

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.02.019

消栓再造丸质量标准提升研究

栾洁, 浦洁, 殷红军

(江苏省无锡市药品安全检验检测中心, 江苏 无锡 214028)

摘要:目的 提升消栓再造丸的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的黄芪、天麻进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定制剂中血竭素的含量,色谱柱为 Phenomenex C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钠溶液(50:50, V/V),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 440 nm,柱温为 40 °C,进样量为 10 μL。结果 黄芪、天麻的 TLC 图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。血竭素质量浓度在 1.428 9~178.613 1 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 3.0%;平均加样回收率为 97.33%,RSD 为 2.92%($n=9$)。结论 所建标准准确、简便、重复性好,可用于完善消栓再造丸的质量标准。

关键词:消栓再造丸;薄层色谱法;高效液相色谱法;含量测定;质量标准

中图分类号:R927;R917 文献标志码:A 文章编号:1006-4931(2023)02-0083-04

Improvement of Quality Standard of Xiaoshuan Zaizao Pills

LUAN Jie, PU Jie, YIN Hongjun

(Wuxi Center for Drug Safety Control, Wuxi, Jiangsu, China 214028)

Abstract: Objective To improve the quality standard of Xiaoshuan Zaizao Pills. **Methods** Astragali Radix and Gastrodiae Rhizoma in the preparation were identified by the thin-layer chromatography (TLC). The content of dracorhodin in the preparation was determined by the high-performance liquid chromatography (HPLC), the chromatographic column was Phenomenex C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.05 mol/L sodium dihydrogen phosphate solution (50:50, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 440 nm, the column temperature was 40 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The TLC spots of Astragali Radix and Gastrodiae Rhizoma were clear and well separated, and the negative control had no interference. The linear range of dracorhodin was 1.428 9-178.613 1 μg/mL ($r=0.999\ 9$), the RSDs of precision, stability and repeatability tests were all less than 3.0%. The average recovery of draconin was 97.33% with an RSD of 2.92% ($n=9$). **Conclusion** The established standard is accurate, simple and reproducible, which can be used for the improvement of the quality standard of Xiaoshuan Zaizao Pills.

Key words: Xiaoshuan Zaizao Pills; TLC; HPLC; content determination; quality standard

消栓再造丸属国家中药保护品种,由血竭、黄芪、天麻、朱砂等 38 味药材组方,始载于《北京市药品标准》(1983 年版),由同仁堂制药厂于 1980 年研制而成(且为其保密方)。方中血竭(含有血竭素、血竭红素等黄酮类衍生物成分)活血祛瘀通经;天麻平肝熄风,祛痰解痉;黄芪补气行滞。全方具有活血化瘀、熄风通络、补气养血、消血栓功效,临床多用于治疗气虚血滞、风痰阻络引起的中风后遗症(症见肢体偏瘫、半身不遂、口眼喎斜、言语障碍、胸中郁闷等)。其现行质量标准^[1]项目设置简单,除【性状】、【检查】项外,仅对制剂中的部分药味进行显微鉴别。为此,本研究中采用薄层色谱(TLC)法对方中黄芪、天麻进行定性鉴别^[2-9],采用高效液相色谱(HPLC)法测定方中血竭素的含量^[10-12],为制剂的质量标准改进提供参考。现报道如下。

1 仪器与材料

仪器: Waters 2695 型高效液相色谱仪,包括四元低

压梯度泵、自动进样器、柱温箱和二极阵列检测器(美国 Waters 公司);XS205DU 型电子天平、XP-6 型精密电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);ATS 4 型薄层自动点样仪、ADC 2 型全自动展开仪(瑞士 CAMAG 公司);S100H 型数控超声波清洗器(德国 Elma 公司)。

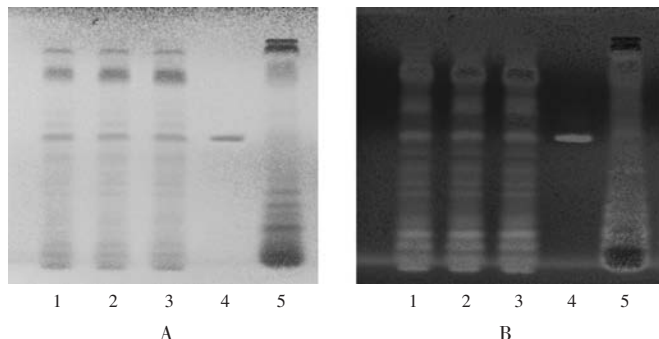
试剂:消栓再造丸(北京某药厂,批号分别为 16013615, 17013437, 17013929, 17013930, 17013964, 18013108, 18013110, 18013437, 18013533, 18013639)。预制硅胶 G 板(100 mm × 100 mm, 德国 Merck 公司);黄芪甲苷对照品(批号为 110781-201717, 含量 96.9%)、天麻素对照品(批号为 110807-201809, 含量 96.7%)、血竭素高氯酸盐对照品(批号为 110811-201707, 含量 96.3%, 血竭素含量 = 血竭素高氯酸盐的含量 / 1.377),天麻对照药材(批号为 120944-201611),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为自制超纯水。

