

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.17.006

复方芍药颗粒质量标准研究*

邵留英¹, 瞿发林^{1△}, 董文燊, 倪玉佳¹, 钟月²

(1. 中国人民解放军第102医院, 江苏 常州 213003; 2. 南京中医药大学翰林学院, 江苏 泰州 210046)

摘要:目的 建立复方芍药颗粒的质量标准。方法 复方芍药颗粒中芍药苷和甘草酸铵定性鉴别采用薄层色谱(TLC)法,含量测定采用高效液相色谱(HPLC)法。结果 芍药苷和甘草酸铵主斑点清晰,且样品中其他成分对鉴别无干扰;芍药苷和甘草酸铵进样量分别在0.263 2~2.632 0 μg和0.421 28~4.212 80 μg范围内与峰面积积分值线性关系良好,平均回收率分别为98.19%和100.65%,RSD分别为1.47%和1.80%(n=9)。结论 该质量标准的建立方法可行,结果可靠,重复性好,可用于复方芍药颗粒的质量控制。

关键词:质量标准;复方芍药颗粒;芍药苷;甘草酸铵

中图分类号:R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)17-0021-04

Study on Quality Standard of Compound Shaogan Granules

Shao Liuying¹, Qu Falin¹, Dong Wenshen¹, Ni Yujia¹, Zhong Yue²

(1. The 102 Hospital of PLA, Changzhou, Jiangsu, China 213003; 2. Nanjing University of Chinese Medicine Hanlin College, Taizhou, Jiangsu, China 210046)

Abstract: Objective To establish a quality standard for Compound Shaogan Granules. **Methods** The TLC method was used for qualitative determination of paeoniflorin and ammonium glycyrrhetate in Compound Shaogan Granules, the HPLC method was used for content determination of paeoniflorin and ammonium glycyrrhetate in Compound Shaogan Granules. **Results** The spots of paeoniflorin and ammonium glycyrrhetate could be separated completely and the assay could avoid being influenced by other spots. Paeoniflorin and ammonium glycyrrhetate had good linearity in the range of 0.263 2~2.632 0 μg and 0.421 28~4.212 80 μg, respectively. The average recovery rates of paeoniflorin and ammonium glycyrrhetate were 98.19% and 100.65%, RSDs were 1.47% and 1.80% (n=9). **Conclusion** The established method of quality standard is feasible, reliable and reproducible, which can be used for quality control of Compound Shaogan Granules.

Key words: quality standard; Compound Shaogan Granules; paeoniflorin; ammonium glycyrrhetate

中药颗粒剂具有服用、携带、贮藏、运输方便等特点,深受广大患者欢迎。复方芍药颗粒的处方出自医圣张仲景《伤寒杂病论》的芍药甘草汤,具有益气、养血、调经、复脉的功效。芍药甘草汤可治疗抗精神病药所致的高催乳素血症^[1-2]。我院在此汤剂基础上增加炙甘草,采用现代制剂制成颗粒^[3-4]。为控制制剂质量,本研究中对质量标准进行了研究。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

高效液相色谱仪(包括CapLC2487紫外检测器,美国Waters公司);FA1004型电子天平(上海精密科学仪器有限公司);DHG9240型鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司);KH2200DB型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);XS105型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 试剂

复方芍药颗粒(中国人民解放军第102医院自制,批号分别为201703301,201703302,201703303);白芍对照药材(批号为B26034-1g),甘草对照药材(批号为B26212-1g),均由上海源叶生物科技有限公司提供;

芍药苷对照品(批号为110736-201438,含量以96.4%计算),甘草酸铵对照品(批号为110731-200614),均由中国食品药品检定研究院提供;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法

