doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.01.05

赤黄止痢颗粒中赤芍的薄层色谱鉴别与含量测定方法的建立

尚静雪¹, 苏岳乐², 张鹏举¹, 蔡小利¹, 张远达¹, 战文¹,
何鸿毅², 付丽云¹, 李海华³, 陈志强^{1*}

(1. 内蒙古华天制药有限公司, 内蒙古赤峰 024070; 2. 内蒙古自治区兽药监察所, 呼和浩特 010020;

3. 赤峰市药品检验所, 内蒙古赤峰 024000)

[收稿日期] 2021-07-20 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 01-0027-08 [中图分类号] S859.79

[摘要] 建立控制赤黄止痢颗粒中赤芍的分析方法。采用薄层色谱法(TLC)对赤黄止痢颗粒中赤芍进行定性分析,采用高效液相色谱法(HPLC)对制剂中芍药苷进行含量测定。薄层色谱结果表明,赤黄止痢颗粒中的赤芍在与对照品色谱相应的位置上,显相同的蓝紫色斑点,而阴性样品无相同特征斑点。HPLC结果表明,芍药苷在0.25~2.0 mg 范围峰面积线性关系良好($R^2 = 0.9996$);芍药苷的平均回收率为99.74%,RSD为1.95%(n=9)。结果表明,研究建立的赤黄止痢颗粒中赤芍的薄层色谱鉴别方法和含量测定分析方法可操作性强,结果准确可靠,重复性好,为赤黄止痢颗粒质量标准的制定提供了方法学依据。

[关键词] 赤黄止痢颗粒;芍药苷;薄层色谱;高效液相色谱

Establishment of TLC Identification and Content Determination Method of *Paeoniae Rubra* in Chihuang Zhili Granules

SHANG Jing-xue¹, SU Yue-le², ZHANG Peng-ju¹, CAI Xiao-li¹, ZHANG Yuan-da¹, ZHAN Wen¹,
HE Hong-yi², FU Li-yun¹, LI Hai-hua³, CHEN Zhi-qiang^{1*}

(1. Inner Mongolia Huatian Pharmaceutical Co., LTD., Chifeng 024070, China; 2. Veterinary Drug Supervision Office of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010020, China; 3. Chifeng Drug Inspection Institute, Chifeng 024000, China)

Corresponding author: CHEN Zhi-qing, E-mail: 584995170@qq.com

Abstract: Establish an analytical method for controlling red peony in Chihuang Zhili Granules. The qualitative analysis of red peony in Chihuang Zhili Granules was carried out by thin-layer chromatography (TLC), and the content of paeoniflorin in the preparation was determined by high performance liquid chromatography (HPLC).

基金项目: 内蒙古自治区科技重大专项(KJZD2018008)

作者简介: 尚静雪, 从事中兽药新药研发方面研究。

通讯作者: 陈志强。E-mail: 147006963@qq.com

测,根据试验结果考察该方法对药材的薄层鉴别是否具有专属性。

1.2.1.3 重复性考察 取 3 批样品,按上述相应方法检测,考察该方法的重复性。

1.2.1.4 耐用性考察 取赤黄止痢颗粒样品按上述相应方法检测,分别点于 3 个不同厂家的薄层板上,考察该方法的耐用性。

1.2.2 赤黄止痢颗粒含量测定方法

1.2.2.1 赤芍色谱条件 色谱柱:用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(Agilent 4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以甲醇为流动相 A,以 0.1% 磷酸溶液为流动相 B;按(36:64)进行等度洗脱,流速为 1.0 mL/min,检测波长 230 nm,理论板数按芍药苷峰计算不应低于 2000。

1.2.2.2 对照品溶液的制备 取经五氧化二磷减压干燥器中干燥 36 h 的芍药苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液,即得。

1.2.2.3 供试品溶液的制备 取本品适量研磨成细粉,取细粉 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定重量,超声冷却 20 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

1.2.2.4 阴性样品溶液制备 取缺赤芍的处方药材制备成缺赤芍的赤黄止痢颗粒样品,同“1.2.2.3”方法制成阴性样品溶液。

1.2.2.5 精密度试验 精密吸取供试品溶液各 10 μL,连续 6 次注入液相色谱仪,记录色谱图。

1.2.2.6 专属性试验 精密吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。

1.2.2.7 线性关系试验 精密称取芍药苷对照品适量,制成不同浓度的对照品溶液,按上述色谱条件进样,记录峰面积,以对照品浓度为横坐标(x),峰面积为纵坐标(y)绘制标准曲线并进行线性回归分析。

