

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.10.005

## 再造丸质量标准研究

程似锦<sup>1</sup>, 李 恒<sup>2△</sup>

(1. 长江职业学院生物医药学院, 湖北 武汉 430064; 2. 武汉药品医疗器械检验所, 湖北 武汉 430075)

**摘要:**目的 建立再造丸的质量标准。方法 采用薄层色谱法定性鉴别处方中的秦艽、续断;采用高效液相色谱(HPLC)法测定秦艽中龙胆苦苷的含量,流动相为甲醇-水(30:70),检测波长为275 nm,流速为1.0 mL/min,柱温为30℃。结果 薄层色谱分离度良好。龙胆苦苷进样量在0.019 74~1.974 1 μg范围内与峰面积积分值线性关系良好, $r=0.999\ 9$ ( $n=7$ );平均回收率为98.11%,RSD为0.44%( $n=6$ )。结论 该方法有效,结果准确、可靠,可用于本制剂的质量控制。

**关键词:**再造丸;秦艽;续断;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准

中图分类号:R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)10-0016-03

### Study on Quality Standard of Zaizao Pills

Cheng Sijin<sup>1</sup>, Li Heng<sup>2</sup>

(1. Department of Biological Medicine, Changjiang Professional College, Wuhan, Hubei, China 430064; 2. Wuhan Institute for Drug and Medical Device Control, Wuhan, Hubei, China 430075)

**Abstract:** Objective To establish the quality standard for Zaizao Pills. **Methods** The *Gentianae Macrophyllae Radix* and *Dipsaci Radix* in the prescription were identified by TLC. The content of gentiopicrosin of *Gentianae Macrophyllae Radix* was determined by HPLC, the mobile phase was methanol-water(30:70), the detection wavelength was 275 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, and the column temperature was 30℃. **Results** The TLC bands were separated well. The gentiopicrosin showed a good linear relationship in the range of 0.019 74~1.974 1 μg,  $r=0.999\ 9$ ( $n=7$ ), the average recovery was 98.11%, and RSD was 0.44% ( $n=6$ ). **Conclusion** The methods are effective, accurate and reliable, which can be used for the quality control of Zaizao Pills.

**Key words:** Zaizao Pills; *Gentianae Macrophyllae Radix*; *Dipsaci Radix*; TLC; HPLC; quality standard

再造丸,原方为《圣济总录·牛膝木瓜丸》之化裁方,是由秦艽、续断等14味中药材经粉碎后加入蜂蜜以水泛丸制成的纯中药复方制剂,能祛风止痛、除湿舒筋,用于风湿痹证引起的关节疼痛、肢体麻木、行履不健等症。方中秦艽具有祛风湿、清湿热之功效<sup>[1]</sup>,续断补肝肾、强筋骨<sup>[2-3]</sup>,以固其本。为有效控制该药品质量,本研究中建立了秦艽、续断的薄层色谱定性鉴别法以及秦艽中龙胆苦苷的含量测定方法。现报道如下。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

Ultimate 3000型高效液相色谱仪(包括DAD检测器、UV检测器,美国DIONEX公司);色谱柱,戴安Acclaim 120 C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),Phenomenex Synergi柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),依利特Hypersil BDS C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);CAMAG TLC VISUALIZER薄层色谱照相机,BP211D电子天平(赛多利斯公司,感量0.01 mg/0.1 mg);硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂)。

#### 1.2 试剂

龙胆苦苷对照品(批号110770-200712,纯度以99.1%计),川续断皂苷VI对照品(批号111685-200802),秦艽对照药材(批号121199-200702),续断

对照药材(批号121033-200608),均由中国食品药品检定研究院提供;甲醇为色谱纯,水为超纯水。5批样品由某制药有限公司提供(批号分别为B#05S-0809, B#05L-1009A, B#05L-1009B, B#05S-0306, B#05S-0306A)。

### 2 方法与结果

#### 2.1 薄层色谱鉴别

秦艽<sup>[4-5]</sup>:取本品5 g,研细,加硅藻土5 g,加甲醇50 mL,加热回流30 min,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加水20 mL,微热使溶解,用乙酸乙酯振摇提取3次,每次25 mL,弃去乙酸乙酯液,水液再用水饱和的正丁醇振摇提取3次,每次25 mL,合并正丁醇液,用正丁醇饱和的水洗涤2次,每次25 mL,弃去水液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。另取秦艽对照药材0.25 g,加甲醇20 mL,同法制成对照药材溶液。再取龙胆苦苷对照品,加甲醇制成每1 mL含1 mg的溶液,作为对照品溶液。按处方比例、制备工艺制备缺秦艽的阴性对照品,按照供试品溶液方法制得。照薄层色谱法[2015年版《中国药典(一部)》附录VI B]试验,吸取上述4种溶液各3~5 μL,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶GF<sub>254</sub>薄层板上,以乙酸乙酯-甲醇-水(20:2:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(254 nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液

