

· 研究报告 ·

桃红通脉颗粒质量标准提高研究

金伟华, 陈 华, 张 明, 于波涛, 蒲志强, 宋宗辉 (原成都军区总医院药剂科, 四川 成都 610083)

[摘要] **目的** 提高桃红通脉颗粒的质量标准。**方法** 采用薄层色谱(TLC)法对赤芍、地黄、甘草进行薄层鉴别,以及采用高效液相色谱法对主药桃仁的有效成分苦杏仁苷进行鉴别;采用高效液相色谱法测定芍药苷的含量,色谱柱为 Agilent HC-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(13:87),流速为 1.0 ml/min,柱温为 30 ℃,检测波长为 230 nm。**结果** 赤芍、地黄、甘草的 TLC 图均斑点清晰,阴性无干扰;芍药苷在 1.79~57.28 μg/ml 范围内浓度与峰面积线性关系良好($r=0.9999$),平均回收率为 99.99%,RSD 为 2.05% ($n=9$)。**结论** 提高桃红通脉颗粒质量标准后,鉴别方法重现性更好,优化了芍药苷的含量测定方法,增强了成品质量的可控性。

[关键词] 桃红通脉颗粒;薄层色谱;高效液相色谱;芍药苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)02-0162-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.02.013

Study on improving the quality standard of Taohong Tongmai granule

JIN Weihua, CHEN Hua, ZHANG Ming, YU Botao, PU Zhiqiang, SONG Zonghui (Department of Pharmacy, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, China)

[Abstract] **Objective** To improve the quality standard of Taohong Tongmai granule. **Methods** TLC was used to make qualitative identification of *Paeoniae Radix Rubra*, *Rehmanniae Radix*, *Glycyrrhizae Radix*; The effective components of the main walnut kernel were identified by HPLC; and HPLC was used to do quantitative determination of Paeoniflorin, the determination was performed on Agilent HC-C₁₈ (250mm×4.6mm, 5μm) column with mobile phase consisted of Acetonitrile-water (13:87) at the flow rate of 1.0 ml/min, the column temperature was 30 ℃ and the detection wavelength was set at 230 nm. **Results** These TLC spots were fairly clear, and the blank test showed no interference; The paeoniflorin at the range of 1.79-57.28 μg/ml was linear with peak area ($r=0.9999$), its average recovery rate was 99.99% and RSD was 2.05% ($n=9$). **Conclusion** The quality standard of Taohong Tongmai granule had been improved, identification method was better reproducibility, the determination method of paeoniflorin content had enhanced the controllability of product quality.

[Key words] Taohong Tongmai granule; TLC; HPLC; Paeoniflorin

桃红通脉颗粒处方由桃仁、红花、赤芍、生地、川芎、骨碎补、当归等十二药味中药组成,是由桃红四物汤衍生而来的医院自制制剂,具有活血化瘀,温经行气,止血定痛,敛疮生肌之功。用于淤血内阻、头痛胸痛、内热憋闷、跌打损伤、失眠多梦、经痛及经行不畅等症。经过多年的临床应用,已成为疗效确切的组方。由于桃红通脉颗粒疗效确切,深受患者的认可和好评^[1]。本实验将桃红通脉颗粒的质量标准进行了提高,增加了桃仁主要成分苦杏仁苷的高效

液相色谱(HPLC)鉴别,以及赤芍、地黄、甘草的薄层色谱(TLC)鉴别。优化了芍药苷的含量测定方法和含量限度,为有效控制桃红通脉颗粒的质量提供可靠的保障。

1 仪器与试药

HP 1100 高效液相色谱仪(G1311A Quat Pump 泵, G1315A DAD 紫外检测器, Agilent HC-C₁₈ 分析柱: 4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司); AL204 型精密电子天平(METTLER TOLEDO); HH-S24S 型恒温水浴锅(上海君竺仪器制造有限公司); VGT-1990QTD 型超声波仪(频率: 40 kHz, 功率: 240 W, 江东精密仪器公司); TGL-18G-C 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂); DU730 型紫外分光光度计(美国贝克曼仪器公司)。

芍药苷(含量≥98%, 批号: 110736-201136), 赤

[基金项目] 2014 年度军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题(14ZJZ18-2)