2.1 定性鉴别

白芍^[5-9]:取样品适量,研细,称取0.2g,置容量瓶中,加乙醇10mL,30℃下超声提取(功率为100kHz),处理30min,过滤,取滤液水浴蒸干,残渣加20mL水溶解,正丁醇液提取3次,每次20mL合并正丁醇液,用适量水洗涤,取正丁醇液蒸干,残渣用1mL乙醇溶解,即得供试品溶液。取芍药苷对照品适量,精密称定,加乙醇定容制成质量浓度为1g/L的溶液,即得对照品溶液。称取0.5g白芍对照药材,同法制备对照药材溶液。按处方组成制备不含白芍的复方芍药颗粒,称取0.1g,同法制备阴性对照品溶液。分别精密吸取上述溶液各2μL,点样至同一硅胶G薄层板,以三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-浓氨溶液(8:4:1:1)展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸溶液,加热至斑点清晰。对照品溶液与对照药材溶液、供试品溶液色谱在同一R_f值处有相同的蓝

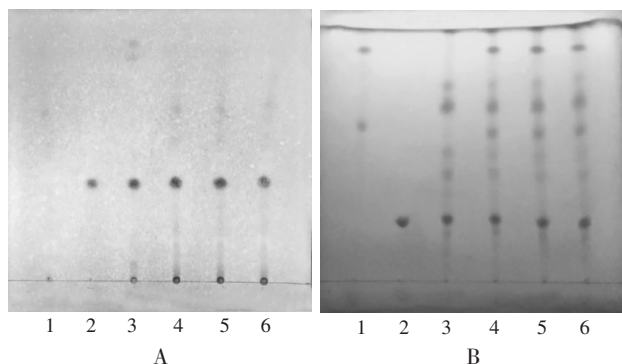
*基金项目:中国人民解放军南京军区医学科技创新项目[联卫[2007]534号]。

第一作者:邵留英,女,大学本科,主管药师,研究方向为医院制剂,(电话)0519-83064835(电子信箱)119430199@qq.com。

△通信作者:瞿发林,男,硕士研究生,主任药师,研究方向为医院制剂,(电话)0519-83064780(电子信箱)qufalin@163.com。

紫色斑点,阴性无干扰。色谱图见图1A。

炙甘草^[10-11]:取样品适量,研细,称取0.9 g置圆底烧瓶中,加乙醚40 mL,回流提取1 h,过滤,滤液水浴蒸干,残渣用甲醇30 mL回流提取1 h,过滤,滤液水浴蒸干,残渣用正丁醇提取3次,每次20 mL,合并正丁醇液,用适量水洗涤,取正丁醇液蒸干,残渣用5 mL甲醇溶解,即得供试品溶液。取甘草酸铵对照品适量,加甲醇定容制成质量浓度为2 g/L的溶液,即得对照品溶液。称取1 g甘草对照药材,同法制备对照药材溶液。按处方组成制备不含炙甘草的复方芍药颗粒,称取0.5 g,同法制备阴性对照品溶液。分别精密吸取上述溶液各2 μ L,点样至同一硅胶GF₂₅₄薄层板(以1% NaOH溶液制备),用乙酸乙酯-甲酸-水-冰醋酸(15:2:2:1)展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,加热至斑点清晰,取出,置紫外灯(254 nm)下检视。对照品溶液与对照药材溶液、供试品溶液色谱在同一R_f值处有相同颜色斑点,阴性无干扰。色谱图见图1B。



1. 阴性对照品溶液 2. 对照品溶液 3. 对照药材溶液
4-6. 供试品溶液
A. 白芍 B. 炙甘草
图1 薄层色谱图

2.2 芍药苷含量测定^[12]

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:月泽 Ze month ODS-L C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μ m);检测波长:230 nm;流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(14:86);柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ L。在此色

