

化痔片质量标准研究

莫少红*, 唐弟光, 陈晓军, 廖厚知
(南宁市汇科药物研究所, 南宁 530028)

[摘要] 目的: 建立化痔片的质量标准。方法: 采用 TLC 对方中槐米、枳壳、茜草、三七进行鉴别; 用 HPLC 测定槐米中芦丁的含量。Fuji silysia C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.2% 磷酸(17:83), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 256 nm。结果: 在 TLC 色谱中检出槐米特征成分芦丁、枳壳特征成分橙皮苷和柚皮苷、茜草特征成分大叶茜草素、三七成分人参皂苷 R_{g1}, 斑点清晰, 分离度好; 芦丁在 0.198 ~ 0.990 μg 与峰面积呈良好的线性关系, $r = 1.000$, 平均回收率 98.5%, RSD 0.85%。结论: 方法可行、重复性好, 适用于该制剂的质量控制。

[关键词] 化痔片; 薄层鉴别; 质量标准; 芦丁; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0150-03

Study on Quality Standards for Huazhi Tablets

MO Shao-hong*, TANG Di-guang, CHEN Xiao-jun, LIAO Hou-zhi
(Nanning Huike Institute of Materia Medica, Nanning 530028, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quality standard of Huazhi tablets. **Method:** Sophorae Flos, Aurantii Fructus, Rubiae Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma were identified by TLC. Rutin in Sophorae Flos was determined by HPLC. The separation was applied on a Fuji silysia C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with actetonitrile-0.2% phosphoric acid as wobile phase; the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, and detected at 256 μm. **Result:** Rutin, hesperidin, naringin, mollugin, ginsenoside R_{g1} could be detected with clear spots and good separation by TLC. Rutin showed a good linear relationship in a range of 0.198-0.990 μg, $r = 1.000$. The average recovery was 98.5% and RSD was 0.85%. **Conclusion:** The methods are available with a good reproducibility and can be used for the quality control of Huazhi tablets.

[Key words] Huazhi tablets; TLC; quality standard; rutin; HPLC

化痔片由槐米、茜草、枳壳、三棱、三七 5 味中药制成, 有清热、凉血、止血、行气散瘀的功效, 用于内痔、外痔、混合痔, 内外痔血栓等病症^[1]。化痔片质量标准收载于《卫生部药品标准中药成方制剂》第 15 册, 质量控制项目缺乏薄层鉴别和含量测定项, 未见有关于本品系统质量研究的文献报道。为有效控制产品质量, 本试验用薄层色谱鉴别法对方中槐米特征成分芦丁、枳壳特征成分橙皮苷和柚皮苷、茜草特征成分大叶茜草素、三七成分人参皂苷 R_{g1} 进

行定性鉴别^[2-4], 用高效液相色谱法对槐米中的芦丁进行含量测定^[5-7], 为建立完整的质量标准提供了依据。

1 仪器与试剂

LC-10ATvp 型高效液相色谱仪(日本岛津), AB265-S 型分析天平(梅特勒-托利多), HS-10260D 型超声波清洗器(天津市恒奥科技发展有限公司), ZF-2 型三用紫外仪(上海市安亭电子仪器厂)。

芦丁对照品(含量测定用, 批号 100080-200306)、橙皮苷对照品(批号 110721-200211)、柚皮苷对照品(批号 110722-200309)、大叶茜草素对照品(批号 110884-200203)、人参皂苷 R_{g1} 对照品(批号 110703-200424)均购于中国药品生物制品检定所; 化痔片(批号 040801, 040802, 041001, 沈阳中药制药有限公司), 阴性样品自制, 硅胶 G(色谱用,

[收稿日期] 20111231(006)

[通讯作者] *莫少红, 硕士, 高级工程师, 从事中药新药研究与开发工作, Tel: 0771-5384382, E-mail: moshao@tom.com

青岛海洋化工厂);聚酰胺薄层板(台州市路桥四青生化材料厂),乙腈(色谱纯),水(自制双蒸水),其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 芦丁、橙皮苷和柚皮苷的鉴别 取本品8片,除去包衣,研细,加甲醇30 mL,超声处理20 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水20 mL使分散,用氢氧化钠溶液调节pH 8~9,用乙酸乙酯提取2次,每次20 mL,弃去乙酸乙酯液,水液用稀盐酸调节pH 2~3,用乙酸乙酯提取2次,每次20 mL,合并乙酸乙酯提取液,蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。另取芦丁对照品,加甲醇制成每1 mL含0.5 mg的溶液,作为芦丁对照品溶液。另取橙皮苷对照品,加甲醇制成每1 mL含0.5 mg的溶液,作为橙皮苷对照品溶液。再取柚皮苷对照品,加甲醇制成每1 mL含0.5 mg的溶液,作为柚皮苷对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述供试品溶液2 μ L,3种对照品溶液各1 μ L,分别点于同一聚酰胺薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(10:4:3:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以1%三氯化铝乙醇液,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。阴性对照液无相应斑点。

