蒲药灌肠液的质量控制Δ

李　燕[1*]，赵利刚[2#]，王春艳[1]，于桂兰[1]，张立新[1]，王洪民[1]（1.唐山市妇幼保健院药剂科，河北 唐山　063000；2.河北联合大学药学院，河北 唐山　063000）

中图分类号　R917　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2015）12-1693-03
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2015.12.38

摘　要　目的：建立蒲药灌肠液的质量控制方法。方法：采用薄层色谱法对乳香、黄芪甲苷和延胡索乙素进行定性鉴别，采用高效液相色谱法同时测定香蒲新苷和异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷的含量。结果：薄层色谱均检出乳香、黄芪甲苷和延胡索乙素，斑点清晰，专属性强；含量测定中香蒲新苷和异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷的线性范围分别为0.216 0～3.240 μg（r=0.999 9，n=6）和0.208 8～3.132 μg（r=0.999 8，n=6），加样回收率分别为98.6%（RSD=1.3%，n=6）和98.4%（RSD=1.4%，n=6）。结论：该方法简便可行，结果准确可靠，可用于蒲药灌肠液的质量控制。

关键词　蒲药灌肠液；香蒲新苷；异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷；高效液相色谱法；质量控制

Quality Control of Puyao Rectal Solution

LI Yan[1], ZHAO Li-gang[2], WANG Chun-yan[1], YU Gui-lan[1], ZHANG Li-xin[1], WANG Hong-min[1]（1.Dept. of Pharmacy, Tangshan Maternal and Child Health Hospital, Hebei Tangshan 063000, China; 2.School of Pharmacy, Hebei United University, Hebei Tangshan 063000, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE: To establish a method for the quality control of Puyao rectal solution. METHODS: Thin layer chromatography (TLC) method was used to identify frankincense, astragaloside A and tetrahydropalmatine; HPLC was used to determinate the content of typhaneoside and isorhamnetin-3-*O*-neohesperidoside. RESULTS: Frankincense, astragaloside A and tetrahydropalmatine were detected by TLC with clear spot and strong specificity. The linear ranges of typhaneoside and isorhamnetin-3-*O*-neohesperidoside were respectively 0.216 0-3.240 μg (r=0.999 9, n=6) and 0.208 8-3.132 μg (r=0.999 8, n=6), the average recoveries were respectively 98.6% (RSD=1.3%, n=6) and 98.4% (RSD=1.4%, n=6). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, and can be used for the quality control of Puyao rectal solution.

KEYWORDS　Puyao rectal solution; Typhaneoside; Isorhamnetin-3-*O*-neohesperidoside; HPLC; Quality control

蒲药灌肠液是唐山市妇幼保健院自制的医院制剂（冀药制字Z20050593），具有化瘀消结、行气活血、散结止痛的功效，用于血瘀气滞型盆腔炎，临床效果显著。该药自获得河北省药品监督管理局批准文号以来，已治愈血瘀气滞型盆腔炎患者上千人，据唐山市妇幼保健院临床统计，总有效率达95.2%。其处方由蒲黄、乳香、延胡索、黄芪、桂枝、水蛭组成，其中蒲黄、乳香活血止痛为君；延胡索化瘀散结、黄芪补气为臣；桂枝温经通阳为佐；水蛭散结止痛为使。为有效控制该制剂产品质量，保证用药的安全有效，本研究采用薄层色谱法分别对君药乳香、臣药黄芪中的黄芪甲苷和延胡索中的延胡索乙素进行了鉴别，并采用高效液相色谱（HPLC）法同时测定君药蒲黄中的香蒲新苷和异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷的含量。

1　材料

LC-20AT HPLC仪，包括高灵敏度紫外可见光可变波长检测器、LC solution色谱工作站（日本岛津公司）；UV-2501PC紫外可见分光光度计（日本岛津公司）；BP211D电子分析天平（北京赛多利斯仪器系统有限公司）。

对照品香蒲新苷（批号：111573-200402，纯度：97.0%）、异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷（批号：111571-200402，纯度：93.2%）、黄芪甲苷（批号：110781-200613，纯度：95.8%）、延胡索乙素（批号：110726-201213，纯度：99.8%）及对照药材乳香（批号：907-200202）均购自中国食品药品检定研究院；硅胶板购自青岛海立信精细硅胶化工有限公司；蒲药灌肠液（批号：140102、140107、140109）由唐山市妇幼保健院制剂室自制；乙腈为色谱纯，水为重蒸馏水，磷酸为分析纯。