[作者简介] 金伟华, 副主任药师, 研究方向: 医院药学, Email: jwh311@sina.com

[通讯作者] 于波涛, 主任药师, 硕士生导师, 研究方向: 医院药学、药剂学, Email: yu-bo-tao@sohu.com

芍药对照药材(批号:121093-200402),地黄对照药材(批号:121180-201005),甘草对照药材(批号:120904-201318),以上对照品及对照药材均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,其余试剂均为分析纯,硅胶G板(青岛海洋化工厂分厂);桃红通脉颗粒3批样品(批号:141220、141221、141222)及阴性样品均由原成都军区总医院制剂中心提供。

2 方法与结果

2.1 HPLC法鉴别苦杏仁苷^[2]

取本品约2g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇25ml,称定重量,超声20min,再称定重量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。另取苦杏仁苷对照品适量,精密称定,加70%甲醇制成每1ml含苦杏仁苷0.2mg的溶液,作为对照品溶液。另取桃红通脉颗粒缺桃仁阴性样品2g,同供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。照HPLC法《《中华人民共和国药典》2015年版四部通则0512》^[3]试验,以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以甲醇-水(20:80)为流动相;检测波长为210nm;理论板数按苦杏仁苷峰计算应不低于3000。分别精密吸取上述溶液各10 μ l,注入液相色谱仪,测定,即得。供试品色谱中呈现与苦杏仁苷对照品色谱峰保留时间相对应的色谱峰,阴性对照无干扰,见图1。

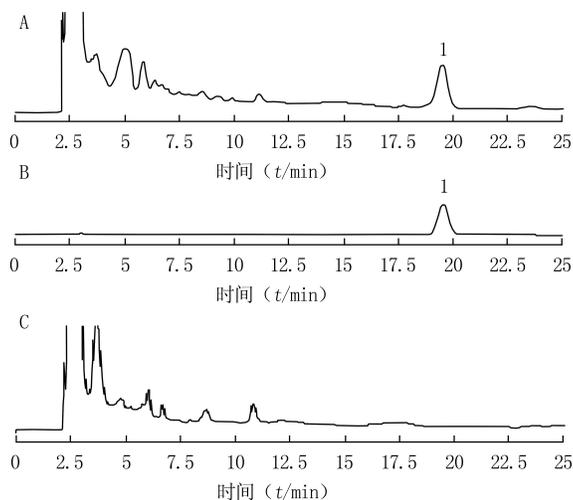


图1 桃红通脉颗粒 HPLC 图

A. 供试品溶液; B. 对照品溶液; C. 阴性对照溶液; 1. 苦杏仁苷

2.2 TLC 鉴别

2.2.1 赤芍^[2,4]

取本品10g,研细,加无水乙醇50ml,超声处

理5min,滤过,滤液蒸干,残渣加无水乙醇1ml使溶解,作为供试品溶液。另取赤芍对照药材1g,加无水乙醇25ml,超声处理5min,滤过,滤液蒸干,残渣加无水乙醇1ml使溶解,作为对照药材溶液。另取桃红通脉颗粒缺赤芍阴性样品10g,同供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。照TLC法《《中国药典》2015年版四部通则0502》^[3]试验,分别吸取对照品溶液5 μ l、供试品溶液10 μ l、阴性对照溶液10 μ l,分别点于同一硅胶G薄层板上,以氯仿-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2)为展开剂,预饱和15min,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。结果供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色斑点,且阴性对照无干扰,见图2。

2.2.2 地黄^[5]

取本品10g,研细,加水50ml,超声处理30min,滤过,滤液加乙酸乙酯25ml振摇提取,分取乙酸乙酯层,水浴蒸干,残渣加甲醇1ml使溶解,作为供试品溶液。另取地黄对照药材3g和桃红通脉颗粒缺地黄阴性样品10g,同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液和阴性对照溶液。按照TLC法《《中国药典》2015年版四部通则0502》^[3]试验,吸取对照药材溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各10 μ l,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯(1:1)为展开剂,预饱和15min,展开,取出,晾干,喷以2,4-二硝基苯肼试液,晾干。结果供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上显相同颜色的斑点,且阴性无干扰,见图2。

2.2.3 甘草^[2]

取本品10g,研细,加氯仿25ml,加热回流1h,滤过,弃去氯仿液,挥干药渣,加水5ml搅拌湿润,加入水饱和正丁醇50ml,超声30min,过滤,分取正丁醇液,蒸干,残渣加入1ml甲醇使溶解,作为供试品溶液。另取甘草对照药材1g和桃红通脉颗粒缺甘草阴性样品10g,同法制成对照药材溶液和阴性对照溶液。照TLC法《《中国药典》2015年版四部通则0502》^[3]试验,吸取对照药材溶液2 μ l、供试品溶液和阴性对照溶液各5 μ l,分别点于同一硅胶G薄层板(10mm \times 20mm)上,以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15:1:1:2)为展开剂,预饱和15min,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(365nm)下检视。结果供试品色谱图中,与对照药材色谱图相应的位置上,显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰,见图2。

