

活血散的质量标准研究^Δ

赵颖^{1*},周芙蓉²,朱维娜²,李文¹,谈瑄忠¹(1.南京市中医院药学部,南京 210001;2.南京市中医院中心实验室,南京 210001)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)15-2114-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.15.33

摘要 目的:建立活血散的质量标准。方法:采用显微鉴别法对散剂中天南星、土鳖虫、黄柏、地肤子进行定性鉴别。采用高效液相色谱法对制剂中黄柏碱、虎杖苷、药根碱、小檗碱、大黄素的含量进行测定;色谱柱为ZORBAX Eclipse Plus C₁₈,流动相为甲醇-0.1%磷酸(梯度洗脱),流速为0.4 ml/min,检测波长为240 nm,柱温为30 ℃,进样量为5 μl。结果:天南星、土鳖虫、黄柏、地肤子的显微鉴别图谱清晰。黄柏碱、虎杖苷、药根碱、小檗碱、大黄素检测进样量线性范围分别为0.159~5.073 μg($r=0.997\ 4$)、0.149~4.761 μg($r=0.999\ 9$)、0.239~7.649 μg($r=0.995\ 5$)、0.165~5.268 μg($r=0.997\ 2$)、0.012~0.382 μg($r=0.999\ 9$);精密密度、稳定性、重复性试验的RSD<3.0%;加样回收率分别为98.9%~104.1%(RSD=1.9%, $n=6$)、96.1%~101.7%(RSD=2.5%, $n=6$)、99.6%~105.1%(RSD=2.6%, $n=6$)、90.3%~98.2%(RSD=2.9%, $n=6$)、92.9%~96.4%(RSD=2.0%, $n=6$)。结论:该研究所建标准可用于活血散的质量控制。

关键词 活血散;显微鉴别;含量测定;黄柏碱;虎杖苷;药根碱;小檗碱;大黄素

Study on the Quality Standard of Huoxuesan

ZHAO Ying¹, ZHOU Fuqiong², ZHU Weina², LI Wen¹, TAN Xuanzhong¹(1.Dept. of Pharmacy, Nanjing Hospital of TCM, Nanjing 210001, China;2.Central Laboratory, Nanjing Hospital of TCM, Nanjing 210001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of Huoxuesan. METHODS: Microscopic identification method was adopted for the qualitative identification of *Rhizoma pinelliae*, *Eupolyphaga seu*, *Phellodendron amurense* and *Fructus kochiae* in the preparation. HPLC was adopted for the contents determination of phellodendrine, polydatin, jatrorrhizine, berberine and emodin: the column was ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ with methanol-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at a flow rate of 0.4 ml/min, the detection wavelength was 240 nm, column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 5 μl. RESULTS: Microscopic identification map of *R. pinelliae*, *E. seu*, *P. amurense* and *F. kochiae* was clear. The linear range was 0.159-5.073 μg($r=0.997\ 4$) for phellodendrine, 0.149-4.761 μg($r=0.999\ 9$) for polydatin, 0.239-7.649 μg($r=0.995\ 5$) for jatrorrhizine, 0.165-5.268 μg($r=0.997\ 2$) for berberine, 0.012-0.382 μg($r=0.999\ 9$) for emodin; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3.0%; recoveries were 98.9%-104.1%(RSD=1.9%, $n=6$), 96.1%-101.7%(RSD=2.5%, $n=6$), 99.6%-105.1%(RSD=2.6%, $n=6$), 90.3%-98.2%(RSD=2.9%, $n=6$) and 92.9%-96.4%(RSD=2.0%, $n=6$) respectively. CONCLUSIONS: The established standard can be used for the quality control of Huoxuesan.

KEYWORDS Huoxuesan; Microscopic identification; Content determination; Phellodendrine; Polydatin; Jatrorrhizine; Berberine; Emodin

活血散在南京市中医院临床上已经使用多年,其疗效确切,副作用小,深受广大患者的青睐。该方主要由天南星、黄柏等7味中药组合而成,具有活血化痰,消肿止痛之功效,临床多用于骨折、骨裂、软组织挫伤等跌打损伤诸症的治疗。前期活血散质量标准仅通过显微鉴别出草酸钙簇晶和草酸钙针晶,本研究运用显微鉴别方法对制剂中的天南星、土鳖虫等进行定性鉴别^[1-5],运用高效液相色谱(HPLC)法对制剂中黄柏碱、虎杖苷、药根碱、小檗碱、大黄素进行含量测定^[6-12],使其更加安全、可靠、有效地应用于临床。

