

痔特佳片鉴别与含量测定的研究

王建明*, 姜 哲, 张晓燕

(黑龙江中医药大学中医药研究院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的: 建立痔特佳片中组成成分的鉴别与含量测定方法。方法: 采用薄层色谱法对该制剂中的槐角、枳壳和当归进行了鉴别; 采用高效液相色谱法测定槐角中芦丁的含量。结果: 薄层鉴别斑点清晰, 重复性好; 含量测定平均回收率为 100.14%, RSD 为 0.78%, 方法可行。结论: 所建立的方法可对痔特佳片进行有效的质量控制。

[关键词] 痔特佳片; 芦丁; 高效液相色谱法; 薄层色谱鉴别

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)09-0015-03

Study on Identification and Content Determination of ZHITEJIA Tablet

WANG Jian-ming*, JIANG Zhe, ZHANG Xiao-yan

(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin Heilongjiang 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To study the methods of identification and determination of the content of effective constituents in ZHITEJIA Tablet. **Method:** Fructus sophorae, Fructus aurantii and Radix angelicae sinensis were identified by TLC. Rutin was assayed by HPLC. **Result:** The TLC spots were clear and the repeatable. The average recovery of Rutin was 100.14% with RSD 0.78%. **Conclusion:** The quality of ZHITEJIA Tablet can be controlled effectively by above methods.

[Key words] TLC; HPLC; ZHITEJIA Tablet; Content determination of Rutin

痔特佳片是由槐角(炒) 地榆炭、黄芩、当归、枳壳、防风、鞣质、阿胶等组成的复方制剂^[1]。具有清热消肿,凉血止血,收敛之功效^[2]。用于 1、2 期内痔,血栓性外痔,肛窦炎,直肠炎,对其它痔疮有缓解作用。为了更好的控制该药的质量,对方中的主要药味槐角、枳壳和当归进行了定性鉴别研究,对槐角中的芦丁采用高效液相色谱法进行了定量分析研究,从而为痔特佳片的质量控制提供了可靠的方法。

1 实验材料

1.1 仪器 Waters 600-2487 型高效液相色谱仪; Millennium³² 色谱工作站数据处理系统, 填充剂为十八烷基硅烷键合硅胶。

1.2 试药 芦丁对照品(由中国药品生物制品检定所提供,批号:080-9303); 柚皮苷对照品(由中国药品生物制品检定所提供,批号:722-200006); 痔特佳片剂(由黑龙江久久药业提供)。所用试剂甲醇、乙腈为色谱纯; 乙醚、乙酸乙酯、乙醇等均为分析纯。

2 薄层色谱鉴别

2.1 槐角(炒)的鉴别^[3] 取本品 5 片,去包衣,研碎,加石油醚(30℃~60℃) 20 mL,浸渍 2 h,时时振摇,滤过,弃去石油醚液,药渣挥尽溶剂,加甲醇 20 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干。残渣加 1.5 mL 甲醇溶解,装入聚酰胺柱(40 目,4 g,内径 0.8~1.0 cm,干法装柱)上,用水 50 mL 洗脱,弃去水液,再用乙醇 50 mL 洗脱,收集洗脱液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取槐角对照药材 0.5 g,同上法制取对照药材溶液。另取芦丁对照品,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^[4],吸取上述溶液各 3 μ L 分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-甲酸-水(8:1:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 三氯化铝乙醇溶液,加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材及对照品色谱相应的位置上,分别显相同颜色的荧光斑点。

2.2 枳壳的鉴别^[5] 取本品 10 片,去包衣,研成细粉,加水 20 mL,超声 30 min,滤过,加乙醚萃取 3 次,每次 15 mL,取水层溶液,用乙酸乙酯萃取,每次 15 mL,取乙酸乙酯层蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液;另取枳壳对照药材 1 g,同法制得对照药材溶液;另取柚皮苷对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法^[4],吸取上述两种溶液各 4 μ L,分别点于同一硅胶

G 薄层板上,以乙酸乙酯-甲酸-水(13:2:3)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品和对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。

