

复方当归妇炎微灌肠剂质量控制研究

余晓晖^{1,2}, 樊秦^{1,2}, 赵磊^{1,2}, 王永刚¹, 杨蕊菁¹, 宋娇娇¹ (1.甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2.甘肃省高校中(藏)药化学与质量省级重点实验室, 兰州 730000)

摘要: 目的 建立复方当归妇炎微灌肠剂的质量控制方法。方法 根据处方组成, 采用 TLC 对制剂中的当归、赤芍、延胡索进行定性鉴别。以 HPLC 测定当归中阿魏酸、赤芍中芍药苷的含量: 采用 Extend-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱; 以乙腈-0.1%磷酸(15:85)为流动相等度洗脱; 柱温 25℃; 流速 1 mL·min⁻¹; 检测波长 320, 234 nm。结果 阿魏酸和芍药苷分别在 0.002 4~0.011 9 mg·mL⁻¹($r=0.999\ 4$), 0.036 4~0.081 9 mg·mL⁻¹($r=0.999\ 2$)内呈良好的线性关系; 平均加样回收率分别为 100.3%, 98.9%, RSD 分别为 1.08%, 0.68%。结论 该方法简便、准确、稳定性好, 可用于该制剂的质量控制。

关键词: 微灌肠剂; 质量标准; 当归; 赤芍; 延胡索

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)12-1703-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.12.013

引用本文: 余晓晖, 樊秦, 赵磊, 等. 复方当归妇炎微灌肠剂质量控制研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(12): 1703-1706.

Study of Quality Control on Compound Angelica Fuyan Micro Enema

YU Xiaohui^{1,2}, FAN Qin^{1,2}, ZHAO Lei^{1,2}, WANG Yonggang¹, YANG Ruijing¹, SONG Jiaojiao¹ (1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Provincial Key Laboratory of Chinese (Tibetan) Medicine Chemistry and Quality in Universities in Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method of quality control for Compound Angelica Fuyan Micro Enema. **METHODS** According to the composition of prescription, the qualitative identification of Angelicae Sinensis Radix, Paeoniae Radix Rubra and Corydalis Rhizoma in Compound Angelica Fuyan Micro Enema was performed by TLC. The content of ferulic acid and paeoniflorin in Compound Angelica Fuyan Micro Enema was determined by HPLC: using Extend-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column; acetonitrile-0.1% phosphoric acid (15:85) was as the flow equality. Column temperature was 25℃; flow velocity 1 mL·min⁻¹; the detection wavelength was 320, 234 nm. **RESULTS** Ferulic acid and paeoniflorin had good linear relationship within 0.002 4~0.011 9 mg·mL⁻¹($r=0.999\ 4$), 0.036 4~0.081 9 mg·mL⁻¹($r=0.999\ 2$). The average recovery rate was 100.3%, 98.9% and the RSD was 1.08%, 0.68% respectively. **CONCLUSION** The established method is simple, accurate and stable well, and can be used for the quality control of the preparation.

KEY WORDS: micro enema; qualitative standard; Angelicae Sinensis Radix; Paeoniae Radix Rubra; Corydalis Rhizoma

复方当归妇炎微灌肠剂原处方由当归、赤芍、延胡索、大血藤、鸡血藤等 10 味中药组成, 为嘉峪关市胜利社区医院的院内制剂, 已有长期的临床疗效, 主要用于慢性盆腔炎^[1]。此制剂本为普通灌肠剂, 经剂型改造将其改进为微型灌肠剂。该制剂中当归补血活血, 调经止痛, 润肠通便, 赤芍清热凉血, 活血散瘀, 这 2 味药材均为方中君药。为有效控制该制剂质量, 本实验采用 TLC 对方中君药当归、赤芍, 臣药延胡索进行定性鉴别。采用 HPLC 建立方中君药当归中阿魏酸、赤芍中芍药苷含量测定方法, 为该制剂的进一步开发提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪系列(美国 Agilent 公司, 二元梯度泵, 自动进样器, 恒温进样器, 柱温箱, 二极管阵列检测器); Extend-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱; SK3300H 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); BT125D 电子天平(梅特勒-托利多, 十万分之一); WB0830026 电子天平(梅特勒-托利多, 万分之一); AL104 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); BPI105 电子分析天平(德国 Sartorius); KQ-250 超声波清洗仪器(昆山市超声仪器有限公司)。