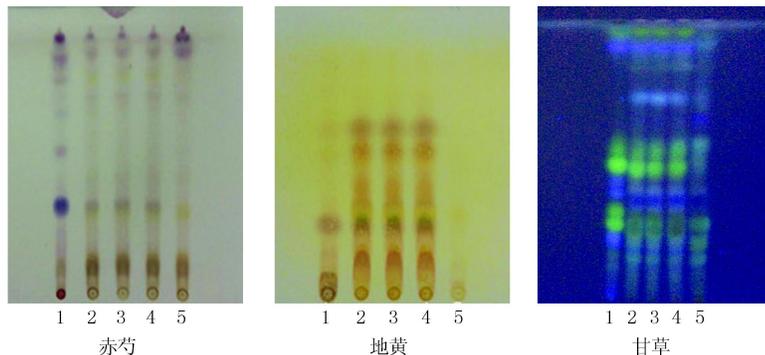


图2 赤芍、地黄、甘草 TLC图

1.对照品或对照药材; 2~4.供试品; 5.阴性对照

2.3 芍药苷的含量测定^[5,6]

2.3.1 色谱条件

色谱柱:Agilent HC-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相:乙腈-水(13 : 87);检测波长:230 nm;流速:1.0 ml/min;柱温30 °C。

2.3.2 对照品溶液的制备

取芍药苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 ml含40 μg的溶液,即得。

2.3.3 供试品溶液的制备

取装量差异项下的本品内容物适量,研细,取约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇25 ml,密塞,称定重量,超声处理(频率40 kHz,功率300 W)20 min,放冷,称定质量,用50%甲醇补足缺失的质量,摇匀,离心,滤过,取续滤液,即得。

2.3.4 阴性对照溶液的制备

取桃红通脉颗粒缺赤芍阴性样品适量,研细,取约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇25 ml,密塞,称定重量,超声处理20 min,放冷,称定质量,用50%甲醇补足缺失的质量,摇匀,离心,滤过,取续滤液,即得。

2.3.5 专属性试验

分别精密吸取对照品溶液、阴性对照溶液和供试品溶液各10 μl,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定。结果表明,供试品溶液主峰的保留时间与芍药苷对照品溶液主峰的保留时间基本一致,阴性对照对供试品中芍药苷的检测无干扰,专属性良好(图3)。

2.3.6 线性关系考察

取芍药苷对照品,精密称定,加甲醇制成71.6 μg/ml的对照品储备溶液。再分别取适量对照品储备溶液,精密量取,加甲醇制成每1 ml中含1.79、3.58、7.16、14.32、28.64、57.28 μg的线性试验对照品溶液。分别精密吸取上述对照品溶液

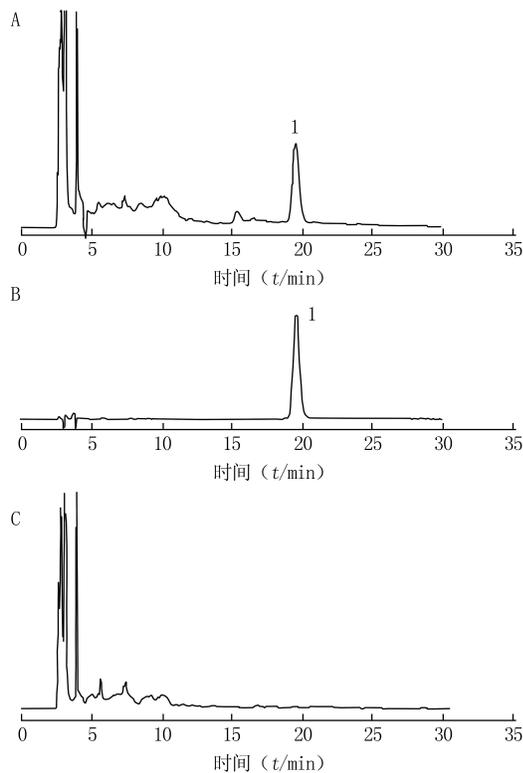


图3 桃红通脉颗粒 HPLC图

A.供试品溶液;B.对照品溶液;C.阴性对照溶液;1.芍药苷

10 μl,注入液相色谱仪,测定,记录色谱图。以测定浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线。回归方程为:

