

参芍止带片的质量标准研究[△]

南敏伦^{1,2*}, 赫玉芳^{1#}, 赵昱玮^{1,2}, 赵全成¹(1.吉林省中医药科学院, 长春 130012; 2.吉林农业大学中药材学院, 长春 130118)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)43-4085-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.43.18

摘要 目的:建立参芍止带片的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的苦参、延胡索、香附、关黄柏进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定赤芍中芍药苷的含量;色谱柱为 Agilent C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(18:82, V/V),检测波长为 230 nm,柱温为 25 ℃,流速为 1.0 ml/min。结果:苦参、延胡索、香附、关黄柏的 TLC 斑点清晰,分离度好。芍药苷的进样量在 0.130 6~0.652 8 μg 范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系($r=0.999\ 8$);精密性、重复性、稳定性试验的 RSD 均≤1.97%;平均加样回收率为 99.66%,RSD=1.09%($n=6$)。结论:所建标准可用于参芍止带片的质量控制。

关键词 参芍止带片;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法;芍药苷

Study on Quality Standard for Shenshao Zhidai Tablets

NAN Min-lun^{1,2}, HE Yu-fang¹, ZHAO Yu-wei^{1,2}, ZHAO Quan-cheng¹(1.Jilin Province Academy of Chinese Medical Sciences, Changchun 130012, China; 2.College of Chinese Medicinal Material, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of Shenshao zhidai tablets. METHODS: *Sophora flavescens*, *Corydalis yanhusuo*, *Cyperus rotundus* and *Phellodendron amurense* were identified by TLC qualitatively. The content of paeoniflorin was determined by HPLC. The separation was performed on Agilent-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid(18:82, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 230 nm, and the column temperature was 25 ℃. RESULTS: *S. flavescens*, *C. yanhusuo*, *C. rotundus* and *P. amurense* could be identified by TLC and separated well. The linear range of paeoniflorin were 0.130 6-0.652 8 μg ($r=0.999\ 8$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1.97%. The average recovery was 99.66% (RSD=1.09%, $n=6$). CONCLUSIONS: The established standard can be used for the quality control of Shenshao zhidai tablets.

KEYWORDS Shenshao zhidai tablets; Quality standard; TLC; HPLC; Paeoniflorin

参芍止带片是吉林省中医药科学院多年使用的临床经验方,由赤芍、关黄柏、苦参、杠板归、败酱草、鸡血藤、延胡索、香附等 8 味中药组成,具有化瘀止痛、解毒利湿之功效,主要用于慢性盆腔炎、细菌性阴道炎的治疗,临床疗效显著。为有效控制参芍止带片的制剂质量,保证临床用药安全,笔者采用薄层色谱(TLC)法对方中苦参、延胡索、香附、关黄柏进行了定性鉴别,并采用高效液相色谱(HPLC)法对赤芍中的药效成分芍药苷进行了定量分析。

1 材料

1.1 仪器

LC-10A 型 HPLC 仪,配有 SPD-10A 型紫外检测器(日本岛津公司);N2000 色谱工作站(浙江大学智达信息工程有限公司);KQ-100 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BS110S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.2 药品与试剂

参芍止带片(批号:20100307、20100314、20100319)及各

阴性样品由吉林省中医药科学院植物化学研究所自制;苦参碱、延胡索乙素对照品与苦参、延胡索、香附、关黄柏对照药材(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110805-200507、110726-200610、121019-200304、120928-200604、121059-200505、120937-200506);硅胶 G(青岛海洋化工有限公司,批号:20111228);水为纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 苦参的 TLC 鉴别 取本品 1 g,研细,加氨水 1 ml、三氯甲烷 25 ml,超声(功率:220 W,频率:50 kHz)处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加三氯甲烷 1 ml 使溶解,作为供试品溶液;取苦参对照药材 0.5 g,与上述供试品溶液同法制成对照药材溶液;取苦参碱对照品适量,加三氯甲烷制成每 1 ml 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液;再取缺苦参的阴性样品,与供试品溶液同法制成阴性对照溶液。照 2010 年版《中国药典》TLC 法试验^[1],取上述 4 种溶液各 6 μl,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-丙酮-乙酸乙酯-浓氨水(2:3:4:0.4, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以碘化钾碘试液,置日光下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品及对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的棕色斑点;阴性对照无干扰^[2-3]。苦参的 TLC 图见图 1。