1.2.2.8 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 10 μL,分别在制备后 0、2、8、12、18 和 24 h 测定芍药苷的峰面积。

1.2.2.9 重现性试验 精密称取同一批颗粒剂样品 6 份研磨成细粉,每份取细粉 0.5 g,照供试品溶液制备项下方法制备,分别进样 10 μL,按上述“1.2.4.1”项中色谱条件进行测定。

1.2.2.10 回收率试验 取已知含量的同一批赤黄止痢颗粒样品 9 份(含量为 0.50%),每份分别按赤黄止痢颗粒中含有芍药苷量的 80%、100% 和 120% 加入对照品溶液,各 3 份,再按供试品溶液制备项下方法制备,精密吸取 5 μL,按上述色谱条件测定芍药苷的峰面积,计算平均回收率。

1.2.2.11 耐用性试验 精密吸取供试品溶液 5 μL,测定芍药苷的峰面积并计算芍药苷含量,分别考察不同厂家(岛津、绿百草和安捷伦)色谱柱、不同流速(0.8、1.0 mL/min)和不同柱温(20、25 和 30 °C)对芍药苷含量测定的影响。

1.2.2.12 样品含量测定 取 3 批样品,各批次三份平行样品,按对照品、供试品溶液制备方法制备好对照品和供试品溶液,精密吸取供试品溶液及对照品溶液各 5 μL,注入液相色谱仪,按“1.2.4.1”中色谱条件进样、测定、记录峰面积。计算样品中芍药苷含量。

2 结果与分析

2.1 赤黄止痢颗粒中赤芍的定性鉴别结果

2.1.1 专属性和重现性 赤芍的薄层鉴别:由图 1 可知,赤黄止痢颗粒样品色谱在与对照药材色谱相应的位置上,显相同的蓝紫色斑点。缺赤芍的阴性样品色谱在与相同的位置上无相应斑点,斑点清晰,方法具有专一性。

2.2.2 耐用性考察结果 赤芍的耐用性结果见图 2,在 3 个不同厂家的硅胶 G 薄层板上 3 批赤黄止痢颗粒样品色谱与芍药苷对照品色谱相应的位置上,均显示相同的蓝紫色斑点。

2.3 赤黄止痢颗粒的含量测定结果

2.3.1 精密度试验 芍药苷峰面积 6 次进样结果分别为:2637993、2643986、2635589、2646308、2654697 和 2667774, $RSD = 0.45\%$ ($n = 6$),表明精密度良好。

1,5:对照品;2:阴性样品;3~4:样品
1,5:reference substance; 2:negative sample; 3~4:sample

图 1 赤芍薄层鉴别专属性和重现性考察结果

1 Results of investigation on the specificity and reproducibility of thin – layer identification of red peony

1,5:芍药苷对照品;2~4:赤黄止痢颗粒;3:批样品

1,5: Paeoniflorin reference substance; 2~4: Chihuang Zhili Granules;3: batches of samples

图 2 赤芍耐用性考察结果

Fig 2 Results of the durability of red peony

2.3.2 专属性试验 专属性试验结果见图 3,芍药苷的保留时间为 8.638 min,阴性样品对测定干扰,结果表明专属性良好。

2.3.3 线性关系试验 通过线性关系分析得到回归方程: $15115057.2000x + 152337.2667$, $R^2 = 0.9996$ 。结果表明,芍药苷在 0.25 ~ 2.0 mg 范围内与其色谱峰峰面积呈良好的线性关系,回归曲线见图 4。

2.4.4 稳定性试验 放置 0、2、8、12、18 和 24 h 的赤黄止痢颗粒中芍药苷峰面积分别为 2933920、3031287、2865617、2934849、2983689 和 2953168, RSD 为 1.93%,表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.5 重现性试验 由表 2 可知,RSD 为 0.81%,

表明样品重现性良好。

表 1 重现性试验结果

Tab 1 Reproducibility test results

编号 Numbering	峰面积 Peak area	含量 Content/%	相对标准偏差 RSD/%
1	3265415	0.50	0.81
2	3253343	0.50	
3	3345929	0.51	
4	3041131	0.47	
5	3251278	0.50	
6	3227893	0.50%	