1 材料

1.1 仪器

1290 Infinity型HPLC,包括紫外检测器(美国Agilent公司);BX43型正置荧光显微镜(日本Olympus公司);AL104型

电子天平(上海速展计量仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

活血散(南京市中医院,批号:150227、150316、150413,规格:500 g/袋);黄柏碱对照品(批号:114248-201008,纯度:98.7%)、虎杖苷对照品(批号:111575-200502,纯度:97.7%)、药根碱对照品(批号:113249-2011049,纯度:96.9%)、小檗碱对照品(批号:110713-9404,纯度:98.5%)、大黄素对照品(批号:110756-200110,纯度:98.7%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 显微鉴别

取过120目筛的样品适量,用水合氯醛溶液进行透化(水合氯醛50 g,加水15 ml和甘油10 ml使溶解),置显微镜下观察(见图1)。由图1可见,样品中各成分显微特征明显,在镜下可准确分辨。

2.2 含量测定

Δ 基金项目:南京市医学科技发展项目(No.YKK14141)

* 主管中药师,硕士。研究方向:中药质量标准。E-mail: 86371797@qq.com

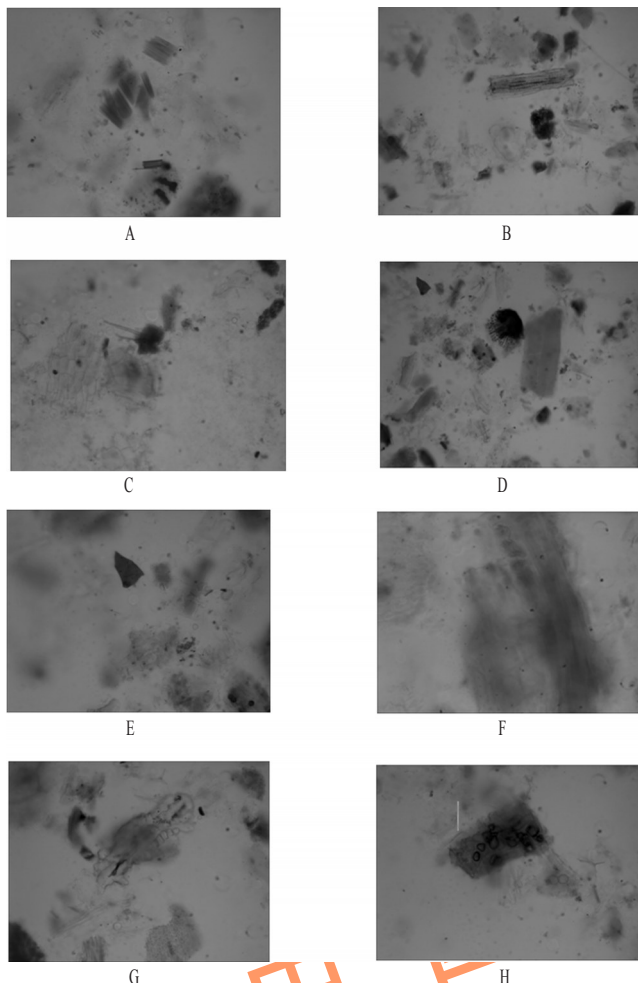


图1 显微镜鉴别结果

A. 天南星草酸钙针晶; B. 天南星导管; C. 土鳖虫刚毛; D. 土鳖虫横纹肌; E. 土鳖虫碎片; F. 黄柏晶纤维; G. 黄柏草酸钙方晶; H. 地肤子花被表皮细胞

Fig 1 Results of micrographs

A. *Arisaematis Rhizoma* calcium acicular crystal; B. *Arisaematis Rhizoma* catheter; C. *Eupolyphaga Steleophaga* bristles; D. *Eupolyphaga Steleophaga* striated muscle; E. *Eupolyphaga Steleophaga* fragment; F. *Phellodendron chinense* crystalline fiber; G. *Phellodendron chinense* calcium oxalate crystal; H. *Kochici scoparia* perianth epidermal cells

2.2.1 色谱条件 色谱柱: ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 甲醇(A)-0.1%磷酸(B), 梯度洗脱(洗脱程序见表1); 流速: 0.4 ml/min; 检测波长: 240 nm; 柱温: 30℃; 进样量: 5 μl。在上述色谱条件下, 理论板数以各待测成分峰计均不低于3 000, 分离度>1.5, 各成分基线分离良好, 详见图2。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间, min	A, %	B, %
0	5	95
10.0	23	77
22.0	23	77
22.1	70	30
28.0	70	30
28.1	5	95
29.0	5	95

