

升血小板片质量标准

孙小玲*, 李虹

(辽宁省食品药品检验所, 沈阳 110023)

[摘要] 目的:建立升血小板片的质量标准。方法:采用 TLC 鉴别青黛、连翘、牡丹皮,以靛玉红为定量指标,通过 RP-HPLC 测定靛玉红含量,采用 Discovery C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液-乙酸(80:20:1),检测波长 290 nm。结果:TLC 鉴别表明阴性对照均无干扰;靛玉红线性范围 0.010 95~0.394 2 μg($r=0.999\ 8$),平均加样回收率 97.4%,RSD 0.7%。结论:建立的质量标准方法简便、准确,可用于升血小板片的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱; 青黛; 连翘; 牡丹皮; 升血小板片; 靛玉红; 含量测定

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)14-0074-03

[doi] 10.11653/syfyj2013140074

Study on Quality Standards of Shengxue Xiaoban Tablets

SUN Xiao-ling*, LI Hong

(Liaoning Institute for Food and Drug Control, Shenyang 110023, China)

[Abstract] **Objective:** To establish quality standards of Shengxue Xiaoban tablets. **Method:** TLC was adopted to identify Indigo Naturalis, Forsythiae Fructus and Moutan Cortex. Indirubin was as quantitative indicator, whose content was determined by RP-HPLC, chromatography conditions were as follows: Discovery C₁₈ column (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), mobile phase of methanol-0.1 mol·L⁻¹ ammonium acetate solution-acetic acid (80:20:1), detection wavelength 290 nm. **Result:** TLC identification showed that negative controls were no interference; Linear range of indirubin was 0.010 95-0.394 2 μg ($r=0.999\ 8$), average recovery was 97.4% with RSD of 0.7%. **Conclusion:** This established method was simple and accurate which could be used to quality control of Shengxue Xiaoban tablets.

[Key words] HPLC; Indigo Naturalis; Forsythiae Fructus; Moutan Cortex; Shengxue Xiaoban tablets; indirubin; content determination

升血小板片是在已上市中成药——升血小板胶囊的基础上改剂型而来,原方源自《国家中成药标准汇编》,由青黛、连翘、仙鹤草、牡丹皮、甘草共 5 味药组成,具有清热解毒、凉血止血、散瘀消斑等功效^[1],临床用于原发性血小板减少性紫癜等症。青黛为方中主药,其有效成分主要为靛玉红^[2-3],升血小板胶囊的质量标准中采用薄层扫描法对青黛作定量分析。在原有质量标准研究基础上,本实验选择 HPLC 作为升血小板片的定量方法,测定靛玉红含

量,同时建立青黛、连翘、牡丹皮的 TLC,为控制该产品的质量、保证其临床疗效提供参考。

1 材料

LC-2010CHT 型高效液相色谱仪(日本岛津),UV-265 型紫外分光光度计(日本岛津)。青黛、连翘对照药材(中国药品生物制品检定所,批号分别为 1170-20001,120908-200915),丹皮酚、靛玉红对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110708-200505,110717-200204),升血小板片(大连辉仁制药有限公司),阴性样品制备药材由厂家提供,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析级。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

2.1.1 青黛^[4] 取本品及按处方制法制得缺青黛

[收稿日期] 20130127(003)

[通讯作者] * 孙小玲, 硕士, 主管药师, 从事药品检验及中成药质量标准研究, Tel: 024-25425645, E-mail: lynlyn88@163.com

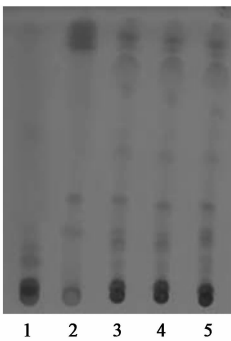
的阴性对照各 1.5 g,加三氯甲烷 10 mL,充分振摇,滤过,取滤液作为供试品溶液。另取青黛对照药材 0.2 g,同法制成对照药材溶液。照 TLC(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B,下同)试验,吸取上述 2 种溶液各 5~10 μL ,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-三氯甲烷-丙酮(5:4:1)为展开剂,展开,取出,晾干,见图 1,结果表明阴性无干扰。