基金项目: 2014 年兰州市科技局重点项目(2014-1-145); 2015 年甘肃省高校中(藏)中药药理与毒理研究省级重点实验室开放基金项目(ZDSYS-KJ-2015-006)

作者简介: 余晓晖, 女, 正高级工程师

Tel: (0931)8765394

E-mail: yxhg123@sina.com

1.2 试药

复方当归妇炎微灌肠剂(由实验小组制备)。

中药材: 赤芍、当归、延胡索(元胡)、鸡血藤、大血藤、薏米仁、败酱草、小茴香, 购于黄河药市, 由甘肃中医药大学药学院晋玲教授鉴定, 均符合中国药典 2015 年版一部标准。

对照品: 芍药苷(成都克洛玛生物科技有限公司, 批号: CHB161227, 纯度: 98.9%)、阿魏酸(成都克洛玛生物科技有限公司, 批号: CHB160913, 纯度: 98.1%)、延胡索乙素(上海源叶生物科技有限公司, 批号: Y21S7Y17091, 纯度: 98.6%)。对照药材: 赤芍(批号: 121093-201303)、当归(批号: 120927-201516)、延胡索(元胡, 批号: 120928-201208), 均购于中国食品药品检定研究院。硅胶 G(青岛海洋化工有限公司); 水为超纯水; 甲醇、乙腈均为色谱纯; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

2.1.1 当归的 TLC 鉴别^[2-3] 精密称取制剂 10 g, 加甲醇 40 mL, 回流 2 h, 抽滤, 挥去甲醇, 得残渣, 加蒸馏水 10 mL, 转移至分液漏斗, 用 10% 稀硫酸调 pH 至 2, 乙醚萃取, 取乙醚层, 挥去乙醚, 加甲醇 1~2 mL, 得复方制剂供试品溶液。同法制取阴性对照溶液。精密称取当归对照药材 0.05 g, 加甲醇 20 mL, 超声提取 30 min, 过滤, 挥去甲醇, 得残渣, 加蒸馏水 10 mL, 转移至分液漏斗, 用 10% 稀硫酸调 pH 至 2, 乙醚萃取 2 次(每次 10 mL), 取乙醚层, 挥去乙醚, 加甲醇 1~2 mL, 得当归对照药材供试品溶液。按照 TLC 法(中国药典 2015 年版, 四部通则 0502), 吸取阿魏酸对照品溶液 5.0 μ L, 其余 3 种溶液 10.0 μ L, 点样, 以氯仿-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2)展开, 晾干, 5% 香草醛-浓硫酸乙醇溶液显色, 加热烘至斑点清晰, 取出。在与芍药苷对照品、赤芍对照药材色谱相应的位置上, 复方制剂供试品色谱显相同颜色的斑点, 且阴性对照色谱中无干扰, 结果见图 1。

2.1.2 赤芍的 TLC 鉴别^[3-5] 精密称取制剂 10 g, 加甲醇 40 mL, 回流 2 h, 抽滤, 水浴挥至 1~2 mL, 得复方制剂供试品溶液。同法制取剂阴性对照溶液。精密称取赤芍对照药材 0.05 g, 加甲醇 20 mL, 超声提取 30 min, 抽滤, 滤液挥至 1~2 mL, 得对照药材供试品溶液。按照 TLC 法(中国药典 2015 年版, 四部通则 0502), 吸取芍药苷对照品溶液

5.0 μ L, 其余 3 种溶液 10.0 μ L, 点样, 以氯仿-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2)展开, 晾干, 5% 香草醛-浓硫酸乙醇溶液显色, 加热烘至斑点清晰, 取出。在与芍药苷对照品、赤芍对照药材色谱相应的位置上, 复方制剂供试品色谱显相同颜色的斑点, 且阴性对照色谱中无干扰, 结果见图 2。

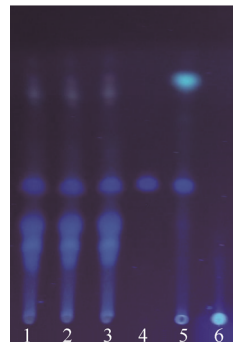


图 1 当归的 TLC 色谱图

1~3-复方制剂; 4-阿魏酸; 5-当归对照药材; 6-阴性对照。

Fig. 1 TLC graph of Angelicae Sinensis Radix

1~3-compound preparation; 4-ferulic acid; 5-reference of Angelicae Sinensis Radix; 6-negative sample.

