

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)12-0072-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.12.017



柴芍理气和胃合剂质量标准研究*

刘信秋¹, 李思光¹, 尹安坤¹, 牛海军², 李晓亮², 刘旭东³, 袁如柏^{1△}

(1. 安徽省亳州市中医院, 安徽 亳州 236800; 2. 安徽九方药物研究院有限公司, 安徽 合肥 230088;
3. 安徽省亳州市蒙城县中医院, 安徽 亳州 233500)

摘要:目的 建立柴芍理气和胃合剂的质量标准。方法 采用薄层色谱法对柴胡、麸炒枳壳、黄芩、浙贝母药材进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法测定芍药苷的含量, 色谱柱为 Thermo Synchronis C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.2% 磷酸水溶液(梯度洗脱), 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 柴胡、麸炒枳壳、黄芩、浙贝母的薄层色谱图斑点清晰, 分离度高, 专属性强, 且阴性对照无干扰; 芍药苷质量浓度在 0.008 4~0.168 9 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($R^2=0.999\ 0, n=5$); 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 1.0%; 平均加样回收率为 104.14%, RSD 为 0.45% ($n=6$)。结论 所建立的方法操作简便、专属性强、稳定性及重复性良好, 可用于柴芍理气和胃合剂的质量控制。

关键词: 柴芍理气和胃合剂; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 质量标准

Quality Standard of Chaishao Liqi Hewei Mixture

LIU Xinqiu¹, LI Siguang¹, YIN Ankun¹, NIU Haijun², LI Xiaoliang², LIU Xudong³, YUAN Rubai¹

(1. Bozhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Bozhou, Anhui, China 236800; 2. Anhui Joyfar Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Hefei, Anhui, China 230088; 3. Mengcheng County Hospital of Chinese Medicine, Bozhou, Anhui, China 233500)

Abstract: Objective To establish a quality standard of Chaishao Liqi Hewei Mixture. **Methods** Bupleuri Radix, Bran-Fried Aurantii Fructus, Scutellariae Radix and Fritillariae Thunbergii Bulbus were identified qualitatively by the thin-layer chromatography (TLC) method. The content of paeoniflorin was determined by the high-performance liquid chromatography (HPLC) method. The chromatographic column was Thermo Synronis C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), 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 chromatograms of Bupleuri Radix, Bran-Fried Aurantii Fructus, Scutellariae Radix and Fritillariae Thunbergii Bulbus showed clear spots, good separation, strong specificity, and no interference from the negative reference. The linear range of paeoniflorin was 0.008 4-0.168 9 mg/mL ($R^2=0.999\ 0, n=5$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 1.0%. The average recovery rate of paeoniflorin was 104.14% with an RSD of 0.45% ($n=6$). **Conclusion** The established method is simple, specific, stable and repeatable, which can be used for the quality control of Chaishao Liqi Hewei Mixture.

Key words: Chaishao Liqi Hewei Mixture; TLC; HPLC; quality standard

肝气犯胃型胃脘痛以上腹部胃脘近心窝处疼痛为主要表现^[1], 情绪宣泄不畅以致积聚成郁气是其主要病因。西医对于胃痛多采取对症治疗, 远期疗效欠佳^[2], 而中医治疗胃脘痛历史悠久且效果显著, 故可考虑结合中医治疗^[3-5]。柴芍理气和胃合剂是我院临床验方, 常用于胃痛的治疗。为建立其较准确、较全面的质量标准, 保证临床疗效。本研究中采用薄层色谱(TLC)法对制剂中柴胡、麸炒枳壳、黄芩、浙贝母进行定性鉴别, 采用高效液相色谱(HPLC)法测定芍药苷的含量。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Thermo U-3000 型高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); SQP 型电子天平(德国 Sartorius

公司, 精度为 0.01 mg); ZF-7N 型智能暗箱式三用紫外分析仪(上海嘉鹏科技有限公司); KQ-100DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 硅胶 G 薄层板(青岛谱科分离材料有限公司)。

1.2 试药

柴芍理气和胃合剂(蒙城县中医院制剂室自制, 16 味组方中药饮片均购于安徽普仁中药饮片有限公司, 并经亳州市中医院袁如柏副主任中药师鉴定均为正品; 批号分别为 20210501, 20210502, 20210503, 规格为每瓶 250 mL); 柴胡、枳壳、浙贝母的对照药材(批号分别为 120992-201509, 120981-201605, 120972-201906), 黄芩苷、芍药苷的对照品(批号分别为 110715-201821, 110736-201943, 含量均大于 95%), 均购于中

