

清肠栓质量标准研究

韩柱¹，崔波¹，陆菁¹，安骛^{1*}，许丽雯^{2*}，王新宏¹
(1. 上海中医药大学，上海 201203；2. 上海中医药大学附属龙华医院，上海 200032)

摘要：目的 建立清肠栓（三七、青黛、五倍子等）的质量标准。**方法** TLC法对三七、青黛、五倍子和马齿苋进行定性鉴别，HPLC法定量测定三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁ 含量。**结果** TLC 斑点清晰，分离度好。三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁ 分别在 1.007 5 ~ 8.06 μg ($r=0.999\ 9$)、0.99 ~ 7.92 μg ($r=0.999\ 1$)、1.012 5 ~ 8.1 μg ($r=0.999\ 1$) 范围内线性关系良好，平均回收率均大于 95%。**结论** 该方法可靠准确，专属性好，可用于清肠栓的质量控制。
关键词：清肠栓；三七；青黛；五倍子；马齿苋；三七皂苷 R₁；人参皂苷 Rg₁；人参皂苷 Rb₁
中图分类号：R927.2 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2016)08-1749-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.08.019

Quality standard for Qingchang Suppository

HAN Zhu¹，CUI Bo¹，LU Jing¹，AN Rui^{1*}，XU Li-wen^{2*}，WANG Xin-hong¹
(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the quality standard for Qingchang Suppository (a medication for ulcerative colitis, made from *Notoginseng Radix et Rhizoma*, *Indigo Naturalis*, *Rhois Chinensis Galla*, etc.). **METHODS** TLC was adopted in the qualitative identification of *Notoginseng Radix et Rhizoma*, *Indigo Naturalis*, *Rhois Chinensis Galla* and *Portulacae Herba*. HPLC was applied to quantitatively determining the contents of notoginsenoside R₁, ginsenosides Rg₁ and ginsenosides Rb₁. **RESULTS** The TLC spots were clear and well-separated. Notoginsenoside R₁, ginsenosides Rg₁ and ginsenosides Rb₁ showed good linear relationships within the ranges of 1.007 5 – 8.06 μg ($r=0.999\ 9$), 0.99 – 7.92 μg ($r=0.999\ 1$) and 1.012 5 – 8.1 μg ($r=0.999\ 1$), respectively, with all the average recoveries of more than 95%. **CONCLUSION** With good specificity, this reliable and accurate method can be used for the quality control of Qingchang Suppository.
KEY WORDS: Qingchang Suppository; *Notoginseng Radix et Rhizoma*; *Indigo Naturalis*; *Rhois Chinensis Galla*; *Portulacae Herba*; notoginsenoside R₁; ginsenosides Rg₁; ginsenosides Rb₁

清肠栓为龙华医院的医院制剂，由三七、青黛、五倍子、马齿苋等中药制备而成，其主要功效为清热化湿、解毒排脓、止痢，治疗非特异性溃疡性结肠炎具有较好的临床疗效^[1-2]。本方以三七为主药，溃疡性结肠炎相关药效研究发现^[3]，其可明显下调结肠组织中 Fas/FasL 蛋白表达水平，对结肠组织中单核细胞趋化因子（MCP-1）水平也具有下调作用，还可明显下调结肠病变组织中核因子 NF-κB 的活性^[4]。目前，清肠栓现行标准仅有对青黛中靛玉红的鉴别，为更全面控制该制剂的内在质量，本研究采用 TLC 法鉴别三七、青黛、五倍子和马齿苋，HPLC 法测定主要有效成分三七皂苷

收稿日期：2016-05-09
基金项目：上海市卫生局中药新药及院内制剂研发项目（2011XY007）
作者简介：韩柱（1991—），男，硕士，从事药物分析与体内过程研究。Tel: (021) 51322450, E-mail: hanzhufirst@163.com
*通信作者：安骛（1973—），女，博士，副教授，从事药物分析与体内过程研究。Tel: (021) 51322183, E-mail: anruimw@126.com
许丽雯（1963—），女，副主任药师，从事医院药学研究。Tel: (021) 64385700-7303, E-mail: lhyyxlw@163.com

