

珍母丸质量标准研究

宿曼筠, 王友兰, 吴爱英(青岛市食品药品检验研究院, 山东 青岛 266071)

摘要: 目的 建立珍母丸的质量标准。方法 采用显微鉴别方法对枸杞子、珍珠母的显微鉴别进行描述, 采用薄层色谱法对香附、山茱萸、赤芍进行定性鉴别; 采用 HPLC 测定赤芍中芍药苷的含量, 色谱柱为 Accurasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.2%磷酸溶液(15:85)为流动相, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 230 nm, 进样量为 10 μL。结果 显微、薄层色谱有较强的专属性, 赤芍中芍药苷在 0.193~2.415 μg 内线性关系良好($r=0.999\ 5$), 平均回收率为 101.56%, RSD 为 1.45%($n=6$)。结论 本方法操作简便, 重复性好, 可作为珍母丸的质量控制方法。

关键词: 珍母丸; 质量标准; 高效液相色谱法; 薄层色谱法; 显微鉴别

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)06-0685-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.06.009

引用本文: 宿曼筠, 王友兰, 吴爱英. 珍母丸质量标准研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(6): 685-688.

Study on Quality Standard of Zhenmu Pills

SU Manyun, WANG Youlan, WU Aiyang(Qingdao Research Institute for Food and Drug Control, Qingdao 266071, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the quality standard for Zhenmu Pills. **METHODS** Microscopic identification method was used to identify Lycii Fructus and Margaritifera Concha. TLC was adopted to identify Cyperi Rhizoma, Corni Fructus and Paeoniae Radix Rubra. The content of paeoniflorin in Paeoniae Radix Rubra was determined by HPLC. The chromatographic separation was carried out on an Accurasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution(15:85) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 230 nm and the injection volume was 10 μL. **RESULTS** Microscopic identification method and TLC had strong specificity. The linear range was 0.193–2.415 μg($r=0.999\ 5$). The average recovery was 101.56% with the RSD of 1.45%($n=6$). **CONCLUSION** The method is simple and good repeatability, which can be used as the quality control method for Zhenmu Pills.

KEYWORDS: Zhenmu pills; quality standard; HPLC; TLC; microscopic identification

珍母丸是由枸杞子、人参、当归等组成, 具有滋阴补肾、益气养血、暖宫调经的功效。常用于女性不孕症, 月经不调, 下焦湿热, 赤白带下及胎漏、胎动不安。珍母丸由青岛市北京山医院(原青岛四方京山医院)生产, 为其独家生产品种, 现行标准编号为 ZBZ0092010, 标准中只收录了当归、川芎的薄层鉴别。为了更全面地控制该制剂的内在质量, 本研究增加了枸杞子^[1]、珍珠母^[2]、香附^[3]、山茱萸^[3-4]、赤芍^[3]的定性鉴别, 并采用 HPLC 对赤芍^[2,5-6]中的芍药苷进行了方法学考察和含量测定。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津); Accurasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 2.5 μm); BP211D 型电子天平(德国 Sartorius); AUTO SCIENCE

AS10200BT 型超声波清洗器(杭州汇尔仪器设备有限公司); ZF7-C 三用紫外分析仪(上海康华生化仪器制造有限公司); Si60(批号: HC39961356; 规格: 10 cm×20 cm)、Si60 GF₂₅₄(批号: HC30492153; 规格: 20 cm×20 cm)均来自默克化工技术(上海)有限公司。

1.2 试剂

山茱萸对照药材(批号: 121495-200401)、赤芍对照药材(批号: 121093-201303)、 α -香附酮对照品(批号: 110748-201513; 纯度: 99.7%)、熊果酸对照品(批号: 110742-200519; 纯度: 100%)、芍药苷对照品(批号: 110736-201539; 纯度: 96.4%)均购自中国食品药品检定研究院; 珍母丸(青岛市北京山医院, 批号: 151209, 151211, 151213); 所用试剂甲醇、乙腈为色谱纯, 其余均为分析纯; 娃哈哈纯净水。

作者简介: 宿曼筠, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0532)58759172

E-mail: Suman_yun@163.com

2 方法与结果

2.1 显微特征鉴别

取本品,置显微镜下观察:种皮石细胞表面观不规则多角形,壁厚,波状弯曲,层纹清晰(枸杞子)。不规则碎块,半透明,表面显颗粒性,由数十至数十薄层重叠,片层结构排列紧密,可见致密的成层线条或极细密的微波状纹理(珍珠母)。结果见图1。