第一作者:栾洁,女,硕士研究生,副主任中药师,研究方向为药品检验及质量标准,(电话)0510-66112730(电子信箱)48982560@qq.com。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

黄芪:取样品6 g,剪碎,加入40 mL甲醇,水浴加热回流1 h,用滤纸滤过,取滤液浓缩至约10 mL,置中性氧化铝柱(100~120目,5 g,内径为15 mm)上,用100 mL 40%甲醇洗脱,取洗脱液,蒸干;残渣加30 mL水使溶解,再用20 mL水饱和的正丁醇振摇提取2次,合并正丁醇提取液,再用水洗涤2次,弃去水液,取正丁醇液,蒸干;残渣加0.5 mL甲醇使溶解,即得供试品溶液。取黄芪甲苷对照品约5 mg,置5 mL容量瓶中,加甲醇制成1 mg/mL的对照品溶液。按消栓再造丸处方和工艺制备缺黄芪的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502^[12],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,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2, V/V/V)的下层溶液为展开剂,展开,取出,喷以10%硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,分别置日光灯及紫外光灯(365 nm)下检视。结果,供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置处显相同颜色斑点,且阴性对照无干扰。详见图1。



1-3. 供试品溶液 4. 黄芪甲苷对照品溶液 5. 阴性对照品溶液
A. 日光灯 B. 紫外光灯(365 nm)

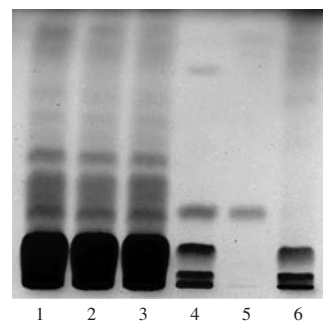
图1 黄芪薄层色谱图

1-3. Test solution 4. Astragaloside IV reference solution 5 Negative reference solution

A. Fluorescent lamp B. Ultraviolet lamp (365 nm)

Fig.1 TLC chromatograms of Astragali Radix

天麻:取样品10 g,剪碎,加等量硅藻土,研匀,称取2 g,加10 mL 70%甲醇超声(功率250 W,频率40 kHz,下同)处理30 min,滤过,取滤液,即得供试品溶液。取天麻素对照品约5 mg,置5 mL容量瓶中,加甲醇制成1 mg/mL的对照品溶液。取天麻对照药材0.5 g,按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按消栓再造丸处方和工艺制备缺天麻的阴性样品,再按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502,取上述供试品溶液及阴性对照品溶液各15 μ L,对照品溶液5 μ L,点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇(9:1:3, V/V/V)为展开剂,展开,取出,喷以磷钼酸乙醇试液,105 $^{\circ}$ C加热



1-3. 供试品溶液 4. 天麻对照药材溶液 5. 天麻素对照品溶液
6. 阴性对照品溶液

图2 天麻薄层色谱图

1-3. Test solution 4. Reference medicinal material solution of Gastrodiae Rhizoma 5. Gastrodin reference solution 6. Negative reference solution

Fig.2 TLC chromatograms of Gastrodiae Rhizoma

至斑点显色清晰,置日光灯下检视。结果,供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置处显相同颜色斑点,且阴性对照无干扰。详见图2。

2.2 血竭素含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钠溶液(50:50, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:440 nm;柱温:40 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

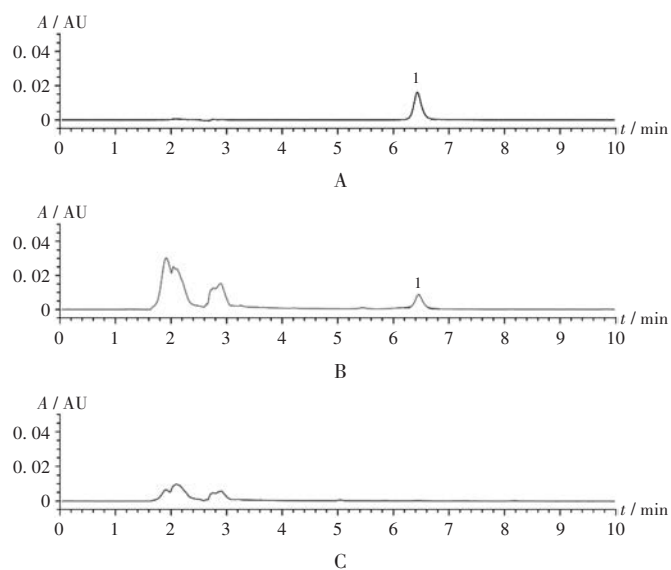
2.2.2 溶液制备

取血竭素高氯酸盐12.770 mg,精密称定,置25 mL棕色容量瓶中,以10%磷酸甲醇溶液溶解并定容,制成血竭素高氯酸盐质量浓度为0.4919 mg/mL(血竭素质量浓度为0.3572 mg/mL)的对照品溶液。取样品10 g,剪碎,精密称定,加入硅藻土10 g,精密称定质量,充分研匀后精密称取4 g,置具塞锥形瓶中,精密加入25 mL 10%磷酸甲醇溶液,密塞,称定质量,超声处理30 min,水浴回流30 min,放冷至室温,再次称定质量,用10%磷酸甲醇溶液补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按处方和工艺制备缺血竭的阴性样品,并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

