

蝎龙酒质量标准研究

王亚洲, 杨春旭*

(广西医科大学第四附属医院, 广西 柳州 545005)

[摘要] 目的: 建立蝎龙酒新的质量标准。方法: 采用薄层色谱法(TLC)定性鉴别处方中的白芍、红花和当归; 采用高效液相色谱法对芍药苷、羟基红花黄色素 A 和阿魏酸进行含量测定。用 Inertsil C_{8,3} 柱, 乙腈-0.1% 磷酸-四氢呋喃(18:80:2)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 340 nm。结果: TLC 特征斑点明显、专属性强。芍药苷、羟基红花黄色素 A 和阿魏酸的线性范围分别为 23.35 ~ 373.56, 5.57 ~ 89.08, 2.42 ~ 38.72 mg·L⁻¹; 平均加样回收率分别为 101.08%, 99.85%, 100.34% (n=6)。结论: 所建的新标准可用于蝎龙酒的质量控制。

[关键词] 蝎龙酒; 芍药苷; 羟基红花黄色素 A; 阿魏酸; 高效液相色谱法; 薄层色谱法; 质量标准

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0105-04

Quality Standard of Xielong Liquor

WANG Ya-zhou, YANG Chun-xu*

(The No. 4 Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou 545005, China)

[Abstract] **Objective:** To study a new quality standard of Xielong liquor. **Method:** Radix paeoniae alba, flos carthami and radix angelicae sinensis in the the formula were identified qualitatively by TLC. The

[收稿日期] 20120209(001)

[基金项目] 广西科技厅攻关基金项目(9920028); 广西柳州市科技局科技攻关基金项目(990608)

[第一作者] 王亚洲, 硕士, 主管药师, 从事药品质量标准工作, Tel:0772-3802560, E-mail: lzpharmacy@163.com

[通讯作者] * 杨春旭, 博士, 主任医师, 从事医院管理及科研工作, Tel:0772-3802560, E-mail: yangchunxu008@126.com

- [3] 中国药科大学. 中药辞海[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996: 807.
- [4] 殷文光, 李曼玲, 康琛. 木蝴蝶的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(19): 1965.
- [5] 王燕, 王儒彬, 孙磊, 等. 不同采摘期连翘叶中总黄酮、总酚含量与 DPPH 自由基清除能力的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 109.
- [6] 胡殿丽. 木蝴蝶总黄酮提取工艺和脂肪酸成分研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2010.
- [7] 徐保利, 管慧洁, 李慧, 等. 锦灯笼果实总黄酮提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 33.
- [8] 李姣娟, 周尽花, 戴瑜, 等. 川桂叶总黄酮清除 DPPH·自由基作用的研究[J]. 中南林业科技大报, 2010, 30(10): 125.
- [9] Gupta R C, Sharma V, Sharma N, et al. *In vitro* antioxidant activity from leaves of *Oroxylum indicum* (L.) Vent. -A north Indian highly threatened and vulnerable medicinal plant[J]. Pharm Res, 2008, 1(1): 65.
- [10] 陈乃东, 周守标, 王春景, 等. 春花胡枝子黄酮类化合物的提取及清除羟自由基作用的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 85.
- [11] 马稳, 吴香梅, 张凯歌. 夏桑菊提取物对自由基的清除作用[J]. 光谱实验室, 2011, 28(5): 2313.
- [12] 周萍, 安东, 王朝川, 等. 食用菌复合多糖的抗氧化活性研究[J]. 中国食用菌, 2011, 30(6): 42.
- [13] 任红荣, 张卫明, 单承莺, 等. 香水莲醇提物抗氧化活性的研究[J]. 食品科技, 2010, 35(3): 200.
- [14] 赵克然, 杨毅军, 曹道俊. 氧自由基与临床[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 48.

[责任编辑 顾雪竹]

content of paeoniflorin, hydroxysafflor yellow A and ferulic acid was determined by HPLC with a Inertsil C₈₋₃ column. The mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid-tetrahydrofuran (18:80:2) with a flow rate at 1.0 mL·min⁻¹. Detection wavelength was at 340 nm. **Result:** The TLC spots were clear and specific. The linear ranges for paeoniflorin, hydroxysafflor yellow A and ferulic acid were 23.35-373.56, 5.57-89.08, 2.42-38.72 mg·L⁻¹ respectively. The average recoveries were 101.08%, 99.85%, 100.34% (n=6). **Conclusion:** The new established standard can be used for the quality control of Xielong liquor.

