

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.09.014

复方独活益肾合剂质量标准提升研究

李德林,任路路,韩 双

(安徽省太和县中医院中药制剂室,安徽 阜阳 236600)

摘要:目的 提升复方独活益肾合剂的质量标准。方法 采用薄层色谱法对制剂中独活、白芍及秦艽进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定制剂中芍药苷的含量,色谱柱为 Welch Zapchrom™ C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~16 min 时 15% A,16~25 min 时 15% A~70% A,25~35 min 时 70% A~15% A),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 230 nm,柱温为 30℃,进样量为 5 μL。结果 独活、白芍、秦艽的薄层色谱图斑点清晰,分离度好,专属性强,阴性对照无干扰。芍药苷进样量在 36.10~541.50 μg 范围内与峰面积线性关系良好;精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2% (n=6);平均加样回收率为 101.54%,RSD 为 1.22% (n=6)。结论 所建立的方法准确可靠,专属性强,稳定性及重复性均较好,可用于提升复方独活益肾合剂的质量标准。

关键词:复方独活益肾合剂;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准;含量测定

中图分类号:R932;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)09-0049-04

Improvement of the Quality Standard of Compound Duhuo Yishen Mixture

LI Delin, REN Lulu, HAN Shuang

(Traditional Chinese Medicine Preparation Room, Taihe Traditional Chinese Medicine Hospital, Fuyang, Anhui, China 236600)

Abstract: Objective To improve the quality standard of Compound Duhuo Yishen Mixture. **Methods** Thin-layer chromatography(TLC) method was used for the qualitative identification of *Radix Angelicae Pubescentis*, *Radix paeoniae alba* and *Radix Gentianae Macrophyllae* in Duhuo Yishen Mixture. High-performance liquid chromatography method(HPLC) was used for the content determination of paeoniflorin in Duhuo Yishen Mixture, the chromatographic column was Welch Zapchrom™ C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile(A)-0.1% phosphoric acid solution(B) with gradient elution(0-16 min, 15% A; 16-25 min, 15% A-70% A; 25-35 min, 70% A-15% A), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 230 nm, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 5 μL. **Results** The TLC spots of *Radix Angelicae Pubescentis*, *Radix paeoniae alba* and *Radix Gentianae Macrophyllae* were clear with good resolution and strong specificity, and the negative control had no interference. The linear range of paeoniflorin was 36.10-541.50 μg. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2% (n=6). The average recovery of paeoniflorin was 101.54% with RSD of 1.22% (n=6). **Conclusion** The established method is accurate, reliable, specific, stable and reproducible, which can be used to improve the quality standard of Compound Duhuo Yishen Mixture.

Key words: Compound Duhuo Yishen Mixture; TLC; HPLC; quality standard; content determination

中医学认为,腰肌劳损多属“痹症”范畴,多因久痹而致肝肾两虚,气血不足而发。临床研究表明,中医药治疗慢性腰肌劳损不仅疗效显著,作用持久,且不易复发^[1]。复方独活益肾合剂系我院名老中医根据中医学理论,结合临床实践研制而成的院内制剂,由独活、白芍、秦艽、桂枝、防风等 15 味中药组方,具有补肝肾、益气养血、祛风止痛功效,主要用于治疗腰肌劳损、腰膝冷痛及肢节屈伸不利,临床疗效较好。现行复方独活益肾合剂执行标准较简单,仅采用高效液相色谱(HPLC)法测定蛇床子素的含量,而蛇

床子素水提取工艺条件下转移率较低,在实际控制该制剂质量时存在一定缺陷。此外,单一成分含量测定已很难保证复杂成方制剂的质量,多组分含量测定更能体现成方制剂的内在质量^[2]。为进一步控制复方独活益肾合剂的质量,保证临床疗效,本研究中建立了独活、白芍、秦艽的薄层色谱(TLC)法,芍药苷含量测定的 HPLC 法。现报道如下。

1 仪器及试剂

1.1 仪器

XSE105DU 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公

第一作者:李德林,男,硕士研究生,执业中药师,研究方向为医院制剂研发,(电子信箱)1223087842@qq.com。

- MMP-3 and MMP-9 polymorphisms and coronary artery disease[J]. Biomed Rep, 2016, 5(6): 709-714.
- [10] 李永芳,李艾帆,张玉超,等. 基质金属蛋白酶 3-1612 基因多态性与急性缺血性脑卒中的关系[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(31): 19-24.
- [11] 孙 钊. 大剂量阿托伐他汀对急性脑梗死患者神经功能和生活质量的影响[J]. 临床合理用药杂志, 2019, 12(29): 34-35.

