

川菊止痛胶囊的质量标准研究

任晓蕾, 霍金海, 张树明, 李先娜, 王顺* (黑龙江省中医药科学院, 哈尔滨 150036)

摘要: 目的 建立川菊止痛胶囊质量标准。方法 采用薄层色谱法对复方中柴胡、菊花进行定性鉴别。HPLC 同时测定制剂中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素及甘草苷含量, 色谱柱: Kromasil 100-5C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.05%磷酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长为 280 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μL。结果 薄层色谱斑点清晰且阴性样品无干扰。甘草苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷及汉黄芩素分别在 10.7~107 μg·mL⁻¹、12.12~121.2 μg·mL⁻¹、11.2~112 μg·mL⁻¹、10.02~100.2 μg·mL⁻¹、10.32~103.2 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好, 精密度、重复性、稳定性试验 RSD 均 <1.8%, 加样回收率分别为 98.34%~101.77%(RSD=1.28%, n=6)、98.69%~101.36%(RSD=1.01%, n=6)、98.46%~101.06%(RSD=0.92%, n=6)、98.67%~101.33%(RSD=1.17%, n=6)、98.43%~100.79%(RSD=0.92%, n=6)。结论 本研究建立的质量标准方法准确、简便, 可用于川菊止痛胶囊的质量控制, 且所建立的菊花、柴胡薄层鉴别方法可供其他含有二药的复方标准建立作参考。
关键词: 川菊止痛胶囊; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 质量标准

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)05-0571-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.05.012

引用本文: 任晓蕾, 霍金海, 张树明, 等. 川菊止痛胶囊的质量标准研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(5): 571-574.

Study on Quality Standard for Chuanju Zhitong Capsule

REN Xiaolei, HUO Jinhai, ZHANG Shuming, LI Xianna, WANG Shun* (Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the quality standard for Chuanju Zhitong capsule. **METHODS** TLC was used to qualitatively identify the compound Bupleuri Radix and Chrysanthemum Flos, respectively. HPLC was used to determine the contents of baicalin, baicalein, wogonoside, wogonin and liquiritin. The determination was performed on Kromasil 100-5C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.05% phosphoric acid, gradient elution at flow rate of 1.0 mL·min⁻¹; the detection wavelength was set at 280 nm; the injection volume was 10 μL. **RESULTS** TLC spots were clear and well separated without negative interference. The linear range of baicalin, baicalein, wogonoside, wogonin and liquiritin were 10.7~107 μg·mL⁻¹, 12.12~121.2 μg·mL⁻¹, 11.2~112 μg·mL⁻¹, 10.02~100.2 μg·mL⁻¹ and 10.32~103.2 μg·mL⁻¹. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were <1.8%. The recoveries were 98.34%~101.77%(RSD=1.28%, n=6), 98.69%~101.36%(RSD=1.01%, n=6), 98.46%~101.06%(RSD=0.92%, n=6), 98.67%~101.33%(RSD=1.17%, n=6), 98.43%~100.79%(RSD=0.92%, n=6), respectively. **CONCLUSION** The established quality standard method is accurate and simple, can be used for the quality control of Chuanju Zhitong capsule, the TLC of Chrysanthemum Flos and Bupleuri Radix can be used for other Chinese herbal compound.

KEYWORDS: Chuanju Zhitong capsule; TLC; HPLC; quality standard

川菊止痛胶囊(黑药制字 Z20100226)以临床多年用于治疗偏头痛的医院制剂为基础, 是黑龙江省中医药科学院拥有自主知识产权的中药新产品, 由菊花、川芎、黄芩、甘草、柴胡等 12 味中药组成, 具有祛风活血、通络止痛的功效, 临床用于风邪阻络所致头痛、牙痛及各种原因引起的神经性疼痛, 治疗偏头痛有效率达 96.7%。为了在原临床基础上对制剂质量进行控制, 本研究建立川菊止痛胶囊质量标准, 采用薄层色谱法(TLC)对制剂中菊花、柴胡进行定性鉴别, 采用 HPLC

同时测定制剂中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素及甘草苷的含量, 提高原制剂质量标准, 为开发治疗偏头痛的中药新药川菊止痛胶囊奠定基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

