

舒肝丸质量标准中薄层和液相方法完善研究

徐乐, 孔亚萍, 孙慧珠, 刘永利 (河北省药品检验研究院, 石家庄 050011)

摘要 目的: 对舒肝丸质量标准进行完善提高。方法: 对现标准中延胡索、陈皮、厚朴的薄层色谱鉴别方法进行完善提高; 采用高效液相色谱法同时测定芍药苷的含量, 色谱柱为 C_{18} 柱, 以乙腈-0.05% 磷酸为流动相, 梯度洗脱, 流速 $1.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长为 230 nm。结果: 薄层色谱斑点清晰, 分离度好, 专属性强, 重复性良好。芍药苷在 $0.03898 \sim 0.9746 \mu\text{g}$ 范围内线性关系良好; 平均回收率为 100.5%, RSD 为 1.5%。结论: 本文建立的鉴别和含量测定方法为舒肝丸的质量标准的修订完善提供可靠依据。

关键词: 舒肝丸; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 质量标准完善; 芍药苷

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2018)04-0516-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2018.03.015

Improvement Study on TLC and HPLC in Quality Standards of Shugan Pills

Xu Le, Kong Yaping, Sun Huizhu, Liu Yongli (Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract Objective: To improve the quality standards for Shugan Pills. **Methods:** The TLC identification methods of *corydalis rhizoma*, *citri reticulatae pericarpium*, *magnoliae officinalis cortex* in the current quality standard were optimized. The content of *paeoniflorin* was determined by HPLC. The chromatographic separation was performed on a C_{18} column with acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution with gradient elution as the mobile phase. The flow rate was $1.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ and the detection wavelength was 230 nm. **Results:** The chromatographic spots were clear with good separation, and the chromatogram for identification by TLC was specific and highly repeatable. The calibration curve was linear within the range of $0.03898 \sim 0.9746 \mu\text{g}$ for *paeoniflorin*. The average recovery was 100.5% and RSD was 1.5%. **Conclusion:** The established identification and content determination methods in this paper provide a reliable basis for the revision and improvement of the quality standards of Shugan Pills.

Keywords: Shugan Pills; TLC; HPLC; improvement of the quality standard; *paeoniflorin*

舒肝丸由川楝子、醋延胡索、白芍、片姜黄、木香、沉香、豆蔻仁、砂仁、姜厚朴、陈皮、枳壳、茯苓、朱砂共13味中药组成, 各药味经粉碎后, 加入不同的辅料精制成大蜜丸、小蜜丸、水蜜丸或水丸。临床上主要用于舒肝和胃、理气止痛等。现《中国药典》(2015年版) 记载该药品的质量标准^[1]中检验项目包括: 显微鉴别, 朱砂理化鉴

别, 延胡索、陈皮、厚朴、木香的薄层色谱鉴别及白芍中芍药苷的高效液相色谱法含量测定。该质量标准检验内容在《中国药典》(2005年版) 后无相关修订, 检验方法较为陈旧。查阅文献报道的质量标准研究内容仅测定芍药苷^[2]或延胡索乙素^[3]的含量, 无定性项检验; 参考骨痹止痛液等质量标准完善提高的文献^[4-8]中报道的对厚朴、延胡索定性

鉴别研究及益胃颗粒等文献^[7-11]报道的对芍药苷定量测定的研究,对本品的质量标准进行全面提高完善,修订了延胡索、陈皮、厚朴的薄层色谱鉴别,建立了更高效快捷的芍药苷HPLC法含量测定项。新方法缩短了分析时间、节约了检验成本,提高检验效率,为舒肝丸的质量标准制定提供科学依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Linomat-5 半自动点样仪(CAMAG公司); LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); KQ-400KDE超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); AE240型电子天平(上海梅特勒仪器有限公司); 薄层板:硅胶G薄层板(10×10cm, 青岛海洋化工厂分厂); 色谱柱: Thermo Acclaim C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm; 美国戴安公司)。

1.2 试药

延胡索对照药材(批号: 120928-201208)、芍药苷对照品(批号: 110736-201035, 含量96.4%)、橙皮苷对照品(批号: 110721-201014, 含量95.3%)、厚朴酚对照品(批号: 110729-200412)、厚朴酚对照品(批号: 110730-201313)均购自中国食品药品检定研究院。

舒肝丸样品三批购自市场(北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂, 批号3015234; 哈药集团世一堂制药厂, 批号1506107; 颈复康药业集团有

