

化痔片的质量标准研究

姚 闽^{1*}, 赖娟华¹, 胡 蓉^{1#}, 李玉云¹, 万仁甫², 肖草茂^{1#} (1. 江西省药物研究所, 南昌 330029; 2. 江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

中图分类号 R283.64; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)15-1406-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.15.20

摘要 目的: 建立化痔片的质量标准。方法: 采用薄层色谱(TLC)法对制剂中槐米、茜草、枳壳、三七进行定性鉴别; 利用高效液相色谱法测定制剂中芦丁的含量: 色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-1%冰醋酸溶液(42:58, V/V), 检测波长为 257 nm。结果: TLC图中能清晰地鉴别出槐米、茜草、枳壳、三七的特征斑点, 阴性对照无干扰。芦丁的质量浓度在 10.086~504.280 μg/ml 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.9999$); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD<2%; 平均加样回收率为 99.69%, RSD=0.45% ($n=6$)。结论: 所建标准可用于控制化痔片的质量。

关键词 化痔片; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 质量标准; 槐米; 茜草; 枳壳; 三七; 芦丁

Quality Standard of Huazhi Tablets

YAO Min¹, LAI Juan-hua¹, HU Rong¹, LI Yu-yun¹, WAN Ren-fu², XIAO Cao-mao¹ (1. Jiangxi Institute of Materia Medica, Nanchang 330029, China; 2. Dept. of Pharmacy, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of Huazhi tablets. METHODS: TLC was used for identifying *Sophora japonica*, *Rubia cordifolia*, *Citrus aurantium* and *Panax notoginseng* in the preparation. HPLC method was adopted to determine the content of rutin. The determination was performed on Hypersil BDS C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-1% glacial acetic acid (42:58, V/V). The detection wavelength was set at 257 nm. RESULTS: TLC spots of them can be identified clearly without interference from negative control. The linear range of rutin were 10.086-504.280 μg/ml ($r=0.9999$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%; average recoveries were 99.69% (RSD=0.45%, $n=6$). CONCLUSIONS: The standard can be used for the quality control of Huazhi tablets.

KEYWORDS Huazhi tablets; TLC; HPLC; Quality standard; *Sophora japonica*; *Rubia cordifolia*; *Citrus aurantium*; *Panax notoginseng*; Rutin

化痔片收载于《中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂)》第15册(WS-3-B-2854-98), 由槐米、茜草、枳壳、三棱、三七等五味中药组成^[1-2], 功能主治包括清热、凉血止血、行气散瘀等, 临床用于治疗内痔、外痔、混合痔、内外痔血栓^[3-4]。该药品原标准中仅采用理化方法鉴别其中的黄酮类化合物, 专属性不强, 且无含量控制项^[1]。鉴于此, 笔者采用薄层色谱(TLC)法对方中槐米、茜草、枳壳、三七进行定性鉴别, 并采用高效液相色谱(HPLC)法测定槐米中芦丁的含量, 旨在更加全面地控制化痔片的质量。

1 材料

1.1 仪器

HPLC仪, 含UV200 II型紫外可变波长检测器, P200型高压恒流泵、EC2000型色谱工作站(大连依利特分析仪器有限公司); Q-250DE型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 功率: 250 W, 频率: 25 kHz); AE100型电子天平、M3型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

1.2 药品与试剂

7批化痔片(批号: 20111011、20111012、20111013、

20111014、20111017、20111018、20111019)以及阴性样品均由江西省药物研究所自制; 芦丁(批号: 0080-9705)、柚皮苷(批号: 110722-201009)、人参皂苷Rg₁(批号: 110703-200924)对照品与茜草(批号: 1049-0301)对照药材均购自中国食品药品检定研究院; 硅胶G(青岛海洋化工有限公司); 甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 槐米的TLC鉴别 取本品20片, 研细, 混匀, 称取0.2 g样品粉末, 加甲醇5 ml, 密塞, 振摇10 min, 滤过, 取滤液作为供试品溶液; 再取缺槐米的阴性样品, 同法制成缺槐米阴性对照溶液; 另取芦丁对照品, 加甲醇制成每1 ml含2 mg的溶液, 作为对照品溶液。吸取上述3种溶液各10 μl, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶G薄层板上, 以乙酸乙酯-甲酸-水(8:1:1, V/V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以三氯化铝试液, 待乙醇挥干后置紫外光灯(365 nm)下检视。结果表明, 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点; 阴性对照无干扰。槐米的TLC图见图1。