*基金项目: 安徽省亳州市科技重大专项[bzzd2021003]。

第一作者: 刘信秋, 女, 硕士研究生, 主管中药师, 研究方向为医院制剂研发及中药质量标准, (电子信箱)857268002@qq.com。

△通信作者: 袁如柏, 男, 大学本科, 副主任中药师, 研究方向为中药鉴定及质量标准, (电子信箱)18712233588@163.com。

国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

柴胡:取样品 10 mL,加水饱和正丁醇溶液振摇萃取 2 次,每次 15 mL,合并正丁醇液,依次用等体积的氨试液和正丁醇饱和的水洗涤,弃去水层,正丁醇液蒸干,加甲醇 1 mL 使残渣溶解,作为供试品溶液;取柴胡对照药材 0.5 g,加水 40 mL,加热回流 1 h,滤过,取滤液,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液;按柴胡理气和胃合剂处方及工艺制备不含柴胡的阴性样品,同供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。取上述溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以水-甲醇-三氯甲烷(2:7:13, V/V/V) 10 $^{\circ}$ C 下静置分层后的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以含 2% 对甲氨基苯甲醛的 40% 硫酸乙醇溶液,70 $^{\circ}$ C 加热至斑点清晰,置紫外光灯(365 nm)下检视^[6-7]。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。详见图 1 A。

麸炒枳壳:取样品 20 mL,加乙酸乙酯振摇萃取 2 次,每次 20 mL,合并乙酸乙酯,水浴蒸干,加甲醇 1 mL 使残渣溶解,作为供试品溶液;取枳壳对照药材 0.2 g,加甲醇 15 mL,超声(功率 100 W、频率 40 kHz,下同)处理 30 min,滤过,滤液蒸干,加甲醇 2 mL 使残渣溶解,作为对照药材溶液;按柴胡理气和胃合剂处方及工艺制备不含麸炒枳壳的阴性样品,同供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。取上述溶液各 2 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以水-甲醇-三氯甲烷(2:7:13, V/V/V)静置分层后的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 2% 三氯化铝乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 加热约 5 min,置紫外光灯(365 nm)下检视^[6,8-9]。供试品溶液色谱

中,在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。详见图 1 B。

黄芩:取样品 1 mL,加水稀释至 10 mL,加盐酸调 pH 至 2,加乙酸乙酯振摇萃取 2 次,每次 15 mL,合并乙酸乙酯,水浴蒸干,加甲醇 2 mL 使残渣溶解,作为供试品溶液;取黄芩苷对照品适量,加甲醇制成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液,作为对照品溶液;按柴胡理气和胃合剂处方及工艺制备不含黄芩的阴性样品,同供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。取上述溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以水-甲酸-丙酮-乙酸丁酯(1:1:3:5, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 2% 三氯化铁乙醇溶液,置日光灯下检视^[6,10]。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。详见图 1 C。

浙贝母:取样品 20 mL,加浓氨试液 2 mL,加三氯甲烷振摇萃取 2 次,每次 20 mL,合并三氯甲烷萃取液,水浴蒸干,加甲醇 1 mL 使残渣溶解,作为供试品溶液;取浙贝母对照药材 2.0 g,加浓氨试液 2 mL,加三氯甲烷 20 mL,超声处理 20 min,放冷,滤过,滤液水浴蒸干,加甲醇 1 mL 使残渣溶解,作为对照药材溶液;按柴胡理气和胃合剂处方及工艺制备不含浙贝母的阴性样品,同供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。取上述溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲醇-浓氨试液-乙酸乙酯(2:1:17, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以稀碘化铋钾试液,置日光灯下检视^[6,11-12]。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。详见图 1 D。

2.2 芍药苷含量测定^[6]

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Thermo Synchronis C₁₈柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)-0.2% 磷酸水溶液(B),梯度