1. 对照药材;2. 阴性样品;3,4,5. 供试品

图 1 青黛 TLC 鉴别

2.1.2 连翘^[5-6] 取本品及按处方制法制得缺连翘的阴性对照各 2 g,加三氯甲烷 30 mL,加热回流 1 h,滤过,弃去滤液,药渣挥干,加甲醇 30 mL,超声提取 30 min,滤过,滤液浓缩至约 1 mL,加中性氧化铝 1 g 拌匀,水浴蒸干,加于中性氧化铝柱上(1 g,内径 1~1.2 cm)上,用甲醇 50 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇 5 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取连翘对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液。照 TLC 试验,吸取上述 2 种溶液各 4 μL ,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇(5:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,热风吹至斑点显色清晰,结果见图 2,表明供试品色谱中检出连翘,且阴性无干扰。

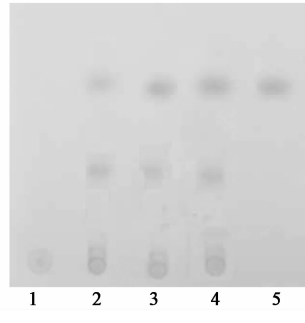


1. 阴性样品;2. 连翘对照药材;3,4,5. 供试品

图 2 连翘 TLC 鉴别

2.1.3 牡丹皮^[7-8] 取本品及按处方制法制得缺牡丹皮的阴性对照各 2 g,研细,加乙醚 15 mL,密塞,振摇 1 min,滤过,滤液自然挥干,残渣加丙酮 2 mL

使溶解,作为供试品溶液。另取牡丹皮对照品,加丙酮制成 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。照 TLC 试验,吸取上述 2 种溶液各 4 μL ,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯(3:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以盐酸酸性 5% 三氯化铁乙醇溶液,热风吹至斑点显色清晰,结果见图 3,表明供试品色谱中检出牡丹皮,且阴性无干扰。



1. 空白对照;2,3,4. 供试品;5. 牡丹皮对照品

图 3 牡丹皮 TLC 鉴别

2.2 含量测定^[9-10]

2.2.1 对照品溶液的配制 精密称取靛玉红对照品 10 mg,置 50 mL 量瓶中,加乙醇-三氯甲烷(4:6)溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取上述溶液 5 mL,置 100 mL 量瓶中,用乙醇-三氯甲烷(4:6)定容至刻度,摇匀,即得。

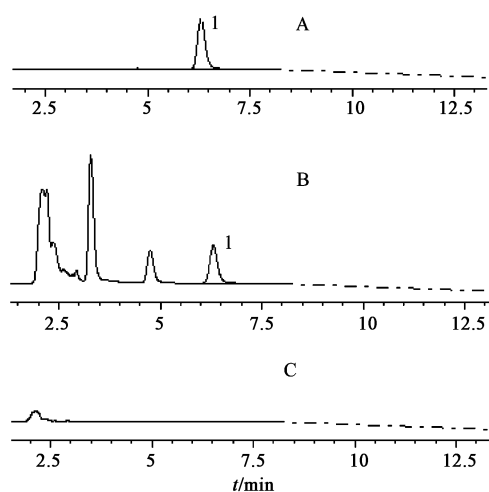
2.2.2 供试品溶液的制备 本品研细,精密称取 0.5 g 置于 100 mL 锥形瓶中,精密加入乙醇-三氯甲烷(4:6)50 mL,称定质量,加热回流 1 h,放冷,称定质量,用乙醇-三氯甲烷(4:6)补足减失质量,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性样品的制备 按处方比例制备缺青黛的升血小板片,按 2.2.2 项下方法制备阴性试液。

2.2.4 检测波长的选定 精密量取靛玉红对照品溶液和供试品溶液适量,以乙醇-三氯甲烷(4:6)为空白,进行全波长光谱扫描,结果发现在 290 nm 处有最大吸收。

2.2.5 色谱条件 Discovery C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 200 mm,5 μm),流动相甲醇-0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液-乙酸(80:20:1),检测波长 290 nm,见图 4。

2.2.6 线性范围的考察 精密量取靛玉红对照品 10.95 mg 置 50 mL 量瓶中,用乙醇-三氯甲烷(4:6)溶解并稀释至刻度,摇匀,得储备液;分别精密吸取该储备液 5,15 mL,依次置于 100,25 mL 量瓶中,用乙醇-三氯甲烷(4:6)稀释至刻度,摇匀,得 131.4, 10.95 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照品溶液。分别精密吸取 10.95 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 靛玉红溶液 1,5,10 μL 和 131.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 靛