△ 基金项目:吉林省科技发展计划项目(No.20120944)

* 副研究员,硕士研究生。研究方向:植物资源及植物化学。电话:0431-86058683。E-mail:nml2000@163.com

通信作者:研究员,博士。研究方向:植物化学提取分离、先导化合物结构修饰、中药新药。电话:0431-86058683。E-mail:hyf_1992@163.com

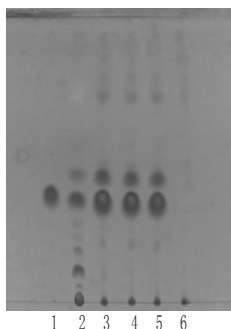


图1 苦参的TLC图

1.苦参碱对照品;2.苦参对照药材;3~5.供试品;6.阴性对照

Fig 1 TLC of *Sophora flavescens*

1.matrine control; 2.Radix Sophorae Flavescens reference substance; 3-5.samples; 6.negative control

2.1.2 延胡索的TLC鉴别 取本品3 g,研细,加甲醇50 ml,超声(功率:220 W,频率:50 kHz)处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水30 ml使溶解,加氨水调pH为9~10,用乙醚萃取3次,每次25 ml,合并乙醚液,挥干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为供试品溶液;取延胡索对照药材1 g,与供试品溶液同法制成对照药材溶液;取延胡索乙素对照品,加甲醇制成每1 ml含0.5 mg的溶液,作为对照品溶液;再取缺延胡索的阴性样品,与供试品溶液同法制成阴性对照溶液。照《中国药典》2010年版TLC法试验^[1],吸取上述4种溶液各6 μl,分别点于同一硅胶G薄层板,以正己烷-三氯甲烷-甲醇(7:4:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,用碘蒸气熏至斑点清晰,放置片刻,置紫外光灯(254 nm)下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品及对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的黄绿色荧光斑点;阴性对照无干扰^[4]。延胡索的TLC图见图2。



图2 延胡索的TLC图

1.延胡索乙素对照品;2.延胡索对照药材;3~5.供试品;6.阴性对照

Fig 2 TLC of *Corydalis yanhusuo*

1.tetrahydropalmatine control; 2.Rhizoma Corydalis reference substance; 3-5.samples; 6.negative control

2.1.3 香附的TLC鉴别 取本品3 g,研细,置锥形瓶中,加乙醚25 ml,时时振摇2 h,超声(功率:220 W,频率:50 kHz)处理10 min,滤过,滤液挥干,残渣加乙酸乙酯1 ml使溶解,作为供试品溶液;取香附对照药材1 g,与供试品同法制成对照药材溶液;再取缺香附的阴性样品,同法制成阴性对照溶液。照2010年版《中国药典》TLC法试验^[1],吸取上述3种溶液各8 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以二氯甲烷-乙酸乙酯-冰乙酸(80:1:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以二硝基苯肼试液,放置片刻,置日光下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的粉红色斑点;阴性对照无

干扰^[5]。香附的TLC图见图3。

2.1.4 关黄柏的TLC鉴别 取本品0.5 g,研细,加乙醚50 ml,超声(功率:220 W,频率:50 kHz)处理15 min,滤过,弃去滤液,滤渣挥干乙醚,加甲醇25 ml,超声(功率:220 W,频率:50 kHz)提取30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为供试品溶液;取关黄柏对照药材粉末0.2 g,与供试品同法制成对照药材溶液;再取缺关黄柏的阴性样品,同法制成阴性对照溶液。照2010年版《中国药典》TLC法试验^[1],吸取上述3种溶液各5 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以正丁醇-冰乙酸-水(7:1:2, 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,显相同颜色的黄绿色荧光斑点;阴性对照无干扰^[6]。关黄柏的TLC图见图4。