- [12] 郑桂茹,樊东升. SLC01B1 基因多态性与阿托伐他汀的安全性及有效性相关性分析[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(10): 1268-1272.
- [13] 付 琛,易惠茹,袁建强,等. 阿托伐他汀钙对高血压合并颈动脉粥样硬化斑块患者 C 反应蛋白等相关指标的影响研究[J]. 基层医学论坛, 2019, 23(17): 2372-2374.

(收稿日期:2020-08-23)

司,精度为十万分之一);Ultimate 3000 型高效液相色谱仪(配备紫外检测器,美国赛默飞世尔公司);ZF-2 型三用紫外仪(上海市安亭电子仪器厂);DHG-9055A 型电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);HH-S4 型数显恒温水浴锅(常州国宇仪器制造有限公司);KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 300 W,频率为 40 kHz);硅胶 G 板(青岛海洋化工厂分厂);硅胶 G₂₅₄ 板(烟台市化学工业研究所)。

1.2 试药

秦艽对照药材(批号为 121199-201003),独活对照药材(批号为 120940-201612),芍药苷对照品(批号为 110736-201943,纯度为 95.10%),均购于中国食品药品检定研究院;复方独活益肾合剂(规格为每瓶 250 mL,本院中药制剂室自制,批号分别为 20052301,20052501,20052701);独活、白芍、秦艽、桂枝、防风等 15 味中药饮片均购于安徽金正元中药饮片有限公司;乙腈为色谱纯,水为纯化水,甲醇、乙醚、正丁醇等其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

独活:分别取 3 批(批号分别为 20052301,20052501,20052701)样品,各 20 mL,加无水乙醚振摇提取 2 次,每次 20 mL,合并乙醚液,保留水液层备用,挥干乙醚液,残渣加乙醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液;另取独活对照药材 2 g,加乙醇 10 mL,水浴加热,回流提取 2 h,放冷,滤过,滤液浓缩至 1 mL,作为对照药材溶液;再按复方独活益肾合剂制备工艺制备不含独活的阴性样品,同法制得缺独活的阴性对照品溶液。照 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502 试验,吸取上述 3 种溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)-乙醚-醋酸(10:10:0.5, V/V/V)为展开剂^[3-4],展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与独活对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点,斑

点清晰,分离效果较好,阴性对照无干扰。详见图 1 A。

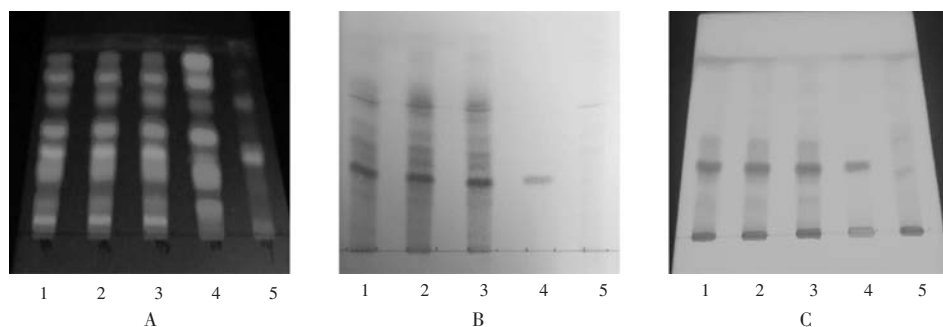
白芍:取独活项下乙醚提取后的水溶液,置已处理好的聚酰胺层析柱(规格为 5 g,内径为 1.5 cm)上,水液冲至无色,收集洗脱液,水浴浓缩至 30 mL,用水饱和的正丁醇提取 2 次,每次 30 mL,合并正丁醇液,蒸干,残渣加乙醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液;另取芍药苷对照品,加乙醇制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液,作为对照品溶液;再按复方独活益肾合剂制备工艺制备不含白芍的阴性样品,同法制得缺白芍的阴性对照品溶液。照 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502 试验,吸取上述 3 种溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2, V/V/V/V)为展开剂^[5-6],展开,取出,晾干,喷以 5% 香草醛硫酸溶液,热风吹至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中,在与芍药苷对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,斑点清晰,分离效果较好,阴性对照无干扰。详见图 1 B。

