

牡丹皮配方颗粒质量标准研究

谢晓梅^{1*}, 戴淑娟¹, 王 伟¹, 张 玲¹, 金传山¹, 彭代银¹, 马 凯²
(1. 安徽中医学院药学院安徽省现代中药重点实验室, 安徽 合肥 230031;
2. 安徽济人药业有限公司, 安徽 亳州 236800)

[摘要] 目的: 建立牡丹皮配方颗粒质量标准。方法: 薄层色谱法(TLC)两次展开鉴别牡丹皮配方颗粒; 高效液相色谱法(HPLC)同时测定丹皮酚和芍药苷含量; 原子吸收光谱法(AAS)和原子荧光光谱法(AFS)测定铜、铅、镉、砷、汞。结果: TLC在同一薄层板上检视牡丹皮中丹皮酚和芍药苷, 斑点清晰; 含量测定中, 丹皮酚在(24~ 120) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好, $r=0.9996$, 平均加样回收率 98.1%; 芍药苷在(10.6~ 53.0) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好, $r=0.9998$, 平均加样回收率 97.6%; 供试品中铜、铅、镉、砷、汞含量均在规定的限量之下。结论: 分析方法简单易行, 重复性好, 专属性高, 可用于较好地控制和评价牡丹皮配方颗粒的质量。

[关键词] 牡丹皮配方颗粒; 丹皮酚和芍药苷; 重金属元素; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 原子荧光光谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)03-0015-04

Study on Quality Standard of Cortex Moutan Dispensing Granules

XIE Xiao-mei^{1*}, DAI Shu-juan¹, WANG Wei¹, ZHANG Ling¹, JIN Chuan-shan¹, PENG Dai-yin¹, MA Kai²
(1. Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Anhui Key Laboratory of Modernized Chinese Material, Hefei 230031, China; 2. Anhui Jiren Pharmacy Co. Ltd, Bozhou 236800, China)

[Abstract] **Objective:** To set up the quality standard of Cortex Moutan dispensing granules. **Methods:** TLC experiments were performed on a plates of silica gel using two solvent systems by gradient development. The contents of paeonol and paeoniflorin in the dispensing granules were determined simultaneously by HPLC. Concentrations of heavy metals (Cu, Pb, Cd, As and Hg) in the samples were analyzed by AAS and AFS. **Results:** paeonol and paeoniflorin in the dispensing granules were identified and determined. The linear relationship were at the ranges of (24~ 120) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.9996$) for paeonol and (10.6~ 53.0) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.9998$) for paeoniflorin. The average recoveries were 98.1% for paeonol and 97.6% for paeoniflorin respectively. The quantity of 5 elements analyzed were below the limits. **Conclusion:** The methods were available with a good reproducibility and can be used to control the quality of Cortex Moutan. dispensing granules.

[Key words] Cortex Moutan Dispensing Granules; paeonol and paeoniflorin; heavy metal; TLC; HPLC; AFS

牡丹皮有清热凉血, 活血化瘀等功效。本文采用薄层色谱法两次展开, 在同板上检视丹皮酚和芍药苷; 采用反相高效液相色谱法, 梯度洗脱, 紫外检测, 同时测定丹皮酚和芍药苷的含量; 采用原子吸收

光谱法和原子荧光光谱法, 测定铜、铅、镉、砷、汞。建立的牡丹皮配方颗粒质量标准, 在鉴别和含量测定的项目上, 不仅检测了丹皮酚, 还同时测定了芍药苷成分, 能够更好地反映牡丹皮配方颗粒内在质量本质; 对重金属和有害元素的检测, 提供了配方颗粒安全性参数。所用方法经济、实用、简便、可靠; 为牡丹皮配方颗粒的质量控制和评价提供了科学的依据。