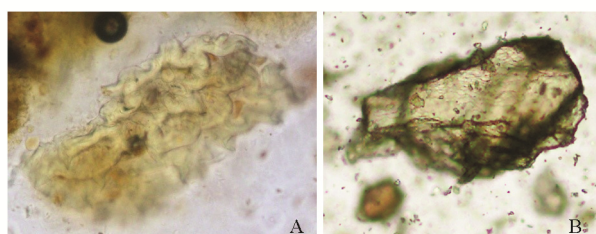


图1 显微鉴别

A-枸杞子; B-珍珠母。

Fig. 1 Microscopic identification

A-Lycii Fructus; B-Margaritifera Concha.

2.2 TLC 鉴别

香附的鉴别:取本品2丸,剪碎,加乙醚30 mL,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙酸乙酯2 mL使溶解,作为供试品溶液。另取 α -香附酮对照品,加乙酸乙酯制成每1 mL含1 mg的溶液,作为对照品溶液。分别取处方中除去香附的其他药味,按处方比例制成缺香附的阴性样品,同供试品溶液的制备方法制成阴性样品溶液。照薄层色谱法(中国药典2015年版四部通则0502)试验,吸取上述溶液5 μ L,分别点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板上,以二氯甲烷-乙酸乙酯-冰醋酸(80:1:1)为展开剂,取出,晾干,置紫外光(254 nm)下检视。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,且阴性对照无干扰,结果见图2。

山茱萸的鉴别:取本品2丸,剪碎,加乙酸乙酯40 mL,超声处理15 min,滤过,滤液蒸干,残渣加无水乙醇2 mL使溶解,作为供试品溶液。另取山茱萸对照药材0.5 g,同法制成对照药材溶液。再取熊果酸对照品,加无水乙醇制成每1 mL含1 mg的溶液,作为对照品溶液。按处方比例和制法制得不含山茱萸的样品,同供试品溶液制备方法制得山茱萸阴性样品溶液。照薄层色谱法(中国药典2015年版四部通则0502)试验,吸取上述

溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(20:4:0.5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,置日光下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的紫红色斑点,且阴性对照无干扰,结果见图3。

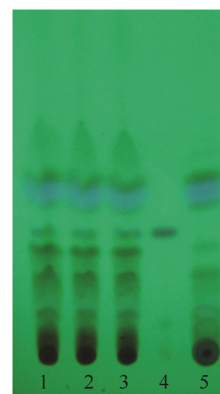


图2 香附的薄层鉴别图谱

1~3-供试品; 4- α -香附酮对照品; 5-阴性样品。

Fig. 2 TLC chromatograms of Cyperi Rhizoma

1-3-test products; 4- α -cyperone; 5-negative sample.

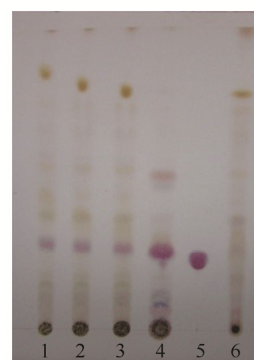


图3 山茱萸的薄层鉴别图谱

1~3-供试品; 4-对照药材; 5-熊果酸对照品; 6-阴性样品。

Fig. 3 TLC chromatograms of Corni Fructus

1-3-test products; 4-control herbs; 5-ursolic acid; 6-negative sample.

赤芍的鉴别:取本品3丸,剪碎,加硅藻土10 g,研匀,加乙醇40 mL,超声处理15 min,滤过,蒸干,残渣加乙醇2 mL使溶解,作为供试品溶液。另取赤芍对照药材0.5 g,加乙醇10 mL,超声处理15 min,滤过,蒸干,残渣加乙醇2 mL使溶解,作为对照药材溶液。再取芍药苷对照品,加乙醇制成每1 mL含1 mg的溶液,作为对照品溶液。按处方比例和制法制得不含赤芍的样品,同供试品溶液制备方法制得赤芍阴性样品溶液。照薄层色谱法(中国药典2015年版四部通则0502)

