

金乌健骨胶囊的质量标准研究[△]

周训蓉*, 杨 亮(贵阳中医学院第二附属医院, 贵阳 550001)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)30-4247-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.30.25

摘要 目的:建立金乌健骨胶囊的质量标准。方法:采用显微鉴别法对制剂中的三七进行显微鉴别;采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的白芍、青风藤进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定制剂中芍药苷的含量。色谱柱为ZORBAX SB-C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸(13:87, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为230 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:三七显微鉴别特征明显;白芍、青风藤TLC分离度好、斑点清晰;芍药苷检测质量浓度线性范围为0.014~1.412 μg/ml($r=0.999\ 2$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率为95.73%~99.48%,RSD为1.54%($n=6$)。结论:该方法简便、准确、重复性好,可用于金乌健骨胶囊的质量控制。

关键词 金乌健骨胶囊;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法;芍药苷;三七;白芍;青风藤

Study on the Quality Standard of Jinwu Jiangu Capsule

ZHOU Xun-rong, YANG Liang (The Second Hospital Affiliated to TCM College of Guiyang, Guiyang 550001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of Jinwu jiangu capsule. METHODS: Microscopy was used to identify *Panax notoginseng*; TLC was used to identify *Paeonia lactiflora* and *Sinomenii* Caulis; HPLC was used to determine the content of paeoniflorin. The column was ZORBAX SB-C₁₈ with mobile phase of acetonitrile -0.1% phosphoric acid (13:87, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 230 nm, column temperature was 30 ℃ and injection volume was 10 μl. RESULTS: Microscopy showed *P. notoginseng* had obvious features; *P. lactiflora* and *Sinomenii* Caulis in preparation were well-separated with clear spots. The linear range of paeoniflorin was 0.014-1.412 μg/μl ($r=0.999\ 2$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recovery was 95.73%-99.48% (RSD=1.54%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the quality control of Jinwu jiangu capsule.

KEYWORDS Jinwu jiangu capsule; Quality standard; TLC; HPLC; Paeoniflorin; *Panax notoginseng*; *Paeonia lactiflora*; *Sinomenii* Caulis

溶剂如甲醇、1%醋酸-甲醇、80%丙酮-乙醇-氯仿等对盐酸小檗碱提取效果的影响,结果以甲醇提取效果最好。并考察了超声和回流两种提取方法,结果二者提取效果差异无统计学意义,因超声提取简便易行,故选择超声提取法。另外,还比较了苯-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-浓氨溶液(6:3:1.5:1.5:0.5, V/V/V/V)和环己烷-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-水(6:3:1.5:1.5:0.3, V/V/V/V)两种展开剂,发现前者斑点拖尾严重而后者斑点清晰。故最终确定了上述黄柏TLC鉴别方法。

川楝子TLC鉴别中,由于川楝子含有脂肪油,对鉴别干扰较大^[4],因此比较了用乙醇、乙酸乙酯、水进行前处理的效果。结果发现,水提效果最好,故选用水提液进行TLC鉴别。

HPLC法测定中,盐酸小檗碱溶液经紫外扫描,在230、265、300 nm波长处均有较强吸收,而选用265 nm为检测波长可避免测定时其他组分的干扰。预试验中,以乙腈-0.1%磷酸溶液(50:50, V/V)为流动相时发现主成分峰与相邻峰分离较

好,而加入十二烷基磺酸钠可以使流动相的离子对保持稳定,并且能够改善峰形,保证结果可靠。

综上所述,该方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于金柏胶囊的质量控制。

参考文献

- [1] 刘俊岭,罗力赛,王玲玲,等.复发性口腔溃疡的中医药治疗进展[J].环球中医药,2012,5(7):552.
- [2] 幸梦琳,张永慧,刘海枝.复发性口腔溃疡的中医药治疗进展[J].光明中医,2013,28(7):1524.
- [3] 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,2010:39,286.
- [4] 丁志军,罗美兰,廖银根,等.金菊解毒颗粒质量考察[J].中国医院药学杂志,2013,33(6):501.
- [5] 车艳楠,曹丽萍,李曙光.加味双柏软膏的制备及质量控制[J].中国药业,2015,24(1):37.
- [6] 董占军,韩桂茹,李桂.颈复康颗粒的一板多信息薄层鉴别研究[J].河北中医,2014,36(1):107.
- [7] 刘红亚,崔红梅.川楝子药材中川楝素的薄层色谱鉴别[J].时珍国医国药,2008,19(7):1674.