[收稿日期] 2007-07-23

[通讯作者] * 谢晓梅, Tel: (0551) 5169230; E-mail: xiexiaomei9401@sina.com

1 仪器与试剂

1.1 仪器 LG-10AB 高效液相色谱仪(日本岛津), LC-Solution 工作站; WFX-130 型原子吸收分光光度计(北京瑞利仪器公司); AFS-830 双道原子荧光分光光度计(北京吉天仪器有限公司); BP221D 电子天平(德国 Sartorius 公司); KQ-250DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 石英亚沸高纯水提取器(江苏金城教学仪器厂); DB-3 型不锈钢电热板(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂); 双槽层析缸(上海信谊仪器厂)。

1.2 试剂 丹皮酚、芍药苷对照品由中国药品生物制品检定所提供(批号: 110708-200505、110736-200525); 牡丹皮饮片购自亳州药材市场, 牡丹皮配方颗粒(自制), 标准铜储备液($500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 由国家水利部环境监测评价研究中心提供(GBW(E) 080360), 标准砷储备液($1.000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 由上海市计量测试技术研究院提供(GBW(E) 080283), 标准铅、镉、汞储备液($1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 由天津市光复精细化工研究所提供, 标准物质茶叶由地球物理地球化学勘察研究所提供(GBW07605), 乙腈为色谱纯, 硝酸、高氯酸为优级纯, 其余试剂均为分析纯, 水为亚沸高纯水。

2 方法与结果

2.1 鉴别 取自制牡丹皮配方颗粒粉末适量(相当于饮片 1.5 g), 加乙醇 10 mL, 密塞, 超声处理 5 min, 滤过, 滤液挥干, 残渣加乙醇 2 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取丹皮酚和芍药苷对照品, 分别加乙醇制成每 1 mL 含 5 mg 丹皮酚和每 1 mL 含 1 mg 芍药苷的对照品溶液。吸取上述各溶液 5 μL , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 先以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40: 5: 10: 0.2) 展开至 5 cm, 取出, 晾干; 再以环己烷-乙酸乙酯(3: 1) 为展开剂, 展开至 8 cm; 取出, 晾干; 喷以盐酸酸性 5% 三氯化铁乙醇溶液(在 10 mL 5% 三氯化铁乙醇溶液中加入 2~3 滴盐酸), 晾干, 再喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 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。薄层图见图 1。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-水, 梯度洗脱程序见表 1; 检测波长为 230 nm; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。

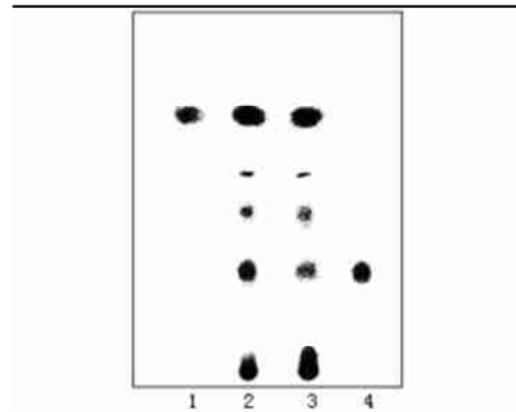


图 1 牡丹皮配方颗粒 TLC 图

(1 丹皮酚对照品; 2 3 牡丹皮配方颗粒; 4 芍药苷对照品)

表 1 牡丹皮配方颗粒 HPLC 梯度洗脱程序(min)

流动相组成	0	10	15	25
乙腈(%, v/v)	15	20	30	55
水(%, v/v)	85	80	70	45

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取丹皮酚和芍药苷对照品适量, 置 25 mL 量瓶中, 加 15% 乙腈溶液溶解, 定容, 摇匀, 制得每 1 mL 含丹皮酚 1 mg、芍药苷 0.5 mg 对照品贮备液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取牡丹皮配方颗粒, 研细, 精密称取适量(约相当于 0.5 g 饮片), 置具塞锥形瓶中, 加 15% 乙腈 20 mL, 称重, 超声处理(功率 300 W, 频率 50 KHz) 30 min, 放冷, 用 15% 乙腈补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 分别取芍药苷和丹皮酚对照品贮备液 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 18% 乙腈定容, 摇匀。按 2.2.1 项下色谱条件, 依序进样测定。以峰面积(A)为纵坐标, 对照品浓度(C)为横坐标, 绘制标准曲线, 建立回归方程。2 种组分检测响应的线性范围、回归方程及相关系数(r)分别为: 丹皮酚($24 \sim 120$) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $A = 6.76 \times 10^4 C + 9.38 \times 10^3$, $r = 0.9996$; 芍药苷($10.6 \sim 53.0$) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $A = 4.64 \times 10^4 C + 2.04 \times 10^3$, $r = 0.9998$ 。