2.3 当归的鉴别 取本品 10 片,去包衣,研碎,用乙醚 20 mL 超声提取 30 min,滤过,滤液水浴浓缩至约 1 mL,为供试品溶液;另取当归药材 0.2 g,同上法制得对照药材溶液。照薄层色谱法^[4],吸取供试品溶液 20 μ L,对照药材溶液 6 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正己烷-乙酸乙酯(9:1)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药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

3 芦丁的含量测定

3.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-乙腈-4% 冰醋酸水溶液(26:9:65); 检测波长: 358 nm; 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹; 柱温 40℃; 理论板数按芦丁峰面积计算不低于 3 000。

3.2 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品约 1 mg,置 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,0.45 μ m 滤膜过滤即得每 1 mL 含 0.01 mg 的对照品溶液。HPLC 色谱图见图 1。

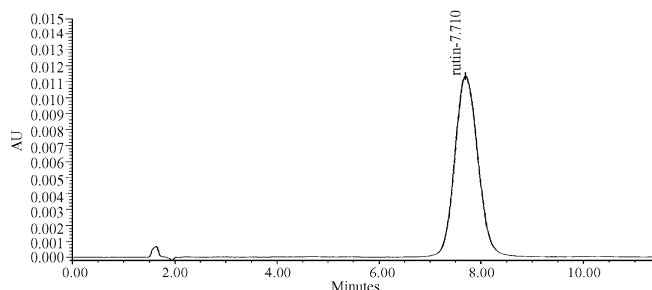


图 1 芦丁对照品 HPLC 图谱

3.3 供试品溶液的制备 取本品 5 片,除去包衣,研细,取约 1 g,精密称定,置索氏提取器中,乙醚 30 mL 加热回流 1 h,弃去乙醚液。残渣风干,加甲醇 40 mL,回流提取 3 h,甲醇蒸干,甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中。精密吸取甲醇液 2 mL,蒸干,1 mL 水溶解装于聚酰胺柱(80~120 目,2 g,内径 0.8~1.0 cm,湿法装柱)上,用水 80 mL 洗脱弃去洗脱液,再用乙醇 150 mL 洗脱,收集洗脱液,水浴蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,0.45 μ m 微孔滤膜,即得。供试品 HPLC 色谱图见图 2。

3.4 缺槐角阴性对照品溶液的制备 取不含槐角的处方,按制备工艺制成缺槐角的阴性对照品,再按

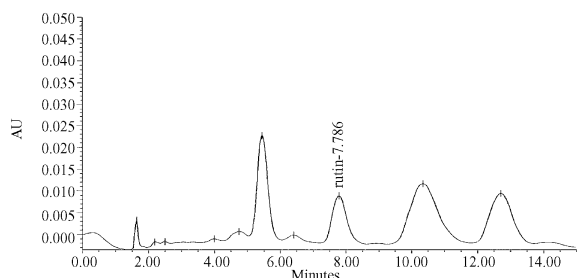


图 2 痔特佳样品 HPLC 图谱

3.3 项下方法制成阴性对照品溶液, 阴性对照液 HPLC 色谱图见图 3。

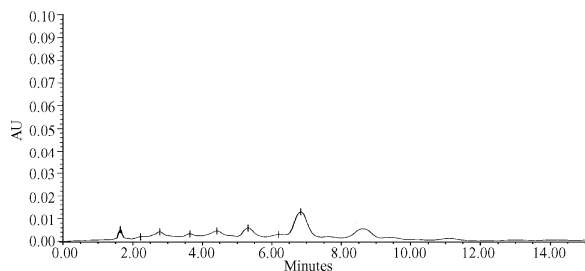


图 3 痔特佳阴性对照液 HPLC 图谱

3.5 线性关系考察 精密吸取芦丁对照品溶液 4, 8, 12, 16, 20, 24 μL , 按上述色谱条件进行测定。以峰面积为纵坐标, 以进样量微克数为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程为: $Y = 2.06 \times 10^6 X - 3.41 \times 10^3$, $r = 0.9998$, 相关性显著。表明芦丁在 (0.044 ~ 0.264) μg 范围内有良好的线性关系。

3.6 精密度试验 精密吸取对照品溶液 15 μL , 注入液相色谱仪, 连续进样 5 次, 按含量测定项下色谱条件测定。对照品 5 次峰面积积分值 RSD 为 0.6%, 表明精密度较高, 测定可靠。

