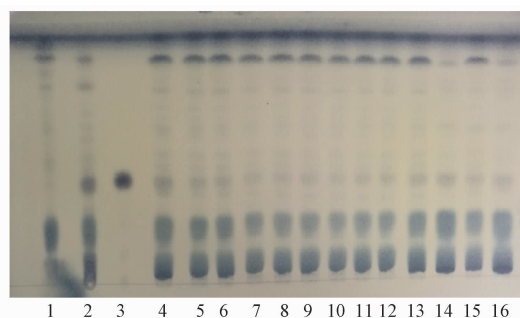
2.1.1.1 供试品溶液的制备 取参茸天麻酒 25 mL,置水浴蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解。

2.2.1.2 对照药材溶液制备 取天麻对照药材 0.5 g,加 70% 甲醇 5 mL,超声(功率 240 W,频率 40 kHz)处理 30 min,滤过,取滤液即得。

2.1.1.3 对照品溶液制备 取天麻素对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,即得。

2.1.1.4 鉴别 取阴性样品适量,同法制成相应溶液。吸取上述供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μ L、对照药材溶液和对照品溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上使成条状,以乙酸乙酯-甲醇-水(9:1:0.2)为展开剂,展开,展距 8 cm,取出,晾干,喷以 10% 磷钼酸乙醇溶液,在 105℃ 加热至斑点显色清

晰^[3],结果见图 1。由图可知,在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上,供试品色谱均显相同颜色的斑点,阴性对照无相应斑点。



1. 阴性样品(negative sample) 2. 天麻对照药材(Gastrodiae Rhizoma reference drug) 3. 天麻素对照品(Gastrodin reference substance) 4~16. 样品(samples)

图1 天麻 TLC 色谱图

Fig. 1 TLC chromatogram of *Gastrodiae Rhizoma*

2.1.2 枸杞子

2.1.2.1 供试品溶液的制备 取参茸天麻酒 100 mL,置水浴蒸至约 30 mL,用乙酸乙酯振摇提取 3 次,每次 20 mL,合并乙酸乙酯液,浓缩至 1 mL,即得^[4]。

2.1.2.2 对照品溶液制备 取枸杞子对照药材 0.5 g,加水 35 mL,加热煮沸 15 min,放冷,滤过,滤液用乙酸乙酯 15 mL 振摇提取,分取乙酸乙酯液,浓缩至 1 mL,即得^[3]。

2.1.2.3 鉴别 取阴性样品适量,同法制成相应溶液。吸取上述供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μ L、对照药材溶液 5 μ L,点于同一硅胶 G 薄层板上使成条状,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(4:1.3:0.1)为展开剂^[5],展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视,结果见图 2。由图可知,在与对照药材色谱相应的位置上,供试品色谱显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无相应斑点。

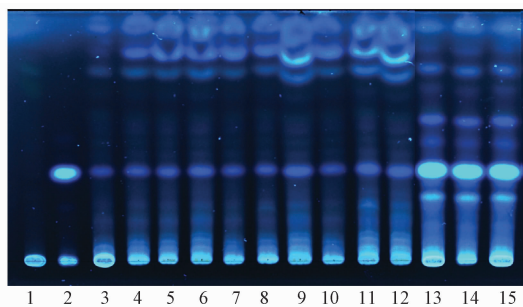
2.1.3 何首乌

2.1.3.1 供试品溶液制备 同“2.1.2.1”枸杞子项下供试品溶液制备。

2.1.3.2 对照药材溶液制备 取何首乌对照药材 0.5 g,加乙醇 50 mL,加热回流 1 h,滤过,滤液浓缩至 1 mL,即得。

2.1.3.3 鉴别 取阴性样品适量,同法制成相应溶液。吸取上述溶液各 5 μ L 点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 H 薄层板上使成条状,以三氯甲烷-甲醇(7:3)为展开剂,展至约 3.5 cm,取出,晾