2.1.2 大叶茜草素的鉴别 取本品10片,除去包衣,研细,加氨试液2 mL使湿润,加水饱和的正丁醇40 mL,超声处理20 min,滤过,滤液用正丁醇饱和的水洗涤3次,每次30 mL,弃去水液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。另取大叶茜草素对照品,加甲醇制成每1 mL含2 mg的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述两种溶液各2 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶G薄层板上,以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-丙酮(20:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。阴性对照液无相应斑点。

2.1.3 人参皂苷 R_{g1} 的鉴别 取2.1.2下的供试品溶液。另取人参皂苷 R_{g1} 对照品,加甲醇制成每1 mL含1 mg的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述两种溶液各3 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10)10 $^{\circ}$ C以下放置过夜的下层液为展开剂,展开,取出,晾干,

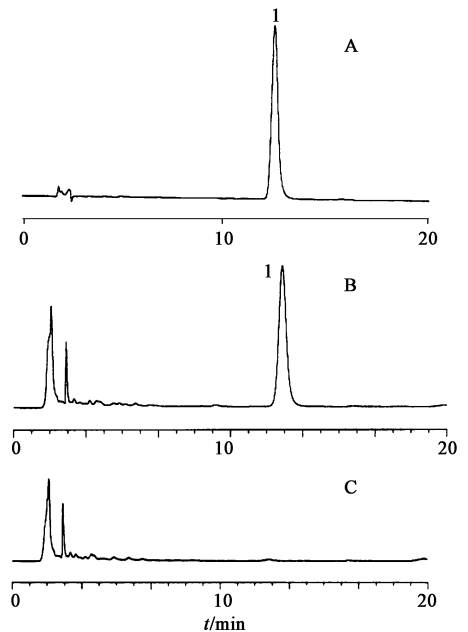
喷以10%硫酸乙醇液,105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。阴性对照液无相应斑点。

2.2 含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取在120 $^{\circ}$ C减压干燥至恒重的芦丁对照品10 mg,置100 mL量瓶中,加50%甲醇70 mL,置水浴上微热使溶解,放冷,加50%甲醇至刻度,摇匀,精密吸取3 mL,置10 mL量瓶中,加50%甲醇至刻度,摇匀,即得(每1 mL中含无水芦丁30 μ g)。

2.2.2 供试品溶液和阴性样品溶液的制备 取化痔片样品20片,除去包衣,精密称定,研细,取0.20 g,精密称定,置100 mL锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,称定质量,超声处理30 min,放冷至室温,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液1 mL置10 mL量瓶中,加50%甲醇至刻度,摇匀,即得供试品溶液。取不含槐米的阴性样品同法制备即得阴性样品溶液。

2.2.3 色谱条件 Fuji silysia C₁₈柱(4.6 mm \times 150 mm,5 μ m);流动相乙腈-0.2%磷酸溶液(17:83),流速1.0 mL \cdot min⁻¹,柱温室温,检测波长256 nm,进样量20 μ L。在此条件下,芦丁与其他成分达基线分离,阴性样品无干扰。理论塔板数按芦丁峰计算在3 000以上。结果见图1。