第一作者:程似锦(1978-),女,讲师,主要从事药物制剂教学工作,(电子信箱)1036670659@qq.com。

△通信作者:李恒(1981-),男,大学本科,主管药师,研究方向为药品质量控制,(电子信箱)liheng@whdc.org.cn。

色谱和对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,分离度良好,阴性样品(缺秦艽)无干扰。结果见图 1A。

续断<sup>[5-6]</sup>:取秦艽鉴别项下供试品溶液作为供试品溶液。按处方比例,制备工艺制备缺续断的阴性样品,同供试品溶液制备方法制得阴性对照品溶液。另取续断对照药材 0.25 g,加甲醇 20 mL,同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。再取川续断皂苷 VI 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(《中国药典》2015 年版一部附录 VI B)试验,吸取上述 4 种溶液各 3~5  $\mu\text{L}$ ,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正丁醇-醋酸-水(4:1:5)的上层溶液为展开剂,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。供试品溶液色谱中,在与对照药材和对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的主斑点,分离度良好,阴性样品(缺续断)无干扰。结果见图 1B。

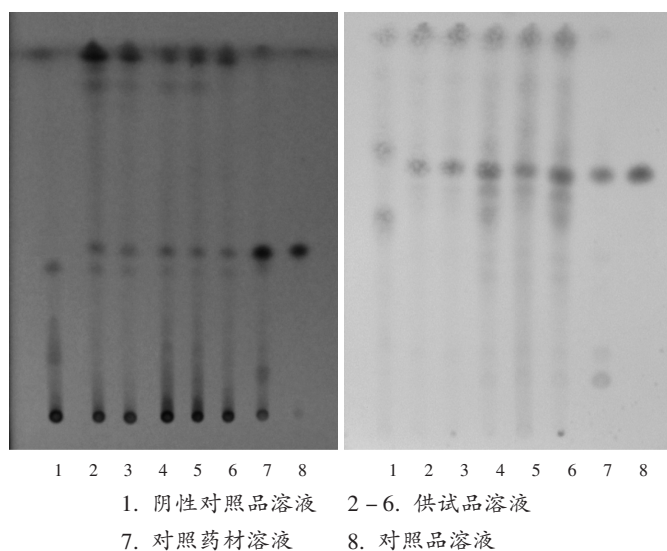


图 1 薄层色谱图

## 2.2 龙胆苦苷含量测定

### 2.2.1 色谱条件

色谱柱:戴安 Acclaim 120 C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:甲醇-水(30:70);检测波长:275 nm;流速:1.0 mL/min;理论板数按龙胆苦苷峰计算应不低于 3 000。柱温:30℃;进样量:20  $\mu\text{L}$ 。

### 2.2.2 溶液制备

对照品溶液:取龙胆苦苷对照品适量,精密称定,加 50% 甲醇制成每 1 mL 含 15  $\mu\text{g}$  的溶液,即得。供试品溶液:取本品,研细,取 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,加热回流 1 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 5 mL 置 10 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45  $\mu\text{m}$ )滤过,取续滤液,即得。阴性对照品溶液:按处方比例、制备工艺制备缺秦艽的阴性

对照品,按照供试品溶液方法制得。

### 2.2.3 方法学考察

专属性试验:取 2.2.2 项下 3 种溶液,按上述色谱条件进行测定。结果表明,供试品溶液色谱中,在与龙胆苦苷对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰,阴性对照品溶液色谱中无相应色谱峰。样品中其他原辅料未对待测物的检测产生干扰。对供试品溶液色谱中与龙胆苦苷溶液相同保留时间色谱峰进行 DAD(190~400 nm)扫描,所得光谱图与龙胆苦苷对照品相一致。详见图 2。