2.2.5 精密度试验 取同一供试品溶液, 重复进样 6 次, 测得丹皮酚峰面积 RSD= 1.1%; 芍药苷峰面积的 RSD= 0.73%。

2.2.6 重复性试验 称取同一批牡丹皮配方颗粒粉末 5 份, 制备成供试品溶液, 测得丹皮酚含量的 RSD= 1.13%, 芍药苷含量的 RSD= 1.56%。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于 0,

2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 丹皮酚峰面积的 RSD= 1.59%, 芍药苷峰面积的 RSD= 1.86%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.8 回收率试验 取同一批已知含量的牡丹皮配方颗粒适量, 精密称重, 按 1:1 浓度水平准确加入丹皮酚和芍药苷对照品, 按照 2.2.3 项下制备供试品溶液, 在上述色谱条件进样分析, 计算回收率, 丹皮酚为 98.7%, RSD= 1.27%; 芍药苷为 97.5%, RSD= 2.01%。

2.2.9 丹皮酚、芍药苷含量测定 精密称取牡丹皮配方颗粒粉末, 按照 2.2.3 项下制成供试品溶液, 吸取对照品溶液和供试品溶液各 20 μ L, 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 按外标法计算丹皮酚和芍药苷百分含量。3 批供试品测定结果分别为: 丹皮酚 0.443%, 0.456%, 0.460%; 芍药苷 0.126%, 0.130%, 0.121%。供试品和对照品的 HPLC 图见图 2。

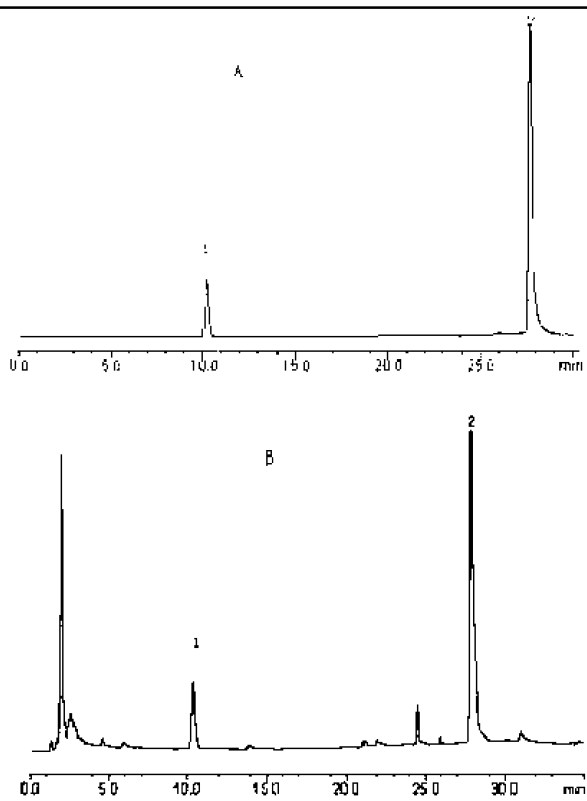


图 2 牡丹皮配方颗粒 HPLC 图

A 对照品; B 供试品 1 芍药苷; 2 丹皮酚)

2.3 重金属及有害元素分析^[1] 采用原子吸收光谱法, 分别在 324.7, 283.3, 228.8 nm 处测定元素 Cu, Pb, Cd; 采用原子荧光光谱法, 分别在 253.7, 193.7 nm 测定元素 Hg, As。湿法消化供试品。在选定的最佳试验条件下, 用标准物质茶叶对仪器进行检定。3 批供试品中 5 种重金属及有害元素的测定结果见表 2。