2　鉴别

2.1　乳香

取本品30 ml，加95%乙醇60 ml醇沉2 h，过滤，滤液蒸干乙醇，用乙酸乙酯提取2次，每次20 ml，取乙酸乙酯层水浴蒸干，残渣加甲醇0.5 ml溶解，作为供试品溶液。另取乳香对照药材1 g，加乙醚10 ml，密闭浸渍24 h，过滤，滤液即为对照药材溶液。照薄层色谱法试验，吸取上述供试品溶液5 μl、对照药材溶液3 μl，分别点于同一硅胶G薄层板上，以石油醚（30～60 ℃）-乙醚-甲苯（14∶4∶3，*V*/*V*/*V*）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以5%香草醛硫酸溶液，110 ℃加热至斑点显色清晰。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，阴性无干扰，见图1。

2.2　黄芪甲苷[1]

取本品30 ml，加乙醇60 ml，放置2 h，滤过，滤液挥干乙

Δ 基金项目：河北省自然科学基金资助项目（No.H2013209098）

* 主管药师，硕士。研究方向：新型医院制剂的质量控制。电话：0315-3726722

通信作者：副教授，博士。研究方向：经皮给药新剂型。电话：0315-3726307。E-mail：zhaoligang1982@gmail.com

醇，用水饱和正丁醇提取3次，每次25 ml，合并正丁醇液，用100 ml氨试液洗涤2次，每次50 ml，弃去水层，正丁醇液蒸干，残渣加甲醇0.5 ml使溶解，作为供试品溶液。另取黄芪甲苷对照品，加甲醇制成每1 ml含1 mg的溶液，作为对照品溶液。照薄层色谱法试验，吸取上述两种溶液各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-甲醇-水（15∶40∶20∶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10%硫酸乙醇溶液，在105 ℃加热至斑点显色清晰。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，阴性无干扰，见图2。

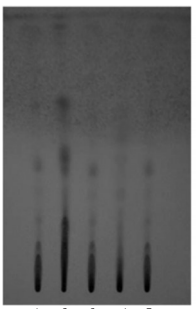

图1 乳香的TLC图

1、3、5.样品；2. 乳香；4. 阴性

Fig 1 TLC chromatogram of frankincense

1, 3, 5.sample; 2.frankincense; 4.ne- gative

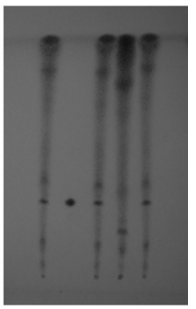

图2 黄芪甲苷的TLC图

1、3、5. 样品；2. 黄芪甲苷；4.阴性

Fig 2 TLC chromatogram of astragaloside A

1, 3, 5.sample; 2.astragalosi- de A; 4.negative

2.3 延胡索乙素

取本品60 ml，浓缩至20 ml，加浓氨试液5 ml，用三氯甲烷提取3次，每次20 ml，合并三氯甲烷液，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇0.5 ml使溶解，作为供试品溶液。另取延胡索乙素对照品，加甲醇制成每1 ml含1 mg的溶液，作为对照品溶液。照薄层色谱法试验，吸取上述两种溶液各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，以正己烷-三氯甲烷-甲醇（7.5∶4∶1，*V/V/V*）为展开剂，预饱和20 min，展开，取出，晾干，以碘蒸气熏至斑点显色清晰。结果，供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同的黄色斑点，阴性无干扰，见图3。

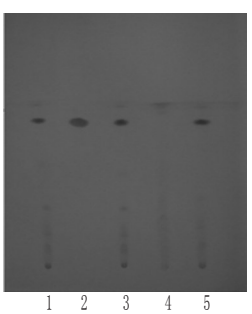

图3 延胡索乙素的TLC图

1、3、5. 样品；2. 延胡索乙素；4.阴性

Fig 3 TLC chromatogram of tetrahydropalmatine

1, 3, 5.sample; 2.tetrahydropalmatine; 4.negative

3 含量测定

3.1 色谱条件

色谱柱：ZORBAX SB-C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈（A）-0.1%磷酸溶液（B）为流动相，梯度洗脱程序见表1；流速：1.0 ml/min；检测波长：254 nm；柱温：30 ℃；进样量：10 μl。在该色谱条件下，香蒲新苷和异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷的保留时间分别为14.19 min和17.77 min，理论板数按异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷计大于5 000，分离度大于1.3。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间，min	流动相A，%	流动相B，%
0～5	15→20	85→80
5～15	20	80
15～20	20→15	80→85