$$Y = 12.626 X - 0.8637 (r = 0.9999),$$

表明芍药苷在1.79~57.28 μg 范围内浓度与峰面积线性关系良好。

2.3.7 精密度试验

取“2.3.6”项下57.28 μg/ml芍药苷对照品溶液,精密吸取10 μl注入液相色谱仪,重复测定6次,记录峰面积,计算RSD为0.70%,表明精密度良好。

2.3.8 稳定性试验

取装量差异项下的本品内容物(批号:141220),研细,取约0.5 g,精密称定,照“2.3.3”项下供试品溶液制备方法制得供试液,分别放置0、2、4、8、12、24 h,按“2.3.5”项下测定法测定6次,记录峰面积,计算芍药苷的RSD为1.21%,表明供试液在24 h内基本稳定。

2.3.9 重复性试验

取装量差异项下的本品内容物6份(批号:141220),研细,取约0.5 g,精密称定,照“2.3.3”项下供试品溶液制备方法制得供试液,按“2.3.5”项下测定法测定,记录峰面积,计算芍药苷的RSD为1.54%,表明该方法重复性良好。

2.3.10 加样回收率试验

取已知含量的样品9份(批号:141220),每份约0.25 g,精密称定,按样品中芍药苷含量的80%、100%、120%精密加入对照品溶液,按“2.3.3”项下供试品溶液制备方法制得供试液,再按“2.3.5”项下测定法测定峰面积并计算回收率,结果见表1。

表1 桃红通脉颗粒加样回收率试验结果(n=9)

取样量 (m/g)	样品含量 (m/mg)	加样量 (m/mg)	测得量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
0.250 9	0.522 4	0.416 4	0.954 3	103.73	99.99	2.05
0.250 2	0.520 9	0.416 4	0.926 0	97.28		
0.249 8	0.520 1	0.416 4	0.941 0	101.09		
0.250 1	0.520 7	0.520 5	1.029 9	97.84		
0.249 9	0.520 3	0.520 5	1.036 5	99.17		
0.249 4	0.519 3	0.520 5	1.038 1	99.68		
0.250 8	0.522 2	0.624 6	1.139 2	98.80		
0.250 3	0.521 1	0.624 6	1.147 6	100.29		
0.250 7	0.522 0	0.624 6	1.159 6	102.09		

2.3.11 样品含量测定

取不同批次的本品内容物3份,每份约0.5 g,精密称定,按“2.3.3”项下供试品溶液制备方法制得供试液,再按“2.3.5”项下测定法测定本品,共测定3批样品,结果见表2。

据所测3批芍药苷含量平均值分别为2.08、2.34、2.10 mg/g,本品规格为5 g/袋,考虑赤芍药材含量及其他对芍药苷含量的影响,每袋含赤芍以芍药苷(C₂₃H₂₈O₁₁)计,以不得少于5.43 mg作为含量限度要求。

3 讨论

3.1 含量测定选择芍药苷的确定

表2 桃红通脉颗粒中芍药苷含量测定结果(n=9)

批号	含量 (mg/g)	平均值 (mg/g)	RSD (%)
141220	2.08	2.08	1.44
141220	2.05		
141220	2.11		
141221	2.34	2.34	1.28
141221	2.31		
141221	2.37		
141222	2.08	2.10	0.95
141222	2.12		
141222	2.10		

在本制剂中,桃仁为君药,本应作为含量测定指标,但桃仁主要成分苯甲醛(为苦杏仁苷在煎煮过程和体内代谢过程中的主要分解产物,含量约占桃仁挥发油总量的57%)是否为桃仁活血祛瘀的有效成分,尚需进一步研究^[7]。因此未作为含量测定的成分,又因桃仁的TLC鉴别未得到满意结果,仅用HPLC作定性鉴别检查。最终通过比较,确定检测芍药苷的含量,较检测其他成分更为方便和准确,检测时受其他成分干扰小,因此含量检测选用芍药苷。

3.2 流动相的确立

在本院之前的芍药苷含量测定中,使用过流动相为甲醇-水(35:65)^[8]和甲醇-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液(35:65)^[1]。本次制剂标准提高验证时发现,之前两种方法均存在有部分杂质峰干扰,导致分离度较差,故而将流动相改为乙腈-水(13:87)^[6],调整出峰时间为20 min左右,结果较为满意,无杂质峰干扰,且峰形较好,分离度佳,阴性对照无干扰。

