

清肠栓质量标准研究

韩柱¹，崔波¹，陆菁¹，安叡^{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含有量。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1.0075~8.06 μg (r=0.9999)、0.99~7.92 μg (r=0.9991)、1.0125~8.1 μg (r=0.9991)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 1.0075~8.06 μg (r=0.9999), 0.99~7.92 μg (r=0.9991) and 1.0125~8.1 μg (r=0.9991), 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：安叡（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_1 、人参皂苷 Rg_1 及人参皂苷 Rb_1 的含量, 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)。

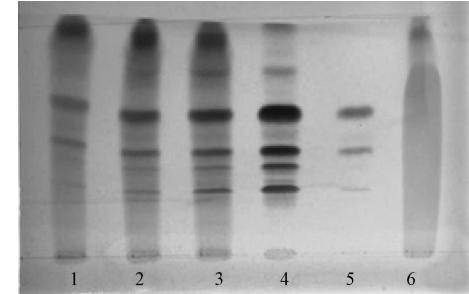
1.2 试药 人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Rg_1 、没食子酸、靛蓝、靛玉红对照品 (批号分别为 110704-201424、110703-201530、110831-201204、110716-201111、110717-200204, 中国食品药品检定研究院); 三七皂苷 R_1 对照品 (批号 B21099, 上海源叶生物科技有限公司)。五倍子、马齿苋对照药材 (批号分别为 121078-201103、121598-201302, 中国食品药品检定研究院); 三七购自上海虹桥中药饮片有限公司; 五倍子、马齿苋、青黛和冰片购自上海康桥中药饮片有限公司, 上述药材均经陈燕军药师鉴定为正品。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, 摆匀, 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 Rg_1 及人参皂苷 Rb_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

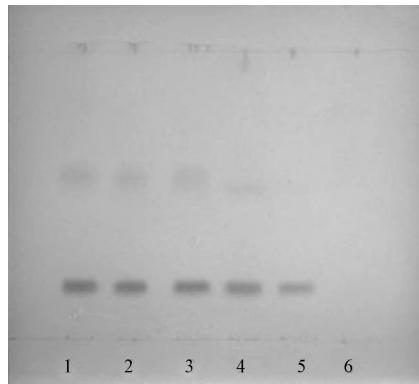
图 1 三七 TLC 色谱图

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。

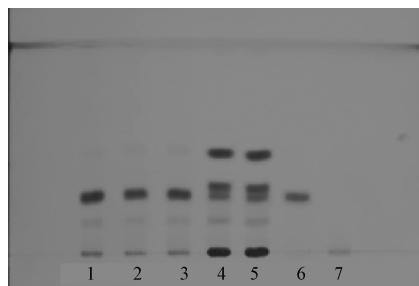


1~3. 清肠栓 4. 青黛 5. 混合对照品 6. 阴性对照品
1~3. Qingchang Suppository 4. *Indigo Naturalis* 5. mixed reference substance 6. negative reference substance

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。



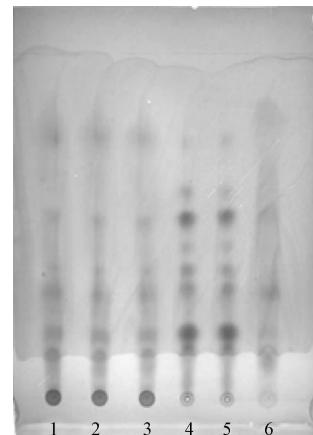
1~3. 清肠栓 4. 五倍子 5. 五倍子对照品 6. 没食子酸对照品
7. 阴性对照品
1-3. Qingchang Suppository 4. *Rhois Chinensis Galla* 5. *Rhois Chinensis Galla* reference substance 6. gallic acid reference substance
7. negative reference substance

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% 苛三酮乙醇溶液, 110 ℃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

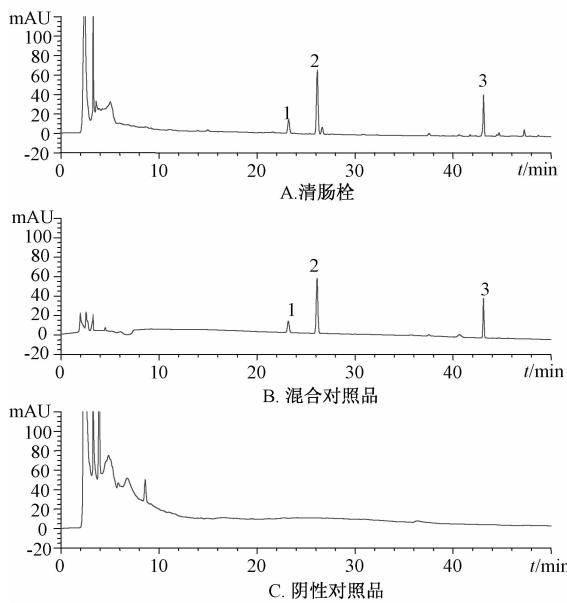
2.2.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~12 min, 81% A; 12~35 min, 81%~70% A; 35~50 min, 70%~55% A); 检测波长203 nm; 体积流量1.0 mL/min; 柱温27 ℃。

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。



1. 三七皂苷 R₁ 2. 人参皂苷 Rg₁ 3. 人参皂苷 Rb₁
1. notoginsenoside R₁ 2. ginsenosides Rg₁ 3. ginsenosides Rb₁

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

Tab. 1 Linear relationships of three constituents

成分	回归方程	线性范围/μg	r
三七皂苷 R ₁	$Y = 41.12X - 5.49$	1.0075 ~ 8.06	0.9999
人参皂苷 Rg ₁	$Y = 190.38X - 58.68$	0.99 ~ 7.92	0.9991
人参皂苷 Rb ₁	$Y = 88.54X - 30.73$	1.0125 ~ 8.1	0.9991

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 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 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 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 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 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 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 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 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/原有量/加入量/测得量/回收率/平均回收 RSD/					
	g	mg	mg	mg	%	%
三七皂苷 R ₁	1.9643	6.8751	6.8600	13.6640	98.96	98.84
	1.9875	6.9563	6.8600	13.7720	99.35	
	1.9123	6.6931	6.8600	13.3410	96.91	
	1.9547	6.8415	6.8600	13.4760	96.71	
	1.9389	6.7862	6.8600	13.5650	98.82	
	1.9993	6.9976	6.8600	14.0130	102.3	
人参皂苷 Rg ₁	1.9643	6.5804	6.3200	12.8690	99.50	99.10
	1.9875	6.6581	6.3200	12.9630	99.76	
	1.9123	6.4062	6.3200	12.5310	96.91	
	1.9547	6.5482	6.3200	12.6800	97.02	
	1.9389	6.4953	6.3200	12.7680	99.25	
	1.9993	6.6977	6.3200	13.1520	102.1	
人参皂苷 Rb ₁	1.9643	6.4036	5.7800	12.0220	97.20	97.38
	1.9875	6.4763	5.7800	12.1590	98.32	
	1.9123	6.2341	5.7800	11.7250	95.00	
	1.9547	6.3723	5.7800	11.8820	95.32	
	1.9389	6.3208	5.7800	11.9130	96.75	
	1.9993	6.5177	5.7800	12.3940	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)

Tab. 3 Results of content determination (mg/g, n=3)

批号	三七皂苷 R ₁	人参皂苷 Rg ₁	人参皂苷 Rb ₁
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.