

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.17.007

丹郁消癖颗粒质量控制方法研究*

蒙麦侠¹, 陈萍¹, 赵治国², 陈志永¹, 杨智峰¹

(1. 陕西省中医药研究院, 陕西 西安 710003; 2. 陕西省西安市碑林区中医医院, 陕西 西安 710002)

摘要:目的 建立丹郁消癖颗粒的质量控制方法。方法 采用薄层色谱法,对丹郁消癖颗粒中益母草、赤芍、青皮、夏枯草、柴胡和皂角刺进行定性鉴别;采用高效液相色谱法,对君药中有效成分丹参素钠进行定量测定。结果 益母草、赤芍、青皮、夏枯草、柴胡和皂角刺薄层色谱斑点清晰,分离度好,阴性无干扰;丹参素钠进样量在0.9~4.5 μg范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 9$),平均加样回收率为97.11%,RSD为2.34%($n=6$)。结论 该方法简单、准确、重复性好,可用于丹郁消癖颗粒大生产中的质量控制。

关键词:丹郁消癖颗粒;质量控制;薄层色谱法;高效液相色谱法;丹参素钠

中图分类号:R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)17-0025-04

Study on Quality Standard of Danyu Xiaopi Granules

Meng Maixia¹, Chen Ping¹, Zhao Zhiguo², Chen Zhiyong¹, Yang Zhifeng¹

(1. Academy of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica of Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi, China 710003; 2. Beilin District Hospital of Traditional Chinese Medicine of Xi'an, Xi'an, Shaanxi, China 710002)

Abstract: Objective To establish the quality standard for Danyu Xiaopi Granules. **Methods** TLC method was used for qualitative determination of *Leonurus japonicus*, *Radix Paeoniae rubra*, *Citri Reticulatae Pericarpium Viride*, *Prunella vulgaris*, *Bupleurum chinense* and *Gleditsiae spina* in Danyu Xiaopi Granules. HPLC method was used for quantitative determination of the effective ingredients sodium danshensu in the monarch herb. **Results** The TLC spots of *Leonurus japonicus*, *Radix Paeoniae rubra*, *Citri Reticulatae Pericarpium Viride*, *Prunella vulgaris*, *Bupleurum chinense* and *Gleditsiae spina* were clear with good separation, the negative controlled substance did not show interference. The linear ranges of sodium danshensu were 0.9–4.5 μg ($r=0.999\ 9$), the average recovery rate was 97.11%, RSD was 2.34% ($n=6$). **Conclusion** The method is simple, reliable and reproducible, which can be used for the quality control of mass production of Danyu Xiaopi Granules.

Key words: Danyu Xiaopi Granules; quality standard; TLC; HPLC; sodium danshensu

丹郁消癖颗粒处方来源于陕西省碑林区中医医院乳腺重点专科,为临床治疗乳腺增生病的经验方,由丹参、益母草、青皮、皂角刺、赤芍、当归、川楝子、柴胡和夏枯草组方,全方发挥疏肝理气、活血化瘀及软坚散结的作用,对肝郁气滞、痰瘀互结型乳腺增生有良好疗效。该药一直以汤剂形式应用,汤剂为传统剂型,具有不易保存、携带不便、服用量大等不足,考虑乳腺增生病用药周期长的特点,为提高患者用药依从性,陕西省碑林区中医医院联合陕西省中医药研究院将其研究开发为颗粒剂。方中丹参为君药,益母草、赤芍、当归为臣药,青皮、皂角刺、夏枯草、川楝子为佐药,柴胡为使药。本研究中建立了益母草、赤芍、青皮、夏枯草、柴胡和皂角刺的薄层色谱鉴别方法,以及有效成分丹参素钠的含量测定方法,并确定含量限度,从而为丹郁消癖颗粒的质量控制提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-2010A HT型高效液相色谱仪(日本岛津公司);UV-VI A型透射反射仪(北京智源通生物技术研究);KQ5200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪

器有限公司);BT 25S型电子分析天平($d=0.01\text{ mg}$,赛多利斯科学仪器北京有限公司)。

1.2 试药

丹参素钠对照品(批号为110855-201412),对照药材柴胡(批号为120992-201108)、青皮(批号为121155-200502)、赤芍(批号为121093-201303)、益母草(批号为0912-9905)、夏枯草(批号为120993-201105)、皂角刺(批号为1121210-201003),均来源于中国药品生物制品检定所;丹郁消癖颗粒样品(规格为每袋15 g,批号分别为170810,170815,170820),由西安市碑林区中医医院提供;甲醇为色谱纯,水为超纯水,无水乙醇、正丁醇和乙酸乙酯等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 溶液制备

