

复方痛经痛胶囊定性定量方法的研究

李兰芳*, 李存满, 张勤增, 张建新
(河北省医学科学院, 河北 石家庄 050021)

[摘要] 目的: 完善复方痛经痛胶囊的质量标准。方法: 采用薄层色谱法对复方痛经痛胶囊中黄芪、白芍、香附、肉桂进行定性鉴别; 并采用 HPLC 法对制剂中的芍药苷进行含量测定。结果: TLC 鉴别专属性强; HPLC 法测定出芍药苷在(0.1 ~ 2.5) μg 范围内线性关系良好($r = 0.9999$), 平均回收率为 99.5%, RSD 为 1.7% ($n = 6$)。结论: 所建立的定性定量方法专属性强、重复性好, 可作为复方痛经痛胶囊的质量控制方法。

[关键词] 复方痛经痛胶囊; 芍药苷; 薄层色谱; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)04-0004-03

Studies on Qualitative and Quantitative Methods of Fufangxiaojingtong Capsule

Li Lanfang*, Li Cun-man, ZHANG Qin-zeng, ZHANG Jian-xin
(Hebei Academy of Medical Sciences, Shijiazhuang 050021, China)

[Abstract] **Objective:** To Complement the quality control standards for Fufangxiaojingtong Capsule (FFXJTC). **Methods:** The TLC method was applied to identify *Radix Astragali*, *Radix Paeoniae Alba*, *Cortex Cinnamomi* and *Rhizoma Cyperi*; and the HPLC method was used to determine the content of paeoniflorin in FFXJTC. **Results:** The TLC identification methods are specific. The linear range of paeoniflorin is 0.1~ 2.5 μg ($r = 0.9999$), and the recovery is 99.5%, and the RSD is 1.7% ($n = 6$). **Conclusion:** The qualitative and quantitative methods are specific and repeatable, which could be applied for quality control of Fufangxiaojingtong Capsule.

[Key words] Fufangxiaojingtong Capsule; paeoniflorin; TLC; HPLC

复方痛经痛胶囊是由黄芪、当归、人参、白芍、川芎、熟地、香附(醋炙)、益母草、肉桂 9 味中药组成的复方制剂, 具有益气养血, 行气活血兼温经散寒之功效。为有效控制产品的质量, 我们采用薄层色谱法对方中的人参、当归、川芎进行的定性鉴别, 采用 TLC 扫描法测定黄芪甲苷的含量^[1]。为了进一步完善控制标准, 本文又对制剂中的黄芪、白芍、香附、肉桂进行了定性鉴别, 并采用高效液相色谱法对方剂中的芍药苷进行了含量测定。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪(Agilent, 1100), G1311A 四元泵, G1313A 自动进样器, G1316A 柱温箱, 二极管阵列检测器, HP Chemstation 色谱工作站; KQ-250DB 型超声清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; METTLER AE240 型电子天平, 梅特勒仪器上海有限公司; 复方痛经痛胶囊, (河北省医学科学院药物研究室制, 批号: 20020710); 黄芪甲苷、芍药苷、 α -香附酮、桂皮醛对照品(中国药品生物制品检定所, 批号分别为: 781-200109, 0736-200116, 748-200004, 0786-9802)。磷酸二氢钾为分析纯, 甲醇, 醋酸为色谱纯, 水为重蒸水。

2 薄层色谱鉴别

2.1 黄芪的鉴别^[2] 取胶囊内容物 10 g, 加 100 mL 甲醇置于索氏提取器中, 加热回流 4 h, 浓缩至干, 残渣加水 30 mL 溶解, 分别用水饱和的正丁醇萃取 3

[收稿日期] 2007-08-29

[基金项目] 河北省科技攻关课题(04276101D-50)