专属性试验:取上述对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰,且阴性对照无干扰,表明专属性良好。详见图3。

线性关系考察:精密量取2.2.2项下对照品溶液,以10%磷酸甲醇溶液制成含血竭素1.4289, 3.5723, 7.1445, 35.7226, 71.4452, 178.6131 μ g/mL的系列对照品溶液。精密量取10 μ L,按2.2.1项下色谱条件进样测定。以血竭素质量浓度(X , μ g/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 2.288 \times$



1. 血竭素

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图3 高效液相色谱图

1. Dracorhodin

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

Fig. 3 HPLC chromatograms

$10^4 X - 1.263 \times 10^3$ ($r = 0.9999$)。结果表明,血竭素质量浓度在 $1.4289 \sim 178.6131 \mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

定量限与检测限考察:分别精密量取对照品溶液适量,倍比稀释,按2.2.1项下色谱条件进样测定,以信噪比10:1、3:1时的待测成分质量浓度分别记作定量限、检测限。结果血竭素的定量限和检测限分别为 $0.5894 \mu\text{g}/\text{mL}$, $0.1768 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

精密度试验:取2.2.2项下对照品溶液适量,按2.2.1项下色谱条件进样测定6次,记录峰面积。结果血竭素峰面积的RSD为0.71% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液(批号为17013437)适量,分别于室温下放置0,2,4,8,12 h时按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果血竭素峰面积的RSD为2.70% ($n=5$),表明供试品溶液在室温放置12 h内基本稳定。

重复性试验:精密称取样品(批号为17013437)适量,各6份,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,并计算血竭素含量。结果血竭素平均含量为 $62.04 \mu\text{g}/\text{g}$, RSD为0.84% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(批号为17013437)适量,共9份,以当前取样含量的1:0.5、1:1、1:1.5,精密加入2.2.2项下对照品溶液适量,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,记录峰面积并计算加样回收率。结果见表1。

表1 加样回收试验结果 ($n=9$)

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

取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
2.0077	62.2152	35.7225	97.3512	98.36		
2.0178	62.5282	35.7225	96.4813	95.05		
2.0074	62.2059	35.7225	96.2802	95.39		
2.0031	62.0726	71.4450	131.6605	97.40		
2.0051	62.1315	71.4450	134.0975	100.73	97.33	2.92
2.0030	62.0695	71.4450	135.5488	102.85		
2.0066	62.1811	107.1675	164.3426	95.33		
2.0025	62.0540	107.1675	165.4081	96.44		
2.0039	62.0974	107.1675	163.2804	94.46		

2.2.4 样品含量测定

取10批样品各适量,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,记录峰面积并计算含量。结果见表2。

表2 样品含量测定结果 ($\mu\text{g}/\text{g}$, $n=2$)

Tab. 2 Results of content determination of dracorhodin in the samples ($\mu\text{g}/\text{g}$, $n=2$)

批号	含量	批号	含量
16013615	63.27	18013108	35.48
17013437	62.04	18013110	39.75
17013929	35.18	18013437	38.91
17013930	55.99	18013533	42.97
17013964	38.30	18013639	43.41

3 讨论

定性鉴别中,由于样品中含38味药材且均为原粉入药,故对其制备和展开条件进行了探索。在制备黄芪的供试品溶液时,样品的提取曾尝试用甲醇回流液浓缩直接点样展开,但由于处方中含众多药味,薄层展开时干扰较多,故采用滤液过中性氧化铝柱的方式净化供试品溶液,获得较好的TLC图谱;展开条件的考察中,鉴别黄芪时对不同展开系统[三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10, V/V/V/V)置10℃以下的下层溶液、三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2, V/V/V)置10℃以下的下层溶液、二氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(25:5:10:0.2, V/V/V/V)]、鉴别天麻时对不同展开系统[三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(8:1:3:0.1, V/V/V/V)、三氯甲烷-甲醇(3:1, V/V)、三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇(9:1:3, V/V/V)]进行考察,同时对不同厂家薄层板(青岛海洋厂、德国默克公司、德国MN公司产硅胶G薄层板)、不同温度(8℃、25℃、30℃)、不同相对湿度(32%、52%、65%)进行了考察,结果表明,筛选的薄层色谱条件重现性好,分离效能高,可用于消栓再造丸的定性鉴别。

定量测定中,曾尝试取样品,直接加入不同体积分数的磷酸甲醇溶液提取制备供试品溶液,但因样品中