限公司, 批号395034, 编号I~III)。川楝子、醋延胡索、白芍(酒炒)、片姜黄、木香、沉香、豆蔻仁、砂仁、姜厚朴、陈皮、枳壳(炒)、茯苓、朱砂经本院中药室段吉平主任药师鉴定。

甲醇、乙腈(色谱纯, Merck公司); 水用去离子水; 其它试剂均为分析纯。

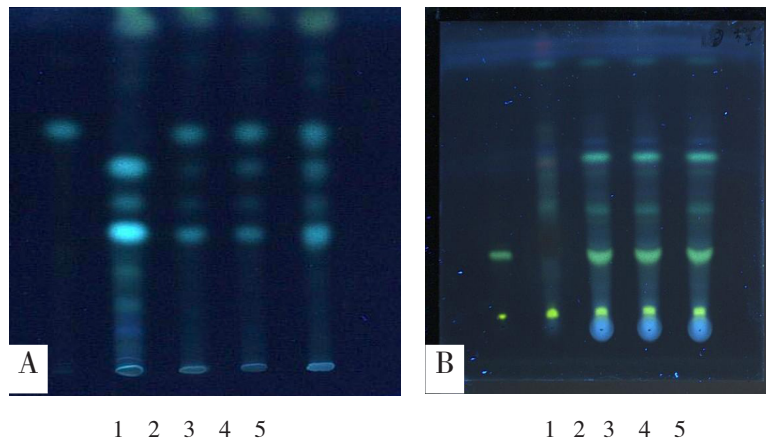
2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 陈皮

取本品水丸2.5 g或水蜜丸4 g, 研碎; 或取小蜜丸、大蜜丸6 g, 剪碎, 加甲醇40 mL, 加热回流30 min, 滤过, 取滤液1 mL, 作为供试品溶液。另取橙皮苷对照品, 加甲醇制成饱和溶液, 作为对照品溶液。按处方比例称取除陈皮外其他药材适量, 制成缺陈皮的阴性样品, 同供试品溶液制备方法制成缺陈皮的阴性对照溶液。照薄层色谱法(附录VI B)试验, 吸取对照品溶液2 μL、供试品溶液及阴性对照溶液各5 μL, 分别点于同一聚酰胺薄膜上, 以三氯甲烷-丙酮-甲醇(5: 1: 1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以三氯化铝试液, 置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。

新旧方法结果对比见图1, 经验证, 所得色谱斑点清晰、圆整、分离较好, 且阴性无干扰。



A. 为新标准方法; B. 为现行标准方法

1. 橙皮苷对照; 2. 陈皮阴性样品; 3~5. 舒肝丸样品

图1 两方法陈皮薄层色谱法鉴别结果

2.1.2 延胡索

取陈皮鉴别节下剩余滤液蒸干, 残渣加水20 mL使溶解, 分取10 mL(剩余水液备用), 加浓氨

试液调制碱性, 用乙醚振摇提取2次, 每次15 mL, 合并乙醚液, 挥干, 残渣加甲醇1 mL使溶解, 作为供试品溶液。另取延胡索对照药材1 g, 加甲醇40

mL, 加热回流30 min, 滤过, 滤液蒸干, 同法制成对照药材溶液。按处方比例称取除延胡索外其他药材适量, 制成缺延胡索的阴性样品, 同供试品溶液制备方法制成缺延胡索的阴性对照溶液。照薄层色谱法(附录VI B)试验, 吸取上述对照药材溶液5 μ L、供试品溶液及阴性对照溶液各10 μ L, 分别点于同一硅胶G薄层板上, 以环己烷-三氯甲烷-甲醇(7.5: 4: 1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置碘蒸气熏至斑点显色清晰, 取出, 置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。

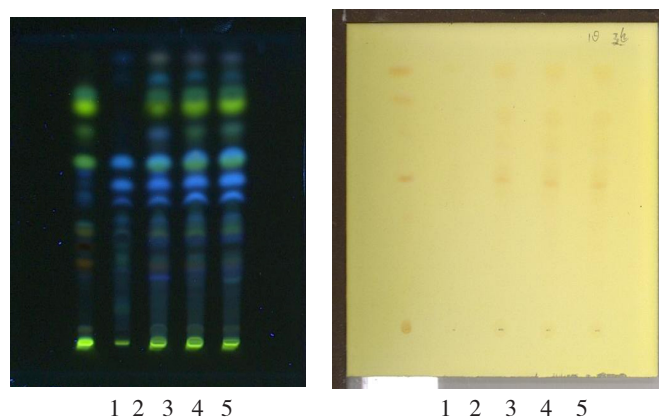
新旧方法结果对比见图2, 经验证, 所得色谱斑点清晰、圆整、分离较好, 且阴性无干扰。