R_{f_1} 、人参皂苷 R_{g_1} 及人参皂苷 R_{b_1} 的含有量,可为清肠栓质量控制提供一定的科学依据,同时也可保证其临床用药安全。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪 (配置 G1311B 型四元梯度泵、G1329B 型自动进样器、G1316A 型柱恒温箱、G1314F 型 VWD 检测器); BT125D 电子天平 (0.000 01 ~ 120 g, 赛多利斯科学仪器有限公司); KUDOS HK5200H 智能超声波清洗器 (200 W、59 kHz, 上海科导超声仪器有限公司); Centrifuge 5424R 离心机 (德国 Eppendorf 公司); Z0061887 漩涡混合器 (Labnet 公司); HSG 薄层板、HSG₂₅₄ 薄层板 (烟台江友硅胶开发有限公司)。

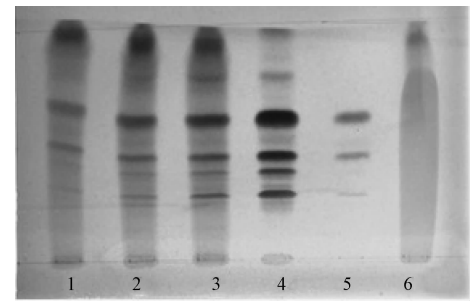
1.2 试药 人参皂苷 R_{b_1} 、人参皂苷 R_{g_1} 、没食子酸、靛蓝、靛玉红对照品 (批号分别为 110704-201424、110703-201530、110831-201204、110716-201111、110717-200204, 中国食品药品检定研究院); 三七皂苷 R_1 对照品 (批号 B21099, 上海源叶生物科技有限公司)。五倍子、马齿苋对照药材 (批号分别为 121078-201103、121598-201302, 中国食品药品检定研究院); 三七购自上海虹桥中药饮片有限公司; 五倍子、马齿苋、青黛和冰片购自上海康桥中药饮片有限公司, 上述药材均经陈燕军药师鉴定为正品。清肠栓 (龙华医院院内制剂, 批号分别为 20140513、20140516、20140521)。乙腈为色谱纯 (赛默飞世尔 [中国] 科技公司); 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

2.1.1 三七 取清肠栓 3 枚, 剪碎, 每次加入 15 mL 水, 水浴中加热熔融, 超声 15 min, 反复 3 次, 离心, 收集上清液, 加水饱和正丁醇 25 mL, 密封, 振摇 10 min, 放置 2 h, 离心, 取上清液。再加 3 倍量水饱和正丁醇, 摇匀, 离心, 取正丁醇层, 蒸干, 残渣加甲醇 5 mL, 作为制剂供试品溶液。取三七药材粉末 0.5 g, 加水 5 滴, 再加水饱和正丁醇 5 mL, 密封, 其他处理同上, 残渣加甲醇 1 mL, 作为药材供试品溶液。另取三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 及人参皂苷 R_{b_1} 对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 对照品的混合溶液, 作为混合对照品溶液。取除三七外的其他药材, 按处方比例及工艺制备不含三七的阴性样品, 同法制备阴性对照溶液。

按照《中国药典》2010 年版一部附录 VI B, 吸取上述溶液各 1 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以水饱和正丁醇-冰醋酸-水 (4 : 1 : 1) 为展开剂展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸溶液, 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。结果, 供试品色谱在与对照品色谱相应的位置上显相同紫色斑点, 阴性无干扰, 见图 1。



1~3. 清肠栓 4. 三七 5. 混合对照品 6. 阴性对照品
1-3. Qingchang Suppository 4. *Notoginseng Radix et Rhizoma*
5. mixed reference substance 6. negative reference substance