试验,吸取上述溶液各 5 μL , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以二氯甲烷-乙酸乙酯-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,加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰,结果见图 4。

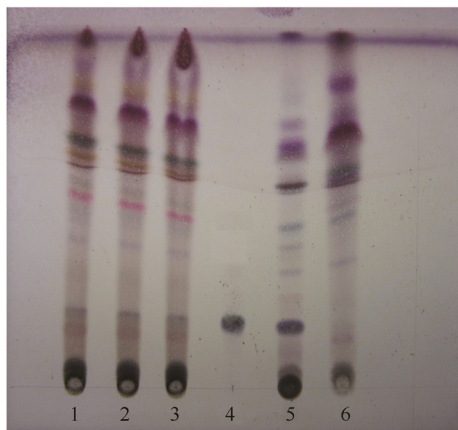


图 4 赤芍的薄层鉴别图谱

1~3-供试品; 4-芍药苷对照品; 5-赤芍对照药材; 6-阴性样品。

Fig. 4 TLC chromatograms of Paeoniae Radix Rubra

1-3-test products; 4-paeoniflorin; 5-control herbs of Paeoniae Radix Rubra; 6-negative sample.

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱: Accurasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.2%磷酸溶液(15:85); 检测波长为 230 nm; 流速为 1 mL·min⁻¹; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 。理论板数按芍药苷峰计算应 $\geq 3\,000$ 。

2.3.2 溶液制备 对照品溶液的制备: 取芍药苷对照品适量,精密称定,加 70%乙醇制成每 1 mL 含 100 μg 的溶液,即得。

供试品溶液的制备: 取本品约 2.8 g,精密称定,置 250 mL 量瓶中,精密加入 70%的乙醇 25 mL,加热回流 30 min,放冷,滤过,取续滤液,即得。

阴性样品溶液的制备: 按处方比例及工艺配制缺赤芍的阴性制剂,按供试品溶液的制备方法制备,即得。

2.3.3 方法学考察 专属性试验: 取对照品、供试品和阴性样品溶液各 10 μL ,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,结果在芍药苷对照品色谱峰相应的保留时间处,阴性样品无色谱峰出现,说明阴性样品不干扰检出。结果见图 5。

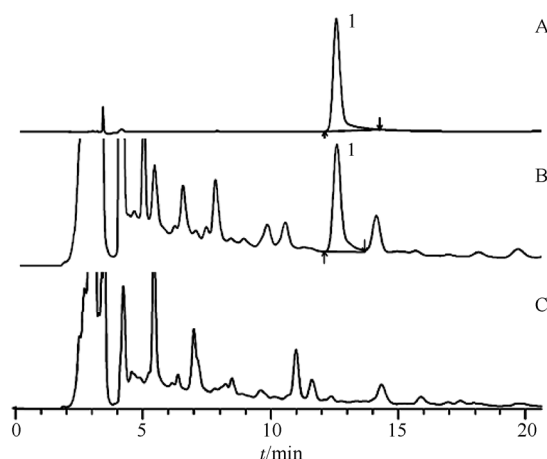


图 5 高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液; C-阴性样品溶液; 1-芍药苷。

Fig. 5 HPLC chromatograms

A-reference substance; B-sample solution; C-negative sample solution; 1-paeoniflorin.

线性关系考察: 分别精密吸取“2.3.2”项下对照品溶液(0.097 mg·mL⁻¹) 2, 5, 10, 15, 25 μL ,按“2.3.1”项下色谱条件测定,以进样量(μg)为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,进行线性回归,得芍药苷回归方程: $Y=1\,000\,000X-77\,726$, $r=0.999\,5$ ($n=5$)。试验结果表明,芍药苷进样量在 0.193~2.415 μg ,与峰面积积分值呈良好的线性关系。

仪器精密性试验: 精密吸取“2.3.2”项下对照品溶液 10 μL ,按“2.3.1”项下色谱条件重复进样 6 次,测定峰面积积分值,芍药苷峰面积的 RSD 为 0.53%($n=6$),表明仪器的精密性良好。

稳定性试验: 取样品(批号: 151209),按“2.3.2”项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,分别于 0, 2, 8, 12, 24 h 进行分析,测定峰面积积分值,芍药苷峰面积值的 RSD 为 0.12%($n=6$)。结果表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