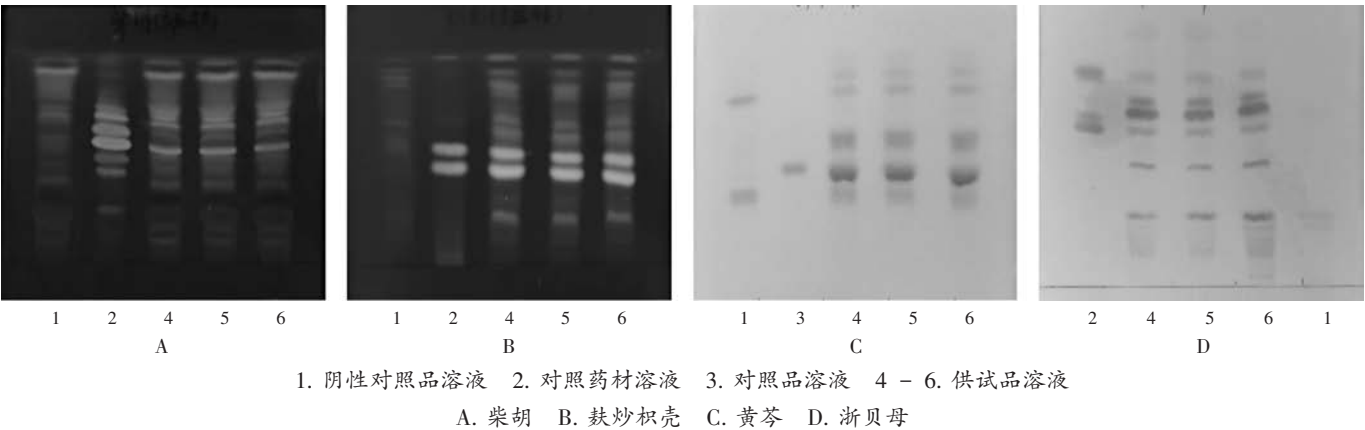


图1 薄层色谱图

1. Negative reference solution 2. Reference solution of medicinal materials 3. Reference solution 4-6. Test solution
A. Bupleuri Radix B. Bran-Fried Aurantii Fructus C. Scutellariae Radix D. Fritillariae Thunbergii Bulbus

Fig. 1 TLC chromatograms

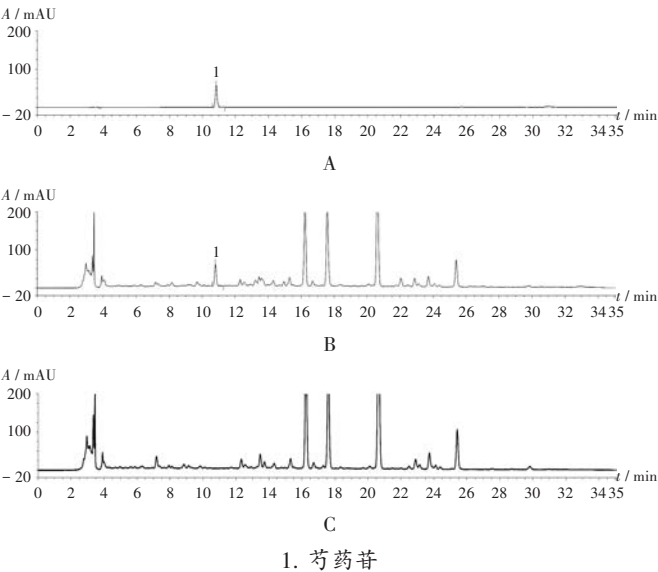
洗脱(0~30 min时12%A→40%A,30~30.1 min时40%A→12%A,30.1~35 min时12%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:230 nm;柱温:30 ℃;进样量:5 μL^[13-17]。

2.2.2 溶液制备

取芍药苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度为59.2 μg/mL的对照品溶液。精密量取样品2 mL,置25 mL容量瓶中,加乙醇稀释,定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按柴芍理气和胃合剂处方及工艺制备缺白芍的阴性样品,再按供试品溶液制备方法制得阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验与系统适用性试验:分别吸取2.2.2项下3种溶液各5 μL,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中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处显相同色谱峰,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。理论板数按芍药苷峰计应不低于2 000,分离度为8.08,拖尾因子为1.01。详见图2。



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. Paeoniflorin

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution
Fig. 2 HPLC chromatograms

线性关系考察:精密量取已知质量浓度(0.059 2 mg/mL)的芍药苷对照品溶液各适量,加乙醇制成质量浓度分别为0.008 4,0.016 9,0.033 8,0.067 6,0.168 9 mg/mL的系列对照品溶液。按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以芍药苷质量浓度(X ,mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=129.13X-0.071(R^2=0.999\ 0,n=5)$ 。结果表明,芍药苷质量浓度在0.008 4~0.168 9 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密量取质量浓度为0.059 2 mg/mL

