

和肝利胆颗粒的质量标准研究[△]

胡 北*,马宏达,张朝绅,贾 辉,吴 琼,史国兵[#](沈阳军区总医院药剂科,沈阳 110016)

中图分类号 R283.6;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)39-3679-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.39.11

摘要 目的:建立和肝利胆颗粒的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对方中黄芩、五味子、茵陈、栀子进行定性鉴别;采用高效液相色谱法对黄芩中的黄芩苷进行含量测定;色谱柱为Welchrom C₁₈(200 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-水-磷酸(42:58:0.2, V/V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为280 nm。结果:TLC图中的斑点清晰、分离较好,阴性对照无干扰;黄芩苷的质量浓度在1~40 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.9997$),平均加样回收率为99.78%,RSD=2.68%($n=6$)。结论:所建标准可用于和肝利胆颗粒的质量控制。

关键词 和肝利胆颗粒;质量标准;黄芩苷;薄层色谱法;高效液相色谱法

Study on Quality Standard of Hegan Lidan Granules

HU Bei, MA Hong-da, ZHANG Chao-shen, JIA Hui, WU Qiong, SHI Guo-bing (Dept. of Pharmacy, General Hospital of Shenyang Military Command, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of Hegan lidan granules. METHODS: TLC method was used for the qualitative identification of *Scutellaria baicalensis*, *Schisandra chinensis*, *Artemisia capillaris* and *Gardenia jasminoides*. HPLC was used to determine the content of baicalin. The determination was performed on Welchrom C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-water-phosphoric acid (42:58:0.2, V/V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 280 nm. RESULTS: TLC spots were clear and well-separated without interference from negative sample. The linear range of baicalin was 1-40 μg/ml ($r=0.9997$) with an average recovery of 99.78% (RSD=2.68%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, specific, accurate and reliable. It can be used for the quality control of Hegan lidan granules.

KEYWORDS Hegan lidan granules; Quality standards; Baicalin; TLC; HPLC

和肝利胆颗粒为我院院内制剂,由黄芩、五味子、茵陈、金钱草、板蓝根、栀子、枳壳(炒)、柴胡(制)等8味中药组成,具有清热利湿、舒肝理气的功效,临床主要用于治疗急性黄疸型肝炎、慢性肝炎(活动期)和急慢性胆囊炎。黄芩为该方的主要成分,具有清热燥湿、泻火解毒之功效^[1],其主要有效成分黄芩苷具有保肝利胆、抗菌消炎、降压镇静等作用。为建立该制剂的质量标准,本试验采用薄层色谱(TLC)法对方中黄芩、五味子、茵陈、栀子进行了定性鉴别,并采用高效液相色谱(HPLC)法对黄芩中的黄芩苷进行了含量测定。

1 材料

1.1 仪器

全自动HPLC仪,配备W600型泵、2996型紫外检测器(美国Waters公司);AUW 120D型电子分析天平(日本岛津公司);水浴锅(金坛市双捷实验仪器厂);KQ3200型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

和肝利胆颗粒(批号:20130906、20130913、20130920)和各阴性样品均由沈阳军区总医院自制;黄芩苷对照品(批号:110715-201117)、黄芩对照药材(批号:120955-201008)、五味

子对照药材(批号:120922-201108)、五味子醇甲对照品(批号:110857-201211)、茵陈对照药材(批号:120950-201007)、栀子苷对照品(批号:11049-201115)均由中国食品药品检定研究院提供;水为重蒸水(自制),甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC鉴别

2.1.1 黄芩的TLC鉴别^[2-3] 取本品5g,研细,加甲醇20ml使溶解,超声(功率:150W,频率:40kHz)处理30min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1ml使溶解,作为供试品溶液。另取黄芩对照药材1g,同法制成对照药材溶液。再取按处方比例制成的缺黄芩的阴性样品5g,同法制成阴性对照溶液。照2010年版《中国药典》(一部)^[1]中的TLC法,吸取上述3种溶液各5μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(5:3:1:1, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以1%三氯化铁乙醇溶液,日光下检视。结果,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;阴性对照无干扰。黄芩的TLC图见图1、图2。