[通讯作者] * 李兰芳, Tel: (0311) 86573415; E-mail: yaoyanllf@163.com

次(30, 30, 20 mL), 合并萃取液, 用 1% NaOH 溶液洗涤 3 次(20, 20, 15 mL), 弃去碱液, 再用 20 mL 蒸馏水洗正丁醇液, 弃水液, 正丁醇萃取液水浴蒸干, 残渣用蒸馏水 10 mL 溶解, 通过 D₁₀₁ 型大孔树脂柱(内径 1.5 cm, 长 12 cm), 先用 50 mL 水洗, 弃水溶液, 再用 40% 乙醇 70 mL 洗脱, 弃去 40% 乙醇液, 最后用 70% 乙醇液 80 mL 洗脱, 收集此洗脱液, 水浴蒸干, 残渣用甲醇溶解并定量至 2 mL 的量瓶中, 摇匀, 作为供试品溶液。取缺黄芪同法制成的黄芪阴性对照制剂 10 g, 按制备黄芪供试品液的方法制备 2 mL 溶液, 作为黄芪阴性对照液。另取黄芪甲苷对照品加甲醇制成每 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。吸取上述样品 5 μ L 及对照品液各 4 μ L, 分别点于同一 0.2% 羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 板上, 以氯仿-甲醇-水(16: 7: 2) 10 $^{\circ}$ C 以下放置过夜的下层液为展开剂, 展开, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与黄芪甲苷相应的位置上, 日光下显棕褐色斑点, 紫外灯(365 nm) 下显相同的橙黄色荧光斑点, 阴性无干扰。

2.2 白芍的鉴别^[3] 取胶囊内容物 1.5 g, 加甲醇 20 mL, 超声提取 15 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 3 mL 溶解, 作为供试品液。取缺白芍同法制成的白芍阴性对照制剂 1.5 g, 按制备白芍供试品的方法制备 3 mL 溶液, 作为阴性对照样品液。另取芍药苷对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 溶液, 作为对照品溶液。吸取上述两种溶液 10 μ L, 分别点于同一 0.2% 羧甲基纤维素钠作粘合剂的硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-醋酸乙酯-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, 加热至斑点清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同的兰紫色斑点, 阴性无干扰。

2.3 香附的鉴别 取胶囊内容物 10 g, 加乙醚 40 mL, 回流提取 1.5 h, 滤过, 滤液挥干, 加醋酸乙酯 1 mL 使溶解, 作为供试品液。取缺香附同法制成的香附阴性对照制剂 10 g, 按制备香附供试品液的方法制备 1 mL 香附阴性对照液。另取 α -香附酮对照品, 加醋酸乙酯制成每 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。吸取上述两种溶液各 10 μ L, 分别点于同一 0.2% 羧甲基纤维素钠作粘合剂的硅胶 G 薄层板上, 以石油醚(60~ 90 $^{\circ}$ C)-醋酸乙酯(17: 3) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 2, 4-二硝基苯肼试液, 放置片刻, 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, 阴性无干扰。

2.4 肉桂的鉴别 取胶囊内容物 10 g, 加无水乙醚 40 mL 回流提取 1.5 h, 滤过, 滤液蒸干, 加甲醇 1 mL 溶解残渣作为供试品溶液。取缺肉桂同法制成的肉桂阴性对照制剂 10 g, 按鉴别肉桂供试品液的方法制备肉桂阴性对照样品液 1 mL 作为肉桂阴性对照液。另取桂皮醛对照品, 加乙醇制成每 mL 含 1 μ L 的溶液, 作为对照品溶液。吸取供试品溶液 10 μ L, 对照品溶液 2 μ L, 分别点于同一 0.2% 羧甲基纤维素钠作粘合剂的硅胶 G 薄层板上, 以石油醚(60~ 90 $^{\circ}$ C)-醋酸乙酯(17: 3) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以二硝基苯肼试液, 放置片刻, 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, 阴性无干扰。