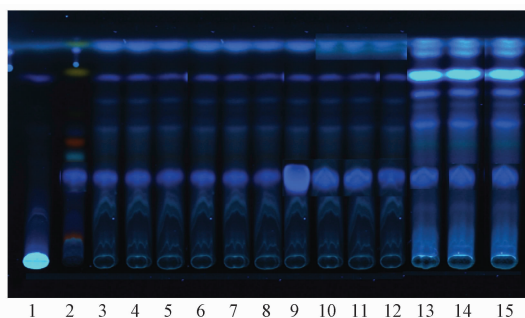
干,再以三氯甲烷-甲醇(20:1)为展开剂,展至约7 cm,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视,结果见图3。由图可知,在与对照药材色谱相应的位置上,供试品色谱显相同蓝色的荧光斑点,阴性对照无相应斑点。



1. 阴性样品 (negative sample) 2. 枸杞子对照药材 (Lycii Fructus reference drug) 3~15. 样品 (samples)

图2 枸杞子 TLC 色谱图

Fig. 2 TLC chromatogram of *Lycii Fructus*



1. 阴性样品 (negative sample) 2. 何首乌对照药材 (Polygoni Multiflori Radix reference drug) 3~15. 样品 (samples)

图3 何首乌 TLC 色谱图

Fig. 3 TLC chromatogram of *Polygoni Multiflori Radix*

2.1.4 人参

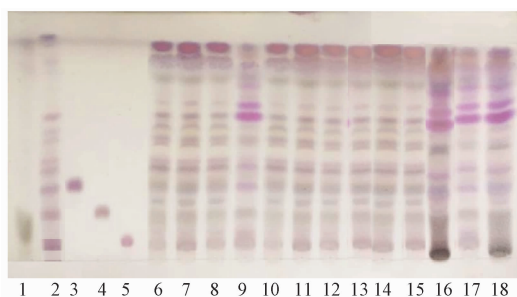
2.1.4.1 供试品溶液制备 取参茸天麻酒100 mL,置水浴蒸至约30 mL,用水饱和的正丁醇振摇提取2次,每次25 mL,合并提取液,用氨试液洗涤2次,每次20 mL,取正丁醇提取液,蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,即得^[6]。

2.1.4.2 对照药材溶液制备 取人参对照药材0.5 g,加水饱和的正丁醇30 mL,超声(功率240 W,频率40 kHz)处理30 min,滤过,滤液加氨试液50 mL,摇匀,放置使分层,取上层液,蒸干,残渣加甲醇2 mL使溶解,即得。

2.1.4.3 对照品溶液制备 取人参皂苷 Rb₁对照品、人参皂苷 Re 对照品、人参皂苷 Rg₁对照品,加甲

醇制成每1 mL 各含1 mg 的混合溶液,即得。

2.1.4.4 鉴别 取阴性样品适量,同法制成相应溶液。吸取供试品溶液和阴性对照溶液各10 μL,对照药材和对照品溶液各5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上使成条状,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10)10℃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,105℃加热至斑点显色清晰^[7],结果见图4。由图可知,在与对照药材色谱及对照品色谱相应的位置上,供试品色谱均显相同颜色的斑点,阴性对照无相应斑点。



1. 阴性样品 (negative sample) 2. 人参对照药材 (Ginseng Radix et Rhizoma reference drug) 3~5. 人参皂苷 Rg₁、Re、Rb 对照品 (Ginsenoside Rg₁、Re、Rb reference substance) 6~18. 样品 (samples)

图4 人参 TLC 色谱图

Fig. 4 TLC chromatogram of *Ginseng Radix et Rhizoma*

2.1.5 五味子

2.1.5.1 供试品溶液制备 同“2.1.2.1”枸杞子项下供试品溶液制备。

2.1.5.2 对照药材溶液的制备 取五味子对照药材1 g,加三氯甲烷20 mL,加热回流30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,即得。