2.1.3 厚朴

取延胡索鉴别剩余水溶液, 加盐酸调至酸

性, 用乙醚振摇提取2次, 每次15 mL, 合并乙醚液, 挥干, 残渣加甲醇1 mL使溶解, 作为供试品溶液。取厚朴酚对照品与和厚朴酚对照品, 加甲醇制成每1 mL各含1 mg的混合溶液, 作为对照品溶液。按处方比例称取除厚朴外其他药材适量, 制成缺厚朴的阴性样品, 同供试品溶液制备方法制成缺厚朴的阴性对照溶液。照薄层色谱法(附录VI B)试验, 吸取上述对照品溶液5 μ L、供试品溶液及阴性对照溶液各10 μ L, 分别点于同一硅胶GF254薄层板上, 以环己烷-乙酸乙酯(3: 1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(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。

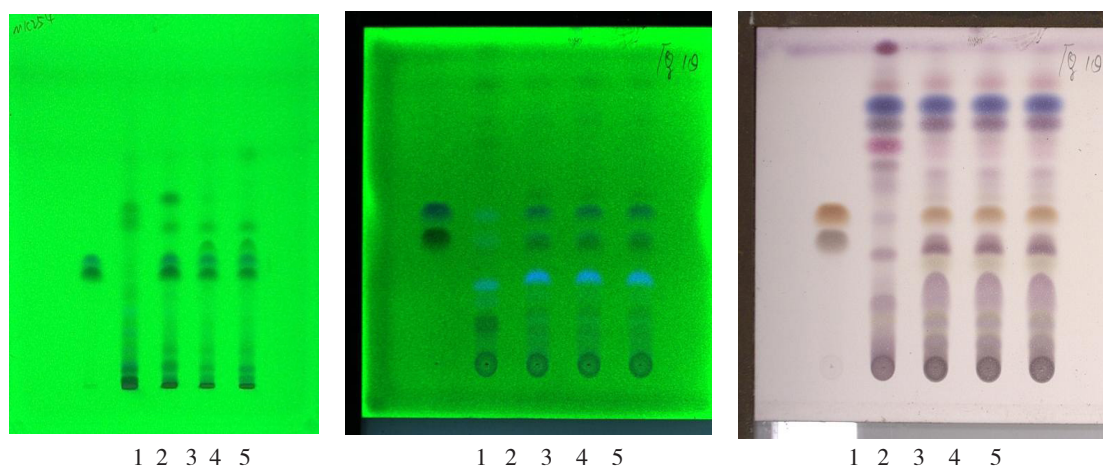
新旧方法结果对比见图3, 经验证, 所得色谱斑点清晰、圆整、分离较好, 且阴性无干扰。



A. 为新标准方法; B. 为现行标准方法

1. 延胡索对照药材; 2. 延胡索阴性样品; 3~5. 舒肝丸样品

图2 两方法延胡索薄层色谱法鉴别结果



A. 为新标准方法; B1. 为现标准方法(254nm); B2. 为现行标准方法(日光)

1. 混合对照品; 2. 阴性样品; 3~5. 舒肝丸样品

图3 两方法厚朴薄层色谱法鉴别结果

2.2 芍药苷的含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Thermo Acclaim C18 (250mm × 4.6mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A) - 0.05%磷酸(B), 梯度洗脱(0~40 min, 15%A → 25%A); 柱温: 35 °C; 检测波长为230nm; 流速1.0 ml · min⁻¹; 进样量: 5 μL; 理论板数大于8000; 芍药苷与相邻峰的分度均大于1.5。

2.2.2 对照品溶液的制备

精密称取芍药苷对照品0.01011 g, 置25 mL量瓶中, 加甲醇适量使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取5 mL, 置50 mL量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备