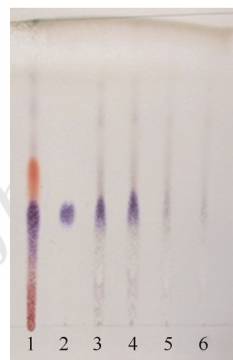


图 2 赤芍的 TLC 色谱图

1-赤芍对照药材; 2-芍药苷; 3~4-复方制剂; 5~6-阴性对照。

Fig. 2 TLC graph of Paeoniae Radix Rubra

1-reference Paeoniae Radix Rubra; 2-paeoniflorin; 3~4-compound preparation; 5~6-negative sample.

2.1.3 延胡索的 TLC 鉴别^[6] 精密称取制剂 10 g, 加甲醇 40 mL, 回流 2 h, 抽滤, 挥去甲醇, 得残渣, 加蒸馏水 10 mL, 转移至分液漏斗, 用浓氨水调 pH 至 9, 正己烷萃取, 取正己烷层, 挥去正己烷, 加甲醇 1~2 mL, 得复方制剂供试品溶液。同法制取剂阴性对照溶液。精密称取延胡索对照药材 0.05 g, 加甲醇 20 mL, 超声提取 30 min, 过滤, 挥去甲醇, 得残渣, 同复方制剂供试品溶液的制备。按照 TLC 法(中国药典 2015 年版, 四部通则 0502), 吸取上述对照品溶液 5.0 μ L, 其余 3 种溶液 10.0 μ L, 点样。先以正己烷-氯仿-甲醇(15:8

: 0.6)为展开剂一次展开, 溶剂前沿约 12 cm, 取出, 晾干; 再以环己烷-丙酮为展开剂(14: 6)二次展开, 取出, 晾干; 用碘单质显色, 365 nm 紫外灯下检视。在与延胡索乙素对照品、延胡索对照药材色谱相应的位置上, 复方制剂供试品色谱显相同颜色的斑点, 且制剂阴性对照色谱中无干扰, 结果见图 3。

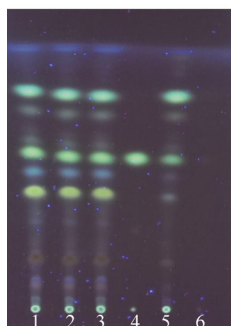


图3 延胡索的 TLC 色谱图

1~3-复方制剂; 4-延胡索乙素对照品; 5-延胡索对照药材; 6-阴性对照。

Fig. 3 TLC graph of Corydalis Rhizoma

1-3-compound preparation; 4-tetrahydropalmatine; 5-reference Corydalis Rhizoma; 6-negative sample.

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱 Extend- C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.1%磷酸(15: 85); 柱温: 25 $^{\circ}$ C; DAD 检测器; 检测波长: 阿魏酸 320 nm, 芍药苷 234 nm; 流速: 1 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μ L。

2.2.2 溶液的制备 ①对照品溶液的制备: 精密称取阿魏酸对照品 0.04 mg, 芍药苷对照品 0.27 mg, 至 5 mL 量瓶中, 以甲醇溶解, 配制成阿魏酸浓度为 0.008 mg·mL⁻¹, 芍药苷浓度为 0.054 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液, 放入冰箱贮存, 备用。②供试品溶液的制备: 精密称取样品制剂约 1 g, 置 25 mL 量瓶中, 加入甲醇定容至刻度, 超声提取 10 min, 作为供试品溶液。③阴性供试品溶液的制备: 分别称取缺少当归、赤芍的阴性制剂, 按照②方法制备阴性供试品溶液。

2.2.3 系统适用性试验 分别精密吸取对照品、供试品和阴性供试品溶液各 10 μ L, 按“2.2.1”项下色谱条件进样。理论板数按芍药苷峰计算 $\geq$ 5 000。样品色谱图中, 在与对照品色谱图相应保留时间有相同色谱峰, 阴性样品无干扰, 见图 4。