2.1.2 茜草的TLC鉴别 取本品20片, 研细, 混匀, 称取0.5 g样品粉末, 加甲醇10 ml, 超声提取30 min, 滤过, 滤液浓缩至约1 ml, 作为供试品溶液; 再取缺茜草的阴性样品, 同法制成缺茜草阴性对照溶液; 另取茜草对照药材0.5 g, 同法制成对照药材

* 工程师。研究方向: 天然药物。电话: 0791-88105994。E-mail: 2337263942@qq.com

通信作者: 副研究员, 硕士。研究方向: 天然药物。电话: 0791-88105994

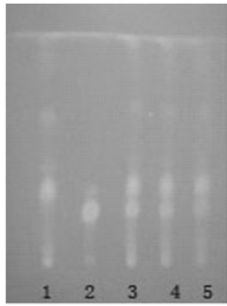


图1 槐米的TLC图

1.缺槐米阴性对照;2.芦丁对照品;3~5.供试品

Fig 1 TLC of *Sophora japonica*

1.negative control without *S. japonica*; 2.rutin control; 3-5.test samples

溶液。吸取上述3种溶液各10 μl,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶G薄层板上,以石油醚(60~90℃)-丙酮(4:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,立即置紫外光灯(365 nm)下检视。结果表明,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点;阴性对照无干扰。茜草的TLC图见图2。

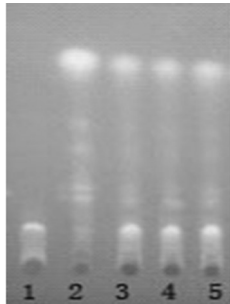


图2 茜草的TLC图

1.缺茜草阴性对照;2.茜草对照药材;3~5.供试品

Fig 2 TLC of *Rubia cordifolia*

1. negative control without *R. cordifolia*; 2. Rubiae Radix et Rhizoma reference substance; 3-5. test samples

2.1.3 枳壳的TLC鉴别 取本品20片,研细,混匀,称取2 g样品粉末,加甲醇20 ml,回流提取30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水20 ml使溶解,用乙酸乙酯20 ml振摇提取,提取液蒸干,残渣加甲醇2 ml使溶解,作为供试品溶液;再取缺枳壳的阴性样品,同法制成缺枳壳阴性对照溶液;另取柚皮苷对照品,加甲醇制成每1 ml含0.5 mg的溶液,作为对照品溶液。吸取上述3种溶液各10 μl,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶G薄层板上,以苯-乙酸乙酯-甲酸-水(1:12:2.5:3, V/V/V/V)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以三氯化铝试液,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果表明,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点;阴性对照无干扰。枳壳的TLC图见图3。

2.1.4 三七的TLC鉴别^[5] 取本品10片,研细,加甲醇20 ml,超声提取30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水饱和的正丁醇20 ml使溶解,用氨试液振摇提取2次,每次10 ml,弃去氨试液层,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为供试品溶液;再取缺三七的阴性样品,同法制成缺三七阴性对照溶液;另取人参皂苷Rg₁对照品,加甲醇制成每1 ml含1 mg的溶液,作为对照品溶液。吸取上述3种溶液各5 μl,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-

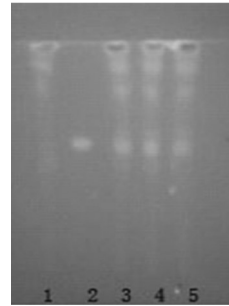


图3 枳壳的TLC图

1.缺枳壳阴性对照;2.柚皮苷对照品;3~5.供试品

Fig 3 TLC of *Citrus aurantium*

1.negative control without *C. aurantium*; 2.naringin control; 3-5. test samples

甲醇-水(15:40:22:10, V/V/V/V)10℃以下放置的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以硫酸乙醇溶液,于105℃下加热至斑点显色清晰,日光下检视。结果表明,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;阴性对照无干扰。三七的TLC图见图4。