秦艽:分别取 3 批(批号分别为 20052301,20052501,20052701)样品,各 30 mL,加无水乙醇 70 mL,静置,过夜,离心,取上清液,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 0.5 g,加甲醇 50 mL,超声处理 20 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 10 mL 使溶解,作为对照药材溶液;再按复方独活益肾合剂制备工艺制备不含秦艽的阴性样品,同法制得缺秦艽的阴性对照品溶液。照 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502 试验,吸取上述 3 种溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G₂₅₄ 薄层板上,以乙酸乙酯-甲醇-水(20:2:1, V/V/V)为展开剂^[7-9],展开,取出,晾干,置紫外光灯(254 nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与秦艽对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点,斑点清晰,且阴性对照无干扰。详见图 1 C。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件^[10-12]与系统适用性试验

色谱柱:Welch Zaphrom™ C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,



1-3. 供试品溶液 4. 对照药材(对照品)溶液 5. 阴性对照品溶液

A. 独活 B. 白芍 C. 秦艽

图 1 薄层色谱图

1-3. test solution 4. reference material/reference solution 5. negative reference solution

A. *Radix Angelicae Pubescentis* B. *Radix paeoniae alba* C. *Radix Gentianae Macrophyllae*

Fig. 1 TLC chromatograms

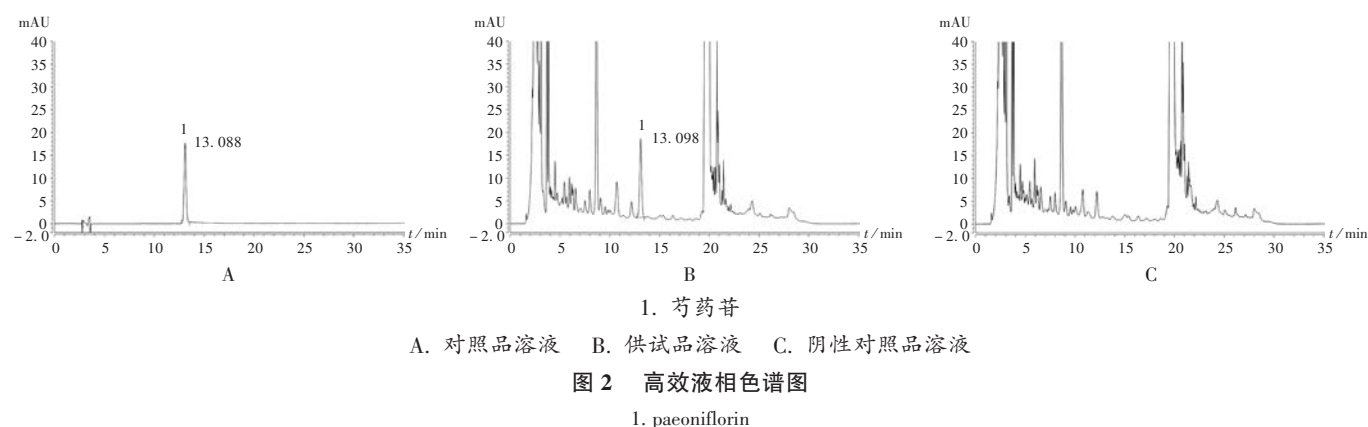


Fig. 2 HPLC chromatograms

5 μm); 流动相: 乙腈(A) - 0.1% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 16 min 时 15% A, 16 ~ 25 min 时 15% A ~ 70% A, 25 ~ 35 min 时 70% A ~ 15% A); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长: 230 nm; 进样量: 5 μL 。理论板数按蛇床子素峰计应不低于 2 000。

2.2.2 溶液制备

量取芍药苷对照品 18.98 mg, 精密称定, 置 50 mL 容量瓶中, 加入适量甲醇溶解, 并定容, 摇匀, 即得质量浓度为 0.361 0 mg/mL 的对照品贮备液。再精密量取上述对照品贮备液 1 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 即得质量浓度为 0.036 1 mg/mL 的对照品溶液。精密量取样品 2 mL, 置 20 mL 容量瓶中, 加稀乙醇 15 mL, 超声处理(功率为 300 W, 频率为 40 kHz) 20 min, 放冷, 再加入稀乙醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。取空白芍药材的阴性样品, 依法制备阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验: 按 2.2.1 项下色谱条件, 分别吸取 2.2.2 项下供试品溶液、芍药苷对照品溶液和阴性对照品溶液各 5 μL , 进样测定。色谱图见图 2。供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相同保留时间内出现芍药苷色谱峰, 且芍药苷分离度及拖尾因子均符合要求, 阴性对照无干扰, 表明专属性良好。