2010 型高效液相色谱仪(日本岛津公司); KQ-300DB 数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司); BSAZ24S-CW 型电子天平、BP211D 型电子天平均来自德国赛多利斯公司; ATC2-5-U 超纯水

基金项目: 黑龙江省应用技术与开发计划重大项目(GA16C101)

作者简介: 任晓蕾, 女, 硕士, 副研究员 Tel: (0451)55653086

E-mail: 353713454@qq.com

*通信作者: 王顺, 男, 博士, 教授

Tel:

(0451)55653086 E-mail: hljwang@aliyun.com

机(美国艾科浦国际有限公司)。

1.2 试药

柴胡对照药材(批号: 120992-201509)、菊花对照药材(批号: 121384-201504)、黄芩苷(批号: 110715-201720; 纯度: >98%)、黄芩素(批号: 111595-201607; 纯度: >98%)、汉黄芩苷(批号: 112002-201702; 纯度: >98%)、汉黄芩素(批号: 111514-201706; 纯度: >98%)、甘草苷(批号: 111610-201607; 纯度: >98%)以上标准物质均购自中国食品药品检定研究院; 硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂); 乙腈、磷酸为色谱醇, 水为超纯水。

川菊止痛胶囊样品由黑龙江省中医药科学院制剂室制备(批号: 180101, 180102, 180103), 处方饮片(哈药集团世一堂制药厂提供), 阴性样品自制。

2 方法与结果

2.1 菊花的薄层鉴别^[1]

取川菊止痛胶囊内容物 2 g, 加甲醇 25 mL, 置水浴上加热回流 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取菊花对照药材 0.5 g 同法制成对照药材溶液。取缺菊花药材的其他中药饮片, 根据处方工艺制得菊花阴性样品, 同法制得阴性供试品溶液。按中国药典 2015 年版四部 TLC 试验, 吸取上述 3 种溶液各 2~5 μL , 分别点于同一硅胶 G 薄层板, 以甲苯: 乙酸乙酯: 甲醇: 甲酸(16: 4: 1.2: 0.8)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以三氯化铝试液, 置 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热, 置紫外光灯(365 nm)下检视^[2-4]。供试品色谱中, 在与对照药材色谱主斑点相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 且阴性供试品溶液无干扰。结果见图 1。

2.2 柴胡的薄层鉴别

取川菊止痛胶囊内容物 1 g, 加乙醚 20 mL 超声 15 min, 弃去乙醚液, 药渣挥干溶剂, 以水饱和正丁醇提取 3 次, 每次 20 mL, 合并正丁醇液, 加等体积的氨试液, 摇匀, 弃去氨试液, 静置, 分层后, 取正丁醇蒸干, 残渣加 5 mL 甲醇使溶解, 作为供试品溶液。取缺柴胡的其他饮片, 根据处方工艺制得阴性样品, 取粉末 1 g 按照供试品溶液制备方法制得阴性供试品溶液。另取柴胡对照药材 0.5 g, 加水 20 mL 回流 1 h, 滤过, 以水饱和正丁醇萃取 3 次, 同法制成对照药材溶液。吸取供

试品溶液, 阴性供试品溶液及对照药材溶液各 5 μL , 分别点于同一硅胶 G 板薄层板, 以三氯甲烷: 甲醇: 水(13: 7: 2) 10 $^{\circ}\text{C}$ 以下放置的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 2% 对二甲氨基苯甲醛硫酸乙醇液(1 $\rightarrow$ 10), 置 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥箱加热, 置紫外光(365 nm)下检视^[5-7], 供试品色谱在与对照药材主斑点相应位置上显示相同颜色荧光斑点, 阴性供试品溶液无干扰。结果见图 1。

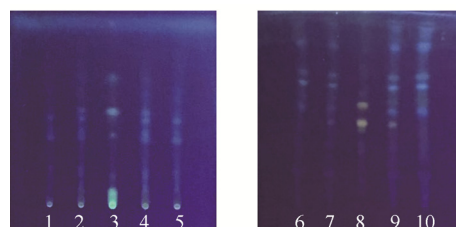


图 1 薄层色谱图

1, 5-菊花阴性供试品溶液; 2, 4-菊花供试品溶液; 3-菊花对照药材溶液; 6, 10-柴胡阴性供试品溶液; 7, 9-柴胡供试品溶液; 8-柴胡对照药材溶液。