2.1.2 五味子的TLC鉴别^[4] 取本品10g,研细,加二氯甲烷30ml使溶解,超声(功率:150W,频率:40kHz)处理30min,滤过,滤液蒸干,残渣加二氯甲烷1ml使溶解,作为供试品溶液。另取五味子对照药材1g,同法制成对照药材溶液。再取五味子醇甲对照品适量,加二氯甲烷制成每1ml含1mg的溶液作为对照品溶液。又取按处方比例制成的缺五味子的阴性样品10g,同法制成阴性对照溶液。照2010年版《中国药典》

△ 基金项目:军队医疗机构制剂标准提高科研专项重点项目(No.13ZJZ02)

* 药师,硕士研究生。研究方向:中药分析。电话:024-28851751。E-mail:hubei.19831123@163.com

[#]通信作者:主任药师,博士研究生。研究方向:临床药学。电话:024-28856262。E-mail:sysgb@126.com

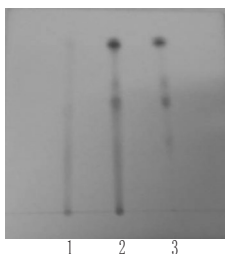


图1 黄芩的TLC图(专属性试验)

1.阴性对照;2.供试品;3.黄芩对照药材

Fig 1 TLC of *S. baicalensis* (specificity test)

1.negative control;2.test sample;3. Scutellariae Radix reference substance

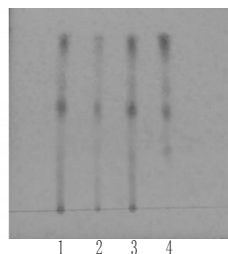


图2 黄芩的TLC图(重复性试验)

1~3.供试品;4.黄芩对照药材

Fig 2 TLC of *S. baicalensis* (reproducibility test)

1-3. test samples; 4. Scutellariae Radix reference substance



图5 茵陈的TLC图(专属性试验)

1.阴性对照;2.供试品;3.茵陈对照药材

Fig 5 TLC of *Artemisia capillaris* (specificity test)

1.negative control; 2.test sample; 3.Artemisiae Scopariae Herba reference substance

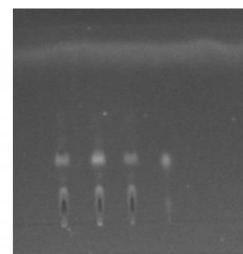


图6 茵陈的TLC图(重复性试验)

1~3.供试品;4.茵陈对照药材

Fig 6 TLC of *A. capillaris* (reproducibility test)

1-3.test samples; 4.Artemisiae Scopariae Herba reference substance

(一部)^[1]中的TLC法,吸取上述4种溶液各5 μl,分别点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板上,以石油醚(30~60℃)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1, V/V/V)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。结果,供试品色谱中,在与对照药材和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。五味子的TLC图见图3、图4。

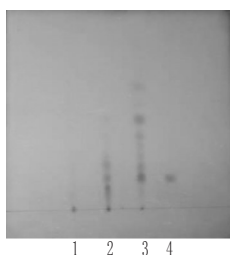


图3 五味子的TLC图(专属性试验)

1.阴性对照;2.供试品;3.五味子对照药材;4.五味子醇甲对照品

Fig 3 TLC of *Schinensis chinensis* (specificity test)

1.negative control; 2.test sample; 3.Schisandrae Chinensis Fructus reference substance; 4.schisandrin control

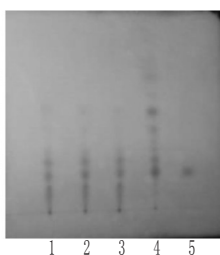


图4 五味子的TLC图(重复性试验)

1~3.供试品;4.五味子对照药材;5.五味子醇甲对照品

Fig 4 TLC of *S. chinensis* (reproducibility test)

1-3. test samples; 4. Schisandrae Chinensis Fructus reference substance; 5. schisandrin control

2.1.3 茵陈的TLC鉴别^[6] 取本品10 g,研细,加水30 ml,搅拌溶解,滤过,滤液用二氯甲烷振荡提取3次,每次30 ml,合并提取液,蒸干,残渣加二氯甲烷1 ml使溶解,作为供试品溶液。另取茵陈对照药材1 g,加水20 ml,煎煮30 min,滤过,取滤液同法制成对照药材溶液。再取按处方比例制成的缺茵陈的阴性样品10 g,同法制成阴性对照溶液。照2010年版《中国药典》(一部)^[1]中的TLC法,吸取上述3种溶液各5 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯-丙酮(6:4:0.5, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果,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。茵陈的TLC图见图5、图6。