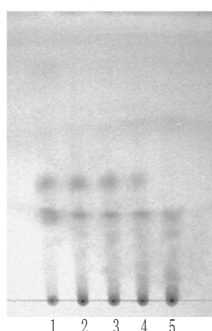


图3 香附的TLC图

1.香附对照药材;2~4.供试品;5.阴性对照

Fig 3 TLC of *Cyperus rotundus*

1.Cyperi Rhizoma reference substance; 2-4. samples; 5.negative control

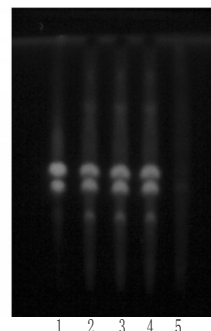


图4 关黄柏的TLC图

1.关黄柏对照药材;2~4.供试品;5.阴性对照

Fig 4 TLC of *Phellodendron amurense*

1.Cortex Phellodendri reference substance; 2-4.samples; 5.negative control

2.2 芍药苷的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(18:82, V/V);检测波长:230 nm;柱温:25 °C;流速:1.0 ml/min。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品适量,加甲醇溶解并稀释,制成质量浓度为32.64 μg/ml的对照品溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品0.5 g,研细,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 ml,密塞,称定质量,超声(功率:220 W,频率:50 kHz)处理30 min,放冷,再次精密称定,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过。精密量取续滤液20 ml,蒸干,残渣加50%甲醇5 ml使溶解,加在已处理好的中性氧化铝柱(100~200目,2 g)上,用50%甲醇洗脱,收集洗脱液,置50 ml量瓶中至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得^[7-8]。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 取缺赤芍的阴性样品适量,按“2.2.3”项下方法制备阴性对照溶液,即得。

2.2.5 专属性试验 精密吸取芍药苷对照品溶液、供试品溶液和赤芍阴性对照溶液各10 μl,按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,芍药苷峰与杂质峰可达到良好的分离,阴性对照在芍药苷出峰处未见相应色谱峰出现,表明本方法专属性良好,阴性对照无干扰。色谱见图5。

2.2.6 线性关系考察 精密吸取芍药苷对照品溶液4、8、12、

表2 样品含量测定结果(n=6)

Tab 2 Results of content determination (n=6)

编号	样品批号	芍药苷含量,mg/片	平均含量,mg/片
1	20100307	3.72	
2	20100314	3.66	
3	20100319	3.41	3.54
4	20100409	3.61	
5	20100414	3.36	
6	20100418	3.50	

方法制备供试品;笔者又对提取时间(20、30、40 min)进行了考察,结果表明超声提取20 min芍药苷的含量最低,而提取30 min和40 min时的芍药苷含量差别不大,最终选择了超声提取30 min。

笔者还尝试对方中的杠板归、鸡血藤、败酱草进行定性鉴别:在杠板归的鉴别试验中,由于《中国药典》2010年版(一部)尚未载杠板归的对照药材,但其记载杠板归中含有槲皮素和咖啡酸,故笔者分别以槲皮素和咖啡酸作对照进行鉴别,尝试了多种鉴别方法仍未能消除阴性对照中的干扰^[9];在鸡血藤的鉴别试验中^[10],由于鸡血藤中无明显的指标性成分,故笔者选择以其对照药材作对照进行鉴别,采用多种方法也未能消除阴性对照中的干扰;而败酱草既无对照药材也无明显的化学成分报道,所以尚无法对其进行TLC鉴别研究。

在参芍止带片的处方中,赤芍为君药,由于芍药苷为赤芍中的指标性成分,可作为本制剂的质量控制指标,因此本试验采用HPLC法对其含量进行测定。由表2可知,6批参芍止带片的平均含量为每片中含芍药苷3.54 mg,考虑到工业化生产过程中可能产生的损失以及原料药材等综合情况,笔者建议将芍药苷的含量限度定为每片不低于2.40 mg。

