

防芷鼻炎片质量标准研究

Study on Quality Standard for Fangzhibiyan Tablets

黎 瑞, 赵翠红, 闫莲姣, 苏桂前, 陆巧燕

LI Rui, ZHAO Cui-hong, YAN Lian-jiao, SU Gui-qian, LU Qiao-yan

(南宁市迪智药业有限责任公司, 广西南宁 530003)

(Nanning Dizhi Pharmaceutical Co. Ltd., Nanning, Guangxi, 530003, China)

摘要: 采用薄层色谱法对防芷鼻炎片中的野菊花、防风、胆南星及蒺藜进行定性鉴别, 并采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定白芍中芍药苷的含量。HPLC 的色谱柱为 C_{18} 柱 (4.6mm × 250mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液 (15 : 85), 检测波长为 230nm。鉴别项下薄层图斑点清晰, 阴性对照无干扰, 专属性强。芍药苷含量测定在进样浓度 10.4~52.0 μ g/ml 之间呈良好的线性关系, $r=0.9998$, 回收率为 98.73%, $RSD=1.93\%$ 。本方法简便准确, 重现性好, 可以用于防芷鼻炎片的质量标准。

关键词: 薄层色谱法 高效液相色谱法 芍药苷 防芷鼻炎片

中图分类号: O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2006)S0-0471-04

Abstract: Flos Chrysanthemi indicis, Radix Saposhnikoviae, arisaema cum bile, caltrop were identified quantitatively by TLC. Paeoniflorin content in Cortex Phellodendri Chinensis determined by HPLC. HPLC was applied with a C_{18} column, and the mobile phase of methyl cyanide -0.05mol/L potassium dihydrogen phosphate (15 : 85), and the detection wavelength was 230nm. The TLC chromatogram spots were clear and no interference was found in the negative reference. Paeoniflorin was obtained in the range of 10.4 ~ 52.0 μ g/ml, $r=0.9998$. The average recovery of Paeoniflorin was 98.73%, $RSD=1.93\%$. This method is simple, accurate and has good reproducibility, which can be used for a quality control standard of Fangzhibiyan tablets.

Key words: TLC, HPLC, Paeoniflorin, fangzhibiyan tablets

防芷鼻炎片是《中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂》收载品种, 由苍耳子、野菊花、鹅不食草、白芷和防风等十味药组成的中草药制剂, 具有清热消炎, 祛风通窍的功效, 用于治疗慢性鼻炎引起的喷嚏、鼻塞、头痛、过敏性鼻炎、慢性鼻窦炎^[1]。我们在原标准基础上, 根据防芷鼻炎片处方中药味的化学成分, 进行新的质量标准研究, 建立了专属性较强的薄层色谱鉴别方法, 增加了野菊花、防风、胆南星和蒺藜的薄层色谱鉴别方法, 还采用高效液相色谱法测定方中的白芍中芍药苷的含量, 进一步控制产品的内在质量。本实验建立的 TLC 定性鉴别与 HPLC 定量检测结果满意, 为防芷鼻炎片的质量控

制提供了新的依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

日本岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪, 日本岛津 UV-10A 紫外检测器, 威玛龙色谱工作站; AICROM 柱 (C_{18} , 4.6mm × 250mm, 5 μ m)。

1.2 试剂

芍药苷对照品由中国药品生物制品检定所提供, 批号: 110736-200220, 供含量测定用。

乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

防芷鼻炎片供试品由广州白云山制药股份有限公司提供, 批号 20050112、20050115、20050118。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 野菊花的薄层鉴别

取本品 20 片,除去糖衣,研细,加水 30ml,加热使其溶解,加盐酸 9ml,加热回流 30min,取出,放冷,滤过,滤液加醋酸乙酯提取 3 次,每次 15ml,合并醋酸乙酯提取液,移至中性氧化铝柱(100~200 目,5g,内径 10 mm,干法装柱)上,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇 1ml 溶解,作为供试品溶液。另取野菊花对照药材 3g,加水 300ml,煎煮 1h,滤过,滤液浓缩至 30ml,同法制成对照药材溶液。按照薄层色谱法(附录 V B)^[2],吸取上述两种溶液各 5 μ l,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以甲苯:乙醚:冰醋酸(10:10:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,于 105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照试验结果无干扰。详见图 1。