谱条件下,处方中其他成分对芍药苷的测定无干扰,色谱图见图2。

2.2.2 溶液制备

取复方芍药颗粒(批号为201703301)适量,研细,取细粉0.4 g,精密称定,置25 mL容量瓶中,加水20 mL,超声提取(温度为30 $^{\circ}$ C,频率为100 kHz)30 min,取出,放冷,加水定容,摇匀;精密量取5 mL,置25 mL容量瓶中,加水定容,摇匀,离心10 min,取上清液,用0.45 μ m微孔水膜过滤,取续滤液即得供试品溶液。取芍药苷对照品,精密称取12.16 mg,加水制成质量浓度为121.6 μ g/mL的对照品贮备液;精密量取对照品贮备液5 mL,加水制成质量浓度为60.8 μ g/mL的对照品溶液。按处方组成制备不含白芍的复方芍药颗粒,按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

线性关系考察:精密量取芍药苷对照品贮备液1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 mL,分别置10 mL容量瓶中,用水定容,混匀,制成不同质量浓度的对照品溶液,依法进样,测定峰面积。以峰面积(Y)为纵坐标、进样量(X)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 716\,782X - 20\,858$, $r = 0.999\,7$ ($n = 7$)。结果表明,芍药苷进样量在0.263 2 ~ 2.632 0 μ g范围内与峰面积线性关系良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液适量,分别于0, 4, 8, 12, 24 h时按拟订色谱条件进样。结果的RSD为1.50% ($n = 5$),表明供试品溶液在室温24 h内稳定。

重复性试验:取样品(批号为201703301)6份,精密称定,分别制备供试品溶液,进样分析,记录峰面积。结果的RSD为0.94% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

精密度试验:精密量取质量浓度为60.8 μ g/mL的芍药苷对照品溶液,按拟订色谱条件重复进样6次。结果的RSD为0.34% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

加样回收试验:取样品(批号为201703301,芍药苷含量为27.51 mg/g)9份,精密称定,每份0.2 g,置50 mL容量瓶中,精密加入质量浓度为2.631 7 g/L的芍药苷对照品溶液1, 2, 3 mL,平行操作3份,按拟订色谱条件

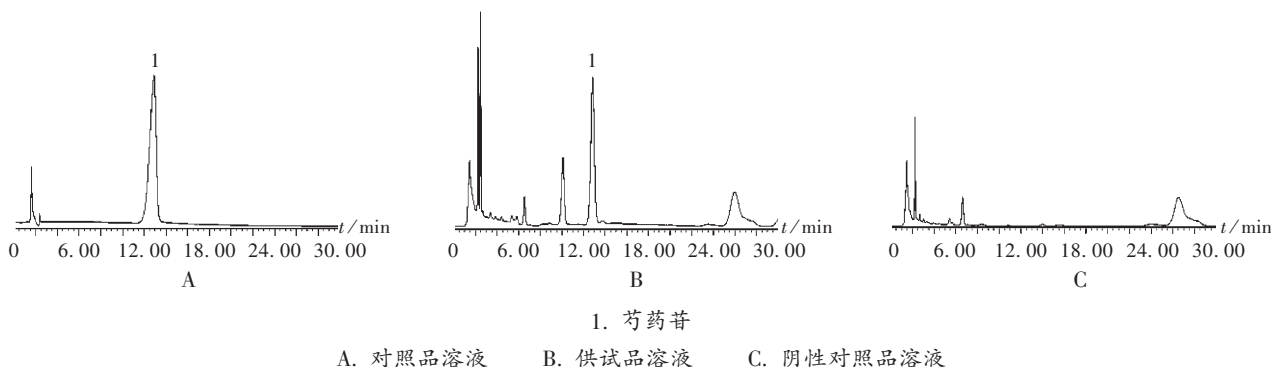
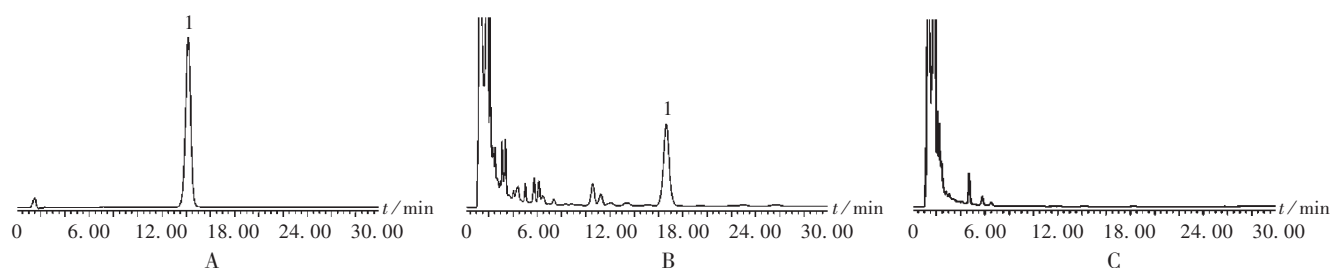