线性关系考察: 分别吸取 2.2.2 项下芍药苷对照品溶液 1, 2, 5, 8, 10, 15 μL , 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以芍药苷对照品进样量($X, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y = 0.021\ 6X + 0.092$, $r = 0.999\ 9$ ($n = 6$)。结果表明, 芍药苷进样量在 36.10 ~ 541.50 μg 范围与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 取 2.2.2 项下芍药苷对照品溶液(质量浓度为 0.036 1 mg/mL)适量, 按 2.2.1 项下色谱条

件连续测定 6 次, 记录峰面积。结果芍药苷平均峰面积为 4.072 7, RSD 为 0.25% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取同一批(批号为 20052501)样品, 依法制备供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时进样测定, 记录峰面积。结果芍药苷平均峰面积为 4.075 8, RSD 为 0.22% ($n = 6$), 表明供试品溶液在室温放置 24 h 内较稳定。

重复性试验: 精密量取同一批(批号为 20052501)样品, 共 6 份, 按 2.2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 再按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果芍药苷平均峰面积为 4.115 3, RSD 为 0.77% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 精密量取已知含量的样品(批号为 20052501) 6 份, 每份 1 mL, 置 20 mL 容量瓶中, 分别加入芍药苷对照品贮备液(质量浓度为 0.361 0 mg/mL) 各 1 mL, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 再按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算回收率。结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果 ($n = 6$)
Tab. 1 Results of the recovery test ($n = 6$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.372 5	0.361 0	0.740 1	101.83	101.54	1.22
0.372 5	0.361 0	0.742 7	102.55		
0.372 5	0.361 0	0.731 7	99.50		
0.372 5	0.361 0	0.736 0	100.69		
0.372 5	0.361 0	0.740 2	101.86		
0.372 5	0.361 0	0.743 6	102.80		

2.2.4 样品含量测定及含量限度确定

通过测定投料前处方中白芍饮片及 3 批(批号分别为 20052301, 20052501, 20052701)样品中芍药苷的含量, 计算芍药苷的转移率。结果样品中芍药苷的含量分别为 0.369 2, 0.372 5, 0.375 8 mg/mL, 平均含量为 0.372 5 mg/mL。生产

原料白芍中芍药苷的含量为3.0%。因处方中每1 mL含白芍生药0.04 g,相当于每1 mL含芍药苷1.2 mg,平均转移率为31.04%。根据2015年版《中国药典(一部)》规定,白芍饮片中芍药苷的含量不得少于1.20%。制成制剂后相当于每1 mL不得少于0.47 mg,结合芍药苷的平均转移率,应不少于0.145 9 mg,再结合多批制剂含量测定结果及工业化大生产,故暂定该制剂每1 mL含芍药苷不得低于0.20 mg。

3 讨论

原标准独活 TLC 项下,供试品的处理采用样品蒸干加适量乙醇超声提取,显色时喷以8%磷钼酸乙醇溶液,加热至斑点显色清晰,主斑点分离虽好,但背景颜色较深,且操作较复杂,尤其蒸干较耗时。参考相关文献,本研究中根据独活所含化学成分的理化性质,采用乙醚提取,置紫外光灯下检视,结果显色效果较好,且操作简单,而乙醚提取后的水液层又可继续为白芍 TLC 鉴别所用。

原标准白芍 TLC 项下,供试品的处理以水饱和的正丁醇萃取,但在实际显色中,供试品中芍药苷分离效果不太理想,在芍药苷斑点处有其他成分覆盖,故首先对展开剂进行了优化,但改变甚微,考虑到供试品所含成分复杂的可能性,在原处理过程中增加了聚酰胺层析纯化步骤。结果显示,供试品中芍药苷在原展开剂条件下,分离效果较好。

对秦艽进行 TLC 鉴别时,比较了2种显色系统,一种是硅胶 G 板,以乙酸丁酯-甲醇-水(20:2:1, V/V/V)为展开剂,喷以10%硫酸乙醇溶液,加热至斑点显色清晰;另一种为硅胶 G₂₅₄ 板,以乙酸乙酯-甲醇-水(20:2:1, V/V/V)为展开剂,置紫外光灯下检视。结果显示,在使用 G₂₅₄ 板置紫外光下检视时,主斑点清晰,且操作更简便。