2.1.5.3 对照品溶液制备 取五味子醇甲对照品,加甲醇制成每1 mL 含1 mg 的溶液,即得。

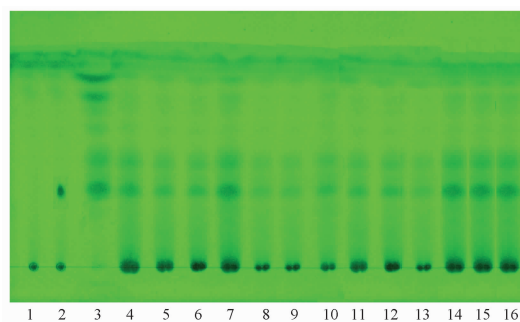
2.1.5.4 鉴别 吸取供试品溶液和阴性对照溶液各10 μL、对照药材和对照品溶液各2 μL,分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上使成条状,以石油醚(30℃~60℃)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(254 nm)下检视^[3],结果见图5。由图可知,在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上,供试品色谱显相同颜色的斑点,阴性对照无相应斑点。

2.2 天麻素含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

采用 Inertsil ODS-SP 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5

μm),柱温 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$,流动相:乙腈-0.05% 磷酸溶液 (3:97,V/V),流速 $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长为 220 nm ,进样量 $5\text{ }\mu\text{L}$ 。色谱图见图 6。由图可知,各成分分离度良好,阴性无干扰,理论塔板数按天麻素峰计应不少于 3 000。



1. 阴性样品 (negative sample) 2. 五味子醇甲对照品 (schizandrin reference substance) 3. 五味子对照药材 (Schisandrae Chinensis Fructus reference drug) 4~16. 样品 (samples)

图 5 五味子 TLC 色谱图

Fig. 5 TLC chromatogram of *Schisandrae Chinensis Fructus*

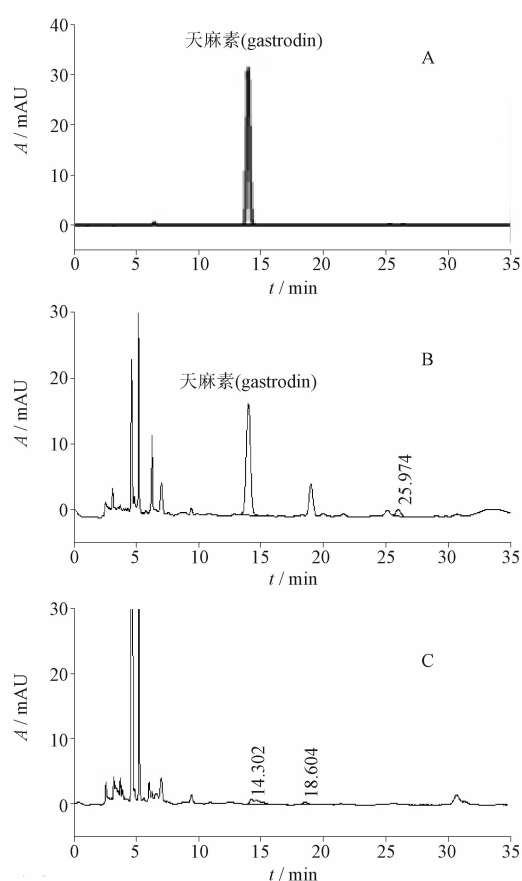


图 6 对照品(A)、样品溶液(B)和阴性样品(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 6 The chromatograms of standard solution(A), test solution(B) and negative solution(C)

2.2.2 溶液制备

2.2.2.1 对照品溶液 精密称定天麻素对照品约 12.5 mg ,置 50 mL 量瓶中,用流动相溶解并定容至刻度,作为对照品储备液。精密量取对照品储备液 5 mL 置 25 mL 量瓶中,用流动相稀释制成每 1 mL 含 $50\text{ }\mu\text{g}$ 的溶液,作为对照品溶液。

2.2.2.2 供试品溶液 将装量项下的该制剂混匀滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.2.2.3 阴性对照溶液 参照参茸天麻酒处方制备缺天麻的样品,按生产工艺方法制备阴性对照溶液。

