

# 桂枝肌瘤丸质量标准提升研究

曹薇薇\*, 果扬威, 高翠雪, 匡珺婷, 石可歆, 王志平

(唐山市食品药品综合检验检测中心, 唐山 063000)

**摘要:**目的 提高医院制剂桂枝肌瘤丸的质量标准。方法 对桂枝肌瘤丸中桃仁、丹参、茯苓进行薄层色谱法定性鉴别, 对丹参酮 II A 进行高效液相色谱法含量测定。结果 建立的薄层色谱鉴别方法比移值适宜, 显色清晰, 阴性无干扰; 丹参酮 II A 在 1.0582~31.7460  $\mu\text{g/mL}$  范围内线性关系良好, 平均加样回收率为 92.7% (相对标准偏差 RSD=1.3%)。结论 本研究建立的方法准确度高, 专属性强, 可用于桂枝肌瘤丸的定性鉴别、定量测定。

**关键词:** 桂枝肌瘤丸; 薄层色谱鉴别; 丹参酮 II A; 高效液相色谱法; 含量测定

## 0 引言

桂枝肌瘤丸, 由桂枝、桃仁、赤芍、牡丹皮、丹参、茯苓 6 味药材组成, 临床主要用于瘀阻胞宫所致漏下不止、血色紫黑灰暗、腹痛拒按; 子宫肌瘤、痛经、盆腔炎等症<sup>[1]</sup>, 在医院临床广泛应用, 其生产、使用及储存过程中的质量控制对临床用药安全有效具有决定性作用。目前, 基层医院制剂室及药品监督检验机构采用的制剂质量标准, 存在检验项目覆盖不全, 涉及药味少, 检验方法落后等问题, 急需进行质量标准提高工作。在现行医疗机构制剂质量标准<sup>[2]</sup>及前期对质量标准的研究中, 已包含对桂枝、赤芍、牡丹皮的薄层色谱(TLC)鉴别, 对芍药苷、桂皮醛、丹皮酚的含量测定研究, 未涉及桃仁、丹参、茯苓。这三味药材具有活血祛瘀、通经止痛、抗肿瘤等药理作用<sup>[3-5]</sup>, 在制剂中发挥重要作用, 有必要对其进行质量控制。因此, 为进一步提高质量标准, 为全面控制制剂质量提供依据, 本研究对桃仁、丹参、茯苓三味药材进行薄层色谱法鉴别试验, 对主要成分丹参中丹参酮 II A 进行高效液相色谱法(HPLC)含量测定试验, 建立桂枝肌瘤丸的定性鉴别、定量测定方法, 以建立更加完善的质量标准, 为临床安全用药提供保障。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 仪器

UltiMate-3000 高效液相色谱仪(赛默飞世尔),

UltiMate-3000 二极管阵列检测器(赛默飞世尔), Chromleon 7 色谱工作站, BSA124S-CW 型电子分析天平( $d=0.1$  mg, 德国赛多利斯), BP211D 型电子分析天平( $d=0.01$  mg, 德国赛多利斯), KQ3200E 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器), F-202-0 型台式电热干燥箱(上海树立仪器仪表), ZF-2 型暗箱式紫外分析仪(上海光豪分析仪器), 硅胶 G 薄层板(10 cm $\times$ 20 cm, 青岛海洋化工)。

#### 1.1.2 试药及试剂

桂枝肌瘤丸样品(批号 20220302、20220801、20221019, 规格每丸重 9 g, 河北省玉田县中医医院), 桃仁(山桃)对照药材(批号 121560-202203), 丹参酮 II A 对照品(含量 98.9%, 批号 110766-202022), 茯苓对照药材(批号 121117-201910), 均购自中国食品药品检定研究院; 石油醚、甲苯(60~90  $^{\circ}\text{C}$ )、香草醛(天津市致远化学试剂), 乙酸乙酯、乙醇(天津福晨化学试剂), 正己烷(天津市鑫铂特化工), 甲酸、硫酸(天津市恒兴化学试剂), 乙醚(天津市凯信化工), 均为分析纯, 甲醇(Fisher Chemical)为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水。