2.3.6 回收率试验 通过测定芍药苷的峰面积,计算平均回收率,结果见表 3,芍药苷平均回收率为

A: 对照品溶液; B: 阴性对照品溶液; C: 供试品溶液

A: Reference substance solution; B: Negative reference substance solution; C: Test substance solution

图 3 专属性试验结果

Fig 3 Results of specificity test

99.74%, *RSD* 为 1.95% ($n = 9$), 表明该方法准确可信。

2.3.7 耐用性试验 试验结果显示, 色谱柱为岛津和绿百草的分离度小于 1.5 且拖尾因子大于 1.05, 色谱柱为安捷伦的分离度大于 1.5 且拖尾因子在 0.95 ~ 1.05 之间, 表明赤黄止痢颗粒中赤芍

含量测定适用于安捷伦色谱柱; 不同流速进样测定试验芍药苷的峰面积, 其含量平均值为 0.54%, *RSD* 为 1.71%, 表明流速变化 ± 0.2 mL/min 耐用性良好; 不同柱温进样测定芍药苷的峰面积, 计算得芍药苷的含量平均值为 0.52%, *RSD* 为 1.69%, 表明柱温变化 ± 5 °C 的耐用性良好。

图 4 芍药苷回归曲线

Fig 4 Paeoniflorin regression curve

表 2 回收率试验结果

Tab 2 Test results of recovery rate

原有量 Original amount/mg	加入量 Add amount/mg	实测量 Actual measurement/mg	平均回收率 Average recovery rate/%	相对标 准偏差 RSD/%
0.2	0.37	0.5594		
0.2	0.37	0.5603		
0.2	0.37	0.5594		
0.2	0.47	0.6779		
0.2	0.47	0.6763	99.74	1.95
0.2	0.47	0.6746		
0.2	0.56	0.7648		
0.2	0.56	0.7619		
0.2	0.56	0.7621		

表 3 3 批样品芍药苷的含量测定结果

Tab 3 Content determination results of berberine hydrochloride in 3 batches of samples

批号 Batch number	芍药苷含量 Berberine hydrochloride content/%	芍药苷平均含量 Berberine hydrochloride Average content/%	相对标 准偏差 RSD/%
200701	0.52		
200701	0.51		
200701	0.48		
200702	0.53		
200702	0.55	0.51	0.041
200702	0.52		
200703	0.49		
200703	0.50		
200703	0.52		

2.3.8 样品含量测定 3 批赤黄止痢颗粒样品各批次三份平行样品的测定结果见表 4, 计算含量平均值为 0.51%, RSD 为 0.041%。参照《中国兽药典》含量限度的一般要求, 并结合赤黄止痢颗粒各批次含量测定结果, 将赤黄止痢颗粒含量限度拟定为: 本品含赤芍以芍药苷 ($C_{23}H_{28}O_{11}$) 计不得少于 0.4%。

3 讨论与结论

3.1 有关薄层色谱鉴别方法 赤黄止痢颗粒应工艺制备需求在处方中需添加适量辅料, 故在薄层色谱鉴别预试验中供试品溶液的制备考虑使用中性氧化铝柱^[14]和未使用中性氧化铝柱对其影响,

试验结果发现: 经中性氧化铝柱前处理的供试品溶液较未使用中性氧化铝柱的供试品溶液薄层鉴别斑点颜色较浅, 说明使用中性氧化铝柱前处理对芍药苷的薄层鉴别有少许影响。因此, 芍药苷供试品溶液不需要经中性氧化铝柱前处理。参照药典中赤芍药材的鉴别方法, 对其进行专属性、重现性和耐用性等方面考察, 结果表明该 TLC 方法稳定、可行, 适用于赤黄止痢颗粒中赤芍药材的鉴别。同时, 李柯^[15]等对芪芍化纤柔肝汤中赤芍参照药典方法进行薄层鉴别, 结果显示鉴别效果较好。

3.2 有关含量测定项检测方法 赤芍为毛茛科植物赤芍或川赤芍的干燥根,具有清热凉血,散瘀止痛的功效^[6]。现代药理学研究发现其主要化学成分为芍药苷,主要占比约 3.1%~7.0%^[16],本研究为更好地控制制剂质量,采用 HPLC 法建立赤黄止痢颗粒中芍药苷的含量测定。