供试品溶液:取本品内容物3份,每份10 g。第1份加50 mL无水乙醇,超声提取30 min,滤过,滤液水浴浓缩至2 mL,作为益母草、赤芍、青皮和夏枯草的供试品溶液^[1158];第2份加50 mL蒸馏水,加热使溶解,用水饱和正丁醇萃取2次,每次25 mL,合并萃取液,加

*基金项目:陕西省社会发展科技攻关项目[2016SF-392]。

第一作者:蒙麦侠,女,硕士研究生,副研究员,研究方向为中药制剂分析,(电子信箱)mengmaixia@163.com。

等体积氨试液,摇匀,放置,分取上层液,水浴蒸干,残渣加2 mL 甲醇使溶解,作为柴胡的供试品溶液;第3份加50 mL 甲醇,超声提取30 min,滤过,滤液水浴蒸干,残渣加20 mL 水使溶解,用乙酸乙酯萃取3次,每次20 mL,合并萃取液,蒸干,残渣加20 mL 甲醇使溶解,作为皂角刺的供试品溶液。

阴性对照品溶液:按组方比例,分别去除益母草、赤芍、青皮、夏枯草和柴胡后的原处方药材,按样品制备工艺,制成缺少上述5种药材的阴性样品;去除皂角刺和川楝子后,制成缺皂角刺和川楝子的双阴性样品。取缺益母草、赤芍、青皮、夏枯草和柴胡的阴性样品,缺皂角刺和川楝子双阴性样品各10 g,按供试品溶液制备方法处理,制成上述相应阴性对照品溶液。

对照药材溶液:取益母草对照药材1 g,赤芍对照药材0.5 g,青皮对照药材0.3 g,夏枯草对照药材2.5 g,按供试品溶液制备方法处理,分别制成上述4种对照药材溶液;取柴胡对照药材0.5 g,加20 mL 甲醇,回流提取30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加20 mL 水使溶解,用水饱和正丁醇萃取2次,下同柴胡供试品溶液制备方法处理,制成柴胡对照药材溶液;取皂角刺对照药材1 g,加50 mL 水,加热回流2 h,滤过,滤液加乙酸乙酯萃取3次,每次15 mL,合并萃取液,蒸干,残渣加2 mL 甲醇使溶解,制成皂角刺对照药材溶液。

2.1.2 方法与结果

益母草:按2015年版《中国药典(四部)》0502 薄层色谱法进行鉴别。吸取2.1.1项下益母草供试品溶液、对照药材溶液和阴性对照品溶液各5 μ L,依次点于同一硅胶G薄层板上,以无水乙醇-丙酮-盐酸(6:10:1)为展开剂,上行展开,取出晾干,在105 $^{\circ}$ C加热15 min后,放至室温,喷以三氯化铁试液与稀碘化铋钾试液(1:10)的混合溶液至色谱斑点显色清晰。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上有相同橙色斑点出现,阴性无干扰。色谱图见图1 A。

赤芍:按2015年版《中国药典(四部)》0502 薄层色谱法进行鉴别。吸取2.1.1项下赤芍供试品溶液、对照药材溶液和阴性对照品溶液各2~4 μ L,依次点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:15:0.2)为展开剂,上行展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸乙醇溶液(需临用现配),75 $^{\circ}$ C加热至色谱斑点显色清晰^[1290]。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同的蓝色斑点,阴性无干扰。色谱图见图1 B。

青皮:按2015年版《中国药典(四部)》0502 薄层色谱法进行鉴别。吸取2.1.1项下青皮供试品溶液、对照药材溶液和阴性对照品溶液各3 μ L,依次点于同一硅

胶G薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲醇(9:4:1)为展开剂,上行展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,置紫外光灯(365 nm)下检视^[2-31]。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色斑点,阴性无干扰。色谱图见图1 C。

夏枯草:按2015年版《中国药典(四部)》0502 薄层色谱法进行鉴别。吸取2.1.1项下夏枯草供试品溶液、对照药材溶液和阴性对照品溶液各5 μ L,依次点于同一硅胶G薄层板上,以正己烷-乙酸乙酯-甲酸(15:1.5:0.5)为展开剂,上行展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视^[4-61]。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色荧光斑点,阴性无干扰。色谱图见图1 D。