## 1.2 桃仁薄层色谱鉴别

### 1.2.1 溶液制备

取桂枝肌瘤丸样品, 剪碎, 称取约 3 g, 加水 5 mL 浸润, 再用 50 mL 乙醚超声提取 30 min, 取滤液, 挥发至 1 mL, 为供试品溶液; 称取桃仁对照药材 1 g, 用 20 mL 乙醚超声提取 15 min, 取滤液为对照药材溶液; 去除桃仁, 其余五味药材按处方比例加炼蜜制备阴性对照样品,

基金项目: 河北省药品监督管理局科技计划资助(2023ZC1023)。

\* 通信作者: 曹薇薇, 高级工程师, 研究方向为药物分析检验。E-mail: 1006436029@qq.com

剪碎, 称取约 2.6 g, 其余操作同供试品溶液, 制备阴性对照溶液。

#### 1.2.2 薄层色谱条件

照《中华人民共和国药典》中的薄层色谱法<sup>[6]</sup>, 分别用毛细管吸取供试品、对照药材、阴性对照溶液, 点在同一张硅胶 G 薄层板上, 点样量各 2  $\mu\text{L}$ , 展开剂为石油醚(60~90  $^{\circ}\text{C}$ )–乙酸乙酯(15:2), 展开 8~15 cm 后, 将薄层板晾干, 显色剂为 5% 香草醛硫酸溶液, 喷后, 放置于 105  $^{\circ}\text{C}$  电热干燥箱, 加热至斑点显色清晰, 可见光下检视。

### 1.3 丹参薄层色谱鉴别

#### 1.3.1 溶液制备

取桂枝肌瘤丸样品, 剪碎, 称取约 8 g, 用 25 mL 乙醚, 超声提取 15 min, 滤过后将溶剂挥干, 残渣用 1 mL 乙醇溶解, 为供试品溶液; 称取丹参酮 II A 对照品, 用乙醇溶解, 制成 0.5 mg/mL 的溶液, 为对照品溶液; 去除丹参, 其余五味药材按处方比例加炼蜜制备阴性对照样品, 剪碎, 称取约 5.7 g, 其余操作同供试品溶液, 制备阴性对照溶液。

#### 1.3.2 薄层色谱条件

照《中华人民共和国药典》薄层色谱法<sup>[6]</sup>, 分别用毛细管吸取供试品、对照品、阴性对照溶液, 点在同一张硅胶 G 薄层板上, 点样量各 5  $\mu\text{L}$ , 展开剂为甲苯–乙酸乙酯(18:2), 展开 8~15 cm 后, 将薄层板室温下晾干, 可见光下检视。

### 1.4 茯苓薄层色谱鉴别

#### 1.4.1 溶液制备

取桂枝肌瘤丸样品, 剪碎, 称取约 9 g, 加水 100 mL 煮沸 15 min, 放至室温, 取滤液用乙醚萃取两次, 每次 50 mL, 将乙醚液挥干, 残渣用 1 mL 正己烷溶解, 为供试品溶液; 称取茯苓对照药材 1 g, 用 50 mL 乙醚超声提取 15 min, 滤过后将溶剂挥干, 残渣用 1 mL 正己烷溶解, 为对照药材溶液; 去除茯苓, 其余五味药材按处方比例加炼蜜制备阴性对照样品, 剪碎, 称取约 7.7 g, 其余操作同供试品溶液, 制备阴性对照溶液。

#### 1.4.2 薄层色谱条件

照《中华人民共和国药典》薄层色谱法<sup>[6]</sup>, 吸取供试品、对照药材、阴性对照溶液, 点在同一张硅胶 G 薄层板上, 点样量各 10  $\mu\text{L}$ , 展开剂为正己烷–乙酸乙酯–甲酸(7:4:0.4), 展开 8~15 cm 后, 将薄层板室温下晾干, 紫外光灯(365 nm)下检视。

### 1.5 丹参酮 II A 含量测定

#### 1.5.1 溶液制备

##### (1) 供试品溶液

取桂枝肌瘤丸样品, 剪碎, 称取约 2.5 g, 于具塞锥形

瓶中, 精密加入 25 mL 甲醇, 超声提取(功率 150 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放至室温后, 添加甲醇使重量与超声前相等, 为供试品溶液。

##### (2) 对照品溶液

精密称取丹参酮 II A 对照品, 于棕色容量瓶中, 加甲醇使丹参酮 II A 溶解, 制成 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的对照品储备液; 精密量取对照品储备液, 于棕色容量瓶中, 用甲醇稀释制成 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的溶液, 为对照品溶液。