(收稿日期:2014-12-26 修回日期:2015-05-08)

(编辑:张 静)

[△]基金项目:贵州省优秀科技教育人才省长专项资金项目(No.黔省专合字[2011]86号);贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(No.QZYY2013-70);贵州省科学技术基金项目(No.黔科合LH字[2014]7323号)

*副主任药师。研究方向:医院药学。电话:0851-85283585。E-mail:13308500362@189.cn

类风湿关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是一种以对称性多发性关节炎为主要临床表现的自身免疫性疾病。该病不易治愈,被世界卫生组织列为疑难症之一,一旦患病往往伴随终身。西药治疗RA因长期服用毒性较大、药品不良反应较多、部分患者疗效较差等因素^[1],临床使用受到诸多限制。金乌健骨胶囊为贵阳中医学院第二附属医院自制制剂,主要用于RA的治疗,临床疗效较好^[2]。为有效控制金乌健骨胶囊的质量,本课题组根据处方所含药味的化学成分及剂型特点,研究了其中三七的显微鉴别,白芍、青风藤的薄层色谱(TLC)鉴别和芍药苷^[3-4]的含量测定方法。

1 材料

1.1 仪器

1100型高效液相色谱(HPLC)仪,包括紫外-可变波长检测器(美国Agilent公司);AG285型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);DL-1800E型超声震荡器(上海五相仪器仪表有限公司);XSP-16A型显微镜(苏州南光电子科技有限公司);硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂)。

1.2 药品与试剂

金乌健骨胶囊(贵阳中医学院第二附属医院自制,批号:20130601、20130701、20130801,规格:0.45 g/粒);白芍、青风藤对照药材(批号分别为120905-201109、121251-201002)和芍药苷对照品(批号:110736-201136,纯度:96%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、磷酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果^[5]

2.1 三七的显微鉴别

取样品内容物1 g,混匀,取适量粉末制片,按2010年版《中国药典》(一部)附录II C进行显微鉴别,可见淀粉粒甚多,单粒呈圆形、半圆形或圆多角形,复粒由2~10余分粒组成;可见梯纹导管、网纹导管及螺纹导管。结果显示,三七显微鉴别特征明显,详见图1。

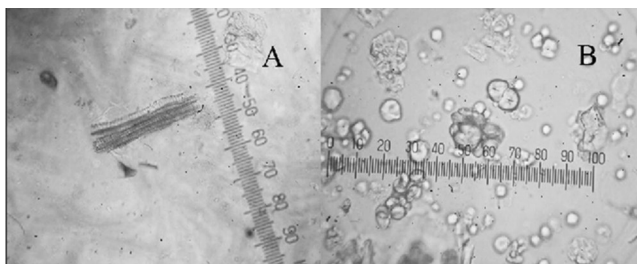


图1 三七显微鉴别

A. 导管; B. 淀粉粒

Fig 1 Microscopic identification of *Paeonia notoginseng*

A. vessel; B. starch grain

2.2 定性鉴别

2.2.1 白芍 取样品内容物2 g,加乙醇10 ml,振摇5 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇1 ml使溶解,得供试品溶液。取缺白芍的阴性样品2 g,同供试品溶液制备方法制得阴性对照溶液。另取白芍对照药材2 g,制成粉末,同供试品溶液制备方法制得对照药材溶液。按TLC法[2010年版《中国药典》(一部)附录VIB]试验,吸取上述3种溶液各10 μl,分别点于同一硅胶

G薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸溶液,加热至斑点显色清晰,置日光下检视。结果显示,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斑点,且阴性对照无干扰,详见图2A。