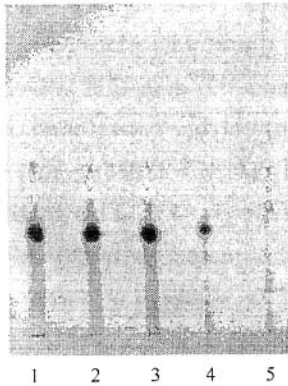


图 1 防芷鼻炎片中野菊花的薄层色谱图

1~3. 样品;4. 野菊花对照药材;5. 缺野菊花阴性对照。

2.1.2 防风的薄层鉴别

取本品 20 片,除去糖衣,研细,加丙酮 40ml,加热回流 20min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 5ml 使溶解,过中性氧化铝柱(100~200 目,5g,内径 1cm,干法装柱),先用甲醇 30ml 洗脱,弃去洗脱液,再用 40% 甲醇 30ml 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇 1ml 溶解,作为供试品溶液。另取 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品,加乙醇制成每 1ml 含 1mg 的溶液,作为对照品溶液。按照薄层色谱法^[2]试验,吸取供试品溶液 10 μ l、对照品溶液 5 μ l,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 GF254 薄层板上,以氯仿:甲醇(4:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯(254nm)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,阴性对照试验结果无干扰。详见图 2。

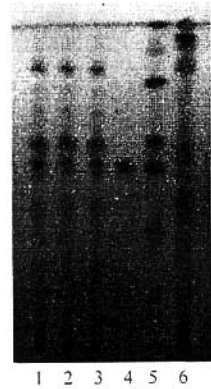


图 2 防芷鼻炎片中防风的薄层色谱图

1~3. 样品;4. 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品;5. 防风对照药材;6. 缺防风阴性对照。

2.1.3 胆南星的薄层鉴别

取本品 15 片,除去糖衣,研细,加乙醇 15ml,置水浴上加热回流 1h,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 2ml 溶解,作为供试品溶液。另取胆南星药材 1g,粉碎,同法制成胆南星药材对照溶液。按照薄层色谱法^[2]试验,吸取供试品溶液 10 μ l、药材对照溶液 15 μ l,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以环己烷:醋酸乙酯-冰醋酸(8:8:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 磷钼酸无水乙醇溶液,于 105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照试验结果无干扰。详见图 3。

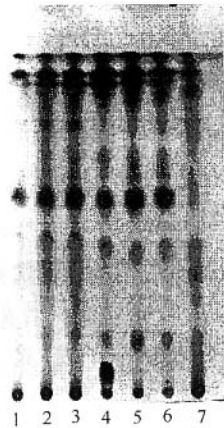


图 3 防芷鼻炎片中胆南星的薄层色谱图

1~3. 样品;4~6. 胆南星药材;7. 缺胆南星阴性对照。

2.1.4 蒺藜的薄层鉴别

取本品 20 片,除去糖衣,研细,加乙醇 40ml,盐酸 3ml,加热回流 2h,滤过,滤液浓缩至 10ml,加水 20ml,混匀,加石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)提取 2 次,每次 20ml,合并石油醚提取液,蒸干,残渣加乙醇 1ml 溶

解,作为供试品溶液。另取蒺藜对照药材 4.4 g,同法制成对照药材溶液。按照薄层色谱法^[2]试验,吸取上述两种溶液各 5 μ l,分别点于同一羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以氯仿为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10%磷钼酸无水乙醇溶液,于 105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照试验结果无干扰。详见图 4。