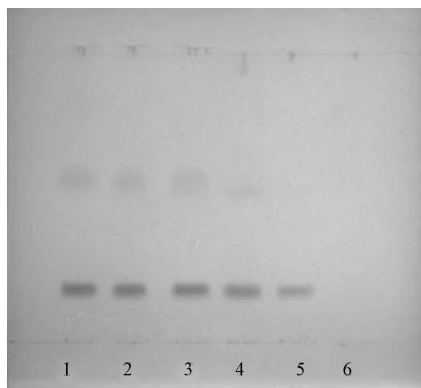
图 1 三七 TLC 色谱图

Fig. 1 TLC chromatogram of *Notoginseng Radix et Rhizoma*

2.1.2 青黛 取清肠栓 1 枚, 10 mL 三氯甲烷充分溶解。取 2 mL, 置于离心管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 作为制剂供试品溶液。取青黛 50 mg, 加三氯甲烷 5 mL, 充分搅拌, 滤过, 滤液作为药材供试品溶液。另取靛蓝、靛玉红对照品质量, 制成每 1 mL 分别含 1、0.5 mg 对照品的混合溶液, 作为混合对照品溶液。取除青黛外的其他药材, 按处方比例及工艺制备不含青黛的阴性样品, 同法制备阴性对照溶液。

按照《中国药典》2010 年版一部附录 VI B, 吸取上述溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-三氯甲烷-丙酮 (5 : 4 : 0.5) 为展开剂展开, 取出, 晾干。结果, 供试品色谱在与对照品色谱相应的位置上, 显相同蓝色和浅紫红色斑点, 阴性无干扰, 见图 2。

2.1.3 五倍子 取清肠栓 1 枚, 加甲醇 5 mL, 超声 15 min, 滤过, 滤液作为制剂供试品溶液。取五倍子 0.5 g, 同法制备药材供试品溶液。另取五倍子对照 0.5 g, 同法制备对照药材供试品溶液。再取没食子酸对照品适量, 加甲醇制成 1 mg/mL 对照品溶液。取除五倍子外的其他药材, 按处方比例及工艺制备不含五倍子的阴性样品, 同法制备阴性对照品溶液。

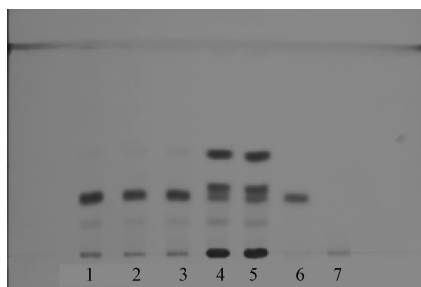


1~3. 清肠栓 4. 青黛 5. 混合对照品 6. 阴性对照品
1-3. Qingchang Suppository 4. *Indigo Naturalis* 5. mixed
reference substance 6. negative reference substance

图 2 青黛 TLC 色谱图

Fig. 2 TLC chromatogram of *Indigo Naturalis*

按照《中国药典》2010 年版一部附录 VI B，吸取上述溶液各 2 μL ，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以三氯甲烷-甲酸乙酯-甲酸（5 : 5 : 1.5）为展开剂展开，取出，晾干，紫外光灯（254 nm）下检视。结果，供试品色谱在与对照药材、对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点，阴性无干扰，见图 3。



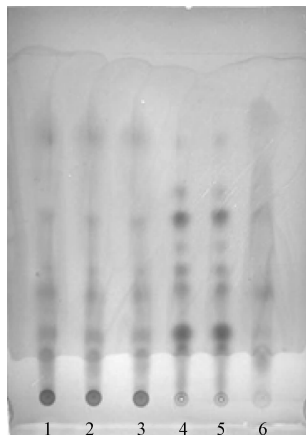
1~3. 清肠栓 4. 五倍子 5. 五倍子对照品 6. 没食子酸对照品
7. 阴性对照品
1-3. Qingchang Suppository 4. *Rhois Chinensis Galla* 5. *Rhois
Chinensis Galla* reference substance 6. gallic acid reference substance
7. negative reference substance