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取黄柏碱、虎杖苷、药

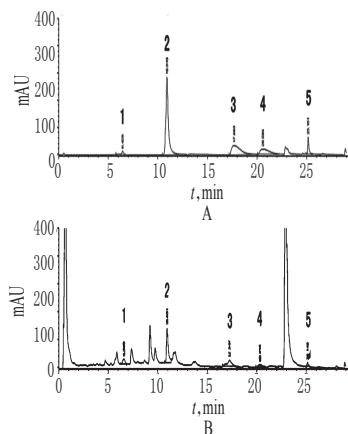


图2 高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 黄柏碱; 2. 虎杖苷; 3. 药根碱; 4. 小檗碱; 5. 大黄素

Fig 2 HPLC chromatograms

A. mixed reference substance; B. test sample; 1. phellodendrine; 2. polydatin; 3. jatrorrhizine; 4. berberine; 5. emodin

根碱、小檗碱、大黄素对照品适量, 加甲醇制成黄柏碱、虎杖苷、药根碱、小檗碱、大黄素质量浓度分别为317.07、297.56、478.05、329.27、23.90 μg/ml的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取样品1 g, 置于10 ml量瓶中, 加70%甲醇定容, 超声(功率: 250 W, 频率: 40 kHz)处理30 min, 经0.22 μm滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按活血散处方和制备工艺制备缺虎杖、黄柏的阴性样品, 并按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.2.5 线性关系考察 分别精密量取“2.2.2”项下混合对照品溶液0.5、1、4、8、16 μl, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以黄柏碱、虎杖苷、药根碱、小檗碱、大黄素进样量(x, μg)为横坐标, 峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程为与线性范围, 见表2。

表2 回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
黄柏碱	$y=35.221x+61.118$	0.997 4	0.159~5.073
虎杖苷	$y=1889.2x-56.229$	0.999 9	0.149~4.761
药根碱	$y=537.43x+263.62$	0.995 5	0.239~7.649
小檗碱	$y=203.95x+231.62$	0.997 2	0.165~5.268
大黄素	$y=216.44x+10.265$	0.999 9	0.012~0.382

2.2.6 精密度试验 取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次, 记录峰面积。结果, 黄柏碱、虎杖苷、药根碱、小檗碱、大黄素峰面积的RSD分别为2.62%、0.09%、0.76%、2.89%、0.84%(n=6), 表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(批号: 150227)适量, 分别于室温下放置0、2、4、8、10、12 h时进样测定, 记录峰面积。结果, 黄柏碱、虎杖苷、药根碱、小檗碱、大黄素峰面积的RSD分别为2.96%、2.57%、1.80%、2.60%、2.13%(n=6), 表明供试品溶液在12 h内基本稳定。

2.2.8 重复性试验 精密称取同一批样品(批号: 150227)适量, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 共6份, 再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 黄柏碱、虎杖苷、药根碱、小檗碱、大黄素峰面积的RSD分别为2.78%、2.51%、2.89%、1.92%、2.45%(n=6), 表明本方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 取已知含量样品(批号:150227)1 g,共6份,精密称定,分别加入一定质量的黄柏碱、虎杖苷、药根碱、小檗碱、大黄素对照品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量并计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果(n=6)
Tab 3 Results of recovery test(n=6)

待测成分	样品含量, μg	加入量, $\mu\text{g/ml}$	测得量, $\mu\text{g/ml}$	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
黄柏碱	278.78	290	580.1	104.1	101.5	1.9
	278.78	290	576.2	102.6		
	278.78	290	572.3	101.2		
	278.78	290	571.5	100.9		
	278.78	290	565.6	98.9		
	278.78	290	572.6	101.3		
虎杖苷	49.97	50	98.0	96.1	98.7	2.5
	49.97	50	100.8	101.7		
	49.97	50	98.7	97.5		
	49.97	50	98.2	96.5		
	49.97	50	100.7	101.5		
	49.97	50	99.4	98.9		
药根碱	80.23	80.5	163.5	103.4	102.6	2.6
	80.23	80.5	164.8	105.1		
	80.23	80.5	164.7	104.9		
	80.23	80.5	162.5	102.2		
	80.23	80.5	160.4	99.6		
	80.23	80.5	160.5	99.7		
小檗碱	36.88	37	70.3	90.3	95.1	2.9
	36.88	37	71.5	93.6		
	36.88	37	72.7	96.8		
	36.88	37	73.2	98.2		
	36.88	37	71.8	94.4		
	36.88	37	72.8	97.1		
大黄素	2.70	2.8	5.3	92.9	94.6	2.0
	2.70	2.8	5.3	92.9		
	2.70	2.8	5.4	96.4		
	2.70	2.8	5.4	96.4		
	2.70	2.8	5.4	96.4		
	2.70	2.8	5.3	92.9		

2.2.10 样品含量测定 取3批样品各适量,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果(n=3)

Tab 4 Results of content determination of samples(n=3)