柴胡:按2015年版《中国药典(四部)》0502 薄层色谱法进行鉴别。吸取2.1.1项下柴胡供试品溶液、对照药材溶液和阴性对照品溶液各2~3 μ L,依次点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(30:10:1)为展开剂,上行展开,取出,晾干,喷以2%对二甲氨基苯甲醛的40%硫酸溶液,60 $^{\circ}$ C加热至色谱斑点显色清晰,置紫外光灯(365 nm)下检视^[7-91]。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同黄色荧光斑点,且久置后荧光更加明显,阴性无干扰。色谱图见图1 E。

皂角刺:按2015年版《中国药典(四部)》0502 薄层色谱法进行鉴别。吸取2.1.1项下皂角刺供试品溶液、对照药材溶液和缺皂角刺和川楝子的双阴性对照品溶液各5 μ L,依次点于同一硅胶G薄层板上,以甲醇-三氯甲烷-浓氨试液(1:9:0.2)为展开剂,上行展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视^[101]。供试品溶液在与对照药材溶液相应位置上有相同亮蓝色荧光斑点,阴性无干扰。色谱图见图1 F。

2.2 含量测定^[11-131]

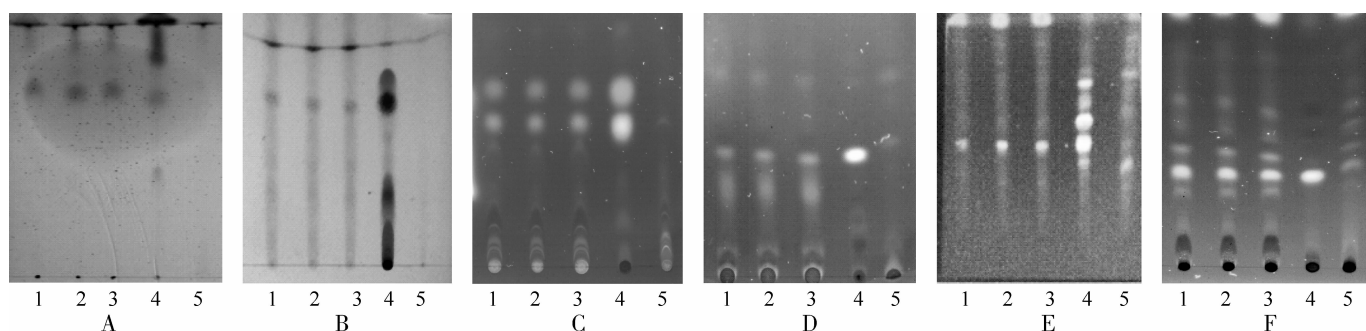
2.2.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱:Inertsil ODS-3柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-0.5%冰醋酸溶液(7:93);检测波长:280 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:35 $^{\circ}$ C。理论板数按丹参素钠峰计不低于3 000。

2.2.2 溶液制备

对照品溶液:取丹参素钠对照品适量,精密称定,置10 mL容量瓶中,加甲醇使溶解并定容至刻度,制成每1 mL含0.375 mg的贮备液;取贮备液6 mL,置10 mL容量瓶中,加甲醇定容至刻度,制成1 mL含0.225 mg的对照品溶液。

供试品溶液:取本品内容物2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入25 mL 甲醇,称定质量,加热回流



1-3. 供试品溶液 4. 对照药材溶液 5. 阴性对照品溶液
A. 益母草 B. 赤芍 C. 青皮 D. 夏枯草 E. 柴胡 F. 皂角刺

图1 薄层色谱图

30 min, 放至室温, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 滤过, 取续滤液, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 即得。

阴性对照品溶液: 按组方比例, 去除丹参后的原处方药材, 按样品制备工艺制得缺丹参的阴性样品; 取阴性样品 2 g, 按供试品溶液制备方法处理, 即得缺丹参阴性对照品溶液。

2.2.3 提取完全性试验

取同一批(批号为 170810)样品内容物 5 份, 每份约 2 g, 精密称定, 置磨口锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 第 1~4 份依次超声提取 10, 20, 30, 40 min, 第 5 份回流提取 30 min, 分别提取后, 放至室温, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 滤过, 取续滤液用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 得供试品溶液, 按拟订色谱条件测定丹参素钠含量。结果回流提取 30 min, 丹参素钠提取率最高, 故确定提取方式为回流提取 30 min。结果见表 1。