此外,本研究中还对方中防风、桂枝、熟地黄、桑寄生、茯苓等药味进行了 TLC 鉴别。结果发现,防风、桂枝、熟地黄及茯苓阴性对照有干扰,桑寄生、杜仲及其他药物主斑点不清晰,有待后续进一步研究,故暂未纳入复方独活益肾合剂的质量标准。

考察了不同提取溶剂甲醇、50%甲醇和稀乙醇超声提取对芍药苷含量测定的影响^[12-14]。结果发现,样品加入甲醇后呈混悬状态,吸附严重,提取效果较差;50%甲醇和稀乙醇比较发现,稀乙醇提取率较高。考察了不同

超声时间20 min 的芍药苷含量较超声10 min 高,而与超声30 min 相差不大,表明超声20 min 可提取完全。故选择稀乙醇超声20 min 为最佳提取方法。考察了不同流动相(乙腈-水和甲醇-水)对芍药苷含量测定的影响^[11-12]。结果发现,有机相为乙腈时,芍药苷理论板数较甲醇系统高,且出峰时间较短;无机相为磷酸水溶液时,芍药苷色谱峰形对称性及分离度更好。考察了不同品牌色谱柱(Hypersil ODS2 柱,Wonda Cract ODS2 柱及 Welch Zapchrom™ C₁₈ 柱)对芍药苷含量测定的影响。结果发现,Hypersil ODS2 柱上芍药苷分离度较差,Welch Zapchrom™ C₁₈ 柱较 Wonda Cract ODS2 柱出峰时间短,且分离效果更佳。故选择以乙腈-0.1%磷酸溶液和 Welch Zapchrom™ C₁₈ 柱作为最佳流动相和色谱柱。

综上所述,本研究中建立的独活、白芍及秦艽的 TLC 法阴性对照无干扰,斑点清晰,且专属性较强;芍药苷的 HPLC 含量测定方法简便易行,重复性较好,可用于提升复方独活益肾合剂的质量标准。

参考文献

- [1] 王昭力,王光辉.慢性腰肌劳损中医治法近况概要[J].齐齐哈尔医学院学报,2018,39(12):1431-1432.
- [2] 吕 玥,汤 湧,李立言,等.中药复方制剂质量控制体系的研究进展[J].中国中西医结合外科杂志,2020,26(1):170-172.
- [3] 李喜香,李兴勇,包 强,等.骨痹止痛液的质量标准提高研究[J].中国药房,2017,28(9):1249-1253.
- [4] 李思雨,刘纪青,简 晖.护肾痛风泰颗粒的质量控制方法研究[J].时珍国医国药,2018,29(1):67-68.
- [5] 唐斌斌,杜书君,郝保华.黄芪补气养血合剂质量标准研究[J].中国药业,2018,27(22):40-42.
- [6] 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,2015:1272-1273.
- [7] 李养学,曾文雪,陈秋谷,等.远芪口服液质量标准研究[J].江西中医药,2016,47(12):60-63.
- [8] 王晓娜,宫志强,宋军娜,等.蠲痹颗粒质量标准研究[J].河北中医药学报,2018,33(3):42-45.
- [9] 程似锦,李 恒.再造丸质量标准研究[J].中国药业,2018,27(10):16-18.
- [10] 辛玲歌,赵 锐.养血补元合剂质量标准研究[J].吉林中医药,2019,39(10):1368-1372.
- [11] 陈丽艳.高效液相色谱法测定活血散中芍药苷的含量[J].福建中医药,2018,49(1):37-38.
- [12] 王建花.高效液相色谱法测定防感合剂中芍药苷含量[J].临床合理用药杂志,2017,10(4):68-69.
- [13] 周 哲,孟晓彬,赵 博.HPLC 法测定道遥汤中芍药苷的含量测定[J].贵阳中医学院学报,2019,41(4):23-27.
- [14] 段晓颖,宋少华,张 辉,等.凉血退紫合剂的质量标准研究[J].中国新药杂志,2019,28(23):2909-2913.

(收稿日期:2020-06-24;修回日期:2020-10-21)

本栏目由

国药控股云南有限公司

协办

超声时间(10, 20, 30 min)对芍药苷含量测定的影响。结果显示,稀乙