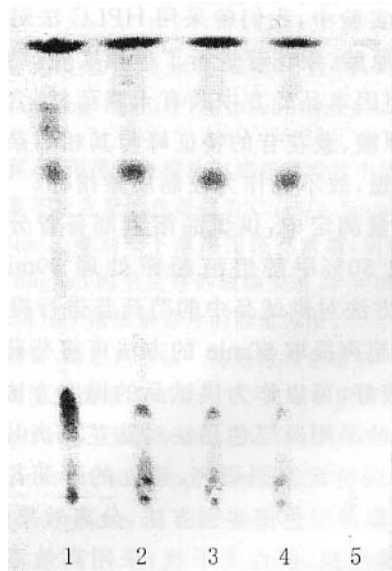


图 4 防芷鼻炎片中蒺藜的薄层色谱图

1~3. 样品;4. 蒺藜对照药材;5. 缺蒺藜阴性对照。

2.2 芍药苷的含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱为 AICHROM C_{18} 柱 (5 μ m, 4.6mm \times 250mm),流动相为乙腈-0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液 (15 : 85);流速 1.0ml/min;检测波长 230nm。在此条件下,芍药苷能达到基线分离(见图 5),分离度 $R > 1.5$,芍药苷保留时间约为 17.5min,理论塔板数按芍药苷峰计算均在 4000 以上。

2.2.2 测定波长选择

取芍药苷对照品适量,用甲醇溶解,在紫外分光光度计上扫描,结果分别在 230nm 处有最大吸收。故选取芍药苷最大吸收波长 230nm 为测定波长。

2.2.3 对照品溶液制备

精密称取芍药苷对照品适量,加甲醇制成每 1ml 含芍药苷 30 μ g 的溶液,即得对照品溶液。

2.2.4 供试品溶液制备

取本品 20 片,除去糖衣,精密称定,研细,取约 1.5g,精密称定,置于 50ml 容量瓶中,加稀乙醇适量,超声处理 60min,放冷,加稀乙醇至刻度,摇匀,用微孔滤膜 (0.45 μ m) 滤过,取续滤液,即得供试品

溶液。

2.2.5 阴性对照品溶液制备

取缺白芍的阴性样品 1.5g,按供试品溶液制备项下的方法制备,即得阴性对照品溶液。

2.2.6 干扰试验

取芍药苷对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液按实验方法进行测定的结果是:阴性对照溶液色谱中,在芍药苷峰相应的保留时间无吸收峰(见图 5、图 6、图 7),处方中其它成分对测定无影响。

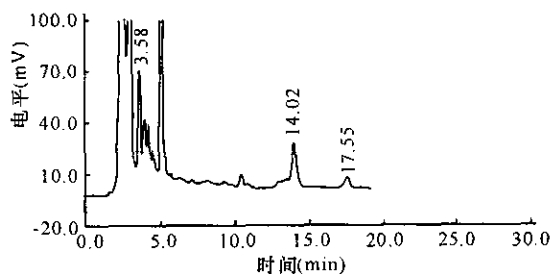


图 5 芍药苷供试品溶液 HPLC 色谱图

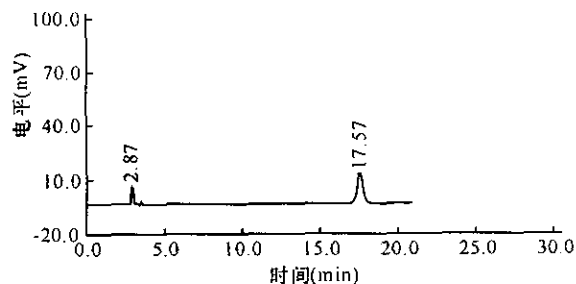


图 6 芍药苷对照品 HPLC 色谱图

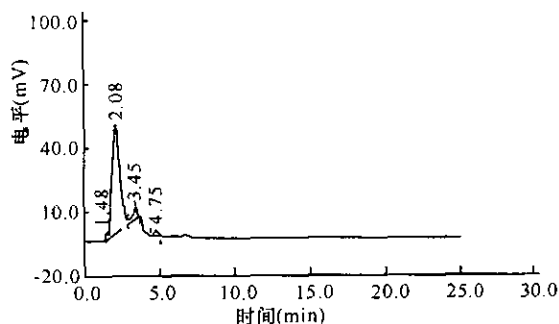


图 7 阴性对照溶液 HPLC 色谱图

2.2.7 线性关系考察

精密称取芍药苷对照品 10.4mg,置于 100ml 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成 104.0 μ g/ml 对照品溶液,备用。分别精密吸取上述对照品溶液 1.0ml、2.0ml、3.0ml、4.0ml、5.0ml,分别置于 10ml 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,进样测定。以对照品进样浓度为横坐标 (X),峰面积积分为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线,回归方程为 $Y = 13273X - 3224$, $r = 0.9998$ 。芍药苷在进样浓度 10.4~52.0 μ g/ml 范围内,进样浓度与芍药苷峰面积呈良好的线性关系。