##### (3) 阴性对照溶液

取 1.3.1 项下丹参阴性样品, 剪碎, 称取约 1.8 g, 其余操作同供试品溶液, 制备阴性对照溶液。

#### 1.5.2 色谱条件及测定方法

色谱柱型号: KINGFUN C18(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )。流动相: 甲醇–水(80:20)。检测波长 270 nm。流速 1.0 mL/min。柱温: 25  $^{\circ}\text{C}$ 。取用微孔滤膜(0.45  $\mu\text{m}$ ) 滤过的供试品及对照品溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 按外标法以峰面积计算丹参酮 II A 含量。

#### 1.5.3 专属性试验

取 1.5.1 项下的供试品溶液、对照品溶液及阴性对照溶液, 照 1.5.2 项下方法进行测定。

#### 1.5.4 线性关系考察

取 1.5.1 项下的对照品储备液, 精密量取各 0.5、1、2.5、5、7.5、10、12.5、15 mL, 分别用甲醇精密稀释至 50 mL, 摇匀, 照 1.5.2 项下方法进行测定, 分别记录丹参酮 II A 峰面积值(Y), 与对应进样浓度(X), 绘制标准曲线。

#### 1.5.5 精密度试验

取 1.5.1 项下的对照品溶液, 连续重复测定 5 次, 计算丹参酮 II A 峰面积 RSD 值。

#### 1.5.6 加样回收率试验

取已知丹参酮 II A 含量的桂枝肌瘤丸样品约 1.25 g, 共 6 份, 分别置于具塞锥形瓶中, 精密加入丹参酮 II A 对照品, 使之与样品中等量, 照 1.5.1、1.5.2 项下方法制备及测定, 计算回收率。

#### 1.5.7 稳定性试验

取 1.5.1 项下供试品溶液, 分别于 0、4、8、12、24 h, 不同时间取样, 同法进行测定, 计算丹参酮 II A 峰面积 RSD 值。

#### 1.5.8 重复性试验

取桂枝肌瘤丸样品(批号 20220302)共 6 份, 照 1.5.1、1.5.2 项下方法制备及测定, 计算丹参酮 II A 含量, 计算 RSD 值。

#### 1.5.9 样品测定

取桂枝肌瘤丸 3 批, 照 1.5.1、1.5.2 项下方法制备及

测定, 计算供试品中丹参酮 II A 含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 桃仁、丹参、茯苓薄层色谱鉴别结果

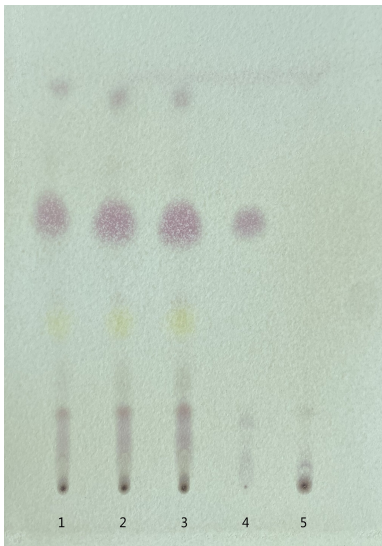
图 1 为桃仁薄层色谱鉴别图谱, 供试品与对照药材显相同颜色的主斑点, 阴性对照无干扰。

图 2 为丹参薄层色谱鉴别图谱, 供试品与对照品显相同颜色的主斑点, 阴性对照无干扰。

图 3 为茯苓薄层色谱鉴别图谱, 供试品对照药材显相同颜色的荧光斑点, 阴性对照无干扰。

### 2.2 丹参酮 II A 含量测定结果

图 4~6 为丹参酮 II A 含量测定图谱, 供试品中丹参酮 II A 保留时间为 16.2 min, 与对照品一致, 阴性对照溶液在丹参酮 II A 测定处无干扰。