2.3 线性关系考察

精密称取阿魏酸对照品 2.98 mg, 定容至 50 mL; 精密称取芍药苷对照品 5.69 mg, 定容至

25 mL。精密吸取阿魏酸、芍药苷对照品溶液, 配制成阿魏酸浓度为 0.002 4, 0.004 8, 0.007 2, 0.009 5, 0.011 9 mg·mL⁻¹, 芍药苷浓度为 0.036 4, 0.045 5, 0.054 6, 0.063 7, 0.072 8, 0.081 9 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样 10 μ L, 记录色谱峰面积。以浓度(mg·mL⁻¹)为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。阿魏酸的回归方程为: $Y=31\,662X-19.715(r=0.999\,4)$, 芍药苷的回归方程为: $Y=11\,142X-15.736(r=0.999\,2)$, 表明阿魏酸在 0.002 4~0.011 9 mg·mL⁻¹, 芍药苷在 0.036 4~0.081 9 mg·mL⁻¹ 内线性关系良好。

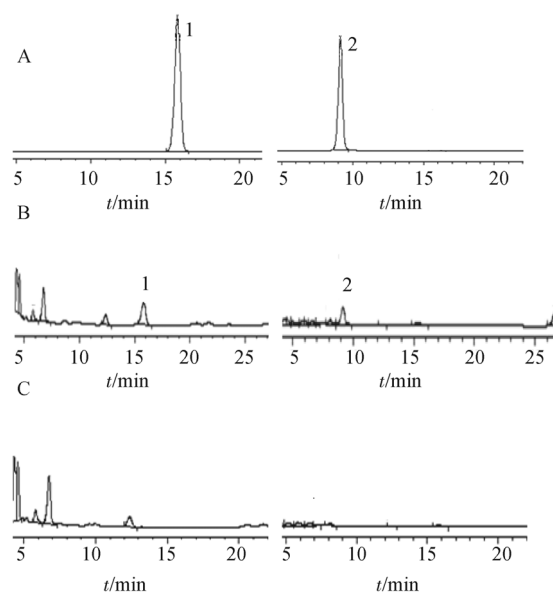


图4 高效液相色谱图

A-对照品; B-样品; C-阴性对照; 1-阿魏酸; 2-芍药苷。

Fig. 4 HPLC chromatograms

A-reference substance; B-sample; 1-ferulic acid; 2-paeoniflorin.

2.4 仪器精密度试验

取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 阿魏酸、芍药苷的 RSD 分别为 2.23%($n=6$), 1.56%($n=6$), 结果表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取同一供试品溶液, 室温下静置, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 阿魏酸、芍药苷的 RSD 分别为 1.83%($n=6$), 1.74%($n=6$), 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6 重复性试验

取同一批样品 6 份, 按“2.2.2”项下供试品溶液制备的方法平行制备供试品溶液 6 份, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 计算阿魏酸、芍药苷的 RSD 分别为 1.58%($n=6$), 0.81%($n=6$), 结果

表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

精密称取已知含量的同一批样品 9 份, 分别按样品含量的 50%, 100%, 150%(低、中、高)3 个浓度加入浓度为 $0.0732 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的阿魏酸对照品溶液 0.4, 0.8, 1.2 mL, 浓度为 $0.1358 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芍药苷对照品溶液 2.7, 5.4, 8.1 mL, 各 3 份分别加甲醇溶解定容至 25 mL 量瓶, 按照“2.2.2”②项下方法制备, 按“2.2.1”项色谱条件测定, 结果见表 1。

表 1 加样回收实验结果(n=6)

Tab. 1 Results of recovery tests (n=6)

样品	取样量/g	样品中 含量/mg	对照品 加入量/ mg	实测量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	平均 RSD
阿 魏 酸	0.496 6	0.058 3	0.029 3	0.087 2	98.55	100.3	1.08
	0.496 1	0.058 3	0.029 3	0.087 4	99.65		
	0.495 6	0.058 2	0.029 3	0.087 5	100.01		
	0.499 1	0.058 6	0.058 6	0.118 0	101.43		
	0.499 7	0.058 7	0.058 6	0.117 2	99.89		
	0.499 1	0.058 6	0.058 6	0.114 8	95.92		
	0.498 7	0.058 6	0.087 8	0.149 1	103.05		
	0.488 1	0.057 3	0.087 8	0.149 0	104.37		
	0.498 6	0.058 6	0.087 8	0.145 9	99.47		
芍 药 苷	0.496 6	0.745 8	0.366 7	1.104 5	97.84	98.9	0.68
	0.496 1	0.745 0	0.366 7	1.112 8	100.29		
	0.495 6	0.744 3	0.366 7	1.094 4	95.48		
	0.499 1	0.749 5	0.733 3	1.497 7	102.03		
	0.499 7	0.750 4	0.733 3	1.477 7	99.17		
	0.499 1	0.749 5	0.733 3	1.493 0	101.38		
	0.498 7	0.748 9	1.100 0	1.812 9	96.72		
	0.488 1	0.733 0	1.100 0	1.823 0	99.09		
	0.498 6	0.748 8	1.100 0	1.828 5	98.16		

