

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.08.019

苁蓉连翘合剂质量标准研究*

刘娟,韩文均,范伟,时扣荣,张春燕,辛蓓玮,顾伟鹰,朱建勇[△]

(上海中医药大学附属第七人民医院,上海 200137)

摘要:目的 建立苁蓉连翘合剂的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对样品中肉苁蓉、连翘、佛手进行定性鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)法测定样品中松果菊苷的含量,色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.1%甲酸溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 330 nm,柱温为 30℃。结果 肉苁蓉、连翘、佛手的 TLC 斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。松果菊苷进样量在 1.0~20.0 μg 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 9, n=6$);精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 1.1%,平均加样回收率为 98.76%,RSD 为 2.05%($n=9$)。结论 所建立的方法简便易行,专属性强,准确可靠,可用于苁蓉连翘合剂的质量控制。

关键词:苁蓉连翘合剂;薄层色谱法;高效液相色谱法;松果菊苷;质量标准

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)08-0080-04

Study on Quality Standards of Cistanches Herba and Forsythiae Fructus Mixture

LIU Juan, HAN Wenjun, FAN Wei, SHI Kourong, ZHANG Chunyan, XIN Beiwei, GU Weiying, ZHU Jianyong

(Seventh People's Hospital, Shanghai University of TCM, Shanghai, China 200137)

Abstract: **Objective** To establish the quality standard of Cistanches Herba and Forsythiae Fructus mixture. **Methods** The qualitative identification of Cistanches Herba, Forsythiae Fructus and Citri Sarcodactylis Fructus in samples were identified by thin-layer chromatography (TLC). The content of echinacoside was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) method, the chromatographic column was Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.1% formic acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 330 nm, the column temperature was 30℃. **Results** The TLC spots of Cistanches Herba, Forsythiae Fructus and Citri Sarcodactylis Fructus were clear and well separated, and the negative sample had no interference. The injection volume of echinacoside showed a good relationship with the peak area in the range of 1.0-20.0 μg ($r=0.999\ 9, n=6$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 1.1%, the average recovery was 98.76% with RSD of 2.05% ($n=9$). **Conclusion** The established method with strong specificity is simple, accurate, reliable, and it can provide a reference for the quality control of Cistanches Herba and Forsythiae Fructus mixture.

Key words: Cistanches Herba and Forsythiae Fructus mixture; TLC; HPLC; echinacoside; quality standard

苁蓉连翘合剂处方源于上海市名老中医叶景华教授的经验方,由肉苁蓉、连翘、菟丝子、续断、巴戟天、佛手6味中药组方,已在本院临床应用20余年^[1],多用于治疗早泄,尤其对早泄型射精功能障碍具有良好疗效^[2]。方中肉苁蓉为君药,其味甘咸,性温,质润,既能补肾阳、又能益精血,补而不峻、补中有通,《神农本草经》谓其“养五脏,强阴,益精气”;连翘为臣药,其性凉味苦,清心降火;菟丝子、续断、巴戟天为佐使药,可补肝肾、强筋骨;佛手具有疏肝理气、条畅气机功效。该方疗效确切,安全稳定,已获得发明专利授权^[3],为了扩大其临床应用范围,拟开发成院内制剂及中药复方制剂。为控制苁蓉连翘合剂质量,本研究中采用薄层色谱(TLC)法对合剂中的肉苁蓉、连翘、佛手进行TLC鉴别,采用

高效液相色谱法测定君药肉苁蓉中松果菊苷的含量,为苁蓉连翘合剂的质量控制提供客观的评价方法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);CP225D型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);DL720-A型超声波清洗仪(上海之信仪器有限公司);SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵(郑州博科设备有限公司);RV-10型旋转蒸发器(德国IKA公司);BD-II型多功能紫外分析仪(北京启航博达科技有限公司);HWS28型电热恒温水浴锅(上海一恒科学实验仪器有限公司);DNG-9140A型电热恒温干燥箱(上海精宏