3.3 TLC鉴别淘汰的成分

在本试验中笔者进行了红花、骨碎补、川芎、柴胡的TLC鉴别,均因供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上无相同特征斑点或斑点不明显,故未纳入标准。

3.4 甘草TLC鉴别溶剂的选择

进行甘草TLC鉴别时,文献[2]用的溶剂是乙醚,由于乙醚(沸点34.6℃)的挥发性较强,极不易控制,改用氯仿(沸点61.3℃)作为溶剂,其挥发性弱于乙醚,极性与乙醚相似,替换后得到满意的结果。

3.5 地黄TLC鉴别展开剂的选择

在文献[5]中,地黄TLC鉴别使用的展开剂为二甲苯-乙酸乙酯(1:1),考虑在TLC鉴别中尽量不使用含苯等剧毒试剂,因此笔者改用环己烷-乙酸

新思路。笔者强调应关注合并用药多的患者、老年患者、肝肾功能不全患者的用药选择,为减少可能的低血糖反应或无法到达既定疗效,应优先选择 DDI 更少的药物。

【参考文献】

- [1] Xu Y, Wang L, He J, *et al.* Prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. *Jama*, 2013, 310(9):948-959.
- [2] Doucet J, Chassagne P, Trivalle C, *et al.* Drug-drug interactions related to hospital admissions in older adults: a prospective study of 1000 patients[J]. *J Am Geriatr Soc*, 1996, 44(8):944-948.
- [3] Hu DY, Pan CY, Yu JM, *et al.* The relationship between coronary artery disease and abnormal glucose regulation in China: the China Heart Survey[J]. *Eur Heart J*, 2006, 27(21):2573-2579.
- [4] Zhu M, Li J, Li Z, *et al.* Mortality rates and the causes of

death related to diabetes mellitus in Shanghai Songjiang District: an 11-year retrospective analysis of death certificates [J]. *BMC Endocr Disord*, 2015, 15:45.

- [6] 应令雯,周健. 2017年 ADA 糖尿病医学诊疗标准解读[J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2017, 9(1):48-55.
 - [7] Lien D, Mader TJ. Survival from profound alcohol-related lactic acidosis[J]. *J Emerg Med*, 1999, 17(5):841-846.
 - [8] 中国医师协会内分泌代谢科医师分会,中国住院患者血糖管理专家组. 中国住院患者血糖管理专家共识[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2017, 33(1):1-10.
 - [9] 母义明,杨文英,朱大龙,等. 磺脲类药物临床应用专家共识(2016年版)[J]. *药品评价*, 2017, 14(1):5-12.
 - [10] van Giersbergen PL, Treiber A, Clozel M, *et al.* *In vivo* and *in vitro* studies exploring the pharmacokinetic interaction between bosentan, a dual endothelin receptor antagonist, and glyburide[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2002, 71(4):253-262.
- [收稿日期] 2017-11-17 [修回日期] 2018-01-03
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 165 页)

乙酯(1:1),结果满意。

【参考文献】

- [1] 向清宇,于波涛,范开华,等. 桃红通脉颗粒的提取工艺研究[J]. *药学服务与研究*, 2011, 11(2):147-148.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部):2015年版[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:86-87;158-159;277-278.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部):2015年版[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:57-61.
- [4] 吴金萍,刘志军. 赤芍六味退黄颗粒的薄层色谱定性鉴别[J].

内蒙古医学杂志, 2015, 47(1):72-73.

- [5] 刁保忠,冯家龙,赵文法. 芪麦苓口服液质量标准研究[J]. *食品与药品*, 2016, 18(3):174-179.
 - [6] 栗建明,侯惠婵,顾利红. HPLC法测定白灵片中芍药苷的含量及不确定度评价[J]. *中国药房*, 2015, 26(36):5152-5154.
 - [7] 顾蕾蕾,武露凌,李祥,等. 桃仁、红花及其药对挥发油的气相-质谱分析[J]. *中成药*, 2008, 30(5):719-722.
 - [8] 杜晓琳,姜云平,于波涛. 高效液相色谱法测定桃红通脉颗粒中芍药苷的含量[J]. *解放军药学学报*, 2011, 27(4):346-347.
- [收稿日期] 2017-07-20 [修回日期] 2017-12-22
[本文编辑] 陈盛新