Fig. 1 Thin-layer chromatogram

1, 5-negative sample without Chrysanthemum Flos; 2, 4-Chrysanthemum Flos sample; 3-Chrysanthemum Flos reference substance; 6, 10-negative sample without Bupleuri Radix; 7, 9-Bupleuri Radix sample; 8-Bupleuri Radix reference substance.

2.3 HPLC 同时测定黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素及甘草苷含量

2.3.1 色谱条件^[8-13] 色谱柱: Kromasil 100-5C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.05% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱, 0~8 min, 19%A; 8~35 min, 19% $\rightarrow$ 50%A; 35~36 min, 50% $\rightarrow$ 100%A; 36~40 min, 100% $\rightarrow$ 19%A; 检测波长: 280 nm; 流速: 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹; 进样量: 10 μL 。

2.3.2 混合对照品溶液的制备 分别称取甘草苷对照品 5.35 mg、黄芩苷对照品 6.06 mg、汉黄芩素对照品 5.16 mg、汉黄芩苷对照品 5.01 mg 及黄芩素对照品 5.60 mg, 置于 25 mL 容量瓶中, 加 70% 乙醇制成混合对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取川菊止痛胶囊内容物 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入 70% 乙醇 100 mL, 称定重量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz)30 min, 放冷, 用 70% 乙醇补足失重, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.4 系统适用性试验 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 10 μL , 按“2.3.1”项下色谱条件测定, 供试品溶液中 5 种成分分离较

好,且阴性对照溶液无干扰。结果见图2。

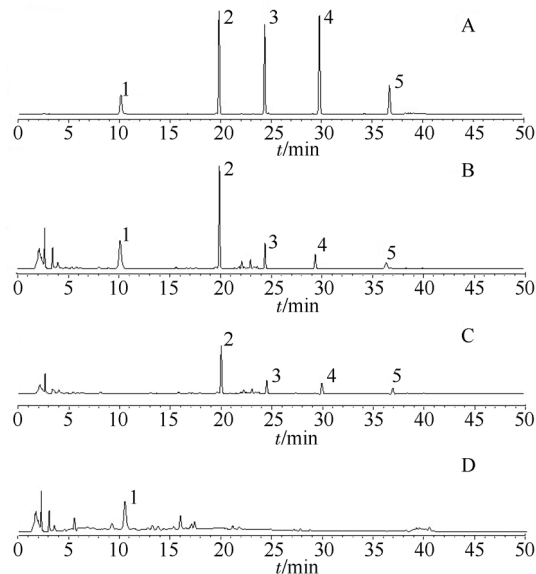


图2 川菊止痛胶囊 HPLC 色谱图

A-混合对照品溶液; B-供试品溶液; C-甘草阴性供试品溶液; D-黄芩阴性供试品溶液; 1-甘草苷; 2-黄芩苷; 3-汉黄芩苷; 4-黄芩素; 5-汉黄芩素。

Fig. 2 HPLC chromatograms of Chuanju Zhitong capsule

A-mixed reference substance; B-sample; C-negative sample without liquorice; D-negative sample without Scutellariae Radix; 1-liquiritin; 2-baicalin; 3-wogonoside; 4-baicalein; 5-wogonin.

2.3.5 线性关系考察 分别精密量取“2.3.2”项下混合对照品溶液 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加 70%乙醇溶液定容, 制成系列混合对照品溶液; 精密吸取上述混合对照品各 10 μ L, 按“2.3.1”项下色谱条件测定峰面积, 以对照品浓度为横坐标(X), 峰面积(Y)为纵坐标, 进行线性回归, 回归方程分别为: $Y_{\text{甘草苷}}=26\,048X-231.26$, $r=0.999\,9$; $Y_{\text{黄芩苷}}=54\,974X-2\,708$, $r=0.999\,6$; $Y_{\text{黄芩素}}=46\,652X-286$, $r=0.999\,9$; $Y_{\text{汉黄芩苷}}=39\,781X-632$, $r=0.999\,6$; $Y_{\text{汉黄芩素}}=66\,398X+116$, $r=0.999\,8$, 5 种对照品分别在 10.7~107 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、12.12~121.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、11.2~112 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、10.02~100.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、10.32~103.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内呈良好线性关系。