*基金项目:上海市卫生健康委员会科研项目[20214Y0280];上海市浦东新区卫生健康委员会优秀青年医学人才培养计划[PWRq2020-48]。

第一作者:刘娟,女,大学本科,主管药师,研究方向为临床药学和院内制剂,(电子信箱)liujuan2012@163.com。

[△]通信作者:朱建勇,男,博士研究生,副主任药师,研究方向为天然药物化学、中药新药开发及中药质量标准,(电子信箱)jyzhu@fox-mail.com。

实验设备有限公司)。

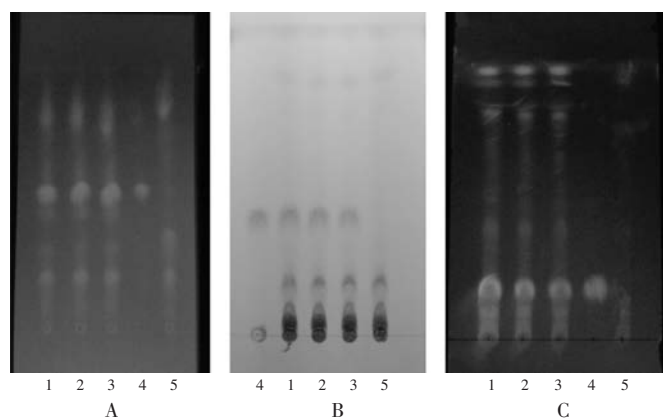
1.2 试药

苁蓉连翘合剂(医院中心实验室,批号分别为20180601,20180602,20180603);连翘苷对照品(批号为111670-201706,含量为95.1%),松果菊苷对照品(批号为110821-201615,含量为97.2%),柚皮苷对照品(批号为110722-201714,含量为96.2%),均购于中国食品药品检定研究院;聚酰胺薄层板(浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂);硅胶G薄层板(山东省烟台江友硅胶开发有限公司);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

肉苁蓉^[4]:取样品5 mL,加水稀释至25 mL,加入石油醚(30~60℃),萃取2次(20,20 mL),弃去石油醚液,剩余溶液再用水饱和正丁醇振摇提取3次(30,15,15 mL)、合并正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇使溶解并定容至5 mL,作为供试品溶液;按苁蓉连翘合剂处方及工艺,制备缺肉苁蓉的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液;取松果菊苷对照品适量,加甲醇制成质量浓度为1 mg/mL的对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法,吸取上述溶液各5 μL,分别点于同一聚酰胺薄层板上,以甲醇-醋酸-水(2:1:7,V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点,斑点清晰,阴性对照无干扰。详见图1 A。



1-3. 供试品溶液(批号分别为20180601,20180602,20180603)

4. 对照品溶液 5. 阴性对照品溶液

A. 肉苁蓉 B. 连翘 C. 佛手

图1 薄层色谱图

1-3. Test solution(the batch numbers were 20180601,20180602,20180603)

4. Reference solution 5. Negative reference solution

A. Cistanches Herba B. Forsythiae Fructus C. Citri Sarcodactylis Fructus

Fig.1 TLC chromatograms

连翘^[5]:取样品5 mL,加水至25 mL,超声(功率600 W,频率40 kHz,下同)处理10 min,用水饱和正丁醇振摇提取3次(30,15,15 mL)、合并正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇使溶解并定容至5 mL,作为供试品溶液;按苁蓉连翘合剂处方及工艺,制备缺连翘的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液;取连翘苷对照品,加50%甲醇制成质量浓度为1 mg/mL的对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法,吸取上述溶液各5 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以二氯甲烷-甲醇(8:1,V/V)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,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。详见图1 B。

佛手^[6]:取样品5 mL,加水至25 mL,超声处理10 min,用氯仿萃取2次(20,20 mL),弃去氯仿液,剩余溶液再用水饱和正丁醇振摇提取3次(30,15,15 mL)、合并正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇使溶解并定容至5 mL,作为供试品溶液;按苁蓉连翘合剂处方及工艺,制备缺佛手的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液;取柚皮苷对照品,加甲醇制成质量浓度为1 mg/mL的对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法,吸取上述3批供试品溶液各10 μL、对照品溶液与阴性对照品溶液各5 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:6:2,V/V/V)下层液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以3%三氯化铝乙醇溶液,在105℃加热约5 min,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点,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^[7]

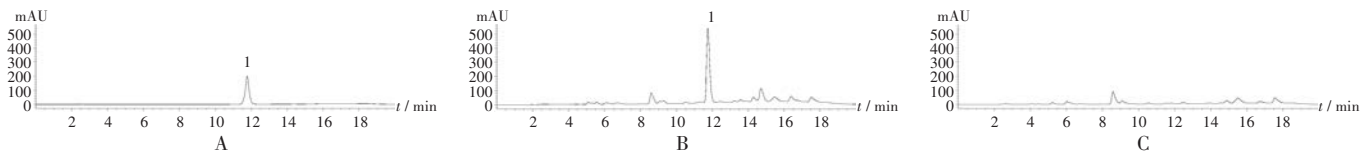
色谱柱:Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1%甲酸溶液(B),梯度洗脱(0~10 min时80%A→60%A,10~15 min时60%A→50%A,15~20 min时50%A→80%A;流速:1.0 mL/min;检测波长:330 nm;柱温:30℃。