3.2 溶液的制备

3.2.1 对照品溶液 分别精密称取香蒲新苷对照品10.80 mg和异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷对照品10.44 mg，置于25 ml量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得对照品贮备液；分别精密量取对照品贮备液0.5、1.0、2.5、5.0、7.5 ml，置于10 ml量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，即得对照品系列溶液。

3.2.2 供试品溶液 精密量取本品50 ml，用水饱和正丁醇振摇提取3次，每次50 ml，合并正丁醇提取液，过滤，滤液蒸干，残渣用甲醇溶解转移至10 ml量瓶中，稀释至刻度，用0.45 μm针式滤器过滤，取续滤液作为供试品溶液。

3.2.3 阴性对照溶液 按照蒲药灌肠液处方的比例，制备不含蒲黄的阴性样品，精密量取50 ml，按“3.2.2”项下方法操作，即得。

3.3 方法学试验

3.3.1 专属性试验 分别取对照品溶液、阴性对照溶液、供试品溶液各10 μl，按照上述色谱条件进样，色谱见图4。结果，阴性样品色谱在与样品中香蒲新苷和异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷相应的保留时间处无吸收峰。

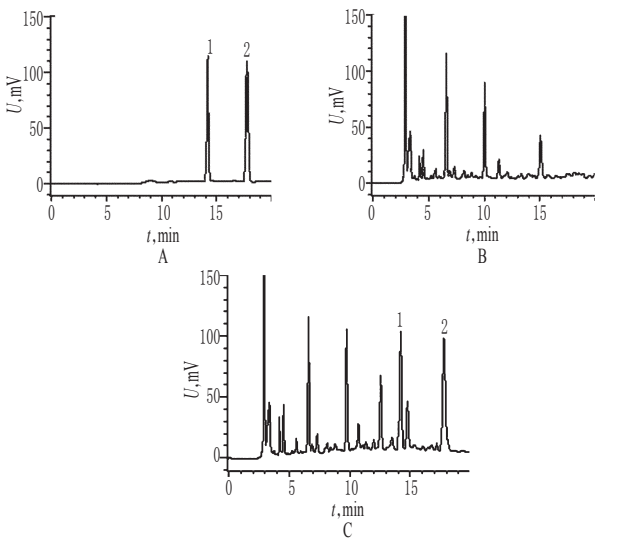

图4 高效液相色谱图

A.对照品；B.不含蒲黄的阴性样品；C.样品；1.香蒲新苷；2.异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷

Fig 4 HPLC chromatograms

A.reference substances; B.negative sample without cattail pollen; C.sample; 1.typhaneoside; 2.isorhamnetin-3-*O*-neohesperidoside

3.3.2　线性关系考察　分别精密量取对照品系列溶液，按上述色谱条件进样测定其峰面积，以峰面积（y）对进样量（x，μg）进行回归，得香蒲新苷和异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷的回归方程分别为 $y=1.326\times10^{6}x-3.687\times10^{4}$（$r=0.999\ 9$）；$y=1.297\times10^{6}x+2.719\times10^{4}$（$r=0.999\ 8$）。结果表明，香蒲新苷进样量在0.216～3.240 μg、异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷进样量在0.208 8～3.132 μg范围内与峰面积呈良好的线性关系。

3.3.3　精密度试验　取对照品溶液适量，按照“3.1”项下色谱条件，连续进样9次。结果，香蒲新苷和异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷峰面积的RSD分别为0.5%和0.4%，表明仪器的精密度良好。

3.3.4　重复性试验　取本品6份，分别按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液，按上述色谱条件进样测定，记录峰面积。结果，测得香蒲新苷质量浓度平均值为18.3 μg/ml，RSD为1.1%；异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷质量浓度平均值为18.4 μg/ml，RSD为1.2%，表明方法重复性良好。

3.3.5　稳定性试验　取“3.3.4”项下同一供试品溶液1份，分别于0、2、4、8、12、24 h，按上述色谱条件进样测定1次。结果，香蒲新苷和异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷峰面积的RSD分别为0.3%和0.4%，表明供试品溶液在24 h内稳定。

3.3.6　加样回收率　取已知质量浓度的样品6份（批号：140102），每份50 ml，分别加入每1 ml含香蒲新苷964.8 μg和异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷970.4 μg的对照品溶液1 ml，按“3.2.2”项下方法操作，制成供试品溶液，按上述色谱条件进样测定，计算加样回收率，结果见表2。

