

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)16-0082-04
doi: 10.3969/j.issn.1006-4931.2024.16.018



参归益血合剂质量标准研究*

李小伟¹, 张松¹, 牛倩^{2△}, 吴鸿飞³

(1. 安徽省亳州市蒙城县中医院, 安徽 亳州 233500; 2. 安徽省亳州职业技术学院, 安徽 亳州 236800;
3. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230031)

摘要:目的 建立参归益血合剂的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的虎杖、当归、白芍进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定芍药苷的含量,色谱柱为 Hypersil GOLD C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%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 °C,进样量 5 μL。结果 3种药材 TLC 图斑点清晰,分离度好,且阴性对照无干扰。芍药苷的质量浓度在 0.007 32~0.146 4 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($R^2 = 0.999 8, n = 5$);精密性、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 101.92%, RSD 为 0.66%($n = 6$)。3批样品中芍药苷含量分别为 0.264 0, 0.281 9, 0.271 6 mg/mL。结论 本研究中所建方法操作简便、结果准确可靠,可用于参归益血合剂的质量控制。

关键词:参归益血合剂;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法;芍药苷;含量测定

Study on Quality Standard of Shengui Yixue Mixture

LI Xiaowei¹, ZHANG Song¹, NIU Qian², WU Hongfei³

(1. Mengcheng Hospital of Traditional Chinese Medicine, Bozhou, Anhui, China 233500; 2. Bozhou Vocational and Technical College, Bozhou, Anhui, China 236800; 3. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China 230031)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Shengui Yixue Mixture. **Methods** Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix, Angelicae Sinensis Radix and Paeoniae Radix Alba in the preparation were qualitatively identified 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 the Hypersil GOLD C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.1% 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 °C, and the injection volume was 5 μL. **Results** The TLC chromatograms of the three medicinal herbs showed clear characteristic spots, good resolution, and there was no interference from the negative reference. The linear range of paeoniflorin was 0.007 32 - 0.146 4 mg/mL ($R^2 = 0.999 8, n = 5$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 1.0%. The average recovery rate of paeoniflorin was 101.92% with an RSD of 0.66% ($n = 6$). The contents of paeoniflorin in three batches of samples were 0.264 0, 0.281 9, 0.271 6 mg/mL, respectively. **Conclusion** The established method is easy, accurate and reliable, which can be used for quality control of Shengui Yixue Mixture.

Key words: Shengui Yixue Mixture; quality standard; TLC; HPLC; paeoniflorin; content determination

特发性血小板减少性紫癜(ITP)西医属获得性自身免疫性疾病^[1],中医属“紫癜病”“肌衄”“葡萄疫”等范畴^[2-3]。参归益血合剂为蒙城县中医院治疗ITP的协定方剂,由白芍、太子参、当归、地黄、熟地黄、白茅根、鸡血藤、仙鹤草、虎杖、墨旱莲等10味中药组成。白芍为方中君药,其有效成分为理化性质较稳定的芍药苷^[4]。为加强该方的质量控制,本研究中采用薄层色谱(TLC)法对方中虎杖、当归、白芍进行定性鉴别,采用高效液相色谱(HPLC)法测定制剂中芍药苷的含量^[5-7]。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

SQP型电子分析天平(赛利多斯科学仪器<北京>

有限公司,精度为0.01 mg);DHG-9140A型鼓风干燥箱(上海三发科学仪器有限公司);JK-500DVE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DZKW-S-4型电热恒温水浴锅(上海科恒实业发展有限公司);WFH-203型三用紫外分析仪(上海精科实业有限公司);Ultimate 3000型高效液相色谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

1.2 试药

参归益血合剂(蒙城县中医院制剂室,批号分别为20210601, 20210602, 20210603);芍药苷对照品(批号为110736-201842,含量>98%),虎杖对照药材(批号为120980-201706),当归对照药材(批号为120927-