2.8 样品测定

取 3 批样品, 平行取样 3 份, 按“2.2.2”②项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱峰面积, 按外标法计算样品中阿魏酸、芍药苷的含量, 结果 185 g 生药所制备的 92.5 g 制剂中含阿魏酸含量为 $0.1222 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD=1.38%; 芍药苷为 $1.4871 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD=0.76%。

3 讨论

复方当归妇炎微灌肠剂为复方制剂, 方剂组成的药味多, 分离难, 干扰大, 质量标准建立难。本实验对方中多味药进行了鉴别, 最后根据药材的主要成分和新药审批标准选择君药当归、赤芍、

延胡索定性鉴别。该鉴别方法专属性强, 且阴性对照无干扰, 可作为该制剂专属鉴别, 以更好地控制产品质量。

根据中国药典 2015 年版阿魏酸检测波长选定为 320 nm。采用芍药苷的最大吸收波长(230 nm)时, 其杂质的吸收过大, 影响了芍药苷的峰型, 通过对其 3D 图谱观察, 在 234 nm 的波长下, 其对芍药苷的吸收影响不大, 但对杂质的吸收减弱。因此, 本实验结合药典、文献选择芍药苷的检测波长为 234 nm^[5,7-8]。

在流动相的选择上, 根据阿魏酸和芍药苷的化学性质, 本实验首先采用甲醇-0.085%磷酸(15 : 85)洗脱, 分离效果及峰型欠佳; 更换为乙腈-0.1%磷酸梯度洗脱, 出现较大基线漂移; 故将流动相再次更换为乙腈-0.1%磷酸(15 : 85)等度洗脱^[5,8-9]。结果表明, 此流动相对 2 种成分进行测定的分离效果和对称性都很好, 且该制剂其他组分没有影响。本实验为建立复方当归妇炎微灌肠剂质量控制标准提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] ZHAO P X, WANG Y Z, YU X H. Clinical observation of 100 cases of pelvic inflammatory disease treated by Compound Angelica Fuyan Enema [J]. Clin J Chin Med(中医临床研究), 2015, 7(6): 67-69.
- [2] 谢仲德, 方应权, 李文烈, 等. 当归调经胶囊的薄层鉴别与阿魏酸、芍药苷的测定[J]. 中成药, 2013, 35(2): 427-430.
- [3] LU J X, TAN C M, CHEN B L, et al. Improvement of the quality control standard for Mingmu Shangqing pills [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2016, 36(11): 2051-2058.
- [4] YANG F. Study on TLC identification and general methods of Yuanhuzhitong series varieties [J]. Chongqing J Res Chin Drug Herb(重庆中草药研究), 2014(1): 7-9.
- [5] LIU Y Q, MA Y, YANG B W, et al. Determination of bioactive components in paeonia lactiflora roots cultivated in various areas by UHPLC [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2016, 39(5): 980-985.
- [6] YANG M, LI C, FENG W H, et al. Simultaneous determination of eleven major alkaloids in Corydalis Rhizoma by RP-HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2016, 22(6): 22-25.
- [7] HE L L. Determination of perlic acid in Angelica Nourishing pills by HPLC [J]. Chin Med Her(中国医药导报), 2011, 8(3): 60-62.
- [8] 中国药典. 一部[S]. 2015: 80-81.
- [9] CHEN Y H. Fast determination of Aifu Nuangong pills by HPLC [J]. Strait Pharm J(海峡药理学), 2014, 26(12): 55-57.

收稿日期: 2017-06-28

(本文责编: 李艳芳)