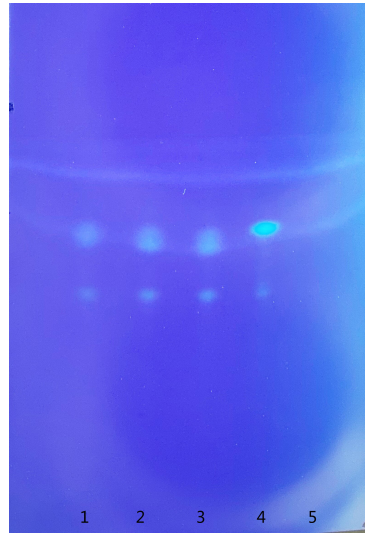
注: 1-3 供试品; 4- 对照药材; 5- 阴性对照。

图 1 桃仁薄层色谱图



注: 1-3 供试品; 4- 对照品; 5- 阴性对照。

图 2 丹参薄层色谱图



注: 1-3 供试品; 4- 对照药材; 5- 阴性对照。

图 3 茯苓薄层色谱图

丹参酮 II A 的线性回归方程为  $Y=1.0309X-0.0566$ ,  $r^2=1.0000$ , 在  $1.0582\sim 31.7460\ \mu\text{g/mL}$  范围内, 与峰面积线性关系良好。对照品溶液精密度检查, 峰面积 RSD 为 0.3%, 仪器精密度良好。平均加样回收率为 92.7%, RSD 为 1.3%, 方法准确度良好。24 h 内不同时间点取样, 峰面积 RSD 值为 0.7%, 供试品在 24 h 内稳定性良好。同一批次样品重复测定, 含量 RSD 值为 1.1%, 方法重复性良好。

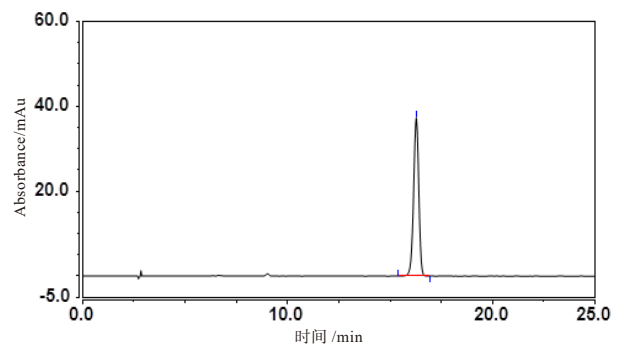


图 4 丹参酮 II A 对照品 HPLC 图

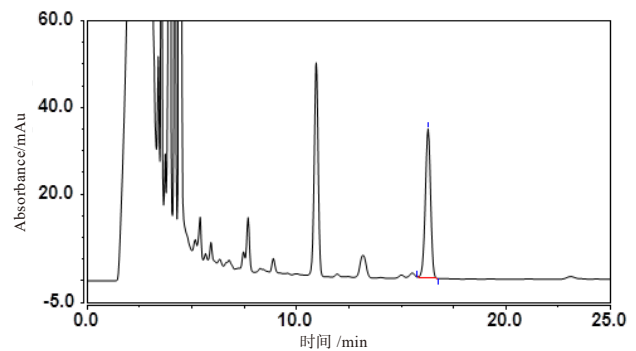


图 5 桂枝肌瘤丸供试品 HPLC 图

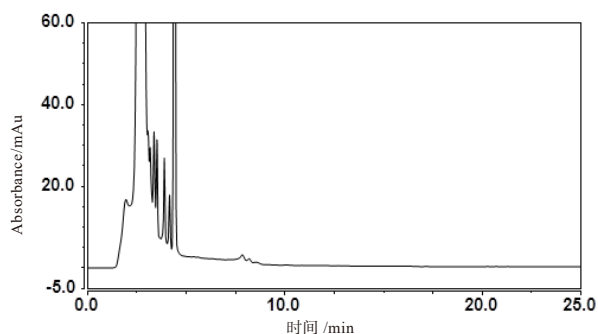


图6 桂枝肌瘤丸阴性对照样品 HPLC 图

### 3 讨论与结论

#### 3.1 TLC 鉴别方法研究

桃仁鉴别<sup>[7-9]</sup>, 对展开系统 [环己烷-乙酸乙酯、三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水、石油醚(60~90 °C)-乙酸乙酯] 及提取条件(石油醚、甲醇回流提取, 乙醚超声提取)进行了试验。丹参鉴别<sup>[10-12]</sup>, 对展开系统 [三氯甲烷-甲苯-乙酸乙酯-甲醇-甲酸、石油醚(60~90 °C)-乙酸乙酯-环己烷、甲苯-乙酸乙酯] 及提取条件(甲醇超声提取, 乙醚超声提取)进行了试验。茯苓鉴别<sup>[13-15]</sup>, 对展开系统 [甲苯-乙酸乙酯-甲酸、石油醚(60~90 °C)-乙醚、正己烷-乙酸乙酯-甲酸] 及提取条件(乙醚超声提取, 无水乙醇超声提取, 水煮后乙醚萃取)进行了试验, 最终确立的展开系统阴性无干扰, 分离度好, 比移值适宜, 确立的提取条件操作简单, 提取效率高, 杂质干扰少。经自制硅胶 G 薄层板重复试验, 方法重现性良好, 专属性强。