的对照品溶液5 μL,按2.2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果的 RSD 为0.31%($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密量取样品(批号20210501)2 mL,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0,2,4,8,12,24 h时按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 为0.96%($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验:精密量取样品(批号20210501)适量,平行6份,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果芍药苷含量的 RSD 为0.22%($n=6$),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20210501),共6份,每份1 mL,精密加入芍药苷对照品适量,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,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($n=6$)
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 (%)
0.685 2	0.563	1.273 5	104.49	104.14	0.45
0.685 2	0.563	1.269 1	103.71		
0.685 2	0.563	1.271 6	104.16		
0.685 2	0.563	1.267 7	103.46		
0.685 2	0.563	1.272 9	104.39		
0.685 2	0.563	1.274 3	104.64		

2.2.4 样品含量测定及限度确定

取投料的3批次白芍药材饮片和3批样品适量,分别按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算芍药苷含量及转移率。结果见表2。柴芍理气和胃合剂成品最低含量范围为0.334 9~0.338 5 mg/mL,考虑到生产实际,并保证临床疗效,芍药苷最低含量限度定为0.35 mg/mL。

表2 样品含量及转移率

Tab. 2 Results of content and transfer rate of paeoniflorin in samples

饮片序号	芍药苷含量(%)	制剂理论含量(mg/mL)	样品批号	实测含量(mg/mL)	转移率(%)
1	2.44	1.952	20210501	0.681 1	34.89
2	2.42	1.936	20210502	0.680 5	35.15
3	2.41	1.928	20210503	0.679 9	35.26

3 讨论

3.1 方解

柴芍理气和胃合剂由柴胡、白芍、醋香附、麸炒枳壳、槟榔、黄芪等16味中药材组方。方中柴胡疏肝解郁,白芍柔肝止痛,共为君药;香附疏肝、行气、止痛、解郁,麸炒枳壳、槟榔理气行滞,黄芪、山药补脾益气,白术、

薏苡仁健脾燥湿,共为臣药;姜半夏降逆止呕、燥湿化痰、消痞散结,白及收敛止血,黄芩清肝热燥湿,煅瓦楞子消痰化瘀、软坚散结、止酸止痛,浙贝母清热化痰散结,徐长卿止痛消肿,均为佐药;甘草调和诸药,为使药。诸药合用,共奏疏肝理气、活血止痛及止酸止血之功。

3.2 TLC 条件优化

预试验中,曾对方中除白芍和煅瓦楞子外的14味药材进行了研究,考察了不同的提取方法、展开剂、薄层板及显色剂对TLC鉴别结果的影响,排除了专属性、耐用性不好的鉴别项,最终将柴胡、麸炒枳壳、黄芩及浙贝母4种药材的TLC鉴别纳入质量标准的考察范围。煅瓦楞子的主要成分为碳酸钙,目前相关文献对复方制剂中碳酸钙的定性鉴别研究较少,唐蕾等^[18]采用离子色谱法,通过测定制剂中钙元素的含量,推算出瓦楞子含量,该方法可为柴芍理气和胃合剂中煅瓦楞子含量的测定提供参考。

3.3 HPLC 条件优化

预试验中,在210~400 nm波长范围内对芍药苷样品进行测定,结果在231 nm波长处有最大吸收,因此本研究的测定波长确定为230 nm。在确定定量检测指标时,首先选择君药(柴胡、白芍)中的有效成分作为检测指标,但由于柴胡药材定量成分(柴胡皂苷a和柴胡皂苷d)含量限度较低,故本研究选择目标成分单一、稳定,且含量相对较高的芍药苷作为定量检测指标;药理学研究表明,芍药苷具有抗抑郁、镇痛、保肝、调节免疫等作用^[19],这与柴芍理气和胃合剂疏肝理气、活血止痛的关键功效有较强关联;芍药苷为白芍中的有效成分,梅茜等^[20]分析预测芍药苷可作为白芍的质量标志物,作为复方制剂质量标准控制的指标成分,其含量能客观反映白芍药材及含有白芍的复方制剂质量的优劣。基于以上三点,选择芍药苷作为定量测定指标。

在耐用性试验中,考察了Thermo Synchronis C₁₈柱, Wonda Cract ODS-2柱, Hypersil ODS2柱(规格均为250 mm×4.6 mm, 5 μm)3种品牌色谱柱,结果在色谱峰面积、理论板数、分离度及拖尾因子方面均能满足耐用性要求,表明色谱柱的改变对结果无明显影响。