2.2.3 线性关系考察

分别精密量取“2.2.2.1”项下对照品储备液各 1 、 2 、 5 、 7 、 10 mL 分别置 25 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,制成不同浓度的对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。以溶液质量浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为横坐标 (X)、峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归,得天麻素回归方程:

$$Y = 5\,396X - 804.79 \quad r = 0.999\,9$$

结果表明,天麻素质量浓度在 $9.76 \sim 97.6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系。

2.2.4 精密度试验

精密吸取对照品溶液各 $5\text{ }\mu\text{L}$,在“2.2.1”项色谱条件下连续进样测定 6 次。天麻素峰面积的平均值为 $392\,478$,RSD 为 0.4% ,表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验

取批号 160401 的样品适量,按“2.2.2.2”项方法制备供试品溶液,在 0 、 2 、 4 、 6 、 8 、 12 、 24 h 时依法测定。结果天麻素峰面积的平均值为 $402\,568$,RSD 为 0.8% ,表明供试品溶液室温放置 24 h 内基本稳定。

2.2.6 重复性试验

取批号 160401 的样品 6 份,按“2.2.2.2”项下供试品溶液制备方法,在“2.2.1”项下色谱条件进样测定。计算 6 份样品天麻素含量平均值为 $35.2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,RSD 为 0.1% ,表明本方法重复性良好。

2.2.7 加样回收率试验

精密量取批号 160401 样品 9 份,每份 25 mL ,置水浴蒸干,每 3 份为一组,每组残渣分别加入对照品储备液 4 、 5 、 6 mL ,加稀乙醇使溶解并定容至 25 mL ,过滤,按“2.2.1”项下测定天麻素峰面积,计算回收率,结果见表 1。

表1 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab. 1 Results of recovery tests

序号 (No.)	样品含量 (original)/mg	加入量 (spiked)/mg	测得量 (detected)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
1	0.88	0.95	1.84	101.05	100.2	1.1
2	0.88	0.95	1.82	98.95		
3	0.88	0.95	1.83	100.00		
4	0.88	1.19	2.06	99.16		
5	0.88	1.19	2.09	101.68		
6	0.88	1.19	2.06	99.16		
7	0.88	1.43	2.32	100.70		
8	0.88	1.43	2.30	99.30		
9	0.88	1.43	2.33	101.40		

2.2.8 样品中天麻素含量测定

取13批样品按“2.2.2”项下方法制备并依法测定,样品中含天麻以天麻素计,结果广西禅方药业股份有限公司10批样品的含量分布在 $34.0 \sim 38.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,河南宛东药业有限公司3批样品的含量分别为 40.6 、 60.0 、 $105.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3 讨论

3.1 TLC 条件筛选

原标准人参和天麻在同一薄层色谱法中检验,笔者考察了不同企业的薄层板,结果供试品色谱图均呈现背景干扰严重的现象,导致在与人参对照药材相应的各特征色谱斑点处,供试品色谱均无法清晰辨别。本研究优化了人参和天麻的薄层鉴别方法,并新增枸杞子、何首乌和五味子的薄层色谱方法,并同时考察了鹿茸的薄层色谱条件,但由于每1 mL酒剂中只含鹿茸药材 0.29 mg ,将供试品取样量提高至200 mL仍无法检测到与对照药材或甘氨酸对照品相应的主斑点,因此考虑到样本量的问题该制剂无法建立鹿茸的薄层定性鉴别方法。

为了考察上述薄层色谱法的系统耐用性,预试验中经对高温($35 \text{ }^{\circ}\text{C} \sim 40 \text{ }^{\circ}\text{C}$)、高湿($70\% \sim 90\%$)、低温($4 \text{ }^{\circ}\text{C} \sim 10 \text{ }^{\circ}\text{C}$)、低湿($20\% \sim 40\%$)薄层展开实验条件及不同厂家薄层板进行考察,结果表明,各条件下供试品色谱图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。