*基金项目:安徽省高校自然科学基金项目[KJ2021A1432]。

第一作者:李小伟,男,硕士研究生,主管药师,研究方向为中药制剂工艺及质量标准,(电子信箱)mexzyzjs@sina.com。

△通信作者:牛倩,女,硕士研究生,副教授,研究方向为中药资源开发与应用,(电子信箱)ahbanli@163.com。

202118), 白芍对照药材(批号为120905-202011), 均由中国食品药品检定研究院提供; 硅胶G薄层板, 硅胶GF₂₅₄薄层板; 乙腈、甲醇均为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

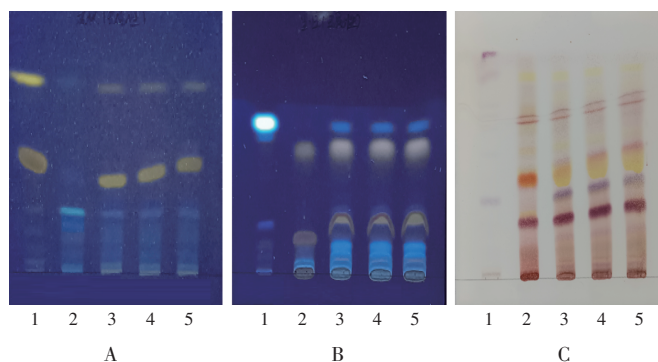
2.1 TLC鉴别

虎杖^[7-8]: 取3批样品各10 mL, 置分液漏斗中, 分别加入三氯甲烷振荡提取2次(每次20 mL), 合并三氯甲烷溶液, 蒸干, 残渣加1 mL三氯甲烷使溶解, 作为供试品溶液; 称取虎杖对照药材0.1 g, 精密称定, 加水10 mL, 超声(功率500 W、频率40 kHz, 下同)处理30 min, 滤过, 取续滤液, 同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液; 按参归益血合剂处方及工艺制备缺虎杖的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验, 分别吸取上述溶液各5 μ L, 点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板上, 以石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1, V/V/V)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, 在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的荧光斑点, 比移值理想, 且阴性对照无干扰。详见图1A。

当归^[9-10]: 取3批样品各40 mL, 置分液漏斗中, 分别加入乙醚20 mL, 充分萃取, 静置5 min, 弃去下层水液, 取乙醚层, 萃取2次, 合并提取液, 蒸干, 再加入乙醇1 mL, 作为供试品溶液; 称取当归对照药材0.5 g, 粉碎, 加乙醚20 mL, 超声处理30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加乙醇1 mL使溶解, 作为对照药材溶液。按参归益血合剂处方及工艺制备缺当归的阴性样品, 按供试品制备方法制备阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验, 分别吸取供试品溶液、阴性对照品溶液各10 μ L, 对照药材溶液5 μ L, 点于同一硅胶G薄层板上, 以环己烷-醋酸乙酯(4:1, V/V)为展开剂, 室温展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中, 在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点, 比移值理想, 且阴性对照无干扰。详见图1B。

白芍^[4]: 取3批样品各40 mL, 置分液漏斗中, 分别加入乙醚振荡提取2次(每次20 mL), 收集水液层, 用水饱和的正丁醇提取2次, 合并正丁醇液, 水浴蒸干, 残渣加乙醇1 mL使溶解, 作为供试品溶液; 称取白芍对照药材0.5 g, 加乙醇10 mL, 超声处理10 min, 离心, 倾出上清液, 水浴蒸干, 加入乙醇1 mL, 作为对照药材溶液; 按参归益血合剂处方及工艺制备缺白芍的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。按2020年

版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验, 分别吸取上述阴性对照品溶液、供试品溶液各10 μ L, 对照药材溶液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-甲酸(40:5:10:0.2, V/V/V/V)为展开剂, 室温展开, 取出, 晾干, 喷以5%香草醛硫酸溶液, 105 $^{\circ}$ C加热至斑点清晰, 取出, 在日光灯下检视。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, 比移值理想, 且阴性对照无干扰。详见图1C。