2.3.6 仪器精密度试验 取“2.3.5”项下混合对照品, 按“2.3.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 以峰面积计算黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素及甘草苷的 RSD 值分别为 0.12%, 0.35%, 0.11%, 0.23%和 0.19%, 仪器精密度良好。

2.3.7 重复性试验 取本品内容物 6 份, 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液并进行测定, 结果黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素及甘草苷平均

含量分别为 53.24, 0.78, 6.23, 0.29, 5.14 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 5 种成分 RSD 分别为 0.36%, 0.68%, 0.96%, 0.77%和 0.28%, 实验结果显示方法重复性良好。

2.3.8 稳定性试验 精密吸取同一供试品(批号: 780101)溶液 10 μ L, 按“2.3.1”项下色谱条件分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 测定峰面积, 结果黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、甘草苷 RSD 值分别为 1.36%, 1.05%, 1.67%, 0.88%和 1.73%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.9 加样回收率试验 取已知含量样品(批号: 180101), 分别精密加入黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、甘草苷对照品溶液, 按供试品溶液制备方法, 在“2.3.1”项色谱条件下测定, 计算回收率。结果见表 1。

表 1 5 种化合物的加样回收率结果(n=6)

Tab. 1 Recovery test results of 5 compounds(n=6)

化合物	样品取 样量/g	含量/ mg	加入量/ mg	测定值/ mg	回收率/ %	RSD/%
黄芩苷	0.102 8	5.674 6	5.565 2	11.338 2	101.77	1.28
	0.115 5	6.375 6	6.150 8	12.553 9	100.45	
	0.112 3	6.199 0	6.206 4	12.364 2	99.34	
	0.100 7	5.564 2	5.624 1	11.246 8	101.04	
	0.107 4	5.928 5	6.003 9	11.832 7	98.34	
	0.109 1	6.022 3	6.115 3	12.209 4	101.17	
黄芩素	2.582 9	2.350 4	2.474 8	4.792 9	98.69	1.01
	2.572 2	2.340 7	2.301 1	4.673 2	101.36	
	2.627 0	2.390 6	2.407 2	4.805 3	100.31	
	2.695 2	2.452 6	2.517 3	4.990 4	100.81	
	2.552 5	2.322 8	2.465 9	4.783 2	99.78	
	2.618 6	2.382 9	2.578 1	4.992 8	101.23	
汉黄芩苷	0.527 2	3.843 3	3.887 4	7.704 0	99.31	0.92
	0.538 4	3.924 9	3.890 3	7.777 3	99.02	
	0.503 8	3.672 7	3.794 5	7.474 3	100.19	
	0.529 1	3.857 1	3.826 3	7.662 2	99.44	
	0.543 7	3.963 6	3.904 2	7.909 3	101.06	
	0.528 4	3.852 0	3.800 3	7.593 8	98.46	
汉黄芩素	5.119 3	2.047 7	2.147 9	4.184 1	99.46	1.17
	5.183 2	2.073 3	2.264 6	4.365 7	101.23	
	5.033 4	2.013 4	2.045 9	4.075 3	100.78	
	5.105 7	2.042 3	2.184 6	4.205 6	99.03	
	5.264 0	2.105 6	2.054 7	4.133 0	98.67	
	5.149 5	2.059 8	2.184 5	4.273 4	101.33	
甘草苷	1.004 7	5.596 2	5.374 0	11.008 9	100.72	0.92
	1.028 4	5.728 2	5.872 7	11.646 3	100.77	
	1.175 7	6.548 7	6.174 2	12.723 4	100.01	
	1.076 2	5.994 4	6.023 4	11.923 2	98.43	
	1.029 5	5.734 3	5.669 1	11.448 0	100.79	
	1.103 9	6.148 7	6.005 6	12.185 9	100.53	