2.2.8 精密度试验

取同一对照品溶液和同一供试品溶液,按色谱条件,连续测定 6 次,记录芍药苷峰面积的结果显示,对照品溶液中芍药苷的平均峰面积为 447006, *RSD* 为 1.80%,供试品溶液中芍药苷的平均峰面积为 300374, *RSD* 为 1.62%。本法的精密度较好。

2.2.9 稳定性考察

取同一供试品溶液,每隔一定时间测定 1 次,共测定 6 次的结果是,芍药苷峰面积的平均值为 295502, *RSD* 为 0.98% ($n=6$)。供试品在 10h 内测定稳定。

2.2.10 重现性试验

取同一批样品,按含量测定项下方法平行测定 6 份,结果芍药苷含量平均值为每片 0.1608mg, *RSD* 为 1.54% ($n=6$)。本法的重现性较好。

2.2.11 加样回收率测定

取已知含量的供试品,除去糖衣,研细,取约 0.8g,精密称定,精密加入芍药苷对照品溶液 104.0 μ g/ml(精密称取芍药苷对照品 10.4mg,置于 100ml 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得)3.5ml,置于 50ml 容量瓶中,加稀乙醇适量,超声处理 60min,放冷,加稀乙醇至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μ m)滤过,取续滤液,测定,计算回收率。结果平均回收率为 98.73%, *RSD* 为 1.93% ($n=6$)。

2.2.12 样品测定

分别取不同批号的样品 20 片,按 2.2.4 项下操作制备,作为供试品溶液。分别精密吸取供试品溶液与对照品溶液各 10 μ l,注入液相色谱仪测定。共测定了 3 批样品中芍药苷的含量,结果见表 1。

表 1 样品中芍药苷含量测定结果

样品批号	含量(毫克/片)			相对平均偏差(%)
	1	2	平均值	
20050112	0.1630	0.1614	0.1622	0.49
20050115	0.1417	0.1399	0.1408	0.64
20050118	0.1567	0.1591	0.1579	0.76

(上接第 470 页)

参考文献:

[1] 方玉珍,宋杰云,岑燕飞,等.毒八角酸的镇痛作用研究[J].贵阳中医学院学报,1989(1):59.

3 讨论

在试验过程中,我们参考文献[2,3],曾采用了多种流动相系统,如乙腈-磷酸溶液、乙腈-水、乙腈-醋酸溶液等,分离效果均不理想,后来改用乙腈-0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液(15:85)作流动相,分离效果最佳。

在本实验中,我们曾采用 HPLC 法对方中野菊花所含绿原酸、蒙花苷进行了摸索实验,结果样品中有检出,但因本品处方中共有十味药材,含有的杂质较多,绿原酸、蒙花苷的特征峰与其相邻杂质峰分离度均不理想,故不能作为控制质量指标。

在含量测定中,供试品溶液制备曾分别采用甲醇溶液或 50% 甲醇溶液超声处理 30min、60min、90min 的方法对供试品中的芍药苷进行提取。结果,用稀乙醇超声提取 60min 的方法可将芍药苷提取完全,效果较好,可以作为供试品的提取方法。

本实验采用薄层色谱法对防芷鼻炎片中所有药味进行薄层色谱鉴别研究,建立的野菊花、防风、胆南星和蒺藜薄层色谱鉴别方法,分离效果满意,重现性好,专属性强,阴性无干扰;采用高效液相色谱法测定了防芷鼻炎片中白芍的芍药苷含量,方法快速准确、方便可行,为防芷鼻炎片的质量控制提供了良好的方法。

参考文献:

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂:第五册[S].1991:65.
[2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典 2005 年版一部[M].北京:化学工业出版社,2005.
[3] 曹志胜,宿洁.高效液相色谱法测定防芷鼻炎片中芍药苷含量[J].中国药业,2006,15(11):34-35.

[2] 马怡,孙建宁,徐秋萍,等.莽草酸对血小板聚集和凝血的拟制作用[J].药学学报,2000,35(1):1.

[3] 丛浦珠,李笋玉.天然有机质谱学[M].北京:中国医药科技出版社,2003.