2.1.4 栀子的TLC鉴别^[6-8] 取本品10 g,研细,加乙酸乙酯

50 ml,加热回流1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为供试品溶液。另取栀子苷对照品适量,加甲醇制成每1 ml含1 mg的溶液作为对照品溶液。再取按处方比例制成的缺栀子的阴性样品10 g,同法制成阴性对照溶液。照2010年版《中国药典》(一部)^[1]中的TLC法,吸取上述3种溶液各5 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以二氯甲烷-丙酮-甲醇-甲酸(5:2:1:0.5, 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,日光下检视。结果,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。栀子的TLC图见图7、图8。

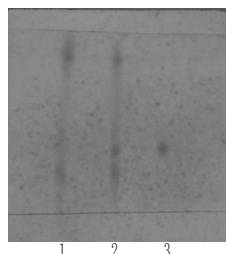


图7 栀子的TLC图(专属性试验)

1.阴性对照;2.供试品;3.栀子苷对照品

Fig 7 TLC of *Gardeniae jasmminoides* (specificity test)

1.negative control; 2.test sample; 3. gardenoside control

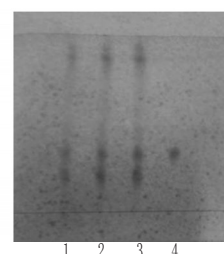


图8 栀子的TLC图(重复性试验)

1~3.供试品;4.栀子苷对照品

Fig 8 TLC of *Gardeniae Fructus* (reproducibility test)

1-3.test samples; 4.gardenoside control

2.2 含量测定^[9-10]

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Welchrom C₁₈(200 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水-磷酸(42:58:0.2, V/V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:280 nm;柱温:30℃。

2.2.2 对照品溶液的制备 取黄芩苷对照品适量,置五氧化二磷干燥器中减压干燥12 h以上,精密称定,加适量甲醇使溶解,制成每1 ml含黄芩苷10 μg的溶液,作为对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品约1 g,研细,精密称定,置具塞锥形瓶中,加70%乙醇50 ml,密塞,称质量,超声(功率:150 W,频率:40 kHz)处理30 min,放冷,再次精密称定,用70%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液1 ml,

置10 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 取按处方制备的缺黄芩的阴性样品1 g,按“2.2.3”项下方法制成阴性对照溶液。

2.2.5 专属性试验 分别精密吸取阴性对照溶液、供试品溶液、对照品溶液各20 μ l,按上述色谱条件进样测定。结果显示,色谱峰在与对照品色谱相应位置处无干扰峰出现,表明处方中其他成分对测定结果无影响。理论板数按黄芩苷峰计算应均不低于2 000;分离度 <1.5 。色谱见图5。

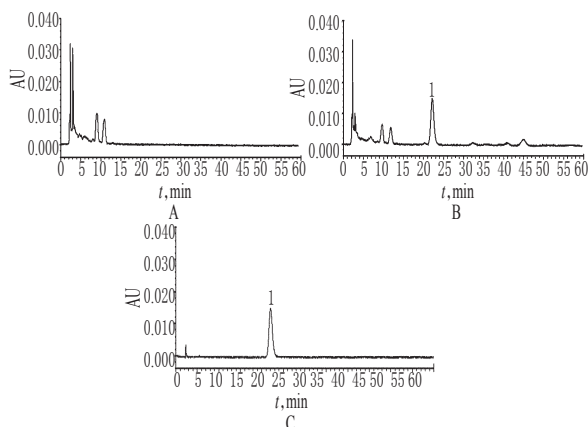


图5 高效液相色谱图

A.阴性对照;B.供试品;C.黄芩苷对照品;1.黄芩苷

Fig 5 HPLC chromatograms of baicalin

A.negative control;B.test sample;C.baicalin control; 1.baicalin control

2.2.6 线性关系考察 精密吸取质量浓度为1、2.5、5、10、20、40 μ g/ml的黄芩苷对照品溶液各20 μ l,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以对照品的质量浓度(x, μ g/ml)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程: $y=69\ 016x+2\ 920.8(r=0.999\ 7)$ 。结果表明,黄芩苷的质量浓度在1~40 μ g/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.2.7 精密度试验 精密吸取对照品溶液20 μ l,按上述色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,RSD=1.12%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液,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,RSD=1.84%($n=6$),表明供试品溶液在10 h内稳定。