重复性试验: 取样品(批号: 151209),按“2.3.2”项下供试品溶液的制备方法制备 6 份样品后,分别进样,结果芍药苷平均含量每丸 11.298 mg, RSD 为 0.83%($n=6$),表明方法重复性良好。

回收率试验: 取已知含量的珍母丸(批号: 151209),研细,称取约 1.4 g,共 6 份,精密称定,精密加入 0.873 mg·mL⁻¹芍药苷对照品 2 mL,按“2.3.2”项下供试品溶液的制备方法制备,按“2.3.1”项下色谱条件进行分析,计算加样回收

率，结果平均回收率为 101.56%，RSD 为 1.45%(n=6)，该方法回收率良好。结果见表 1。

表 1 芍药苷加样回收率试验结果(n=6)

Tab. 1 Results of recovery for the paeoniflorin(n=6)

取样量/ g	样品含量/ mg	加入量/ mg	测定结果/ mg	回收率/ %	平均 值/%	RSD/ %
1.417 7	1.786	1.746	3.549	100.93	101.56	1.45
1.414 1	1.782	1.746	3.587	103.37		
1.424 3	1.795	1.746	3.555	100.81		
1.485 5	1.872	1.746	3.607	99.35		
1.497 6	1.887	1.746	3.680	102.70		
1.484 4	1.870	1.746	3.656	102.23		

2.3.4 样品的测定 按“2.3.2”项下供试品溶液的提取方法和“2.3.1”项下色谱条件对收集到的样品进行测定，记录峰面积并计算其含量，结果见表 2。

表 2 样品的测定结果

Tab. 2 Results of sample determination

批号	含量	平均含量
151209	0.87	0.87
151211	0.90	
151213	0.83	

3 讨论

3.1 薄层鉴别

香附的薄层鉴别中采用了香附对照药材和 α -香附酮对照品作为对照试剂，但是香附对照药材与阴性有部分斑点一致，因此，未将香附对照药材纳入正文的质量标准中。

中国药典 2015 年版一部中赤芍项下的薄层鉴别采用了三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2)的展开系统，考虑到三氯甲烷为毒性较大的有机试剂，为了遵循绿色环保的理念，将三氯甲烷用二氯甲烷代替，试剂毒性较小，随行阴性

样品无干扰，因此选用二氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2)为展开系统。

实验分别考察了不同品牌的薄层板、不同的显色条件及不同温湿度对结果的影响。结果表明，温度在 10~30℃，相对湿度在 40%~75%时，各指标成分斑点集中，不影响分离效果。

3.2 含量测定

实验分别对乙醇、甲醇、70%乙醇^[7]提取溶剂进行了考察，结果表明，甲醇提取效率较差，而乙醇、70%乙醇提取效果相当，因此选择更为环保的 70%乙醇作为提取溶剂。并考察了甲醇-磷酸二氢钾溶液、乙腈-磷酸溶液、甲醇-水 3 种流动相，结果发现，芍药苷的峰型有拖尾现象，对流动相稍加改进，采用乙腈-0.2%磷酸溶液(15:85)，峰型较好，可用于芍药苷的含量测定。

REFERENCES

- [1] JIAO Q, WANG X W, SHI Y, et al. Research and discussion on quality standard of Zuogui pills [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2018, 38(4): 710-715.
- [2] HOU F, SHI F, LI Z. Study on quality standard of Gengnian'an Pill [J]. Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志), 2013, 40(3): 516-519.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2015: 27, 258, 158.
- [4] WANG H B, GUO D, WANG Q, et al. Study on the quality standard for Tianzi capsules [J]. China Pharm(中国药师), 2018, 21(7): 1289-1292.
- [5] LI J S, CHANG Y F, HUO B J, et al. Quality comparative analysis of Paeoniae Rubia Radix formula granule from different manufacturers [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2018, 20(6): 755-758.
- [6] LI C, WANG T, WANG Z. Experimental study on quantitative determination of total paeony glycoside in Chinese berberaceous paeony [J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2005, 9(11): 23-24.
- [7] 何石兰, 洪松彬. 高效液相色谱法测定赤芍中芍药苷的含量[J]. 医学信息, 2010, 23(7): 2342-2343.

收稿日期: 2019-02-26

(本文责编: 沈倩)