3 含量测定

3.1 色谱条件 色谱柱 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 甲醇-0.05 mol \cdot L⁻¹-磷酸二氢钾-醋酸-异丙醇(67: 173: 4: 4) 为流动相; 检测波长为 230 nm; 室温。理论塔板数按芍药苷峰计算应不低于 4 000。

3.2 对照品溶液的制备 精密称取在五氧化二磷减压干燥器中干燥 36 h 的芍药苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 摇匀, 即得。

3.3 供试品溶液的制备 取胶囊内容物约 0.60 g, 精密称重, 置索氏提取器中, 加甲醇约 80 mL, 回流 2 h, 收集甲醇提取液置 100 mL 量瓶中, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

3.4 标准曲线与线性范围 精密量取对照品溶液 8, 32, 60, 80, 200 μ L, 分别置于 2 mL 的量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 按上述 HPLC 测定条件进行测定, 以浓度为横坐标, 相应的峰面积为纵坐标, 制得标准曲线, 回归方程为 $Y = 8.55X - 60.4$, $r = 0.9999$, 结果表明芍药苷在(2~ 50) μ g \cdot mL⁻¹ 时浓度与峰面积积分值呈良好的线性关系。

3.5 空白试验 按处方中各药味的比例, 自配不含白芍的群药, 按制剂工艺制成空白制剂, 再按供试品溶液制备方法制成空白溶液, 依法测定, 结果表明, 空白溶液在与对照品芍药苷对照品相同保留时间处未显色谱峰, 故认为无干扰。

3.6 精密度考察 取芍药苷对照品溶液(80 μ g \cdot mL⁻¹), 进样量 5 μ L(相当于 0.4 μ g 芍药苷) 重复进样 5 次, 结果测得芍药苷峰面积 RSD 为 0.73%。

3.7 重复性考察 取同一批号样品 5 份,精密称定,每份 0.5 g,按供试品溶液制备方法制备,依法测定,计算芍药苷含量,其 RSD 为 1.1%。

3.8 稳定性考察 取供试品溶液分别于制备后 0, 1, 2, 3, 4, 7 h 依法测定,结果芍药苷峰面积的 RSD 为 1.8%。

3.9 加样回收率考察 精密称取已知芍药苷的复方痛经胶囊 6 份,精密加入芍药苷对照品适量,依法提取,测定,结果回收率为 98.2%, 102.3%, 98.9%, 99.8%, 99.4% 和 98.4%, 平均回收率 99.5%, RSD 为 1.5% ($n=6$)。

3.10 样品测定 取供试品溶液 5 μL 进样,对照品溶液 5 μL ,在拟定的测定条件下进行测定,计算,制剂中芍药苷的含量为 0.941, 1.02, 0.935 mg/粒。

4 讨论

处方由 9 味中药组成,成分复杂,制备工艺中大部分药材用乙醇提取,少部分药材用水提取。在制备测定芍药苷供试液时,分别实验了甲醇、乙醇做溶

剂的提取和分离效果,结果以甲醇作溶剂干扰较少,样品容易分离。中国药典 2005 年版一部中白芍药材中芍药苷的含量测定采用了超声提取法,在本实验中我们以测得芍药苷的峰面积为指标,对超声提取法和索氏提取法进行了比较,表明索氏提取法提取率明显高于超声提取法,故选用索氏提取法进行样品提取。

在香附和肉桂的薄层鉴别中,因挥发油采用了 β -环糊精包合的工艺,因此制备样品时需要回流提取,才能从包合物中提出挥发油,从而成功完成鉴别反应。

[参考文献]

- [1] 李存满,李兰芳,张勤增.复方痛经胶囊质量标准研究[J].中草药,2004,26(8):631-634.
- [2] 葛勤,徐大锭,蒋雪涛.心脉神口服液中黄芪甲苷含量的测定[J].中药材,1997,20(10):530-531.
- [3] 国家药典委员会编.中华人民共和国药典[S].一部,北京:化学工业出版社,2005.68.