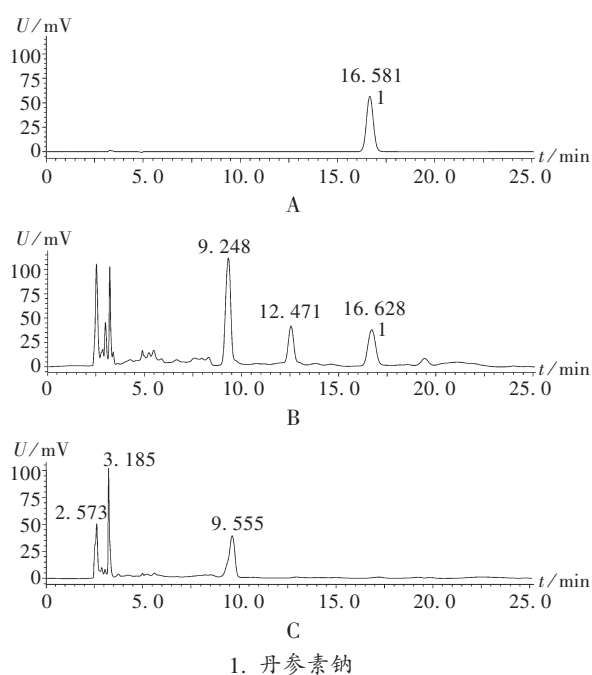
表1 提取完全性试验结果

项目	超声提取				回流提取
	10 min	20 min	30 min	40 min	30 min
取样量(g)	2.082 6	2.031 2	2.010 8	2.021 4	2.052 6
峰面积	500 364	610 838	719 426	852 788	1123 105
丹参素钠含量(mg/g)	0.99	1.21	1.42	1.68	2.22

2.2.4 方法学考察

专属性试验: 分别精密吸取 2.2.2 项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各 $10 \mu\text{L}$, 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图。供试品溶液色谱中, 丹参素钠色谱峰与其他相邻峰均能达到基线分离; 阴性对照品溶液色谱图中, 丹参素钠色谱峰保留位置无干扰峰出现。结果见图 2。

线性关系考察: 分别精密吸取 2.2.2 项下质量浓度为 0.225 g/L 的对照品溶液 4, 6, 8, 10, 15, $20 \mu\text{L}$, 注入高效液相色谱仪, 按拟订色谱条件测定峰面积, 以丹参素钠含量 (X) 与其峰面积 (Y) 进行线性回归, 得丹参素钠回归方程 $Y = 611\,919X + 44\,903$, $r = 0.999\,9$ ($n = 6$)。



1. 丹参素钠
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液
图2 高效液相色谱图

结果表明, 丹参素钠进样量在 $0.9 \sim 4.5 \mu\text{g}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 精密吸取 2.2.2 项下对照品溶液和供试品溶液各 $10 \mu\text{L}$, 连续进样 6 次, 按拟订色谱条件测定峰面积。结果的 RSD 分别为 1.80% 和 1.50% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 精密吸取 2.2.2 项下同一供试品溶液 $10 \mu\text{L}$, 注入液相色谱仪, 按拟订色谱条件测定峰面积, 每隔 2 h 测定 1 次, 共测定 6 次, 考察 12 h 内峰面积变化。结果的 RSD 为 2.10% ($n = 6$), 表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

重复性试验: 取同一批(批号为 170810)样品内容物 6 份, 每份约 2 g, 精密称定, 按 2.2.2 项下方法处理样品, 得 6 份供试品溶液, 按拟订色谱条件测定丹参素钠含量。结果的 RSD 为 1.94% ($n = 6$), 表明方法重复性好。

加样回收试验:取同一批(批号为170810)已知含量的样品约1 g,共6份,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别加入质量浓度为0.180 2 g/L的丹参素钠对照品溶液10 mL,再精密加入甲醇15 mL,称定质量,加热回流30 min,放至室温,用甲醇补足减失的质量,滤过,取续滤液,用0.45 μm的微孔滤膜滤过,得供试品溶液,按拟订色谱条件测定丹参素钠含量。结果见表2。

表2 丹参素钠加样回收试验结果(n=6)

取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
1.009 6	2.214 8	1.802	3.914 8	94.34	97.11	2.34
1.000 2	2.215 1	1.802	3.995 1	98.78		
1.004 6	2.217 0	1.802	4.007 0	99.33		
1.005 7	2.218 3	1.802	3.998 3	98.78		
1.002 1	2.208 0	1.802	3.908 0	94.34		
1.000 1	2.215 0	1.802	3.965 0	97.11		

2.2.5 样品含量测定

分别取3批样品生产中所用丹参原药材、中间品和成品各2 g,精密称定,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定,计算丹参素钠含量,得成品中丹参素钠平均转移率为205.8%,平均含量为2.11 mg/g。详见表3。