取重量差异节下的本品, 剪碎, 取约0.8g, 精

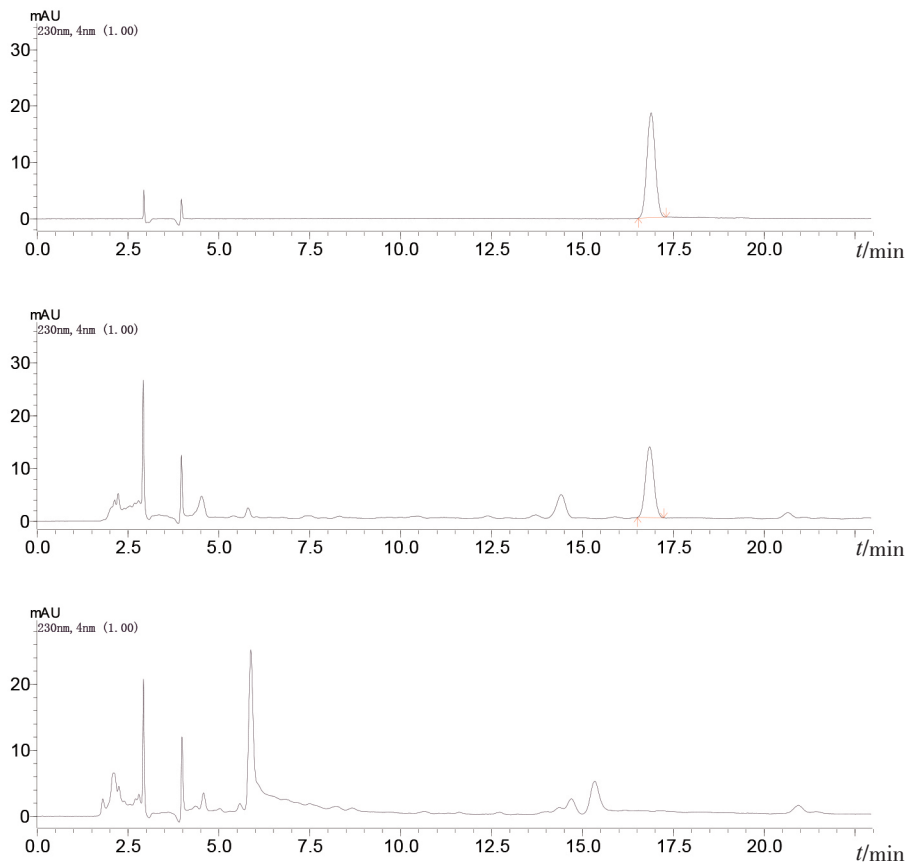
密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇25 mL, 密塞, 称定重量, 加热回流90 min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 即得。

2.2.4 阴性样品溶液的制备

按质量标准处方比例及制备工艺, 将药材粉碎后, 自行配制缺白芍的阴性样品, 并按“2.2.3”节下方法制备溶液, 即得。

2.2.5 专属性考察

分别取对照品溶液、供试品溶液及阴性缺味药材溶液进样分析, 按“2.2.1”节下色谱条件进样分析, 结果样品色谱中与对照品色谱相同保留时间处有色谱峰, 而阴性样品相应位置无相应峰, 不干扰测定。待测成分与杂质分离度良好。



A. 对照品; B. 样品; C. 白芍; D. 阴性样品

图4 芍药苷色谱图

2.2.6 线性关系考察

取系列浓度对照品溶液,按拟定的色谱条件测定,记录峰面积。以对照品进样量(μg)为横坐标,峰面积积分为纵坐标,进行线性回归。结果线性方程为 $y=1.269 \times 106x+1727.45$;线性范围为 $0.03898\sim 0.9476 \mu\text{g}$;相关系数为 0.9999 ,表明待测成分线性关系良好。

2.2.7 重复性试验

取同一舒肝丸样品约 0.64 g 、 0.8 g 、 0.96 g 各三份,精密称定,按“2.2.3”节下制备9份供试品溶液,分别测定含量,结果样品中芍药苷含量为 $0.8945 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD为 1.4% ,结果表明方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验

取同一供试品溶液,分别在 0 、 2 、 7 、 13 和 20h 进样测定,记录峰面积。结果RSD为 1.1% ,表明供

试品溶液中待测成分在室温放置 20 h 内基本稳定。

2.2.9 回收率试验

采用加样回收法,取“2.2.7”项下已知含量的样品 0.4 g ,共9份,精密称定,分别置具塞锥形瓶中,分别精密加入不同浓度的对照品溶液各 25ml ,按“2.2.3”节下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”节下色谱条件进行分析,计算回收率。结果芍药苷的平均回收率($n=9$)为 100.5% ,RSD为 1.5% ,表明方法回收率良好,方法可行。