表 2 牡丹皮配方颗粒重金属及有害元素测定结果(μ g \cdot g⁻¹)

样品	Cu	Pb	Cd	Hg	As
1	0.141	—*	—	0.002 5	0.031
2	0.168	—	—	0.002 6	0.030
3	0.091	—	—	0.002 5	0.034

注: * 未检出

3 讨论

文献报道牡丹皮中主要含有丹皮酚类和芍药苷类成分^[2]。目前对牡丹皮的 TLC 鉴别, 多通过其主要成分丹皮酚的鉴别来完成^[3]。由于丹皮酚非牡丹皮配方颗粒独有成分(如徐长卿配方颗粒也含有丹皮酚), 仅仅通过丹皮酚的 TLC 特征难以实现牡丹皮配方颗粒的准确鉴别, 同时选择另一活性成分芍药苷共同作为鉴别依据, 加强了方法的专属性。

丹皮酚和芍药苷极性差别较大, 在进行 TLC 鉴别的样品处理时, 比较了乙醚和乙醇两种提取溶剂。结果发现, 芍药苷极性大, 乙醚提取液难以检出芍药苷成分; 用乙醇提取, 芍药苷和丹皮酚均容易被检出; 同样原因, 使采用简单改变展开剂配比的方法难以获得满意的 TLC 谱图。经过试验, 选择的分离条件和展开方式不仅可以获得丹皮酚和芍药苷在薄层板上合适的展开距离, 还可以展示供试品中其他被分离的未知成分斑点, 使建立的 TLC 对牡丹皮配方颗粒的鉴别有了更高的专属性。

本文在前期研究^[4,5]和文献^[6]的基础上, 进一步考察了同时测量丹皮酚和芍药苷含量的 HPLC 方法, 并对样品处理方法、流动相的选择和梯度洗脱程序以及检测波长进行了条件试验。本文所建立的 HPLC 同时测量丹皮酚和芍药苷含量方法, 指标成分分离完全, 色谱峰形好, 分析时间适中, 操作易于实施。

中药含铅、镉、汞、砷、铜的限量^[7]是: 铅 $\leq 5.0 \mu$ g \cdot g⁻¹, 镉 $\leq 0.3 \mu$ g \cdot g⁻¹, 砷 $\leq 2.0 \mu$ g \cdot g⁻¹, 汞 $\leq 0.2 \mu$ g \cdot g⁻¹, 铜 $\leq 20.0 \mu$ g \cdot g⁻¹。由表 2 可知, 供试品中上述元素均没有超标。本实验同时还检测了其原料牡丹皮饮片, 测量表明, 配方颗粒中重金属含量明显低于饮片, 铅、镉均未检出。由于采用合理的提取和制剂工艺, 结果显示, 配方颗粒提高了用药安全性。

本文建立的方法不仅可以用于牡丹皮配方颗粒的质量分析, 同样也可以用于牡丹皮药材和饮片。

(下转第 23 页)

(上接第 17 页)

[参考文献]

- [1] 谢晓梅,汪电雷,郑荣庆,等.夏枯草和薯蓣不同部位铅镉汞砷含量的分析[J].安徽中医学院学报,2002,21(5):47.
- [2] Kitagawa I, Yoshikawa M, Tsunaga K, *et al.* Studies on Moutan Cortex II. On the Chemical Constituents [J]. *Shoyakugaku zasshi*, 1979, 33 (3): 171.
- [3] 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,2005.119.
- [4] 谢晓梅,戴淑娟,夏红梅,等.高效液相色谱法测定牡丹皮配方颗粒和饮片中丹皮酚含量[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(12):28.
- [5] 谢晓梅,余长柱,徐衡,等.赤芍饮片质量标准研究一芍药苷含量测定[J].中国中药杂志,2004,29(8):759.
- [6] 郭宝林,巴桑德吉,肖培根,等.中药牡丹皮原植物和药材的质量研究[J].中国中药杂志,2002,27(9):654.
- [7] 中华人民共和国对外贸易经济合作部.药用植物及制剂进出口绿色行业标准[J].中药研究与信息,2001,3(8):9.