表3 3批样品丹参素钠含量测定结果

批号	原药材 (mg/g)	中间品 (mg/g)	转移率 (%)	成品(mg/g)	
				含量	平均含量
170810	2.99	2.12	205.62	2.11	2.11
170815	3.01	2.15	207.15	2.13	
170820	2.93	2.10	204.89	2.08	

3 讨论

在薄层鉴别研究中,益母草所用显色剂需临用现配,且在配置过程中碱式硝酸铋难溶于冰醋酸,需放置24 h后方可全部溶解;青皮鉴别时,先采用药典方法,展开耗时长,且效果不理想,后建立了用对照药材,以甲苯-乙酸乙酯-甲醇(9:4:1)为展开剂,10%的硫酸乙醇溶液显色,在紫外光灯(365 nm)下检视,效果较理想;皂角刺鉴别时,缺皂角刺的阴性样品对检出有干扰,为了排除干扰,对方中柴胡、川楝子、丹参等其余药材按皂角刺对照药材处理方法处理并进行薄层展开,结果川楝子对皂角刺检出有干扰,经制备川楝子和皂角刺双阴性样品后,再行薄层展开,无干扰;皂角刺消肿托毒、川楝子行气止痛,两者同时用在治疗乳腺增生的处方中概率较大,上述研究为其他相关药物标准制订提供了借鉴。

丹参为丹郁消癥颗粒处方君药,味苦,性微寒,归心、肝经,具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦之功;丹参

所含丹参素钠具有扩张冠状动脉,抗血小板凝集、动脉粥样硬化、血栓形成,促进血管新生等作用^[14],对于改善乳腺增生瘀血症状发挥重要疗效,本研究中选择丹参素钠作为丹郁消癥颗粒的定量指标,对其质量控制具有重要意义。在测定丹参素钠含量时选用了Agela和Inertsil ODS-3两种型号色谱柱,后者峰形和分离效果较好,故选用ODS-3色谱柱。

由含量测定结果可见,丹参素钠提取转移率增高,可能是提取过程中益母草或其他药材生物碱成分的存在使其溶解度增加,或加工过程中煎煮浓缩高温环境使丹参中酚酸类成分受热分解所致。

本研究中建立了益母草、赤芍、青皮、皂角刺、夏枯草和柴胡的薄层色谱鉴别方法,建立了君药丹参中丹参素钠的含量测定方法,并考虑到药材的产地、批次之间的差异性,确定丹参素钠含量限度为丹郁消癥颗粒含丹参以丹参素钠计不低于1.60 mg/g。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [2] 王建伟, 王伟影. 青皮质量标准研究[J]. 海峡药学, 2013, 25(7): 123-124.
- [3] 曾海松, 俞洁东, 绍秋红. 青乳消癥颗粒的质量标准研究[J]. 中国当代医药, 2016, 23(27): 122-125.
- [4] 李俊, 王冬, 张丽梅, 等. 复方黄槐片质量标准的提高[J]. 中国药师, 2017, 20(12): 2251-2254.
- [5] 陈方, 王益杰, 李歆, 等. 三草安神胶囊的质量标准[J]. 中国药师, 2017, 20(12): 2255-2257.
- [6] 徐锐, 张雪绒, 郭巧生, 等. 9个产地夏枯草主要化学成分的比较分析[J]. 成都医学院学报, 2017, 12(5): 551-554.
- [7] 崔雅慧, 孙雅娜, 郑艳春. 不同品种柴胡的化学成分分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(6): 655-657.
- [8] 魏凤环, 陈敏婷, 沈群, 等. 护肝抗原胶囊质量标准研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(1): 71-74.
- [9] 孙冬梅, 陈秋谷, 李养学, 等. 清热疏肝颗粒的质量标准研究[J]. 广东药学院学报, 2016, 32(5): 601-605.
- [10] 覃华亮, 韦怡. 皂角刺研究进展及临床应用[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(17): 54-56.
- [11] 凌雪宇, 刘文亮, 郑玥, 等. HPLC法测定参附丹强心颗粒中丹参素钠质量浓度[J]. 哈尔滨商业大学学报, 2014, 30(5): 536-538.
- [12] 周轶, 袁强华, 陈俊龙. 利咽舒喉颗粒质量标准研究[J]. 成都中医药大学学报, 2013, 36(2): 27-31.
- [13] 芦志伟, 李美珍, 卢欣, 等. HPLC法测定参花通脉胶囊中丹参素钠的含量[J]. 天津医科大学学报, 2012, 2(18): 260-262.
- [14] 李骅, 王四旺, 张邦乐, 等. 丹参素的药理活性与药物动力学研究进展[J]. 西北药学杂志, 2011, 26(4): 310-312.

(收稿日期: 2018-05-10)