2.2.10 样品测定结果对比

取3批舒肝丸样品,分别按现标准^[1]及拟修订标准(即按“2.2.3”节下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”节下色谱条件进行测定)测定芍药苷含量,结果对比见表1。

表1 样品测定结果对比($n=2$)

| 编号 | 生产企业 | 现标准/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ | 拟修订标准/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ |
|----|------|--------------------------------------|--|
| 1 | I | 0.78 | 0.87 |
| 2 | II | 1.21 | 1.28 |
| 3 | III | 0.65 | 0.65 |

3 讨论

3.1 薄层色谱鉴别方法的优化

三个薄层色谱鉴别均为舒肝丸现行标准收录的检验项目,但方法繁琐,毒性试剂使用率高、使用量大,如陈皮使用甲苯作为展开剂;延胡索的样品前处理用苯加热回流时间为 2 h ,展开剂系统也使用了苯,费时,不环保,而且按标准检验结果显示薄层色谱斑点不清晰;厚朴样品前处理过程萃取次数达9次,而且频繁使用三氯甲烷,展开系统中也使用了苯。优化后的薄层色谱鉴别方法可以共用1份样品,经过不同极性的溶剂振摇提取后,按样品中化学成分的极性大小富集,分别进行薄层色谱鉴别,简化了操作,大大节约样品用量,大幅节约检验成本。

3.2 含量测定方法的优化

现行标准^[1]及文献报道^[12]的芍药苷高效液相色谱法含量测定中,流动相使用的磷酸缓冲盐(取5

份 $0.067 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸氢二钠溶液,用约1份 $0.067 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸二氢钾溶液调节pH为 7.4)配制繁琐;供试品溶液制备的过程中,样品经过超声提取后,采用大孔树脂柱净化、浓缩,试验过程繁琐。而优化后的含量测定方法,以乙腈-水-磷酸为流动相,样品仅需超声处理,大大提高了工作效率。

3.3 小结

舒肝丸现行标准收载项目虽较为完善,但鉴别及含量测定试验中,样品的处理及检测方法操作复杂,薄层色谱鉴别样品提取及薄层板展开过程中苯、甲苯等毒性试剂使用率高,含量测定项中结果易受样品净化过程中柱填料(GDX-201型大孔吸附树脂)影响而致重现性差。因此,探索方便、快捷及更高效的检测方法十分必要,本研究建立了环保高效的薄层色谱鉴别方法及操作简单、重现性好的含量测定方法,为舒肝丸现行标准的提升打下良好基础。

参考文献：

- [1] 中国药典：一部[S]. 2015：1600.
- [2] 孙大鹏. 高效液相色谱法测定舒肝丸中芍药苷含量[J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20(2): 32-33.
- [3] 朱晓军, 陈彬. 高效液相色谱法测定舒肝丸中延胡索乙素的含量[J]. 医药导报, 2006, 25(6): 570-572.
- [4] 李喜香, 李兴勇, 包强, 王雪梅. 骨痹止痛液的质量标准提高研究[J]. 中国药房, 2017, (9): 1249-1253.
- [5] 丁曼, 华洁, 周福军, 侯文彬. 和胃颗粒质量标准研究[J]. 西北药学杂志, 2016, (1): 18-22.
- [6] 幸而, 杨银凤, 曾源泉, 陈水仙. 舒肝健胃丸的质量标准研究[J]. 今日药学, 2016, (11): 783-785+791.
- [7] 程艳芹, 刘旭, 赵丽艳, 李明春. 益胃颗粒的质量标准研究[J]. 中国药房, 2015, (36): 5123-5125.
- [8] 刘冰, 祝小静. 舒肝调气丸质量标准研究[J]. 天津药学, 2010, 22(6): 15-18.
- [9] 毛和平, 刘光斌, 石晓峰, 等. 柴胡舒肝健乳丸质量标准研究[J]. 西部中药, 2013, 26(10): 31-33.
- [10] 贾福群, 刘卫东, 任建国. 通脉颗粒的质量标准研究[J]. 西北药学杂志, 2017, (2): 130-133.
- [11] 王芳, 刘皈阳, 马建丽, 等. HPLC法测定丹膝颗粒中芍药苷的含量[J]. 中国药事, 2013, 27(2): 199-201.
- [12] 杜春双, 李宏, 宋晓坤. HPLC法测定乳痛丸中芍药苷的含量[J]. 中国药事, 2012, 26(4): 385-387.

(收稿日期 2017年11月30日 编辑 范玉明)