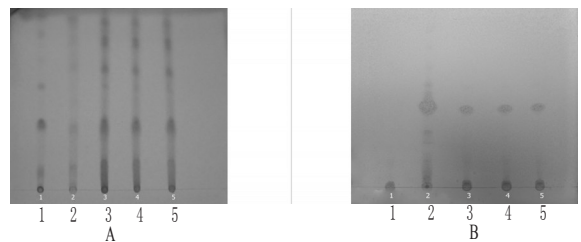


图2 薄层色谱图

A. 白芍[1.对照药材; 2.阴性对照; 3~5.供试品(批号:20130601、20130701、20130801)]; B. 青风藤[1.阴性对照; 2.对照药材; 3~5.供试品(批号:20130601、20130701、20130801)]

Fig 2 TLC chromatograms

A. *Paeonia lactiflora*[1. control medicinal herb; 2. negative control; 3-5. test samples (batch number: 20130601, 20130701, 20130801)]; B. *Sinomenii Caulis*[1. negative control; 2. control medicinal herb; 3-5. test samples (batch number: 20130601, 20130701, 20130801)]

2.2.2 青风藤 取样品内容物2.5 g,加乙醇25 ml,加热回流1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇1 ml使溶解,作为供试品溶液。取缺青风藤的阴性样品2.5 g,同供试品溶液制备方法制得阴性对照溶液。另取青风藤对照药材2 g,制成粉末,同供试品溶液制备方法制得对照药材溶液。按TLC法[2010年版《中国药典》(一部)附录VIB]试验,吸取上述3种溶液各10 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲醇-水(2:4:2:1, V/V/V/V)10℃以下放置的上层溶液为展开剂,置于浓氨试液预饱和20 min的展开缸内,展开,取出,晾干,喷以碘化铍钾试液,加热至斑点显色清晰,置日光下检视。结果显示,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斑点,且阴性对照无干扰,详见图2B。

2.3 芍药苷的含量测定

2.3.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:ZORBAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸(13:87, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:230 nm;柱温:30℃;进样量:10 μl。在上述色谱条件下,理论板数以芍药苷峰计应不低于2000,各成分基线分离良好,详见图3。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品适量,加甲醇制成每1 ml含141.247 μg的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密称取样品内容物约0.250 0 g,置于锥形瓶中,加25 ml甲醇,称定质量,超声(功率:250 W,频率:40 kHz,下同)提取40 min,以甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得^[9]。

2.3.4 阴性对照溶液的制备 精密称取缺白芍的阴性样品约0.250 0 g,按“2.3.3”项下方法制得阴性对照溶液。

2.3.5 线性关系考察 精密量取“2.3.2”项下对照品溶液0.1、0.5、1、2.5、5、10 μl,分别置于10 ml量瓶中,加流动相定容,制得系列对照品溶液。精密吸取上述系列对照品溶液各10 μl,

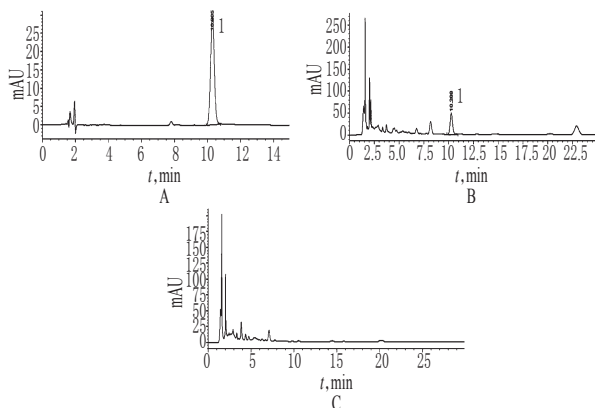


图3 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.芍药苷

Fig 3 HPLC chromatograms

A.reference substance;B.test sample;C.negative control;1.paeoniflorin
按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以芍药苷质量浓度(x , $\mu\text{g/ml}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=1\,257.2x+14.923$ ($r=0.999\,2$)。结果表明,芍药苷检测质量浓度线性范围为 $0.014\sim 1.412\ \mu\text{g/ml}$ 。