3.7 稳定性试验 精密称取样品 1.0114 g, 按样品制备方法制备供试品溶液。每次精密进样 10 μL , 按设定时间连续进样 5 次。结果在 6 h 内样品测定是稳定的, 而 24 h 数据亦在允许误差内, RSD 为 1.0%。实际操作时, 2 h 内可以完成, 测定方法是稳定的。

3.8 重复性试验 精密称取同一批号痔特佳片去包衣层并研细的粉末 1 g 共 5 份, 按含量测定项下提取和测定, 结果 RSD 为 1.36%, 表明重复性良好。

3.9 加样回收率试验 取本品痔特佳片去包衣层并研细的粉末约 0.5 g 共 5 份, 精密称定, 分别加入芦丁对照品 0.5 mg, 混匀, 分别按含量测定项下制备供试品溶液并测定。结果表明样品平均回收率为 100.14%, RSD = 0.78%, 回收率良好, 结果见表 1。

3.10 样品的含量测定 取本品 10 批, 制备供试品溶液, 按上述色谱条件操作, 测定样品中芦丁含量。结果见表 2。

表 1 回收率测定数据表

序号	供试品取 样量(g)	芦丁含量 (mg)	加入对照 品量(mg)	测得芦丁 总量(mg)	回收率 (%)
1	0.6037	0.4648	0.5866	1.0590	101.3
2	0.5393	0.4153	0.5460	0.9635	100.4
3	0.5601	0.4313	0.4855	0.9115	98.9
4	0.5798	0.4464	0.5466	0.9925	99.9
5	0.5359	0.4126	0.5518	0.9655	100.2

表 2 供试品含量测定数据表

批号	供试品取 样量(g)	芦丁含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	芦丁含量(mg/片)
050305	0.9762	0.7696	0.2309
050316	1.1093	0.7686	0.2306
050322	1.0581	0.7809	0.2343
050410	1.0388	0.7737	0.2321
050420	1.0794	0.7704	0.2311
050429	1.0866	0.7927	0.2378
050506	1.1035	0.8315	0.2495
050511	1.0400	0.7584	0.2275
050518	1.1739	0.8330	0.2499
050524	1.0273	0.8095	0.2429

4 讨论

在供试品溶液的制备过程中, 由于方中干扰较大, 采用了多种处理方法进行了试验, 结果表明采用甲醇提取芦丁的方法提取完全, 经聚酰胺柱洗脱后剩余杂质对分离无干扰, 选择性较强。由于槐角中含有一定量的油脂, 故先用乙醚进行脱脂以避免对有效成分的干扰。聚酰胺柱对黄酮类化合物有特异性吸附, 故能与其他非黄酮类成分分离, 通过洗脱可以把吸附的芦丁洗脱下来, 关键是上样量适当以及足够的洗脱液, 经实验用 150 mL 乙醇足以充分洗脱, 之后的洗脱液已无黄酮反应。加样回收率表明方法可行。

含量测定在选择流动相的过程中, 对芦丁的分离进行不同比例的考察, 结果以甲醇-乙腈-4% 冰醋酸水溶液 (26: 9: 65) 为流动相, 同中国药典 2005 年版一部^[4] 的条件相比, 分离效果最好, 出峰时间短, 芦丁与杂质峰基线分离好。

用高效液相色谱法测定痔特佳片中芦丁的含量, 具有方法简便、快速、灵敏、专属性好的特点, 是对痔特佳片质量控制的有效方法。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准. 中药成方制剂[S]. 第八册, 1993. 179.
- [2] 王千菊, 高延军, 刘德武, 等. 痔特佳片配合外洗药治疗内痔出血 54 例[J]. ACMP, 2001, 29(5): 38.
- [3] 边清泉, 杨振萍, 刘家琴, 等. HPLC 同时测定槐角丸中生药槐角的 4 种有效成分[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(19): 1514-1515.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005. 附录 31.
- [5] 刘莲英, 郭耀武, 朱自力. HPLC 法测定痔特佳片中柚皮苷的含量[J]. 陕西中医药学报, 2002, 25(5): 45-46.