1. 对照药材溶液 2. 阴性对照品溶液 3-5. 供试品溶液
A. 虎杖 B. 当归 C. 白芍

图1 薄层色谱图

1. Reference medicinal herb solution 2. Negative reference solution
3-5. Test solution
A. Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix B. Angelicae Sinensis Radix
C. Paeoniae Radix Alba

Fig. 1 TLC chromatograms

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件

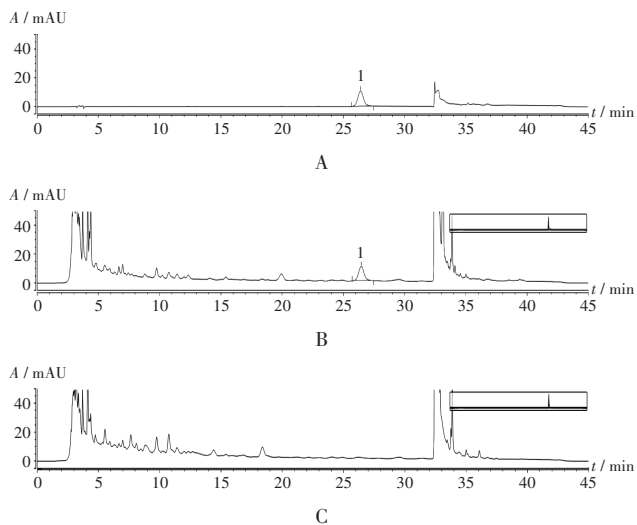
色谱柱: Hypersil GOLD C₁₈柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~28 min时10%A, 28~38 min时40%A, 38~45 min时10%A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 230 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 5 μ L。

2.2.2 溶液制备

取芍药苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇超声处理30 min, 制成每1 mL含0.058 56 mg的对照品溶液。精密量取样品(批号为20210601)5 mL, 置25 mL容量瓶中, 加乙腈-0.1%磷酸水溶液(10:90, V/V)定容, 充分摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。按参归益血合剂处方及工艺制备缺白芍的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

系统适用性试验及专属性考察: 精密吸取2.2.2项下3种溶液各5 μ L, 按2.2.1项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果供试品溶液在与对照品溶液相应位置有吸收峰, 各色谱峰分离良好(分离度 > 1.5), 理论



1. 芍药苷
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. Paeoniflorin

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

Fig. 2 HPLC chromatograms

塔板数按芍药苷峰计应不低于2 000,且阴性对照无干扰。详见图2。

线性关系考察:量取质量浓度为0.732 0 mg/mL的对照品溶液适量,加甲醇制成质量浓度分别为0.007 32, 0.014 64, 0.029 28, 0.058 56, 0.146 4 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 $Y = 102.9X - 0.148$ ($R^2 = 0.999 8, n = 5$)。结果表明,芍药苷质量浓度在0.007 32 ~ 0.146 4 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取质量浓度为0.058 56 mg/mL的对照品溶液5 μ L,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0.63% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液(批号为20210601)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。结果的RSD为0.36% ($n = 5$),表明供试品溶液室温放置12 h内基本稳定。

重复性试验:取同一批(批号为20210601)样品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,并计算样品含量。结果芍药苷平均含量为0.264 8 mg/mL,峰面积的RSD为0.98% ($n = 6$),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20210601)6份,各5 mL,分别加入芍药苷对照品1.464 mg,按2.2.2项下

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(%)
1.324	1.464	2.829 4	102.83	101.92	0.66
1.324	1.464	2.802 7	101.00		
1.324	1.464	2.812 4	101.67		
1.324	1.464	2.811 0	101.57		
1.324	1.464	2.815 8	101.90		
1.324	1.464	2.825 5	102.56		

方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件下进样测定,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批样品适量,各3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3批样品中芍药苷的含量分别为0.264 0, 0.281 9, 0.271 6 mg/mL。