2.3.6 精密度试验 取“2.3.2”项下对照品溶液适量,按“2.3.1”项下色谱条件连续进样6次测定,记录峰面积。结果,芍药苷峰面积的RSD为 0.21% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.7 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号:20130601)适量,分别于放置0、2、4、8、18、24、48 h时进样测定,记录峰面积。结果,芍药苷峰面积的RSD为 1.95% ($n=7$),表明供试品溶液在48 h内基本稳定。

2.3.8 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:20130601)适量,共6份,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,芍药苷峰面积的RSD为 0.93% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.3.9 加样回收率试验 取样品(批号:20130601)适量,共6份,分别加入适量对照品,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery test($n=6$)

称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.056 94	0.695 0	0.523 1	1.201 1	96.74	97.36	1.54
0.053 36	0.651 3	0.523 1	1.153 1	95.92		
0.061 69	0.753 0	0.523 1	1.268 9	98.62		
0.059 12	0.721 6	0.523 1	1.242 0	99.48		
0.059 25	0.723 2	0.523 1	1.234 1	97.67		
0.050 02	0.610 5	0.523 1	1.111 3	95.73		

2.3.10 样品含量测定 取3批样品各适量,分别按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定并计算含量,结果见表2。

3 讨论

表2 样品含量测定结果($n=3$)

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

批号	芍药苷含量, mg/g
20130601	3.038 2
20130701	3.053 0
20130801	2.958 5

本课题组前期根据《贵州省医疗机构制剂技术评审要点(中药、民族药)(试行)》^[6]相关技术要求,对方中烫狗脊、乌梢蛇、千年健、姜黄等进行了TLC鉴别,由于方法未能鉴别^[7-8]、存在阴性对照干扰,暂不列入质量标准草案。

试验前期,本课题组分别采用了Agilent SB-C₁₈、依利特Hypersil BDS C₁₈色谱柱进行分析,结果表明Agilent SB-C₁₈色谱柱分离效果最好,故选择该色谱柱;分别采用了乙腈-0.03%磷酸、乙腈-0.1%磷酸作为流动相进行洗脱,结果表明流动相为乙腈-0.1%磷酸时色谱峰分离效果及峰形较好,故选择该流动相;分别采用25、30℃柱温进行分析,结果表明30℃柱温的分离效果最好,故选择该柱温。

本课题组分别采用了甲醇、50%甲醇、70%乙醇作为提取溶剂,超声提取30 min进行分析,结果表明以甲醇超声提取芍药苷的含量最高,故选择该溶剂;以甲醇为溶剂,分别采用回流、超声方法提取有效成分,结果表明超声提取法可使芍药苷含量最高,故选择该方法;以甲醇为溶剂,分别比较了超声提取30、40、60 min的效果,结果表明超声提取40 min时芍药苷含量较高,且峰形较好,故选择该提取时间。

综上所述,该方法简便、准确、重复性好,可用于金乌健骨胶囊的质量控制。

参考文献

- [1] 徐晖,黄颖.中药治疗类风湿关节炎的研究进展[J].云南中医杂志,2015,36(1):88.
- [2] 马武开,钟琴,姚血明,等.苗药金乌健骨汤治疗类风湿关节炎临床观察[J].中华中医药杂志,2010,25(12):2190.
- [3] 杜蓉,张孟佑.HPLC法测定加味逍遥丸中芍药苷与甘草苷的含量[J].中国药房,2015,26(18):2571.
- [4] 王绍龙.榕须胶囊制剂工艺、质量标准及初步药效学研究[D].南宁:广西医科大学,2014.
- [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:附录10-11.
- [6] 贵州省食品药品监督管理局.贵州省医疗机构制剂技术评审要点:中药、民族药:试行[S/OL].(2009-11-17)[2014-07-23].http://www.gzhfda.gov.cn/read_Article_13_977.shtml.
- [7] 谭琴,沈婷,金芳,等.脉络通胶囊质量标准[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(19):93.
- [8] 刘聪,郝旭亮.柴青消癖胶囊质量标准研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(12):89.

(收稿日期:2015-05-21 修回日期:2015-08-21)

(编辑:张静)