表2　加样回收率试验结果（$n=6$）

Tab 2　Results of recovery test（$n=6$）

成分	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，%
香蒲新苷	0.945 0	0.964 8	1.910 6	100.1	98.6	1.3
	0.945 0	0.964 8	1.881 4	97.1		
	0.945 0	0.964 8	1.889 7	97.9		
	0.945 0	0.964 8	1.905 5	99.6		
	0.945 0	0.964 8	1.887 4	97.7		
	0.945 0	0.964 8	1.902 9	99.3		
异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷	0.935 5	0.970 4	1.905 3	99.9	98.4	1.4
	0.935 5	0.970 4	1.886 5	98.0		
	0.935 5	0.970 4	1.883 4	97.7		
	0.935 5	0.970 4	1.908 2	100.2		
	0.935 5	0.970 4	1.878 6	97.2		
	0.935 5	0.970 4	1.883 9	97.7		

3.4　样品含量测定

取蒲药灌肠液3批，按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液，按上述色谱条件进样测定，连续平行测定5次，用外标法计算样品含量，结果见表3。

4　讨论

本研究考察了乙醚[2-3]和乙酸乙酯[4-5]两种溶剂对乳香的提取效果，结果采用乙醚为提取溶剂得到的供试品溶液在薄层色谱中展开后现象不明显；采用乙酸乙酯为提取溶剂有现象，但由于底色较深，斑点显色不太清晰。笔者又考察了醇沉时间对除杂效果的影响，结果表明醇沉2 h后再用乙酸乙酯提取处理得到的供试品溶液斑点显色清晰、现象明显。

表3　蒲药灌肠液中香蒲新苷和异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷的含量测定结果（$n=5$，μg/ml）

Tab 3　Content results of typhaneoside and isorhamnetin-3-*O*-neohesperidoside in Puyao rectal solution（$n=5$，μg/ml）

批号	香蒲新苷	异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷
140102	18.9	18.7
140107	18.5	18.4
140109	18.3	18.2

将香蒲新苷和异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷的对照品溶液分别在210～400 nm波长范围内进行光谱扫描，结果显示两种成分均在254 nm和350 nm波长处有较大吸收，兼顾检测灵敏度和干扰情况，并参考相关文献[6-7]，选择254 nm为检测波长。

本试验参考相关文献，对乙腈-0.05%乙酸溶液[8]、乙腈-0.1%磷酸溶液[9]、乙腈-水[10]3种流动相作不同比例和流速的试验考察，但是供试品溶液中杂质较多，用等度条件无法将两种有效成分和杂质完全分离。由于香蒲新苷和异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷在乙腈-0.1%磷酸溶液中峰形最好，因此采用乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相作不同梯度程序的试验比较。最后优选出本试验的梯度程序，可使处方中两个成分与杂质较好地分离，分离效果和峰形较理想。

综上，本方法简便可行，结果准确可靠，可作为蒲药灌肠液的质量控制方法。

参考文献

[1] 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)：2 551.

[2] 邵红燕，张和明，刘志海.骨质增生贴质量标准研究[J].中国医院药学杂志，2011，31(6)：509.

[3] 聂黎行，刘燕，戴忠，等.活血止痛制剂质量标准研究[J].中国药学杂志，2012，47(12)：989.

[4] 周庆氢，张聪，谢松.蟾乌巴布膏的质量标准研究[J].中成药，2010，32(7)：1 151.

[5] 夏磊，宋志前，张琳琳，等.乳香及含乳香中成药中乳香酸类薄层层析鉴别[J].中成药，2012，34(7)：1 403.

[6] 王敏春，王云霞，王苑桃，等.市售草蒲黄的质量考察及质量控制标准的探讨[J].中草药，2010，41(1)：132.

[7] 李志浩，孙新建，瞿京红，等.高效液相色谱法测定复方蒲黄片中香蒲新苷与异鼠李素-3-O-新橙皮苷含量[J].医药导报，2012，31(4)：503.

[8] 崔文霞，束艳，宿树兰，等.少腹逐瘀汤中7种有效成分的HPLC-PDA分析与评价[J].中成药，2011，33(9)：1 538.

[9] 夏卉莉，刘力，倪嘉纳. HPLC法同时测定红藤颗粒中苦杏仁苷、香蒲新苷及异鼠李素-3-O-新橙皮苷[J].中成药，2013，35(3)：525.

[10] 刘斌，王晓强，王伟.蒲黄配方颗粒质量标准的研究[J].中成药，2003，25(8)：624.

（收稿日期：2014-04-28　修回日期：2014-09-03）

（编辑：余庆华）