图 3 五倍子 TLC 色谱图

Fig. 3 TLC chromatogram of *Rhois Chinensis Galla*

2.1.4 马齿苋 取清肠栓 4 枚，加水 20 mL，甲酸调节 pH 值至 3~4，冷浸 3 h，滤过，滤液蒸干，残渣加水 5 mL 溶解，作为制剂供试品溶液。取马齿苋 2 g，同法制备药材供试品溶液。另取马齿苋对照 2 g，同法制备对照药材供试品溶液。取除马齿苋外的其他药材，按处方比例及工艺制备不含马齿苋的阴性样品，同法制备阴性对照溶液。

按照《中国药典》2010 年版一部附录 VI B 试验，吸取上述溶液各 1~2 μL ，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以水饱和正丁醇-冰醋酸-水（4 : 1 : 1）为展开剂展开，取出，晾干，喷以 0.2% 茚三酮乙醇溶液，110 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰。结果，供试品色谱在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点，阴性无干扰，见图 4。



1~3. 清肠栓 4. 马齿苋 5. 马齿苋对照品 6. 阴性对照品
1-3. Qingchang Suppository 4. *Portulacae Herba* 5. *Portulacae Herba*
reference substance 6. negative reference substance

图 4 马齿苋 TLC 色谱图

Fig. 4 TLC chromatogram of *Portulacae Herba*

2.2 HPLC 测定

2.2.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱（4.6 mm \times 250 mm，5 μm ）；流动相水（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0~12 min，81% A；12~35 min，81%~70% A；35~50 min，70%~55% A）；检测波长 203 nm；体积流量 1.0 mL/min；柱温 27 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 对照品适量，加甲醇制成 0.403、0.396、0.405 mg/mL 混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取清肠栓 10 枚，粉碎，研匀，精密称取 3.8 g，加水 15 mL，水浴加热熔融，超声（200 W、59 kHz）15 min，收集上清液，残渣用水超声两次，每次 15 mL，合并上清液，正丁醇萃取 3 次，每次 20 mL，回收溶剂，蒸干，甲醇定容至 25 mL，进样前经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.2.4 专属性试验 按清肠栓处方比例及工艺，同法制成不含三七的阴性样品，按“2.2.3”项下方法制备阴性样品溶液，精密吸取混合对照品、供试品及阴性样品溶液各 10 μL ，进样分析。结果，

阴性样品无干扰，HPLC 色谱图见图 5。

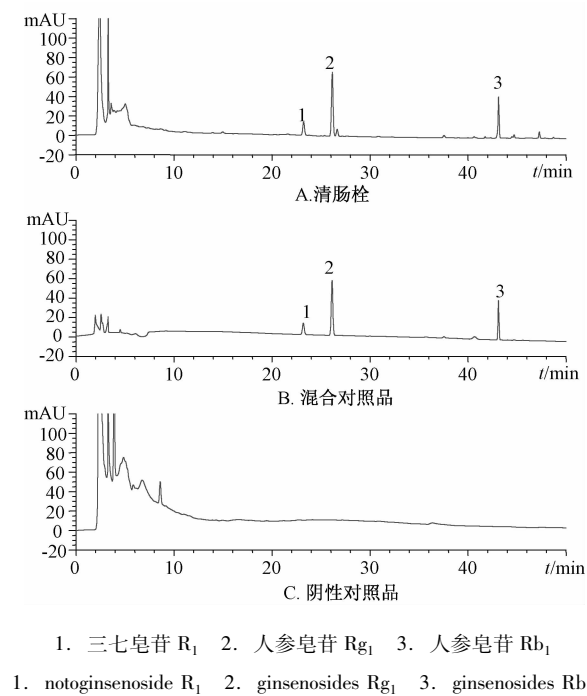


图 5 HPLC 色谱图
Fig. 5 HPLC chromatograms

2.2.5 线性关系考察 精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液 2.5、5、10、15、20 μL，在“2.2.1”项色谱条件下进样。以峰面积（Y）对进样量（μg，X）线性回归，结果见表 1。