本研究中测定了投料的3批次白芍药材饮片中芍药苷的含量,结果相差甚微,表明其含量较稳定,有利于从投料源头对制剂进行质量控制;制成制剂后,芍药苷转移率波动较小,说明制剂制备工艺较稳定。

3.4 方法评价

制剂质量是保障临床有效性的关键,柴芍理气和胃合剂组方药材多、成分复杂,故确立评价制剂质量的多指标综合评价体系有一定意义。本研究中在保障可操作性的基础上,分别建立了柴胡、麸炒枳壳、黄芩、浙贝

母的TLC鉴别法及芍药苷的HPLC含量测定法,简单易行、结果重复性较好,可用于柴芍理气和胃合剂的质量控制。

参考文献

- [1] 牛群艳. 中药汤剂联合穴位贴敷对胃脘痛(肝气犯胃证)患者的效果观察[J]. 临床医学研究与实践, 2017, 2(17): 119-120.
- [2] 邓登华. 中西医结合治疗不同证型胃痛的疗效及对患者生活质量的影响[J]. 中国医药科学, 2016, 6(5): 78-81.
- [3] 付亚江, 李洪波. 中医辨证分型治疗胃脘痛的临床研究[J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(A3): 88-89.
- [4] 韩宗萍, 钟雪梅, 刘日娇. 胃脘痛肝气犯胃证的中医辨证施护[J]. 中西医结合护理(中英文), 2018, 4(10): 84-86.
- [5] 赵丽. 调肝理气方治疗肝气犯胃型胃痛的疗效观察[J]. 河南医学研究, 2015, 24(5): 117-118.
- [6] 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, 2020: 59-60.
- [7] 李 晓, 王学方, 张丽先, 等. 大卫颗粒的质量标准提高[J]. 中国现代中药, 2019, 21(4): 517-522.
- [8] 徐玉玲, 伍利华, 谭 平, 等. 清脑复神液质量标准再评价研究[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2015, 34(4): 326-330.
- [9] 周 涓, 杨瑜珍, 陈华杏, 等. 荆防除湿茶薄层色谱鉴别研究[J]. 中国药业, 2017, 26(9): 22-26.
- [10] 赵增成, 林树乾, 李桂明, 等. 白虎定喘口服液的质量检测[J]. 动物医学进展, 2017, 38(3): 79-85.
- [11] 张义生, 梁惟俊, 范彦博, 等. 调脂康口服液的薄层色谱鉴别[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(7): 556-558.
- [12] 王 林, 王婷媛, 邱远金, 等. 清肺扶正丸的质量标准研究[J]. 西北药学杂志, 2017, 32(3): 294-298.
- [13] 许丽丽, 林 林, 于凤蕊, 等. 消乳散结胶囊多指标含量测定及化学计量学分析[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(4): 594-602.
- [14] 余中霞, 方菲菲, 张继红, 等. 高效液相色谱法同时测定养血当归糖浆中芍药苷和甘草酸铵含量[J]. 中国药业, 2020, 29(9): 120-122.
- [15] 胡 玮, 顾丽亚, 周亚萍, 等. HPLC法同时测定温肾养肝颗粒中4种成分[J]. 中成药, 2019, 41(4): 756-759.
- [16] 张 璐, 姜志戎, 尹 萌, 等. 高效液相色谱法同时测定益肾壮骨丸中芍药苷、莫诺苷和马钱苷含量[J]. 中国药业, 2020, 29(21): 56-59.
- [17] 田 萍, 马 开, 张 薇, 等. HPLC法同时测定真武汤中11种活性成分的含量[J]. 中国药房, 2019, 30(18): 2491-2496.
- [18] 唐 蕾, 唐炳峰, 彭飞燕, 等. 离子色谱法测定复方田七胃痛胶囊中4组分的含量[J]. 中国药师, 2020, 23(8): 1662-1664.
- [19] 牟翔宇, 郭英慧, 孙文君, 等. 柴胡配伍白芍治疗PMDD肝气郁证的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(20): 192-199.
- [20] 梅 茜, 夏金鑫, 郭 爽, 等. 基于指纹图谱及网络药理学的白芍质量标志物(Q-marker)预测分析[J]. 中草药, 2020, 51(10): 2627-2633.

(收稿日期: 2022-08-31; 修回日期: 2022-10-16)