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性;1. 芦丁

图1 化痔片 HPLC

2.2.4 线性关系考察 精密称取在120 $^{\circ}$ C减压干燥至恒重的芦丁对照品9.9 mg,置100 mL量瓶中,

加 50% 甲醇 70 mL, 置水浴上微热使溶解, 放冷, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 精密吸取 1, 2, 3, 4, 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 即得, 按上述色谱条件, 分别进样 20 μ L, 测定, 以峰面积积分 Y 对芦丁进样量 X (μ g) 进行回归分析, 得回归方程 $Y = 1.02 \times 10^6 X - 4.152 \times 10^3$, $r = 1.000$ 。表明芦丁进样量在 0.198 ~ 0.990 μ g 线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 取芦丁对照品溶液 (29.7 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 按上述色谱条件, 重复进样 5 次, 计算得芦丁峰面积 RSD 0.54%, 表明精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在放置 0, 2, 4, 6, 8 h 及 24, 48, 72 h 后, 依法测定芦丁峰面积, 计算, 结果 24 h 内 RSD 0.58%, 72 h 内 RSD 0.75%, 表明供试品溶液在 72 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 取同一批样品, 按供试品溶液的制备方法制备 5 份供试品溶液进行测定, 计算, 结果 RSD 1.78%, 表明方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取已测知芦丁含量的样品 0.1 g, 再分别精密加入一定量的芦丁对照品, 按 2.2.3 项下制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定峰面积, 计算回收率, 结果回收率良好, 见表 1。

表 1 化痔片中芦丁加样回收率

称样量 /g	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.1014	6.70	6.90	13.57	99.6		
0.1051	6.95	6.90	13.79	99.1		
0.1027	6.79	6.90	13.50	97.2		
0.1030	6.81	6.90	13.58	98.1	98.5	0.85
0.1018	6.73	6.90	13.52	98.4		
0.1060	7.01	6.90	13.82	98.7		

2.2.9 样品测定 取化痔片样品, 按 2.2.3 项下制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 计算样品中芦丁的百分含量, 结果见表 2。

表 2 化痔片中芦丁测定 ($n = 3$)

批号	芦丁 / (mg/片)	RSD /%
040801	17.2	1.77
040802	18.9	0.89
041001	18.2	1.52

3 讨论

本品由 5 味中药组方而成, 方中槐米清热凉血止血, 茜草、三七化瘀止血, 枳壳理气消积, 三棱活血化瘀止痛^[8-9]。经反复试验, 试用多种展开系统及纯化方法, 摸索出其中 4 味药的薄层鉴别方法, 这些方法分离效果好, 斑点清晰圆整, 比移值适中, 重复

性和专属性好, 可有效控制制剂质量。

槐米中所含的黄酮类成分芦丁是具有明确止血作用的活性成分^[8], 其在高温下易分解^[10-11], 采用超声提取具有无需加热, 提取效率高, 提取时间短的优点^[12]。

芦丁对照品溶液用紫外分光光度计检测, 绘制紫外吸收光谱图, 结果显示分别在 256, 356 nm 处有最大吸收峰, 256 nm 吸收较大, 基线平稳, 无杂质干扰, 故选定 256 nm 为含测检测波长。

对含测供试品溶液制备的超声处理时间进行了考察, 样品分别超声处理 10, 20, 30, 40 min, 同法制备供试液, 测定, 结果超声处理 30 min 后芦丁提取较完全, 故确定超声处理时间为 30 min。按选定的液相色谱条件, 其他成分不干扰芦丁的测定, 测定结果准确, 重复性好。

[参考文献]

[1] 王秋菊, 吕娟, 盛丽, 等. 化痔片的抗炎镇痛及抗直结肠溃疡作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15 (4): 60.

[2] 杨云, 张村, 李俊娟, 等. 清肠合剂的质量标准研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(4): 9.

[3] 欧阳荣, 胡铁骊. 肝达康片中茜草的薄层色谱鉴别方法探讨 [J]. 中国中医药信息杂志, 2001, 8(10): 38.

[4] 黄顺旺. 麻辛止咳胶囊质量标准的初步研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 16(14): 84.

[5] 哈幸龙, 张金莲. 高效液相色谱法测定痔康栓中芦丁的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(3): 176.

[6] 耿旦, 马雯芳, 甄汉深, 等. RP-HPLC 测定桑椹中芦丁的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 63.

[7] 刘波, 张浩科, 宫海燕. 反相高效液相色谱法测定新疆枸杞叶茶中芦丁和槲皮素的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 92.

[8] 何希瑞, 樊鹏程, 李茂星, 等. 常用止血中药及其止血机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16 (15): 217.

[9] 李孝栋, 侯超. 2010 年版《中国药典》一部中活血化瘀类中药制剂分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (3): 246.

[10] 赵宇新. 芦丁分解速度与加热温度的相关性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 101.

[11] 赵宇新. 槐米中主要成分变化规律与受热温度的相关性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 108.

[12] 涂华, 陈碧琼, 张燕军. 天然类黄酮物质的提取工艺研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (6): 277.

[责任编辑 顾雪竹]