图2 芍药苷含量测定高效液相色谱图

进样测定峰面积,计算回收率($n=6$)。结果见表1。

表1 芍药苷加样回收试验结果($n=9$)

取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.200 6	5.518 5	2.631 7	8.097 2	97.99		
0.201 5	5.543 3	2.631 7	8.138 2	98.60		
0.199 3	5.482 7	2.631 7	8.021 0	96.45		
0.200 0	5.502 0	5.263 4	10.785 4	100.38		
0.201 1	5.532 3	5.263 4	10.638 1	97.01	98.19	1.47
0.199 7	5.493 7	5.263 4	10.652 7	98.02		
0.200 0	5.502 0	7.895 2	13.293 0	98.68		
0.209 8	5.771 6	7.895 2	13.676 7	100.13		
0.202 3	5.565 3	7.895 2	13.178 8	96.43		



1. 甘草酸铵
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图3 甘草酸铵含量测定高效液相色谱图

2.3.2 溶液制备

取样品(批号为201703301)适量,研细,精密称取细粉0.200 3 g,分别置25 mL容量瓶中,加水20 mL,超声提取(温度为30℃,频率为100 kHz),处理30 min,取出,放冷,加水定容至刻度,摇匀,离心10 min,取上清液,用0.45 μm 微孔水膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液。取甘草酸铵对照品,精密称取10.75 mg,加水制成质量浓度为210.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品贮备液;精密量取对照品贮备液5 mL,加水制成质量浓度为105.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液。按处方组成制备不含炙甘草的复方芍药颗粒,按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

2.3.3 方法学考察

线性关系考察:精密量取甘草酸铵对照品贮备液1.0,2.5,5.0,7.5,10 mL,分别置10 mL容量瓶中,用水定容,混匀,制成不同质量浓度的对照品溶液,按拟订色谱条件进样,测定峰面积。以峰面积(Y)为纵坐标、进样量(X)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=752\,553X-760\,29$, $r=0.999\,8$ ($n=5$)。结果表明,甘草酸铵进样量在0.421 28~4.212 80 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于0,4,8,12,24 h时按拟订色谱条件进样。结果的RSD为0.42%($n=5$),表明供试品溶液在室温24 h内稳定。

2.2.4 样品含量测定

取3批样品,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,采用外标法计算含量。结果批号为201703301,201703302,201703303的样品中芍药苷含量分别为2.45%,2.44%,2.45%,平均2.45%。

2.3 甘草酸铵含量测定^[5]

2.3.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:月泽Ze month ODS-L C_{18} 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm,5 μm);检测波长:250 nm;流动相:乙腈-0.017 mol/mL磷酸溶液(35:65);柱温:40℃;进样量:20 μL 。在此色谱条件下,处方中其他成分对甘草酸铵的测定无干扰,色谱图见图3。

重复性试验:精密称定同批样品(批号为201703301)6份,分别制备供试品溶液,进样分析,记录峰面积。结果的RSD为1.28%($n=6$),表明方法重复性良好。