表 1 3 种成分的线性关系

成分	回归方程	线性范围/μg	r
三七皂苷 R ₁	$Y = 41.12X - 5.49$	1.007 5 ~ 8.06	0.999 9
人参皂苷 R _{g1}	$Y = 190.38X - 58.68$	0.99 ~ 7.92	0.999 1
人参皂苷 R _{b1}	$Y = 88.54X - 30.73$	1.012 5 ~ 8.1	0.999 1

2.2.6 精密度试验 精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液，重复进样 6 次，测得三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 峰面积 RSD 分别为 0.55%、0.99%、1.18%，表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 取清肠栓两枚（约 3.8 g，批号 20140513），按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，进样分析，测得三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 平均含有量分别为 3.50、3.35、3.26 mg/g，RSD 分别为 1.98%、2.53%、1.80%，表明该方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取清肠栓两枚（约 3.8 g，批号 20140513），按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、4、8、12、48 h 内测定，测得三

七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} RSD 分别为 1.32%、1.04%、1.04%，表明供试品溶液在 48 h 内基本稳定。

2.2.9 加样回收率试验 取含有量已知的清肠栓（批号 20140513）6 份，每份加入混合对照品溶液（三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 的质量浓度分别为 1.372、1.264、1.156 mg/mL），按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，进样分析，结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果（n = 6）
Tab. 2 Results of recovery tests（n = 6）

成分	取样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
三七皂苷 R ₁	1.964 3	6.875 1	6.860 0	13.664 0	98.96	98.84	2.05
	1.987 5	6.956 3	6.860 0	13.772 0	99.35		
	1.912 3	6.693 1	6.860 0	13.341 0	96.91		
	1.954 7	6.841 5	6.860 0	13.476 0	96.71		
	1.938 9	6.786 2	6.860 0	13.565 0	98.82		
	1.999 3	6.997 6	6.860 0	14.013 0	102.3		
人参皂苷 R _{g1}	1.964 3	6.580 4	6.320 0	12.869 0	99.50	99.10	1.95
	1.987 5	6.658 1	6.320 0	12.963 0	99.76		
	1.912 3	6.406 2	6.320 0	12.531 0	96.91		
	1.954 7	6.548 2	6.320 0	12.680 0	97.02		
	1.938 9	6.495 3	6.320 0	12.768 0	99.25		
	1.999 3	6.697 7	6.320 0	13.152 0	102.1		
人参皂苷 R _{b1}	1.964 3	6.403 6	5.780 0	12.022 0	97.20	97.38	2.51
	1.987 5	6.476 3	5.780 0	12.159 0	98.32		
	1.912 3	6.234 1	5.780 0	11.725 0	95.00		
	1.954 7	6.372 3	5.780 0	11.882 0	95.32		
	1.938 9	6.320 8	5.780 0	11.913 0	96.75		
	1.999 3	6.517 7	5.780 0	12.394 0	101.7		

2.2.10 样品含有量测定 取 3 批（20140513、20140516、20140521）样品，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，外标法计算含有量，结果见表 3。

表 3 含有量测定结果（mg/g，n = 3）

批号	三七皂苷 R ₁	人参皂苷 R _{g1}	人参皂苷 R _{b1}
20140513	3.47	3.33	3.25
20140516	3.71	3.56	3.48
20140521	3.98	3.81	3.75
平均值	3.72	3.57	3.49

3 讨论

在三七 TLC 鉴别过程中，以《中国药典》2010 版的展开剂三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水（15：40：22：10）展开，发现斑点模糊，分离度不佳。参考文献 [5-6]，以正丁醇-乙酸乙酯-水（4：1：5）上层溶液、氯仿-甲醇-水（13：7：2）及水饱和正丁醇-冰醋酸-水（4：1：1）为展开条

件，发现水饱和正丁醇-冰醋酸-水（4：1：1）斑点清晰，分离度好，可有效降低边缘效应。

在青黛 TLC 鉴别过程中^[7-9]，发现由于栓剂本身所含基质等影响，在不同展开剂条件下各斑点的分离度均不理想。将其供试品溶液经硅胶柱纯化，去除相关基质与杂质后，再以甲苯-三氯甲烷-丙酮（5：4：0.5）为展开剂展开，发现斑点较清晰，而且分离度较好。