样品批号	黄柏碱, $\mu\text{g/g}$	虎杖苷, $\mu\text{g/g}$	药根碱, $\mu\text{g/g}$	小檗碱, $\mu\text{g/g}$	大黄素, $\mu\text{g/g}$
150227	60.30	8.07	3.74	3.75	2.11
	59.45	8.05	3.69	3.78	2.13
	60.24	8.14	3.75	3.81	2.18
150316	61.57	8.16	3.85	3.79	2.12
	61.58	8.2	3.79	3.75	2.18
	62.68	8.17	3.81	3.8	2.16
150413	59.63	8.08	3.78	3.72	2.21
	58.42	8.12	3.76	3.69	2.19
	58.59	8.18	3.75	3.73	2.18

3 讨论

在做活血散的显微鉴别过程中,笔者考虑了水合氯醛试液、甘油醋酸试液、甘油-乙醇溶液、苏丹Ⅲ试液、钯红试液等,最终选定水合氯醛试液进行透化,显微鉴别图片清晰。

黄柏碱、虎杖苷、药根碱、小檗碱、大黄素分别在284、306、

225、228、254 nm波长处有较大吸收。笔者经过多次试验,发现以240 nm为检测波长时,5个待测成分紫外吸收均良好,有利于含量测定,故选择240 nm为本试验的检测波长^[13-18]。

笔者曾选用甲醇-水作为流动相,结果发现药根碱和小檗碱分离度较差,而以甲醇-磷酸水溶液系统作流动相时,各色谱峰能良好分离,故最终选用甲醇-0.1%磷酸为本试验的流动相。选用100%甲醇作为提取溶剂时,部分成分峰形较差,而以70%甲醇提取时,各成分峰形较好。

综上所述,本研究所建标准可用于活血散的质量控制。

参考文献

- [1] 周福成. 中华人民共和国药典中药材显微鉴别彩色图鉴[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 59、102、172、376.
- [2] 赵晓秋. 天南星和半夏的显微及理化鉴别[J]. 现代中药研究与实践, 2003, 17(4): 38.
- [3] 葛秀允. 天南星科有毒中药刺激性毒性成分及砒制解毒共性机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2009.
- [4] 邵燕, 辛俐华, 孙金霞, 等. 鳖甲煎丸中3种昆虫药刚毛及体壁碎片的显微鉴别研究[J]. 中成药, 2012, 34(12): 2 358.
- [5] 刘丽, 曲静, 康廷国. 中风回春丸中五种动物药刚毛的显微鉴别研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 2 964.
- [6] 李菁雯, 陈祥龙, 孟祥智. 虎杖及其提取物的研究进展[J]. 中医药学报, 2011, 39(3): 103.
- [7] 俸灵林. 虎杖的化学成分及其质量研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2003.
- [8] 刘晓蕾. 黄柏中盐酸小檗碱超声波经皮渗透量实验研究[D]. 太原: 山西大学, 2013.
- [9] 胡俊青, 胡晓. 黄柏化学成分和药理作用的现代研究[J]. 当代医学, 2009, 7(7): 139.
- [10] 吴嘉瑞, 张冰, 张光敏. 黄柏药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(11): 160.
- [11] 杨周平, 武志军. 中药黄柏的药理作用和临床应用研究[J]. 甘肃医药, 2010, 29(3): 329.
- [12] 林观样, 童洪飞, 陈辉, 等. 大黄素对体外诱导人血来源树突状细胞的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2012, 31(39): 42.
- [13] 周德庆, 郭志雄, 罗泽渊, 等. HPLC法测定黄柏中黄柏碱的含量[J]. 中成药, 2003, 25(12): 1 002.
- [14] 张海欢, 缪红. HPLC法测定疏风解毒胶囊中虎杖苷[J]. 中成药, 2013, 35(10): 2 281.
- [15] 张倩, 蔡丽芬, 钟国跃, 等. RP-HPLC法同时测定关黄柏中小檗碱、药根碱、巴马汀及黄柏酮含量的方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(16): 2 061.
- [16] 师永清, 康淑荷, 王爱军. HPLC法同时测定黄连双清丸中栀子苷、芍药苷、黄芩苷、盐酸小檗碱和大黄素的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(9): 1 612.
- [17] 唐洪梅, 廖小红, 何嘉仑. HPLC法测定肠激安制剂中芍药苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱[J]. 中成药, 2012, 34(5): 853.
- [18] 李红玲, 莫炫永. HPLC法同时测定川黄柏中盐酸黄柏碱和盐酸小檗碱的含量[J]. 中国药房, 2014, 25(27): 2 562.

(收稿日期: 2015-10-27 修回日期: 2016-02-23)

(编辑: 张 静)