3.2 HPLC 条件筛选

天麻为方中君药,具有平肝息风止痉的功效。故拟定选择天麻素与对羟基苯甲醇的总量作为本制

剂的质控指标。笔者在定量分析过程中参考了文献^[8-9]的色谱条件同时测定天麻素与对羟基苯甲醇的含量,但试验后发现,由于本制剂为乙醇浸泡提取工艺,因而13批供试液中对羟基苯甲醇峰面积小,其含量均极低(少于 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),故最终确定只建立天麻素的含量测定方法。使用3种品牌色谱柱与3种品牌的HPLC仪以考察该方法的耐用性,测定结果的RSD均小于 1.5% ,表明含量测定方法通用性强,耐用性好。

参茸天麻酒已上市17年,市场销量稳定,现行质量标准存在检验项目缺失、检验方法缺陷的问题,因此加强其质控方法和标准的研究,无疑是提高企业产品质量、保障临床疗效的重要手段。本研究中收集的样品涵盖目前上市的所有企业,且每家企业样品收集量均不少于3批次,因此本研究提高的标准亦可作为企业内控质量标准。

参考文献

- [1] 卫生部药品标准. 中药成方制剂第三册[S]. 1991:109
Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Ministry of Public Health. PR China. Chinese Medicine Prescription Preparation. Vol III [S]. 1991:109
- [2] 曹春林. 中药制剂汇编[M]. 北京:人民卫生出版社,1983:128
CHAO CL. Compilation of Chinese Medicine Preparations [M]. Beijing: People's Medical Publishing House,1983:128
- [3] 中华人民共和国药典2015年版. 一部[S]. 2015: 8,58,66,249
ChP 2015. Vol I [S]. 2015:8,58,66,249
- [4] 李远荣,李雯,陈丽娟,等. 益眼明口服液薄层鉴别方法研究[J]. 北方药学,2013,10(1):10
LI YR, LI W, CHEN LJ, et al. Study of TLC identification for Yiyanning Oral Liquid[J]. Northern Pharm,2013,10(1):10

- [5] 徐芳琴,马晨超,曹金一,等. 露源胶囊中枸杞子、女贞子的薄层色谱鉴别研究[J]. 中国药业,2016,25(20):57
XU FQ, MA CC, CAO JY, *et al.* Identification of LyciumbarbarumL and Ligustrum lucidum Ait in Luyuan Capsules by TLC[J]. China Pharm, 2016, 20(25):57
- [6] 靳贝贝,梁惠珍,裴香萍,等. 门氏护胃颗粒的薄层鉴别和含量测定研究[J]. 中华中医药杂志,2019,34(6):2758
JIN BB, LIANG HZ, PEI XP, *et al.* Research on the TLC identification and content determination of Mens' Huwei Granules [J]. China J Tradit Chin Med Pharm,2019,34(6):2758
- [7] 廖格斯,汪宇,于士龙,等. 和胃颗粒质量标准研究[J]. 实用药物与临床,2016,19(12):1526
LIAO GS, WANG Y, YU SL, *et al.* Quality standards for Hewei granules[J]. Pract Pharm Clin Rem,2016,19(12):1526
- [8] 刘旭燕,张公信,田孟华,等. 不同等级昭通乌天麻与其他产地天麻的天麻素含量测定及比较[J]. 中国现代中药,2015,17(1):35
XIU XY,ZHANG GX,TIAN MH, *et al.* Determination of Gastrodine in Rhizoma Gastrodiae of different grades and origins[J]. Mod Chin Med,2015,17(1):35
- [9] 郭丽,贾金艳,李霞,等. RP-HPLC 法同时测定强力天麻杜仲胶囊中6种成分[J]. 中成药,2016,38(8):1744
GUO L, JIA JY LI X, *et al.* Simultaneous determination of six constituents in Qiangli Tianma Duzhong Capsules by RP-HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med,2016,38(8):1744
(收稿日期:2019-07-21)