在五倍子 TLC 鉴别过程中^[10-12]，以《中国药典》2010 版的展开剂三氯甲烷-甲酸乙酯-甲酸（5：5：1）展开，发现斑点展开不完全，并伴有一定的拖尾现象。将原展开剂中甲酸的比例提高以增加其极性，以三氯甲烷-甲酸乙酯-甲酸（5：5：1.5）为展开剂展开，发现斑点清晰，分离度较好，而且阴性无干扰。

参考文献 [13-14]，对栓剂制备条件曾采用三氯甲烷洗涤、水洗、正丁醇萃取等方法，但效果均不理想。最终确定处理方法为将清肠栓剪碎，加水，水浴加热熔融，超声，收集上清液，正丁醇萃取，回收溶剂蒸干，定容，这可有效去除栓剂中基质对分析的影响。分析结果显示，样品杂质较少，色谱峰峰型良好。

在 HPLC 分析过程中，分别以水-甲醇（85：15）、0.1% 磷酸溶液-乙腈（75：25）和水-乙腈（81：19）为流动相进行梯度洗脱，发现水-甲醇（85：15）和 0.1% 磷酸溶液-乙腈（75：25）分离效果均不佳，未达到基线分离。最终确定，以水-乙腈（81：19）为流动相，分离效果良好。

参考文献：

[1] 谢建群, 张 涛, 郑 昱, 等. 清肠栓对大鼠溃疡性结肠

炎 caspase-3 影响的研究[J]. 中成药, 2008, 30(3): 340-343.

[2] 杨 坤, 唐志鹏. 溃疡性结肠炎栓剂治疗的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(36): 5648-5652.

[3] 胡鸿毅, 马贵同, 朱凌云, 等. 三七、青黛等对溃疡性结肠炎组织中 Fas/FasL 表达的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2006, 20(4): 64-66.

[4] 胡鸿毅, 马贵同, 朱凌云, 等. 三七、青黛等对溃疡性结肠炎组织中核因子 NF-κB 活性的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2007, 21(5): 44-48.

[5] 岑艳华, 蔡丽云, 陈 华. 活血祛瘀片中三七、大黄的薄层色谱鉴别[J]. 临床医学工程, 2011, 18(6): 915-916.

[6] 李 霄, 万丹丹, 郭洛宏. 薄层色谱对复方丹参片中三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Re 的鉴别[J]. 中成药, 2009, 31(9): 1470-1472.

[7] 谢 贺, 苏健裕, 李 冰, 等. 双料喉风散的薄层色谱分析[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(1): 190-192.

[8] 王 凌, 季 申, 陈逸红. 青黛散质量标准研究[J]. 中成药, 2004, 26(5): 373-376.

[9] 张晓南, 毛云宏, 游 燕, 等. 小儿清咽颗粒中青黛的薄层色谱鉴别研究[J]. 中国民族民间医药, 2015, 24(22): 21-22.

[10] 李煜明, 李韶英, 王 倩. 薄层色谱法鉴别外用紫金锭中的五倍子和千金子[J]. 中国药业, 2009, 18(2): 27.

[11] 周永梅, 王巨存, 冯 鑫, 等. 结肠炎散 I 号的质量标准研究[J]. 中草药, 2008, 39(8): 1176-1178.

[12] 王茂义, 贺浪冲. 降糖灵颗粒质量标准研究[J]. 中成药, 2010, 32(1): 160-162.

[13] 张金阁, 李春慧. HPLC-ELSD 法测前列腺栓中三七总皂苷的含量[J]. 哈尔滨医药, 2011, 31(1): 20-21.

[14] 王桂香, 范晓文, 张春玲, 等. HPLC 法测定化痔栓中人参皂苷 R_{g1}、三七皂苷 R₁ 的含量[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(3): 519-520.