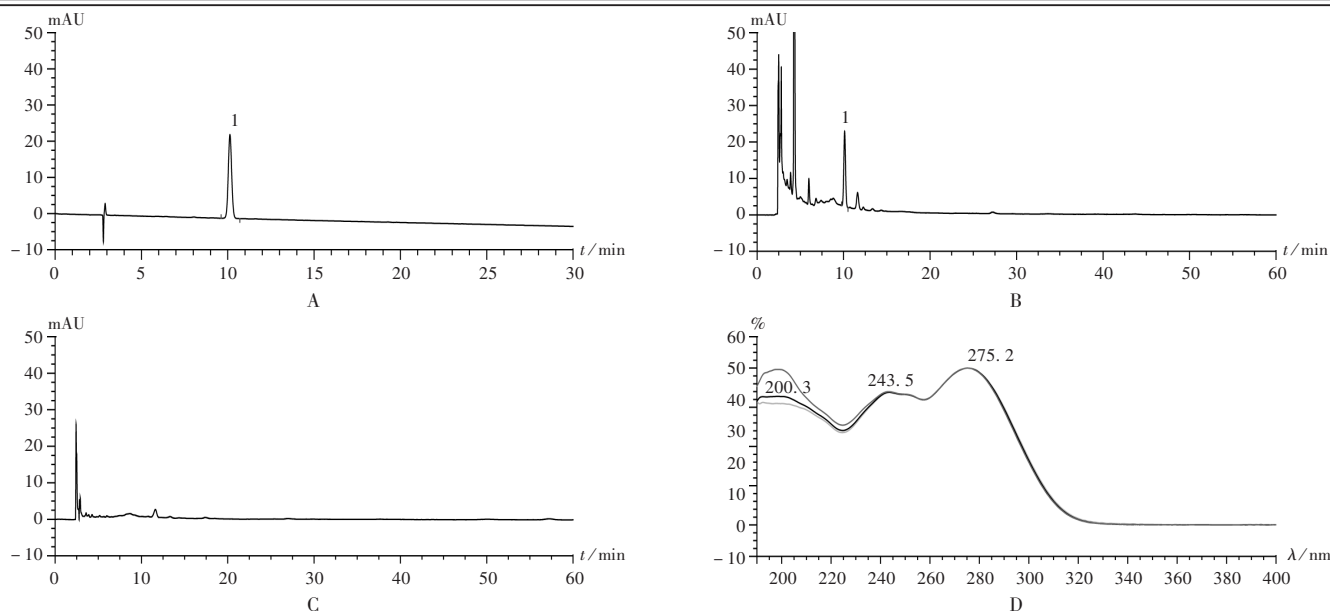
线性关系考察:称取龙胆苦苷对照品(纯度 99.1%)9.96 mg,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取 25 mL 置 50 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,即得到质量浓度为 0.098 7 g/L 的对照品贮备液。再分别精密量取上述对照品贮备液 1,5 mL 置 100 mL 容量瓶中;1.0,1.5,2.0,5.0,10.0 mL 置 10 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为  $9.870 \times 10^{-4}$  g/L,  $4.935 \times 10^{-3}$  g/L,  $9.870 \times 10^{-3}$  g/L,  $1.481 \times 10^{-2}$  g/L,  $1.974 \times 10^{-2}$  g/L,  $4.935 \times 10^{-2}$  g/L,  $9.870 \times 10^{-2}$  g/L 的对照品溶液。分别精密吸取上述系列对照品溶液各 20  $\mu\text{L}$ ,注入液相色谱仪,测定,以进样量为横坐标、峰面积积分值为纵坐标进行线性回归,得回归方程  $Y = 20.796 6 X - 0.076 9$ ,  $r = 0.999 9$  ( $n = 7$ )。结果表明,龙胆苦苷进样量在 0.019 74~1.974 1  $\mu\text{g}$  范围内与峰面积积分值线性关系良好。

精密度试验:吸取质量浓度为 0.014 91 g/L 的龙胆苦苷对照品溶液 20  $\mu\text{L}$ ,连续进样 6 次,以对照品峰面积计算精密度。结果的  $RSD$  为 0.24% ( $n = 6$ ),表明仪器精密度良好。在不同时间以不同的色谱柱将同批样品依法制备供试品溶液,测定含量。结果 3 次测定平均含量为 1.39 mg/g,  $RSD = 0.42\%$  ( $n = 3$ ),表明方法中间精密度良好。

稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液 20  $\mu\text{L}$ ,分别在 0,2,4,8,12 h 时进样。结果平均峰面积值为 5.783,  $RSD = 0.62\%$  ( $n = 5$ ),表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

重复性试验:取本品(批号 B#05S-0809)9 份(取样量分别为 0.7,1.0,1.3 g 各 3 份),依法制备供试品溶液,测定。结果含量平均值为 1.378 mg/g,  $RSD = 0.54\%$  ( $n = 9$ ),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密称定已知含量的样品(批号 B#05S-0809,含量 1.378 mg/g)0.5 g,共取 6 份,分别置于具塞锥形瓶中,再精密量取 50 mL 质量浓度为 0.014 91 g/L 的对照品溶液 6 份,分别加入上述具塞锥形瓶中,再按照供试品溶液项下方法制备供试品溶液,测定并计算回收率。结果回收率在 97%~99% 内,平均 98.11%,