[Key words] Xielong liquor; paeoniflorin; hydroxysafflor yellow A; ferulic acid; HPLC; TLC; quality standard

蝎龙酒为我院院内制剂,处方包括全蝎、白芍、红花、当归、地龙、威灵仙、杜仲等数味中药,有解毒止痛、强筋健骨、活血通经等功效^[1],临床用于治疗各种风湿痹痛所致四肢麻木、腰膝酸痛、骨质增生、跌打损伤、中风后遗症、偏头痛等,疗效明显^[2-3],副作用小。原质量标准中只是对白芍进行鉴别,规定总固体量不少于1%,并无含量测定内容,为进一步提高本制剂质量标准,更好地保证临床疗效,本文参阅有关文献^[4-5,6],对方中的白芍、红花和当归进行了薄层色谱鉴别,并用高效液相色谱法同时测定芍药苷、羟基红花黄色素 A 和阿魏酸 3 种成分的含量。

1 仪器与试剂

LC-10ATvp 高效液相色谱仪 (SHIMADZU 公司),752 型紫外分光光度计 (南京麒麟公司),AB-L 电子分析天平 (梅特勒-托利多公司),MP511 型电子 pH 计 (上海三信公司),B2500S 型超声波清洗器 (BRANSON 公司)。组方中各药材均购自柳州市百草堂中药饮片厂,白芍对照药材、红花对照药材、当归对照药材 (中国药品生物制品检定所,批号 120905-201109,120907-201111,120927-201014);芍药苷对照品 (中国药品生物制品检定所,批号 110736-200630);羟基红花黄色素 A 对照品、阿魏酸对照品 (上海源叶生物科技有限公司,批号 20110311,20110406);甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯,水为重蒸馏水,蝎龙酒 (本院制剂室自制,批号 110809,110822,110830)。

2 定性鉴别

2.1 白芍的 TLC 鉴别 取本品 10 mL,加 70% 甲醇 10 mL,超声处理 30 min,过滤,滤液蒸干,残渣加乙醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取芍药苷对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。称取白芍对照药材粉末 0.5 g,同供试品溶液制备方法,即得对照药材溶液。按照处方组成,取除白芍以外的其余药材,按工艺要求制成酒剂,照上

述供试品溶液制备方法,即得阴性对照溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》2010 年版一部附录 VI B) 试验,吸取上述 4 种溶液各 10 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸 (40:5:10:0.2) 为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 香草醛硫酸溶液,加热至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。

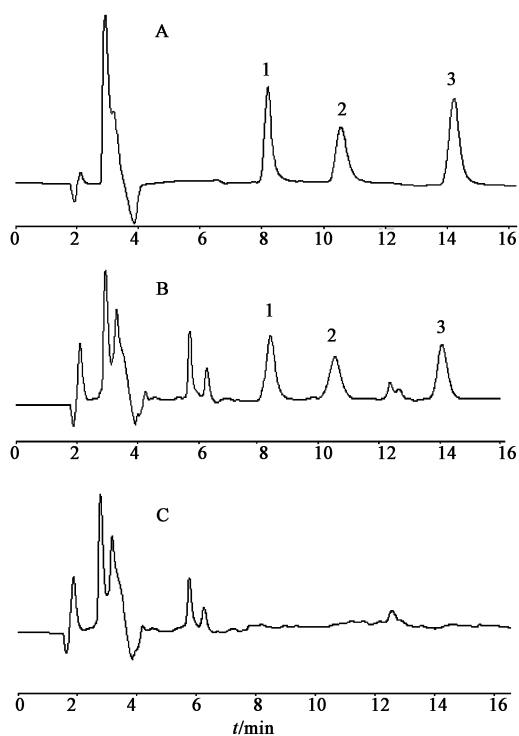
2.2 红花的 TLC 鉴别 取本品 10 mL,用乙酸乙酯振摇提取 3 次,每次 10 mL,合并乙酸乙酯提取液并浓缩至 1 mL,作为供试品溶液。另取羟基红花黄色素 A 对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。称取红花对照药材 0.5 g,加 80% 丙酮溶液 5 mL,密塞,振摇 15 min,静置,吸取上清液,作为对照药材溶液。按照处方组成,取除红花以外的其余药材,按工艺要求制成酒剂,照上述供试品溶液制备方法,即得阴性对照溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》2010 年版一部附录 VI B) 试验,吸取上述 4 种溶液各 5 μL,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 H 薄层板上,以乙酸乙酯-甲酸-水-甲醇 (7:2:3:0.4) 为展开剂,展开,取出,晾干。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。

2.3 当归的 TLC 鉴别 取本品 10 mL,用乙醚振摇提取 3 次,每次 10 mL,合并乙醚提取液,挥干,残渣加无水乙醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取阿魏酸对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。称取当归对照药材粉末 0.5 g,同供试品溶液制备方法,即得对照药材溶液。按照处方组成,取除当归以外的其余药材,按工艺要求制成酒剂,照上述供试品溶液制备方法,即得阴性对照溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》2010 年版一部附录 VI B) 试验,吸取上述 4 种溶液各 10 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正己烷-乙酸乙酯 (4:1) 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,在与对照药材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。