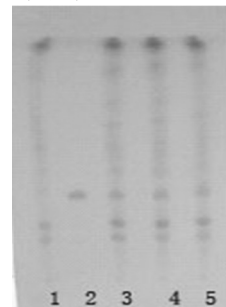


图4 三七的TLC图

1.缺三七阴性对照;2.人参皂苷Rg₁对照品;3~5.供试品

Fig 4 TLC of *Panax notoginseng*

1.negative control without *P. notoginseng*; 2.ginsenoside Rg₁ control; 3-5. test samples

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil BDS C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-1%冰醋酸溶液(42:58, V/V); 流速: 1 ml/min; 检测波长: 257 nm^[3]; 柱温: 25℃; 进样量: 10 μl。

2.2.2 溶液的制备 (1)对照品溶液: 精密称取于120℃减压干燥至恒质量的芦丁对照品适量,加甲醇制成每1 ml含0.1 mg的溶液,即得。(2)供试品溶液: 取本品20片,精密称定,研细,混匀,精密称取粉末约0.2 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 ml,称定质量,超声提取30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液2 ml,置10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。(3)阴性对照溶液: 取缺槐米的阴性样品粉末,按供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液,即得。

2.2.3 系统适用性试验 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液与阴性对照溶液各10 μl,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,主峰保留时间为11.18 min,供试品中芦丁与其他组分分离较好,且阴性对照无干扰。理论板数以芦丁色谱峰计算应为11 091.92。色谱见图5。

2.2.4 线性关系考察 精密称取于120℃减压干燥至恒质量的芦丁对照品适量,加甲醇制成每1 ml含0.5 mg的溶液,分别

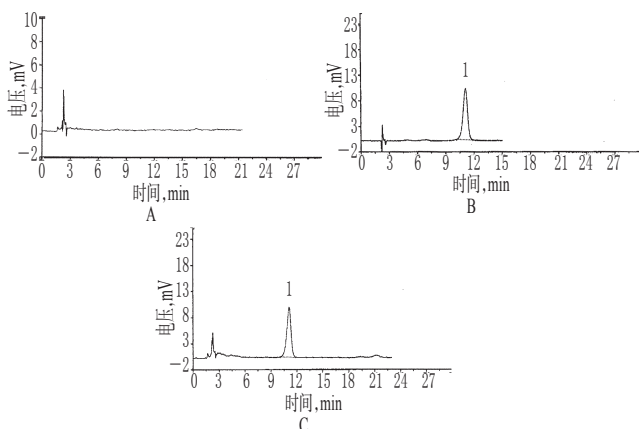


图5 高效液相色谱图

A. 缺槐米阴性对照; B. 芦丁对照品; C. 供试品; 1. 芦丁

Fig 5 HPLC chromatograms

A. negative control without *S. japonica*; B. rutin control; C. test sample; 1. rutin

精密吸取该溶液 0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、5.0、10.0 ml, 置 10 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别精密吸取 10 μ l 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 记录峰面积。以峰面积积分值(A)对对照品质量浓度(x)进行线性回归, 得回归方程为 $A = 3506556.47557x - 13739.24856$ ($r = 0.9999, n = 7$)。结果表明, 芦丁的质量浓度在 10.086~504.280 μ g/ml 范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μ l, 按上述色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果显示, $RSD = 0.86\%$ ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液适量, 分别于 0、2、4、6、8、10 h 按上述色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果显示, $RSD = 1.34\%$ ($n = 6$), 表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 取同一批样品粉末适量, 按“2.2.2(2)”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 再按上述色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算样品含量。结果显示, 每片样品中芦丁的平均含量为 25.493 mg, $RSD = 0.66\%$ ($n = 6$), 表明本方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取已知含量的样品粉末适量, 共 6 份, 精密称定, 分别精密加入芦丁对照品适量, 按“2.2.2(2)”项下方法制备供试品溶液, 再按上述色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果 ($n = 6$)