2.2.2 溶液制备

取松果菊苷对照品适量,60℃减压干燥4 h,加50%甲醇制成质量浓度为1 mg/mL的对照品溶液。取样品5 mL,加水稀释至25 mL,超声处理30 min,放冷,摇匀,经微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按苁蓉连翘合剂处方及工艺,制备缺肉苁蓉的阴性样品,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

系统适用性及专属性试验:取供试品溶液5 μL、



1. 松果菊苷
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图2 高效液相色谱图

1. Echinacoside

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

对照品溶液与阴性对照品溶液各10 μ L,按2.2.1项下色谱条件进样测定。结果理论板数按松果菊苷峰计大于3 000,基线分离良好;阴性对照品溶液在与对照品溶液色谱保留时间相同处无干扰峰,表明专属性良好。详见图2。

线性关系考察:分别取2.2.2项下对照品溶液1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 μ L,按2.2.1项下色谱条件进样测定,并记录峰面积。以松果菊苷进样量(X, μ g)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 296.9X + 32.92 (r = 0.9999)$ 。结果表明,松果菊苷进样量在1.0~20.0 μ g范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取2.2.2项下对照品溶液适量,按2.2.1项下色谱条件重复进样测定6次。结果松果菊苷峰面积的RSD为1.02%($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液适量,分别于室温下放置0, 2, 4, 6, 8 h时按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果松果菊苷峰面积的RSD为0.31%($n = 5$),表明供试品溶液在室温放置8 h内稳定。

重复性试验:精密量取同一批(批号为20180601)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,记录峰面积并计算松果菊苷的含量。结果松果菊苷的平均含量为17.45 mg/mL, RSD为0.97%($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量(17.45 mg/mL)的样品(批号为20180601)适量,共9份,分别加入低、中、高质量浓度的松果菊苷对照品各适量,再按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表1。

2.2.4 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按2.2.2项下方法制备供试品溶液,并按2.2.1项下色谱条件进样测定样品含量。结果3批样品中松果菊苷含量分别为17.59, 17.40, 17.23 mg/mL,平均含量为17.41 mg/mL。

3 讨论

本研究中参照2020年版《中国药典(一部)》,采用TLC法对肉苁蓉、连翘、佛手进行定性鉴别^[8],并在供试

表1 加样回收试验结果($n = 9$)

Tab. 1 Results of the recovery test($n = 9$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
1.75	1.40	3.11	97.14		
1.75	1.40	3.14	99.29		
1.75	1.40	3.10	96.43		
1.75	1.60	3.36	100.63		
1.75	1.60	3.39	102.50	98.76	2.05
1.75	1.60	3.30	96.88		
1.75	2.00	3.70	97.50		
1.75	2.00	3.72	98.50		
1.75	2.00	3.75	100.00		

品处理过程中,结合所含成分极性的差异采取差异化处理,肉苁蓉中松果菊苷极性较大,故先采用极性小的石油醚进行脱脂去除干扰,再以水饱和正丁醇萃取,从而有效富集松果菊苷。鉴别佛手中柚皮苷时,考虑其为苷类物质,极性较大,先采用二氯甲烷萃取,去除脂溶性成分,再利用水饱和正丁醇萃取出柚皮苷,所得TLC图斑点清晰,且阴性对照无干扰。

本研究中松果菊苷的含量测定方法主要参考2020年版《中国药典(一部)》肉苁蓉的含量测定方法^[8],由于该合剂中松果菊苷含量较高,故样品直接以水稀释,然后滤过,进样测定^[9]。另外,梯度洗脱时间设定为20 min,保留时间相差较大,理论板数大于3 000,峰形佳且分离度好,基线较稳定,组分间互不干扰,操作方法简易且高效,结果可靠。

综上所述,本研究中建立的方法简便易行,灵敏度高且重复性好,可用于苁蓉连翘合剂的质量控制。

参考文献

- [1] 韩文均,孙建明,董升栋,等. 叶氏苁蓉连翘方治疗早泄的临床随机对照试验[J]. 上海中医药杂志,2015,49(11):48-50.
- [2] 韩文均,刘娟,董升栋,等. 孙建明教授治疗早泄经验[J]. 新中医,2015,47(9):16-17.
- [3] 韩文均,韩芹,刘娟,等. 治疗早泄的药物:中国, CN104825600A[P]. 2015.
- [4] 王秀琴,王东兴,纪丽颖,等. 薄层色谱法鉴别参麦清眩膏[J]. 华南国防医学杂志,2017,31(9):631-634.