波长的选择:取供试品溶液在紫外分光光度计中 200~400 nm 区间扫面,结果在 230 nm 处芍药苷的吸光度最大,故选用 230 nm 为检测波长。

色谱柱的选择:试验考察了不同色谱柱对芍药苷色谱峰分离的影响,色谱柱厂家分别为岛津、绿百草和安捷伦。结果表明色谱柱为 Agilent (4.6 mm×250 mm,5μm) 时供试品色谱峰的分度度大于 1.5 且拖尾因子在 0.95~1.05 之间,因此色谱柱选择 Agilent (4.6 mm×250 mm,5μm)。

流动相的选择:文献^[17-20]报道,高效液相色谱法测定中药芍药苷的流动相系统有乙腈-0.1% 磷酸溶液、乙腈-水、甲醇-水、甲醇-0.1% 磷酸溶液、甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液等,考察其分离度和峰形等,试验发现甲醇-0.1% 磷酸溶液为流动相时峰面积的分度度与峰形较好。

3.3 结论 本试验建立的赤黄止痢颗粒中赤芍的薄层色谱鉴定方法,分离效果好,专属性强、重复性高;建立的赤黄止痢颗粒中芍药苷含量测定的 HPLC 分析方法,结果准确、专属性强、精密度高,选择的流动相降低对仪器系统和色谱柱的损伤,可用作赤黄止痢颗粒中芍药苷的含量测定。因赤黄止痢颗粒为内蒙古华天制药有限公司自主研发的新中兽药复方制剂,主要用于治疗畜禽痢疾。检索有关资料,未发现本制剂相关检测数据,故本试验建立的赤黄止痢颗粒中赤芍的薄层色谱鉴别方法和含量测定分析方法,为赤黄止痢颗粒质量标准的制定提供了方法学依据。

参考文献:

[1] 张子越. 马齿苋水煎液体外抑制大肠杆菌和痢疾杆菌的作用机制的研究[D]. 山东农业大学,2020.

Zhang Z Y. Study on the mechanism of action of purslane decoction

in inhibiting *Escherichia coli* and Shigella [D]. Shandong Agricultural University,2020. (in chinese)

[2] 白翎. 中药保留灌肠治疗慢性细菌性痢疾的临床疗效分析[J]. 中国继续医学教育,2017,9(17):189-190.

Bai L. Analysis of the clinical efficacy of retention enema with traditional Chinese medicine in the treatment of chronic bacillary dysentery [J]. China Continuing Medical Education, 2017, 9 (17):189-190. (in chinese)

[3] 刘筱. 中药赤黄止痢颗粒治疗仔猪白痢的药效学和安全性研究[D]. 西北农林科技大学,2018.

Liu X. Pharmacodynamics and safety study of Chihuang Zhili Granules in the treatment of piglet white scour [D]. Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, 2018.

[4] 陶春,宣丽颖,林琳. 赤芍的主要化学成分及药理作用研究概况[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版),2014,29;10802:198-201.

Tao C, Xuan L Y, Lin L. The main chemical components and pharmacological effects of redpeony root [J]. Journal of Inner Mongolia University for Nationalities (Natural Science Edition), 2014, 29; 10802:198-201. (in chinese)

[5] 陈传蓉,李必刚,张林,等. 黄柏历代临床用量分析[J]. 中医杂志,2014,55(13):1142-1145.

Chen C R, Li B G, Zhang L, et al. Clinical dosage analysis of Phellodendron amurense in the past dynasties [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2014, 55 (13): 1142-1145. (in chinese)

[6] 中国兽药药典委员会. 中华人民共和国兽药典[M]. 北京:中国农业出版社,2015.

Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015. (in chinese)

[7] 黄晓婧,肖春霞,王欣,等. 风寒感冒颗粒质量标准的建立[J]. 中国药师,2021,24(01):188-193.

Huang X J, Xiao C X, Wang X, et al. Establishment of Quality Standard for Fenghan Ganmao Granules [J]. China Pharmacist, 2021,24(01):188-193. (in chinese)

[8] 耿响,刘希望,杨亚军,等. 乙酰氨基阿维菌素注射用缓释剂质量标准与药学等效研究[J]. 中国畜牧兽医,2021,48(03):1054-1063.