Tab 1 Result of recovery tests ($n = 6$)

序号	称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
1	0.1054	10.184	9.601	19.813	100.28		
2	0.1071	10.349	9.406	19.715	99.58		
3	0.1162	11.228	9.595	20.761	99.36	99.69	0.45
4	0.1044	10.088	9.631	19.728	100.09		
5	0.1057	10.213	9.593	19.784	99.76		
6	0.1039	10.040	9.694	19.645	99.08		

2.2.9 样品含量测定 取 7 批样品粉末各适量, 分别按“2.2.2(2)”项下方法制备供试品溶液, 再按上述色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以峰面积计算样品中芦丁的含量, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 ($n = 3$)

Tab 2 Results of content determination of samples ($n = 3$)

样品批号	含量, mg/片	\bar{x} , mg/片
20111011	25.577	
20111012	25.514	
20111013	24.901	
20111014	25.804	25.129
20111017	24.511	
20111018	24.707	
20111019	24.890	

3 讨论

在做三七药材的 TLC 鉴别试验时, 笔者曾参考文献方法, 以三七对照药材溶液及人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、三七皂苷 R₁ 的混合对照品溶液为对照^[6-8]。结果显示, 阴性对照溶液与三七对照药材及人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、三七皂苷 R₁ 对照品斑点位置上有相同颜色的斑点, 但是人参皂苷 Rg₁ 却与其他斑点分离度较好且阴性对照无干扰, 故三七的 TLC 鉴别仅采用人参皂苷 Rg₁ 作对照。

笔者在预试验中也做了三棱药材的 TLC 鉴别, 但图谱中阴性对照与三棱对照药材有干扰, 故未将其列入本研究中。

槐米为方中君药, 其指标性成分为芦丁, 故笔者参照 2010 年版《中国药典》(一部) 槐花项下芦丁的含量测定法^[9], 确定检测波长为 257 nm, 采用 HPLC 法测定本品中芦丁的含量。结果表明, 重复性好、回收率高, 适用于本品中芦丁的测定。在流动相的选择中, 笔者比较了甲醇-1% 冰醋酸溶液 (32:68, V/V) 与甲醇-1% 冰醋酸溶液 (42:58, V/V) 的分离效果。结果表明, 前者对应的芦丁峰保留时间太长, 而后者对应的芦丁峰保留时间与分离度均符合要求, 故选择甲醇-1% 冰醋酸溶液 (42:58, V/V) 作为流动相。在超声时间的确定试验中, 为了考察样品中芦丁是否提取完全, 笔者比较了 15、30、45 min 3 个不同的超声时间。结果表明, 样品超声 30 min 后已提取完全, 故确定超声时间为 30 min。

综上所述, 所建标准可用于控制化痔片的质量。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准: 中药成方制剂: 第十五册[S]. 1997: 39.
- [2] 《中药辞海》编写组. 中药辞海: 第一卷[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993: 1170.
- [3] 景志杰, 牛拴成, 张轩萍, 等. 化痔灵片对小鼠实验性疼痛的镇痛作用[J]. 山西医科大学学报, 2006, 37(1): 19.
- [4] 景志杰, 牛拴成, 张轩萍, 等. 化痔灵片对大鼠实验性炎症模型的抗炎作用[J]. 山西医科大学学报, 2006, 37(3): 264.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 11-12, 333-334.
- [6] 汪冰, 林永强, 徐丽华, 等. 芪参胶囊的质量标准研究[J]. 中国药事, 2013, 27(6): 592.
- [7] 陈壮, 岳桂华, 黄敏, 等. 芪七连胶囊的质量标准研究[J]. 中国药房, 2013, 24(27): 2551.
- [8] 屈美伦. 脂衡片薄层色谱质量标准的建立[J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(1): 118.

(收稿日期: 2013-04-02 修回日期: 2013-05-10)