#### 3.2 HPLC 含量测定方法研究

流动相的选择<sup>[16-18]</sup>, 试验了甲醇-0.1%磷酸、乙腈-0.02%磷酸梯度洗脱、甲醇-水系统, 待测成分在甲醇-水系统峰形良好, 通过调整试验不同甲醇-水组分比例(85:15、80:20、75:25), 最终确定的流动相比比例, 丹参酮 II A 峰保留时间适中, 主峰与相邻杂质峰分离度均大于 1.5, 阴性对照无干扰。通过二极管阵列检测器全波段扫描, 检测波长确定在丹参酮 II A 最大吸收波长 270 nm 处进行测定。柱温的选择, 试验了室温、25 °C、30 °C 三种柱温, 发现在 25 °C 条件下, 样品稳定性高, 色谱峰峰形良好, 保留时间适宜, 分离度更佳。

#### 3.3 结论

本研究完成了桂枝肌瘤丸质量标准提升, 确立的实验方法采用薄层色谱法、高效液相色谱法, 操作简便, 检测成本低, 实用性强, 为基层检验实验室全面控制制剂质量提供了科学依据, 为其他制剂质量标准提高工作提供了参考。

### 参考文献

- [1] 曹薇薇, 强润东, 张春雨, 等. 高效液相色谱法同时测定桂枝肌瘤丸中3种成分含量[J]. 实验室检测, 2024, 2(8): 25-28.
- [2] JZBZ20091050-2012. 河北省食品药品监督管理局医疗机构制剂质量标准[S]. 石家庄: 河北省食品药品监督管理局, 2012: 1.
- [3] 张妍妍, 韦建华, 卢澄生, 等. 桃仁化学成分、药理作用及质量标志物的预测分析[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(1): 234-241.
- [4] 母伟林, 邵欣欣, 弭志成, 等. 丹参及其药对的药理研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(11): 158-163.
- [5] 何鹏飞, 高敏, 文继红, 等. 茯苓药理作用研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2024, 45(8): 83-87.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2020年版四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 59-60.
- [7] 叶惠焯, 李敏, 黄胜, 等. 甲芪肝纤颗粒中桃仁的定性定量方法研究[J]. 中国医药科学, 2022, 12(19): 85-88.
- [8] 杨振, 古伟玲, 王玉, 等. 前列桂苈颗粒质量标准研究[J]. 吉林中医药, 2024, 44(10): 1232-1237.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2020年版四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1824-1825.
- [10] 邹欣蓉, 谢宇, 龙立慧, 等. 不同加工方式丹参饮片薄层鉴别研究[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(10): 83-86.
- [11] 胡国辉. 不同产地丹参药材中四种丹参酮类成分的定性鉴别和含量测定[J]. 亚太传统医药, 2021, 17(5): 42-46.
- [12] 周和, 张强, 杨辉灿, 等. 心脑血管胶囊中两种丹参酮类成分的薄层鉴别与含量测定[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(8): 48-51.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2020年版一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 251, 745-746.
- [14] 刘柳毅, 刘丽君, 纪秋凤, 等. 复方苓桂颗粒薄层色谱鉴别研究[J]. 中国民族民间医药, 2022, 31(5): 52-57.
- [15] 刘世欣, 陈良妮, 程雪梅, 等. 肾康宁胶囊的薄层色谱定性鉴别质量控制方法研究[J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(10): 66-72.
- [16] 秦学玲, 秦兴卫, 马娜, 等. HPLC法测定丹参片中4种丹参酮类成分的含量[J]. 西北药学杂志, 2019, 34(4): 487-491.
- [17] 唐政, 程茜熙, 余咸熠, 等. 高效液相色谱法测定林芝市藏丹参丹参酮 II A 的含量[J]. 生物化工, 2024, 10(2): 130-133.
- [18] 刘木洪, 唐秋霞, 覃亮. HPLC法测定斑秃丸中丹参酮 II A 含量[J]. 广州化工, 2023, 51(10): 64-66.