精密度试验:精密量取质量浓度为105.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的甘草酸铵对照品溶液,按拟订条件依法重复进样6次。结果的RSD为0.85%($n=6$),表明仪器精密度良好。

加样回收试验:精密称取同一批样品(批号为201703301,甘草酸铵含量为13.27 mg/g)9份,每份0.1 g,置25 mL容量瓶中,精密加入质量浓度为0.635 g/L甘草酸铵对照品溶液1,2,3 mL,平行操作3份,依法制备供试品溶液,测定峰面积,计算回收率。结果见表2。

2.3.4 样品含量测定

取3批样品,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件分别测定峰面积,计算含量。结果批号为201703301,201703302,201703303样品中甘草酸铵含量分别为1.32%,1.33%,1.33%,平均1.33%。

3 讨论

3.1 定性鉴别

芍药苷提取方法:考察2015年版《中国药典(一部)》白芍中芍药苷的提取方法,但杂质多、分离效果差。改用水饱和正丁醇液提取,正丁醇饱和水液洗涤^[8],结果杂质少、分离效果好、斑点清晰。

芍药苷展开剂:以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲

表2 甘草酸铵加样回收试验结果($n=9$)

取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.103 5	1.373 4	0.635 0	2.039 4	104.88		
0.105 8	1.404 0	0.635 0	2.041 5	100.39		
0.107 5	1.426 5	0.635 0	2.058 8	99.57		
0.100 5	1.333 6	1.270 0	2.597 6	99.53		
0.100 7	1.336 3	1.270 0	2.597 5	99.31	100.65	1.80
0.102 0	1.353 5	1.270 0	2.648 4	101.96		
0.102 3	1.357 5	1.905 0	3.257 7	99.75		
0.103 4	1.372 1	1.905 0	3.296 4	101.01		
0.100 5	1.333 6	1.905 0	3.227 8	99.43		

酸(40:5:10:0.2)^[9]为展开剂,阴性有干扰;以乙酸乙酯-甲酸-乙酸-水(15:2:1:2)^[10]为展开剂,阴性无干扰,但展开效果不好;最终确定三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-浓氨溶液(8:4:1:1)^[12]展开的效果最好, R_f 值为0.4,阴性无干扰。

芍药苷点样量、展开温度:考察供试品溶液、对照品溶液和对照药材溶液点样量1,2,3 μL ,以展开剂展开、显色剂显色、检视,结果表明,点样量均为2 μL 时斑点圆整、清晰;取供试品溶液、对照品溶液和对照药材溶液点于同一硅胶G板上,以展开剂分别在6,20,35 $^{\circ}\text{C}$ 展开、显色剂显色、检视。结果表明,在20 $^{\circ}\text{C}$ 时,溶液分离效果最佳。故选择点样量均为2 μL ,温度为20 $^{\circ}\text{C}$ 的条件展开。

甘草酸铵薄层板:曾在硅胶G薄层板上点样,结果展开效果差、斑点不清晰;改在硅胶GF₂₅₄薄层板上点样,结果展开效果好、斑点清晰。

甘草酸铵展开剂:以乙酸乙酯、甲酸、冰醋酸、水(15:1:1:2)^[13]展开, R_f 值偏小,故调整比例,以乙酸乙酯、甲酸、水、冰醋酸(15:2:2:1)展开,阴性无干扰,分离效果好。

甘草酸铵点样量、展开温度:考察供试品溶液、对照品溶液和对照药材溶液点样量1,2,3 μL ,以展开剂展开、显色剂显色、检视,结果表明,点样量均为2 μL 时斑点清晰,易于辨识;取供试品溶液、对照品溶液和对照药材溶液点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板上,以展开剂分别在6,20,35 $^{\circ}\text{C}$ 展开,显色剂显色,检视,结果表明,在20 $^{\circ}\text{C}$ 时,溶液的展开效果好, R_f 值适当。故选择点样量均为2 μL 、温度为20 $^{\circ}\text{C}$ 的展开条件。