3 讨论

3.1 TLC 条件选择

预试验中结合《中国药典(一部)》及相关文献逐一考察了各药味的TLC条件。其中鸡血藤、仙鹤草、熟地黄、墨旱莲、白茅根、太子参等药材均以2种展开剂展开,但供试品溶液色谱在与对照药材(或对照品)溶液色谱相应位置上无相同颜色斑点或斑点显色不清晰。根据中药制剂复方中“所有药味进行鉴别研究首选处方中君药、臣药、贵重药、毒性药列入质量标准”的原则,故本研究中对参归益血合剂中虎杖、当归、白芍建立TLC鉴别标准。

虎杖,参照2020年版《中国药典(一部)》和文献[11-12],分别选择正己烷-乙酸乙酯-甲酸(6:2:0.1, V/V/V)、石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1, V/V/V)、三氯甲烷-丙酮-甲酸(16:3:1, V/V/V)为展开剂进行方法学验证研究,确定以石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1, V/V/V)为展开剂时方法学考察参数良好,在日光灯和254 nm紫外光灯下检视时斑点显现效果最好。当归,参考文献[13-15]选择正己烷-乙酸乙酯(9:1, V/V)、正己烷-乙酸乙酯(4:1, V/V)和环己烷-乙酸乙酯(4:1, V/V)为展开剂进行方法学验证,确定以环己烷-醋酸乙酯(4:1, V/V)为展开剂充分饱和后进行展开并置365 nm紫外光灯下检视时展开效果最好,且无毒无环境污染。白芍,参照2020年版《中国药典(一部)》和文献[16-17],选择三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2, V/V/V/V)为展开剂进行方法学验证研究。薄层板充分饱和约10 min后进行展开,取出,喷洒5%香草

醛硫酸溶液适量,结果在 105 °C 加热后斑点显色较清晰。

3.2 HPLC 法指标成分的选择

参归益血合剂中君药包括太子参、当归、白芍及熟地黄,其中太子参有效成分主要为皂苷类,目前 2020 年版《中国药典》暂未对其含量进行控制^[18-19]。当归的定量成分为挥发油和阿魏酸,含量限度仅为 0.4% 和 0.050%,有研究发现当归中挥发油和阿魏酸含量分别为 0.666 4% 和 0.093%^[20],提示经水提转移率较低。熟地黄定量成分为地黄苷 D,含量限度为 0.050%^[21-22]。白芍中的主要活性成分为芍药苷,其调节免疫细胞与细胞因子、抗过敏、治疗自身免疫性疾病、保肝护肾等药理作用明显^[4],含量限度为 1.2%。白芍的测定成分单一、稳定,且测定的目标成分含量相对较高。因此,本研究中以君药白芍中芍药苷作为定量指标。

3.3 流动相的选择

预试验中查阅文献^[23-26],考察了甲醇-水(1:3, V/V),甲醇-水-冰醋酸(25:75:0.1, V/V/V),甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(27:73, V/V)等流动相,结果三者分离度、峰形、拖尾因子、保留时间等方面均不理想。2020 年版《中国药典(一部)》中芍药苷含量测定色谱条件中流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液(14:86, V/V),课题组微调两者体积比为 10:90,在 26 min 左右出峰,无干扰,且样品含量、理论板数及拖尾因子良好,经方法学考察此流动相条件耐用性好,基本符合本制剂中芍药苷含量测定要求,为保证 50 min 左右出现的杂质峰不干扰目标峰,故选择梯度洗脱。

3.4 方法评价

本研究中建立的参归益血合剂定性和定量方法操作简单易行,专属性强,结果准确,可用于参归益血合剂的质量控制。

参考文献

[1] 万敏,谭晶晶,周林. 健脾益气摄血方对模型小鼠血小板减少性紫癜的改善作用[J]. 中国药业,2022,31(6):55-60.
[2] 周平,左晓峰,徐玉莲,等. 匹多莫德联合泼尼松治疗小儿过敏性紫癜临床研究[J]. 中国药业,2019,28(18):59-61.
[3] 刘媛,刘瑞璇,庄泽钦,等. 基于“阴虚难调”论治慢性难治性血小板减少性紫癜[J]. 环球中医药,2023,16(12):2551-2555.
[4] 陈珍,何蕊,李淑玲,等. 院内制剂丹芍清胃颗粒中芍药苷含量的 HPLC 测定[J]. 长春中医药大学学报,2023,39(7):737-740.
[5] 胡婧文,赵颖. 不同产地虎杖的薄层色谱和 HPLC 指纹图