A. 对照品溶液高效液相色谱图 B. 供试品溶液高效液相色谱图 C. 阴性对照品溶液高效液相色谱图 D. 供试品 DAD 扫描图

图2 专属性试验色谱图和光谱图

$RSD = 0.44\%$  ( $n = 6$ ), 表明方法准确性较好。

#### 2.2.4 样品含量测定

取5批样品, 依法测定含量。结果批号为 B#05S-0809, B#05L-1009A, B#05L-1009B, B#05S-0306, B#05S-0306A 的样品中, 龙胆苦苷含量分别为 1.38, 1.34, 1.32, 0.70, 0.73 mg/g。

### 3 讨论

本品为水蜜丸, 且加蜜量为 30%, 在定性鉴别中加适量硅藻土去除炼蜜, 用乙酸乙酯去除脂溶性成分, 从而有效减少了杂质干扰。对秦艽、续断薄层色谱进行了展开温度、湿度、不同厂家薄层板的考察, 均分离良好, 说明此方法可以作为其定性鉴别的方法。

2015 年版《中国药典(一部)》中“秦艽”“龙胆”含量测定项下<sup>[5]</sup>, 龙胆苦苷检测波长分别为 254 nm 和 270 nm。按照“2.2.1”项下色谱条件对龙胆苦苷对照品溶液进行测定, 并做 DAD(190~400 nm)扫描, 所得光谱图显示龙胆苦苷在 244, 275 nm 处有较大吸收, 供试品色谱中龙胆苦苷在相应波长亦有较大吸收。对供试品溶液、对照品溶液在 254 nm 及 275 nm 同时做双波长检测, 发现龙胆苦苷峰在 275 nm 波长所测响应值较 254 nm 高约 20%, 且供试品溶液色谱中杂质峰较少。参考其他文献资料<sup>[7-10]</sup>, 最终选择 275 nm 为龙胆苦苷含量测定的检测波长。

本研究中对提取方法, 提取时间, 提取溶剂的体积进行了考察<sup>[11-12]</sup>, 结果加热回流提取的龙胆苦苷含量较高, 表明加热回流提取效率更高; 加热回流 30 min, 1 h, 2 h 时提取的龙胆苦苷含量相当; 25, 50, 100 mL 提取的龙胆苦苷含量相当。故选择甲醇 50 mL 加热回流 1 h 作为提取方法。

本研究中建立了中药成方制剂再造丸中秦艽、续断的薄层色谱鉴别法, 以及秦艽中龙胆苦苷的含量测定方法, 为该制剂质量标准的制订提供了方法和依据。

#### 参考文献:

- [1] 蔡秋生, 张志红, 高慧琴. 秦艽药理作用及临床应用研究进展[J]. 甘肃中医学院学报, 2010, 27(6): 55-58.
- [2] 高秀芝, 马鲁豫, 金艳霞, 等. 川续断化学成分及药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2010, 6(7): 142-146.
- [3] 刘二伟, 吴 帅, 樊官伟. 川续断化学成分及药理作用研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2010, 20(7): 1421-1423.
- [4] 曹 雯. 秦艽的薄层色谱分析[J]. 时珍国医国药, 2003, 26(12): 746-747.
- [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: 270.
- [6] 郭征兵, 徐 倩. 生龙接骨胶囊薄层色谱鉴别[J]. 江西医药, 2010, 11(6): 585.
- [7] 付成国, 朱靖平, 白 冰, 等. 灵龙感冒胶囊中龙胆苦苷的含量测定[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(6): 56-57.
- [8] 王 琳, 段宝忠, 聂茜茜, 等. 高效液相色谱法测定云南产龙胆习用品头花龙胆中 3 种成分的含量[J]. 医药导报, 2015, 34(4): 515-516.
- [9] 陈岳蓉, 刘海青, 苏东敏. HPLC 法同时测定骨刺消痛胶囊中落干酸和龙胆苦苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 28(7): 1169-1171.
- [10] 吴美香, 高洪琳, 张 霞, 等. 骨筋丸胶囊中秦艽的龙胆苦苷的检测研究[J]. 中国药品标准, 2011, 12(3): 202-205.
- [11] 杨 帆, 钟桂雄, 赵洪普, 等. 不同方法提取淫羊藿苷的正交试验研究[J]. 中国药房, 2005, 16(6): 16-18.
- [12] 朱 英, 袁德胜, 陈 氏, 等. 金银花叶总黄酮的水提取工艺研究[J]. 中成药, 2007, 29(1): 60-63.

(收稿日期: 2017-11-12)