Geng X, Liu X, Yang Y J, et al. Quality standard and pharmaceutical equivalence study of sustained-release acetamido-avermectin injection [J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine,2021,48(03):1054-1063. (in chinese)

[9] 李媛,朱建勇,顾伟鹰,等. 瓜蒌当归降脂颗粒质量标准研究

- [J]. 中国药业, 2021, 30(06): 50-54.
- Li Y, Zhu J Y, Gu W Y, *et al.* Study on the quality standard of Gualou Danggui Jiangzhi Granules [J]. China Pharmaceuticals, 2021, 30(06): 50-54. (in chinese)
- [10] 李婷, 杨柳, 张义生, 等. 清肠合剂质量标准的建立 [J]. 中国药师, 2017, 20(04): 748-751.
- Li T, Yang L, Zhang Y S, *et al.* Establishment of quality standards for Qingchang Mixture [J]. Chinese Pharmacist, 2017, 20(04): 748-751. (in chinese)
- [11] 邓锐涵, 林柏良, 杨柳, 等. 肿节风三清颗粒的薄层色谱鉴别和含量测定 [J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(10): 3095-3105.
- Deng R H, Lin B L, Yang L, *et al.* Identification and content determination of Zhongjiefeng Sanqing Granules by thin layer chromatography [J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2019, 46(10): 3095-3105. (in chinese)
- [12] 李海华, 陈志强, 蔡小利, 等. 治疗乳房炎的中药赤黄止痢颗粒质量标准的建立 [J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(12): 3775-3784.
- Li H H, Chen Z Q, Cai X Li, *et al.* Establishment of quality standards for Chihuang Zhili Granules, a traditional Chinese medicine for mastitis [J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2019, 46(12): 3775-3784. (in chinese)
- [13] 段雄鹰. 中药代替抗生素治疗猪气喘病效果观察研究 [J]. 中国动物保健, 2021, 23(04): 19+21.
- Duan X Y. Observation on the effect of Chinese medicine instead of antibiotics in the treatment of swine asthma [J]. China Animal Health, 2021, 23(04): 19+21. (in chinese)
- [14] 肖柳君. 复方黄甘颗粒质量标准研究 [D]. 江西中医药大学, 2020.
- Xiao L J. Study on the Quality Standard of Compound Huanggan Granules [D]. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [15] 李柯, 郑兵, 刘彦, 等. 芪芍化纤柔肝汤质量标准研究 [J]. 湖南中医杂志, 2021, 37(03): 169-172.
- Li K, Zheng B, Liu Y, *et al.* Study on the quality standard of Qishaohuaxian Rougan Decoction [J]. Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine, 2021, 37(03): 169-172. (in chinese)
- [16] 贾泽, 王春光, 张石磊, 等. 赤芍水提物及芍药苷对大肠杆菌抗菌增敏活性的影响 [J]. 中国兽医学报, 2019, 39(10): 2026-2032.
- Jia Z, Wang C G, Zhang S L, *et al.* Effects of water extract of red peony root and paeoniflorin on the antibacterial sensitization activity of Escherichia coli [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 39(10): 2026-2032.
- [17] 段立广, 王东晗, 安绯悦, 等. 参苓护肝胶囊定性鉴别和芍药苷含量测定方法的研究 [J]. 科学技术创新, 2020(35): 19-21.
- Duan L G, Wang D H, An F Y, *et al.* Qualitative identification and determination of paeoniflorin in Shenlinghuan Capsules [J]. Innovation in Science and Technology, 2020(35): 19-21.
- [18] 杜西翠, 李云波, 张趁, 等. HPLC 法测定天然植物粗提物中芍药苷含量 [J]. 中国兽药杂志, 2021, 55(04): 39-43.
- Du X C, Li Y B, Zhang C, *et al.* Determination of paeoniflorin content in crude extracts of natural plants by HPLC method [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2021, 55(04): 39-43.
- [19] 张艳, 申丽莎, 杨帆, 等. 赤芍药材中芍药苷含量测定方法的改进 [J]. 中国药业, 2017, 26(24): 28-30.
- Zhang Y, Shen L S, Yang F, *et al.* Improvement of determination method of paeoniflorin in red peony herbs [J]. China Pharmaceutical, 2017, 26(24): 28-30.
- [20] 胡雅怡, 沈萍, 沈虹. 高效液相色谱法测定退黄颗粒中芍药苷的含量 [J]. 海峡药学, 2017, 29(12): 77-79.
- Hu Y Y, Shen P, Shen H. Determination of Paeoniflorin in Tu-ihuang Granules by High Performance Liquid Chromatography [J]. Strait Pharmacy, 2017, 29(12): 77-79.

(编辑:陈希)