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 靛玉红

图 4 升血小板片 HPLC

玉红溶液 1, 2, 3 μL 注入液相色谱仪中, 按 2.2.5 项下色谱条件测定, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 6.582 \times 10^6 X - 21\ 876$ ($r = 0.999\ 8$), 表明靛玉红进样量在 0.010 95 ~ 0.394 2 μg 与峰面积呈良好线性关系。

2.2.7 精密密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL , 按 2.2.5 项下色谱条件连续进样 6 次, 结果峰面积的 RSD 0.4%, 表明仪器精密密度良好。

2.2.8 重复性试验 取同一批号样品 6 份, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 进样, 结果靛玉红平均质量分数 0.811 8 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 0.6%, 表明该方法重复性良好。

2.2.9 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL , 分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 进样, 结果峰面积的 RSD 0.8%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.2.10 加样回收率试验 称取已知含量 (0.811 8 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 的样品 6 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 加入靛玉红对照品溶液 (0.219 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 mL, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 进样, 结果见表 1, 表明本方法回收率良好。

表 1 靛玉红加样回收率试验

No.	取样量 /g	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	实测 总量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.240 3	0.195 1	0.219 0	0.407 7	97.1	97.4	0.7
2	0.250 1	0.203 0		0.415 6	97.1		
3	0.243 7	0.197 8		0.411 5	97.6		
4	0.234 7	0.190 5		0.405 6	98.2		
5	0.238 7	0.193 8		0.404 6	96.3		
6	0.238 1	0.193 3		0.407 7	97.9		

2.2.11 样品测定 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL , 注入液相色谱仪, 测定, 结果 3

批样品中靛玉红的质量分数分别为 0.34, 0.36, 0.37 $\text{mg}/\text{片}$ 。

3 讨论

青黛的鉴别, 原标准采用靛蓝和靛玉红混合溶液作为对照品溶液, 结果靛蓝对照品展开效果较差, 不易上行, 后改用青黛对照药材, 对照药材色谱中斑点清晰, 分离度好。由于苯毒性较大, 故用甲苯代替苯作为展开剂; 连翘鉴别中, 原标准供试品色谱背景较深, 且斑点不是很清晰, 而采用本实验中方法可使斑点分离较好, 背景色带较浅, 重复性好, 且阴性样品溶液无干扰。

青黛为升血小板片中主药, 通过测定其主要有效成分靛玉红含量, 对于控制本品质量及保证本品临床疗效具有重要意义。目前, 靛玉红的含量测定方法有 UV, HPLC^[3], TLC, 本实验建立的方法样品处理简单且分离良好。预试验比较了回流 0.5, 1, 1.5 h 对靛玉红提取率的影响, 结果 1, 1.5 h 时提取率相同, 且均高于 0.5 h, 故确定提取时间 1 h。

[参考文献]

- [1] 国家药品监督管理局. 国家中成药标准汇编[S]. WS-10028(ZD-0028)-2002, 2002:580.
- [2] 扬军, 王京霞. 反相高效液相色谱法测定板蓝根、大青叶中靛蓝、靛玉红的含量[J]. 中药新药与临床药理, 1996, 7(2):43.
- [3] 贾宝红, 卢志刚, 丁川华, 等. HPLC 法测定板蓝根颗粒中靛玉红的含量[J]. 中国药品标准, 2007, 8(6):68.
- [4] 李国辉, 藤欧. 薄层扫描法测定小儿止泻口服液中靛玉红的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2000, 6(3):11.
- [5] 史秀峰, 杨骏, 黄孝春, 等. 连翘中连翘酯苷的大孔树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15):14.
- [6] 张素方, 程怡, 麦艳珍, 等. 正交试验法优选大连翘胶囊提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5):41.
- [7] 段晓颖, 高卫芳, 周淑娟, 等. 牡丹皮中丹皮酚的提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(7):41.
- [8] 谷巍, 巢建国, 刘训红, 等. 安徽道地药材牡丹皮高效毛细管电泳指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17):58.
- [9] 谢东, 路玫. HPLC 法测定升血小板片中靛玉红的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(1):4.
- [10] 姚金, 刘兵兵, 王建中. HPLC 测定口疮膜中靛蓝及靛玉红的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(11):2082.

[责任编辑 全燕]