2.2.9 重复性试验 取同一批样品约1 g,共6份,研细,精密称定,按“2.2.3”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。结果,样品中黄芩苷的平均含量为5.381 3 mg/g,RSD=1.97%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 取同一批样品约0.5 g,共6份,研细,精密称定,分别加入黄芩苷对照品溶液(质量浓度:1 mg/ml)各2.9 ml,称定质量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表1。

2.2.11 样品含量的测定 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,再按上述色谱条件进样测定,每批平行测定3份,记录峰面积,以外标法计算样品中黄芩苷的含量。结果表明,3批样品(批号:20130906、20130913、20130920)中的黄芩苷含量分别为5.052 3、3.783 8、4.742 4 mg/g($n=3$)。

3 讨论

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

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

| 编号 | 称样量,g | 样品含量,mg | 加入量,mg | 测得量,mg | 回收率,% | \bar{x} ,% | RSD,% |
|----|---------|---------|---------|---------|--------|--------------|-------|
| 1 | 0.522 8 | 2.813 3 | 2.900 0 | 5.674 2 | 98.65 | | |
| 2 | 0.506 5 | 2.725 6 | 2.900 0 | 5.497 5 | 95.58 | | |
| 3 | 0.505 4 | 2.719 7 | 2.900 0 | 5.626 2 | 100.22 | 99.78 | 2.68 |
| 4 | 0.538 9 | 2.900 0 | 2.900 0 | 5.831 3 | 101.08 | | |
| 5 | 0.545 1 | 2.933 3 | 2.900 0 | 5.938 6 | 103.63 | | |
| 6 | 0.529 2 | 2.847 8 | 2.900 0 | 5.734 3 | 99.53 | | |

3.1 定性鉴别方法

和肝胆胆颗粒为中药复方制剂,成分复杂,影响TLC鉴别的干扰因素较多。笔者通过参考相关文献和预试验,对方中的金钱草、板蓝根、枳壳和柴胡也分别进行了鉴别研究。结果表明,金钱草、板蓝根、枳壳和柴胡的干扰成分难以排除,故最终选取方中黄芩、五味子、茵陈、栀子4味药材进行TLC鉴别,得到了理想的结果,且重复性良好。

3.2 含量测定方法

本试验在供试品溶液的制备过程中对提取方法(超声提取、回流提取)、提取溶剂(70%乙醇、甲醇、70%甲醇)、提取溶剂用量(30、50、70 ml)、提取时间(10、30、50 min)及提取次数(1~3次)分别进行了考察,最终确定了“2.2.3”项下的供试品溶液制备方法,此方法测定出来的黄芩苷含量较高。

笔者还曾选用甲醇-水-磷酸、乙腈-水-磷酸等流动相系统进行试验,并对流动相进行了不同比例的筛选,最终选用甲醇-水-磷酸(42:58:0.2, V/V/V)为流动相,待测物与杂质完全分离,阴性对照无干扰,并取得了较好的峰形和较高的理论板数。

综上所述,本研究所建方法简便、可靠,重复性好,可用于和肝胆胆颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] 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,2010:282.
- [2] 黄嫣,李希,张嵩,等.扶阳解毒颗粒质量标准的研究[J].中成药,2009,31(10):1 539.
- [3] 张沂,蔡清宇,唐慧慧,等.柴桂解表颗粒质量标准的研究[J].解放军药学学报,2008,24(5):395.
- [4] 杨小月.安神静心胶囊的质量标准研究[J].中国药师,2011,14(8):1 129.
- [5] 杜威,靳守东,陈善,等.茵陈五苓丸的质量标准研究[J].解放军药学学报,2009,25(6):521.
- [6] 师涛,孟宪生,罗国安,等.凉膈丸定性定量方法研究[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(5):1.
- [7] 刘颖,胡琴,史文凤.红花清肝十三味丸质量标准研究[J].中成药,2013,35(6):1 230.
- [8] 王一,田明,冷志爽,等.栀子大黄汤颗粒剂质量标准研究[J].中医药学报,2013,41(4):75.
- [9] 李航,李鹏.HPLC法测定胃炎口服液中黄芩苷的含量[J].中国药房,2008,19(24):1 889.
- [10] 张捷,张艳萍,王欢,等.高效液相色谱法测定固经丸中黄芩苷含量[J].中国药业,2010,19(10):38.

(收稿日期:2013-10-28 修回日期:2014-03-10)