谱研究[J]. 中医药导报,2020,26(16):56-60.
[6] 李旭,李成义,陈杰,等. 基于 HPLC 指纹图谱的当归不同干燥品质量研究[J]. 中国现代中药,2019,21(3):328-332.
[7] 田欢,祁庆瑞,王可欣,等. 定眩饮颗粒质量标准研究[J]. 中国药业,2023,32(5):88-92.
[8] 郑厚平,黄贵庆,潘文按. 医院制剂心脉舒一号口服液薄层色谱鉴别研究[J]. 广东化工,2021,48(12):201-202.
[9] 何佩贞,黄春喜,何成章,等. 中药制剂 702 糖浆薄层色谱鉴别与含量测定[J]. 广西医科大学学报,2022,39(6):987-992.
[10] 黄振忠,袁经权,唐炳兰,等. 洗四方袋泡剂质量标准研究[J]. 中国药业,2020,29(15):64-67.
[11] 吴红燕,李慧媛,杨仁耐,等. 前列通瘀颗粒多指标成分薄层鉴别及含量测定研究[J]. 中国药师,2022,25(5):918-922.
[12] 白雨鑫,童荣生,李晋齐. 虎杖解毒颗粒(无糖型)的质量标准研究[J]. 中国医院用药评价与分析,2022,22(8):910-914.
[13] 唐文文,李国琴,晋小军. 当归不同药用部位有效成分研究[J]. 中国中医药信息杂志,2012,19(12):58-60.
[14] 张苏,任莹. 十四味当归活血合剂的薄层鉴别及含量测定研究[J]. 四川中医,2021,39(5):51-54.
[15] 胡玉良,杨秋明,王英晶. 复方当归薄荷膏质量标准研究[J]. 中医药导报,2023,29(7):70-73.
[16] 刘平,赵俊超,李日光. 芍药苷药理作用及其机制研究进展[J]. 中医药导报,2023,29(8):84-88.
[17] 赵明,余春辉,詹思. 高效液相色谱法测定慢性胃炎颗粒中芍药苷的含量[J]. 药品评价,2022,19(3):158-161.
[18] 倪建成,范永飞,叶祖云. 太子参化学成分、药理作用和应用的研究进展[J]. 中草药,2023,54(6):1963-1977.
[19] 郭承军,张宁,迟名锋,等. 太子参薄层色谱定性鉴别方法研究[J]. 陕西中医药大学学报,2022,45(1):84-87.
[20] 吕成龙,李会会,史永洁,等. 中药当归现代研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志,2022,47(19):5140-5157.
[21] 张晓亚,徐金娣,许军,等. 整合糖组与代谢组学方法比较蒸制和酒炖熟地黄化学成分[J]. 中草药,2021,52(6):1591-1600.
[22] 张颖,孙菲菲,杨佳宁,等. 地黄不同炮制品薄层色谱鉴别方法的建立[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(15):142-149.
[23] 胡静,许建泰,陈志永,等. 糖尿康胶囊质量标准提升研究[J]. 中国民族民间医药,2022,31(22):34-38.
[24] 杨美丽,张少杰,杨金蕊,等. 养血安神片质量评价方法研究[J]. 中国药业,2023,32(13):77-82.
[25] 孙岚萍,马转霞,马天翔,等. 扶正润肠丸质量标准研究[J]. 甘肃中医药大学学报,2020,37(3):29-34.
[26] 蒋境兴,李宁,武英茹,等. 解毒护肺颗粒质量控制方法研究[J]. 山西中医,2021,37(4):54-57.

(收稿日期:2023-07-30;修回日期:2024-02-15)