3.2 含量测定

提取溶剂与方法:根据芍药苷、甘草酸铵的理化特性,选用了甲醇、乙醇、70%乙醇、水为提取溶剂,超声提取,以水提取效率最高,峰形对称,杂质对主峰无干扰,故本试验中选择水为提取溶剂。再对水超声提取和回流提取的提取效率进行考察,结果显示,两种提取方式效率

无明显差异,且超声提取操作简单,最终选择超声提取。

提取温度与时间:考察了提取温度、提取时间对提取效率的影响,结果显示,提取温度超过30 $^{\circ}\text{C}$,提取效率无明显增加;而提取时间超过30 min,提取效率变化亦不明显,故选择温度为30 $^{\circ}\text{C}$ 、超声30 min提取。

流动相及检测波长:曾参考文献[3]采用乙腈-0.017 mol/L磷酸水溶液-三乙胺(35:65:0.3)作流动相测定甘草酸铵(实际测得峰是甘草酸的峰,再按系数折算成甘草酸铵,即甘草酸铵的量=甘草酸的量 $\times$ 1.0207),结果未出峰,原因是流动相偏碱性,甘草酸铵无法水解成甘草酸,故最终选择乙腈-0.017 mol/L磷酸水溶液(35:65)为流动相。本试验中选择230 nm为芍药苷检测波长,250 nm为甘草酸铵检测波长,两主峰附近均无杂质峰干扰,且在这两波长下灵敏度更高、峰形更佳。

加样回收试验:复方芍药颗粒为中药制剂,故加样回收试验中高、中、低浓度对照品加入量为所测供试品成分量的1.5,1,0.5倍,各平行测定3份,结果更科学、可信。

参考文献:

- [1] 顾培,靳秀,李雪,等.芍药甘草汤治疗奥氮平所致高催乳素血症的临床研究[J].中国中西医结合杂志,2016,36(12):1456-1459.
- [2] 向小妹,潘彬斌,李红,等.芍药甘草汤治疗利培酮所致高催乳素的临床研究[J].中国医学创新,2013,10(27):20-22.
- [3] 瞿发林,董文燊,谈丽娜,等.正交试验法优选芍药胶囊提取工艺的研究[J].中国药师,2008,11(1):60-62.
- [4] 董文燊,瞿发林,邵留英,等.复方芍药颗粒制备工艺的研究[J].中国药师,2014,17(6):939-941.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:86-87.
- [6] 王笑笑,许莺婷.丹桃合剂中芍药苷的鉴别和含量测定方法学研究[J].海峡药学,2015,27(8):43-45.
- [7] 刘淑花,刘玉涛,姚继红,等.白芍在配方颗粒冲剂与传统饮片煎剂薄层色谱鉴别及芍药苷含量比较[J].中华中医药杂志,2014,29(8):2665-2667.
- [8] 李清娟,容彦华,陈素锐,等.养阴清肺颗粒中芍药苷与玄参的同板薄层色谱鉴别[J].中国药师,2014,17(2):335-336.
- [9] 李瑞丽,王喜民,张玉东.薄层色谱法鉴别胃康灵胶囊中白芍、三七和延胡索[J].亚太传统医药,2013,9(3):19-20.
- [10] 瞿发林,董文燊,谈丽娜,等.芍药胶囊质量标准标准的研究[J].解放军药学学报,2008,24(2):139-141.
- [11] 罗文汇,毕晓黎,谭志灿,等.甘草配方颗粒快速鉴别的初步研究[J].时珍国医国药,2013,24(12):2925-2926.
- [12] 库尔班江,卡斯木江,赛力曼.白芍配方颗粒中芍药苷的含量测定[J].喀什师范学院学报,2008,29(3):38-40.
- [13] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(四部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:7.

(收稿日期:2018-01-10)