2.3.10 样品含量测定 取3批样品精密称定,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进行检测,记录峰面积计算样品含量,黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、甘草苷平均含量分别为 56.46, 0.87, 7.33, 0.38, 5.64 mg·g⁻¹。

3 讨论

预实验按照中国药典 2015 年版菊花项下对绿原酸进行定性分析,阴性供试品有干扰;展开剂调整为甲苯:乙酸乙酯:甲醇:甲酸(16:4:1.2:0.8),喷以三氯化铝试液显色,对照药材主斑点显色清晰,阳性供试品相应位置斑点达到较好分离且阴性供试品无干扰,本方法于硅胶 G 板点样,相比药典点于聚酰胺薄膜板显色更清晰且易操作。

中国药典 2015 年版针对柴胡薄层鉴别采用乙酸乙酯:乙醇:水(8:2:1)为展开剂,并要求于 60℃加热薄层板,实际操作中较难掌握,且本方于此条件下鉴别,阴性样品在柴胡皂苷 d 相应位置有干扰;本研究建立方法为以三氯甲烷:甲醇:水(13:7:2) 10℃以下放置的下层溶液为展开剂,显色剂浓度调整为 2%对二甲氨基苯甲醛硫酸乙醇液(1→10),于 105℃干燥箱加热,操作简便可行,于紫外光(365 nm)下检视,对照药材及供试品色谱相应位置显相同亮黄色特异性斑点且阴性样品无干扰,此方法可供其他复方中柴胡药材质量标准建立参考。

建立 HPLC 同时测定黄芩、甘草 2 味药材中 5 个成分黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素及甘草苷的含量,考察 237 nm 及 280 nm 下出峰情况,在 2 种检测波长下 5 个色谱峰均达到较好分离,相比 237 nm, 280 nm 处检测到的黄芩苷峰面积值增大 2 倍,因此本研究建立含量测定方法检测波长定为 280 nm。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 310-311, 280-281.
- [2] FAN G J, LI S M, ZHANG S, et al. Quality standard of *Chrysanthemum indicum* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48(19): 4073-4076.
- [3] 蔡晓敏. 苦参洗液的薄层色谱鉴别[J]. 海峡药学, 2017, 29(2): 75-77.
- [4] WANG F, WANG S W, YAO M N, et al. Study on the preparation technology and quality standards of Juteng capsules [J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2017, 32(4): 416-420.
- [5] 李云静. 解郁安神胶囊中柴胡的薄层色谱鉴别[J]. 农业与技术, 2017, 37(11): 9-10.
- [6] LI M, WANG Y, YU X, et al. TLC identification and content determination of saponins from the Roots of *Bupleurum marginatum* [J]. Chin J Experiment Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2014, 20(4): 74-77.
- [7] CAO A N, FAN M, LYU D, et al. Evaluation for merchandise character and quality of Bupleurum chinense Root from different habitats [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2015, 38(8): 1611-1614.
- [8] TANG Z D. Simultaneous determination of six components in Fufang Huangqin tablets by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2016, 36(10): 1870-1874.
- [9] WEN S, SUO Z R, QIN H Y, et al. Determination of saikosaponin a, saikosaponin b1, saikosaponin c, saikosaponin d and baicalin in Chaihuang granules by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2017, 37(1): 148-152.
- [10] WANG F Y, WU C Q, CHEN Z J, et al. Determination of three effective components and preservatives in Compound Yuxingcao mixture [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(3): 399-403.
- [11] LINAG B, ZHANG Y, ZHANG Y T, et al. Simultaneous determination of gallic acid, baicalin and baicalein in compound Xiaoyin granules by RP-HPLC [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2017, 37(12): 2191-2195.
- [12] BAI B, XU J, GAO L J, et al. Fingerprint and multi-component quantification analysis of Xiaoyan tablets by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(2): 258-261.
- [13] SONG Y F, SU C M, YANG H, et al. Simultaneous determination of puerarin, liquiritin, baicalin and berberine hydrochloride in Gegenqinlian micropills by HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(2): 64-67.

收稿日期: 2018-06-18

(本文责编: 沈倩)