综上所述,本试验所建立的方法操作简便、快速,结果准确、可靠,重复性好,可作为该制剂的质量控制标准。

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: 附录34.
- [2] 王丽军, 刘雨萍. 黄柏止痒剂中黄柏、苦参的薄层色谱鉴别[J]. 陕西中医, 2011, 32(10): 1407.
- [3] 杨志洁, 姚仲青, 朱虹. 洁阴泡腾片质量标准研究[J]. 中国药房, 2010, 21(11): 1022.
- [4] 赵晓霞, 张瑞峰, 吴涛. 胆宁分散片质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(8): 69.
- [5] 张绍轩, 张红岩, 司云珊, 等. 痛经片中丹参、香附及白芍的薄层色谱鉴别[J]. 长春中医药大学学报, 2009, 25(12): 954.
- [6] 孙冬梅, 董玉娟, 李素梅. 调经止痛丸的质量标准研究[J]. 中医临床研究, 2013, 5(23): 22.
- [7] 王敏, 李翔, 王洪, 等. 反相离子对高效液相色谱法测定黄柏及其颗粒剂中小檗碱及巴马汀的含量[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26(2): 195.
- [8] 吕曙华, 徐刚, 吕归宝, 等. 离子对高效液相色谱法测定春血安胶囊中盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的含量[J]. 中草药, 2003, 34(4): 332.
- [9] 龙尚祥, 周欣, 赵超, 等. 杠板归药材薄层色谱检测方法研究[J]. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 2011, 29(2): 108.
- [10] 吴融, 卢燕, 陈道峰. 复方鸡血藤膏的质量标准研究[J]. 中成药, 2010, 32(9): 1529.

(收稿日期: 2014-01-06 修回日期: 2014-02-26)

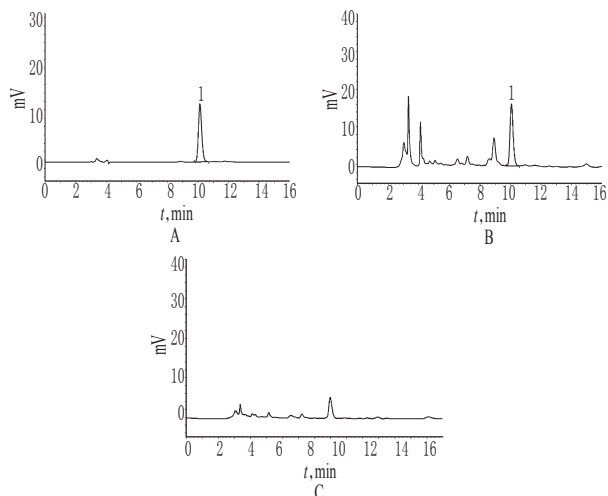


图5 高效液相色谱图

A. 芍药苷对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 芍药苷

Fig 5 HPLC chromatograms

A. paeoniflorin control; B. test sample; C. negative control; 1. paeoniflorin
16、20 μ l, 分别按上述色谱条件进样测定, 记录色谱图。以进样量(x , μ g)为横坐标, 峰面积积分值(y)为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $y=637\ 285.83x+2\ 183.67$ ($r=0.999\ 8$, $n=6$)。结果表明, 芍药苷进样量在 $0.130\ 6\sim 0.652\ 8\ \mu$ g 范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系。

2.2.7 精密性试验 精密吸取芍药苷对照品溶液 $10\ \mu$ l, 按上述色谱条件重复进样6次测定, 记录色谱图。结果, $RSD=1.44\%$ ($n=6$), 表明仪器精密性良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液适量, 按上述色谱条件分别于0、2、4、6、8 h 进样测定, 记录色谱图。结果, $RSD=1.97\%$ ($n=5$), 表明供试品溶液在8 h 内稳定性良好。

2.2.9 重复性试验 取同一批样品6份, 每份0.5 g, 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, 记录色谱图, 测定芍药苷的含量。结果, 样品平均含量为每片含芍药苷 $3.72\ \text{mg}$, $RSD=1.21\%$ ($n=6$), 表明本方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一批样品6份, 每份约0.25 g, 分别精密加入质量浓度为 $2.352\ \text{mg/ml}$ 的芍药苷对照品 $1\ \text{ml}$, 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, 记录色谱图, 测定芍药苷的含量, 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)

样品号	称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
1	0.2503	2.3278	2.3520	4.6719	99.66		
2	0.2489	2.3148	2.3520	4.6791	100.52		
3	0.2494	2.3194	2.3520	4.6956	101.03	99.66	1.09
4	0.2504	2.3287	2.3520	4.6612	99.17		
5	0.2499	2.3241	2.3520	4.6679	99.65		
6	0.2508	2.3324	2.3520	4.6352	97.91		

2.2.11 样品含量测定 取6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, 记录色谱图, 计算芍药苷的含量, 结果见表2。

3 讨论

在制备供试品溶液时, 笔者对超声提取与回流提取两种方法进行了对比, 试验结果差别不大, 最终选择了超声提取的