3 方法与结果

3.1 色谱条件及系统适用性实验 色谱柱:Inertsil C₈₋₃柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.1%磷酸-四氢呋喃(18:80:2),检测波长340 nm,柱温30 ℃,流速1.0 mL·min⁻¹,进样量20 μL。在此色谱条件下,芍药苷、羟基红花黄色素A和阿魏酸均能够达到基线分离,其他成分对测定没有干扰。芍药苷保留时间约为8.4 min,羟基红花黄色素A保留时间约为10.7 min,阿魏酸保留时间为14.1 min。见图1。



A. 对照品溶液; B. 样品溶液; C. 阴性对照溶液;
1. 芍药苷; 2. 羟基红花黄色素A; 3. 阿魏酸

图1 蝎龙酒 HPLC 图谱

3.2 对照品溶液的制备 称取经五氧化二磷减压干燥至恒重的芍药苷、羟基红花黄色素A和阿魏酸对照品适量,精密称定,置于棕色量瓶中,加50%甲醇制成每1 mL分别含芍药苷1 867.8 μg,羟基红花黄色素A 445.4 μg和阿魏酸193.6 μg,即得。

3.3 供试品溶液的制备 精密称取蝎龙酒1 mL,置于10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,0.45 μm微孔滤膜过滤,即得。

3.4 阴性对照溶液的制备 按照处方组成,取除白芍、红花和当归以外的其余药材,按工艺要求制成不

含芍药苷、羟基红花黄色素A和阿魏酸的酒剂,按照供试品溶液制备项下的方法,即得阴性对照溶液。

3.5 线性范围考察 取上述混合对照品溶液适量,用50%甲醇稀释成6个质量浓度,即得芍药苷浓度分别为23.35,46.69,93.39,186.78,280.17,373.56 mg·L⁻¹,羟基红花黄色素A质量浓度分别为5.57,11.13,22.27,44.54,66.81,89.08 mg·L⁻¹,阿魏酸质量浓度分别为2.42,4.84,9.68,19.36,29.04,38.72 mg·L⁻¹的溶液。依次进样,按上述色谱条件测定,再分别以3个组分的进样浓度为横坐标,以相应的峰面积为纵坐标绘制标准曲线,芍药苷、羟基红花黄色素A和阿魏酸的回归方程分别为 $Y = 10\ 216X + 769$ ($r = 0.999\ 7$); $Y = 24\ 753X + 1\ 975$ ($r = 0.999\ 5$); $Y = 83\ 437X - 5\ 612$ ($r = 0.999\ 4$)。结果表明,3组分的线性范围分别为23.35~373.56,5.57~89.08,2.42~38.72 mg·L⁻¹。

3.6 进样精密度的试验 分别取上述混合对照品溶液1 000,500,200 μL,置于10 mL量瓶中,用甲醇定容至刻度,配成高、中、低3种浓度。分别在同日内连续进样5次,计算日内精密度,结果芍药苷、羟基红花黄色素A和阿魏酸的RSD分别为1.21%,1.07%,1.49% ($n = 5$);在5日内连续进样5次,计算日间精密度,结果三者的RSD分别为1.96%,2.351%,2.14% ($n = 5$),说明本法进样精密度良好。

3.7 重复性试验 取同一批(批号110809)蝎龙酒,按供试品溶液制备方法制得6份,再按照上述色谱条件测定。测得芍药苷、羟基红花黄色素A和阿魏酸的RSD分别为0.77%,1.26%,1.04%,说明本法重复性良好。

3.8 加样回收率试验 取已知含量的同一批(批号110809)蝎龙酒6份,每份1 mL,分别置于量瓶中,再加入0.1 mL的混合对照品溶液,按供试品溶液制备方法制备成供试品溶液,并按上述色谱条件进行测定。计算结果见表1。

3.9 样品含量测定 按3.3方法制备3批蝎龙酒供试品溶液,每批进样5次,按上述色谱条件测定,以外标法计算供试品溶液的含量,结果见表2。

4 讨论

本品共含有8味中药,试验选择其中3味进行了TLC鉴别,其余药味由于在实验过程中发现干扰大、重复性较差等因素,故暂不纳入标准。

HPLC同时测定制剂中几种组分,选择合适的检测波长尤为关键。我们将芍药苷、羟基红花黄色

表 1 3 种成分加样回收率试验 (n = 6)

组分	样品含量	加入量	测得量	回收率	$\bar{x}/\%$	RSD
	/μg	/μg	/μg	/%		
芍药苷	191.24	186.78	386.56	104.57	101.08	2.10
	192.53	186.78	383.34	102.16		
	189.62	186.78	377.24	100.45		
	186.14	186.78	370.65	98.78		
	183.67	186.78	369.07	99.26		
	185.30	186.78	374.38	101.23		
羟基红花 黄色素 A	49.16	44.54	93.06	98.56	99.85	1.87
	46.35	44.54	89.64	97.19		
	50.27	44.54	95.82	102.27		
	46.89	44.54	92.07	101.44		
	48.55	44.54	90.62	99.41		
	45.96	44.54	92.83	100.23		
阿魏酸	16.46	19.36	35.52	98.45	100.34	2.28
	17.09	19.36	35.92	97.26		
	18.22	19.36	37.84	101.34		
	18.15	19.36	37.97	102.38		
	16.41	19.36	35.68	99.54		
	16.28	19.36	36.23	103.05		

表 2 样品含量测定结果 (n = 5)

批号	芍药苷	RSD	羟基红花 黄色素 A	RSD	阿魏酸	RSD
	/mg·L ⁻¹	/%	/mg·L ⁻¹	/%	/mg·L ⁻¹	/%
110809	187.24	1.21	47.68	1.75	16.70	1.96
110822	190.57	1.46	52.15	1.63	17.68	1.83
110830	185.46	1.08	48.52	1.50	16.32	2.12

素 A 和阿魏酸的对照品溶液分别进行全波长紫外扫描,确定芍药苷最大吸收波长为 230 nm,羟基红花黄色素 A 最大吸收波长为 403 nm,阿魏酸的最大吸收波长为 327 nm。在上述色谱条件下,分别于 230,300,327,340,403 nm 等处对供试品溶液进行分析,发现阿魏酸最大吸收波长 327 nm 附近的 340 nm 处所得的 HPLC 图谱上各组分峰分离效果较好,杂质干扰峰亦被消除,且能较好地兼顾含量较小的阿魏酸和羟基红花黄色素 A 的峰形,因此选择 340 nm 作为检测波长。

参考有关文献^[7-8],经过不同流动相的摸索,发现乙腈-0.1% 磷酸-四氢呋喃(18:80:2)为测定流动相时,三组分的出峰时间更合适,峰形好、无拖尾,且不受杂质峰干扰。在流动相中少量加入的四氢呋喃,很好的改善了峰形。但四氢呋喃容易与流动相中的溶解氧形成有紫外吸收的络合物,此络合物会

提高背景吸收(特别是在 260 nm 以下),导致检测灵敏度的轻微降低^[9],所以试验流动相必须预先彻底脱气。四氢呋喃易被氧化从而可能在色谱图中产生倒峰,故添加四氢呋喃的流动相宜现用现配。

本品中白芍、红花、当归等均为主要药味,方法学研究结果证明,采用薄层色谱法对上述 3 味药材进行定性鉴别,色谱斑点清晰、专属性强。本文建立的高效液相色谱法同时测定芍药苷、羟基红花黄色素 A 和阿魏酸的方法灵敏度高、专属性好,为其他制剂测定上述 3 种组分提供了方法参考。相比于文献^[10]中的调 pH 再乙醚萃取法,本试验中仅需对酒剂稀释即可进行含量测定,操作简便易行。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:96,124,141.

[2] 杨春旭,戴盛明,李桂生. 蝎龙酒对血瘀大鼠血液流变学及正常大鼠血小板功能影响的实验研究[J]. 广西医学,2002,24(6):763.

[3] 朱灵,杨春旭,黎渊弘,等. 蝎龙液浸膏体内外对动物凝血功能及血栓形成的影响[J]. 现代中药研究与实践,2008,22(4):22.

[4] 范莉,濮润,赵海誉,等. 红花药材的 HPLC 指纹图谱及质量研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):37.

[5] 宋志前,王超,王淳,等. HPLC 测定活络效灵颗粒中芍药苷和丹酚酸 B 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(19):64.

[6] 倪文澎,钱平,周琴妹,等. RP-HPLC 法同时测定养生丸中芍药苷和阿魏酸的含量[J]. 中国药师,2010,13(8):1114.

[7] 刘春旭,张颖,刘东春,等. HPLC 法快速测定通脉颗粒中葛根素和阿魏酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):44.

[8] 刘进怀,张晴,薛彬,等. HPLC 测定降糖明目颗粒中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(11):48.

[9] 张庆合. 高效液相色谱实用手册[M]. 北京:化学工业出版社,2008:83.

[10] 梁陈方,杨春旭,吴洪文,等. 高效液相色谱法测定蝎龙酒中阿魏酸的含量[J]. 时珍国医国药,2009,20(7):1661.

[责任编辑 顾雪竹]